

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

**Vergleich der Stimulation und therapeutischen
Inhibition des Epidermal Growth Faktor-Rezeptors
(EGFR) im 2D- und 3D-Kulturmodell bei Karzinomen im
Kopf-Hals-Bereich**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Barbara Anita Holzinger
aus Cham
2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Philipp Baumeister
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Dr. med. dent. Wenko Smolka Prof. Dr. med. Irmela Jeremias
Betreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Christian Jacobi
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	26.03.2021

*Meinen Eltern,
die das alles möglich gemacht haben*

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 Malignome im Kopf-Hals-Bereich	10
1.1.1 Epidemiologie	10
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	11
1.1.3 Therapie	15
1.2 Der <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF)-Rezeptor	16
1.2.1 Geschichte	16
1.2.2 Einteilung und Aufbau der EGF-Rezeptor-Familie	17
1.2.3 Vorkommen	19
1.2.4 Aktivierung des EGF-Rezeptors	20
1.2.5 Signaltransduktion und Funktion des aktivierten EGFR	24
1.2.6 Inaktivierung des EGFR-Signals	29
1.2.7 Karzinogenese und Rolle des EGF-Rezeptors	30
1.3 Liganden des EGF-Rezeptors	35
1.3.1 Allgemein	36
1.3.2 <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF)	38
1.3.3 <i>Transforming Growth Factor alpha</i> (TGF α)	39
1.3.4 Epiregulin (EREG)	41
1.3.5 Amphiregulin (AREG)	42
1.4 Inhibitoren des EGF-Rezeptors	44
1.4.1 Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)	45
1.4.2 Antikörper	46
1.5 Zielsetzung der Arbeit	51
2. Material und Methoden	53
2.1 Zelllinien	53
2.1.1 PiCa	53
2.1.2 FaDu	53

	Inhalt	
2.2	Materialien	54
2.2.1	Kultivierungsmedien, Liganden, Enzyme und Chemikalien	54
2.2.2	Verbrauchsmaterialien und Test-Kits	55
2.2.3	Geräte und Zubehör	56
2.3	Methoden	57
2.3.1	Studienübersicht	57
2.3.2	Zellkultur	58
2.3.3	Nachweis der Konzentration von EGFR-Liganden in den Kulturüberständen: ELISA-Test	59
2.3.4	Nachweis der Vitalität: WST-8 Test	63
2.4	Statistische Testverfahren und graphische Darstellung	71
3.	Ergebnisse	71
3.1	Konzentrationen der vier EGFR-Liganden (ELISA)	71
3.1.1	Konzentration von EGF in den Kulturüberständen	71
3.1.2	Konzentration von TGF α , EREG und AREG in den Kulturüberständen	72
3.2	Vitalität der Zellen nach TGF α -Gabe und Behandlung mit Cetuximab	84
3.2.1	Vitalität im 2D-Tumormodell (WST-8)	84
3.2.2	Vitalität im 3D-Tumormodell (WST-8)	90
3.2.3	Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Kulturmodell	96
4.	Diskussion	100
4.1	Diskussion der Methodik	100
4.2	Diskussion der Ergebnisse	101
4.2.1	Endogene Produktion der vier Liganden	101
4.2.2	Wirkung des Liganden TGF α , des monoklonalen Antikörpers Cetuximab und deren Kombination auf die Vitalität der Zellen	110
4.2.3	Zelllinie: Pica versus FaDu für den Liganden TGF α	117
4.2.4	Kulturmodell: 2D versus 3D für den Liganden TGF α	118
4.3	Schlussfolgerung	120
4.3.1	Mögliche Ursachen der Resistenz	120
4.3.2	Individuelle Betrachtung einzelner Entitäten	125

Inhalt

5. Zusammenfassung	126
6. Anhang	128
6.1 Literaturverzeichnis	128
6.2 Tabellenverzeichnis	179
6.3 Abbildungsverzeichnis	181
Danksagung	184
Eidesstattliche Versicherung	185

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
ADCC	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
AHR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
Akt	Proteinkinase B, PKB
AREG	Amphiregulin
bzw.	beziehungsweise
CAF	<i>Cancer-Associated Fibroblasts</i>
CDC	<i>Complement Dependent Cytotoxicity</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRC	Kolorektales Karzinom
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal Transition</i>
EpCam	<i>Epithelial Cell adhesion molecule</i>
ErbB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homologue</i>
EREG	Ephiregulin
Erk	<i>Extracellular signal-regulated Kinase</i>
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FCS	Fetales Kälber Serum

Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm
GAPs	<i>GTPase Activating Protein</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein2</i>
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF</i>
HER	<i>Human Epidermal growth factor Receptor</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HPV	Humanes Papillom Virus
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IgG1	Immunglobulin G1
IgG2	Immunglobulin G2
IP3	Inosit-(1,4,5) -Triphosphat
IQR	Interquartilsabstand
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
MAb	<i>Monoclonal Antibody</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
Mek	<i>MAPK/Erk Kinase1</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mTorC2	<i>mammalian Target of rapamycin complex 2</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NRG	Neureguline
NSCLC	<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
PBS	<i>Phospat Buffered Saline</i>
pg	Pikogramm
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
pM	Pikomolar
PH-	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphatidylinosit-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinosit-4,5-Phosphat
PIP ₃	Phosphatidylinosit-3,4,5-triphosphat

PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C gamma
PTB-	<i>Phosphotyrosine Binding</i>
PTEN	<i>Phosphatase Protein Homologue to Tensin</i>
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
SH2-	<i>Src homology 2</i>
Shc	<i>Src homology domain-containing protein C</i>
Sos	<i>Son of sevenless</i>
Src	<i>Sarcoma kinase</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TACE	<i>Tumor necrosis factor-α converting Enzyme</i>
TGF α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TMB	Tetramethylbenzidine
TP53	Tumorsuppressor p53
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
V _H	Schwere Kette
V _L	Leichte Kette
WST-8	<i>Water-Soluble Tetrazolium-8</i>

1. Einleitung

1.1 Malignome im Kopf-Hals-Bereich

Malignome des Kopf-Hals-Bereiches stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren verschiedener Lokalisationen und histologischen Tumorsubtypen dar. Die überwiegende Mehrheit der im Kopf-Hals-Bereich lokalisierten Malignome sind, mit mehr als 90 %, die Plattenepithelkarzinome [Pai *et al.* 2009, Rogers *et al.* 2005]. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) entwickeln sich aus den Zellen des Plattenepithels im oberen Aerodigestivtrakt, einschließlich der Mundhöhle, des Oro-, des Naso-, des Hypopharynx und des Larynx [Ferlay *et al.* 2015, White *et al.* 2007]. Bei Malignomen epithelialen Ursprungs kann zwischen dem verhornenden und dem nicht verhornenden Typ unterschieden werden [Marur *et al.* 2008]. Zu den seltenen Differenzierungsmustern innerhalb der Gruppe der Plattenepithelkarzinome gehören die verrukösen (1 - 2 %), sarkomatoiden (0,3 - 1,3 %), lymphoepithelialen und basaloiden (1 - 2 %) Plattenepithelkarzinome [Erisen *et al.* 2004, Ihrler 2009]. Von diesen abzugrenzen sind seltenere maligne Tumorentitäten wie die Adenokarzinome, die neuroendokrinen Karzinome, die Sarkome und die malignen Lymphome [Ihrler 2009]. Als präkanzeröse Läsionen gelten Leukoplakien und Erythroplakien [Hittelman *et al.* 1993, Martin *et al.* 1999]. Die Transformationsrate dieser Läsionen von einer Dysplasie zu einem Karzinom ist mit nahezu 36,4 % hoch [Silverman *et al.* 1996].

1.1.1 Epidemiologie

Das HNSCC ist weltweit die sechsthäufigste Tumorerkrankung des Menschen und belegte hinsichtlich der zum Tode führenden Tumorleiden im Jahr 2000 den achten Platz [Hunter *et al.* 2005, Ragin *et al.* 2007a]. In Europa erkranken jährlich rund 140.000 Patienten neu an Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich und es kommt zu 60.000 Todesfällen infolge der Erkrankung. Weltweit erhalten mehr als 500.000 Personen pro Jahr die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches [Ferlay *et al.* 2015, Kim *et al.* 2004] mit 325.000 Todesfällen [Ferlay *et al.* 2015]. Das mediane Erkrankungsalter bei Diagnosestellung liegt bei 63 Jahren [Blot *et al.* 1988, Forastiere *et al.* 2001], mit einem Verhältnis von Mann zu Frau von 2:1 [Ferlay *et al.* 2015, Forastiere *et al.* 2001, Torre *et al.* 2015]. Die höhere Inzidenz beim männlichen Geschlecht erklärt sich derzeit noch vor allem durch den häufigeren Tabak- und Alkoholkonsum der männlichen Patienten [Pires *et al.* 2013] (siehe 1.1.2).

Trotz weitreichender Fortschritte im Verständnis des Verlaufs und der Therapie der Erkrankung stieg die 5-Jahres-Überlebensrate innerhalb der letzten 40 Jahre nur auf knapp 50 % [Kim *et al.* 2004]. Die Prognose des Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches ist gut, sofern es früh genug erkannt wird. Allerdings sind frühe Tumorstadien nur wenig symptomatisch. Infolge dessen verzögert sich in vielen Fällen die Diagnosestellung und die anschließende Therapie [Califano *et al.* 1996].

Trotz kombinierter Therapiemöglichkeiten aus Chirurgie und Radiatio/Chemoradiatio zeigen Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung nach anfänglich erfolgreicher chirurgischer Therapie lokale oder regionale Rezidive in 50 - 60 % mit damit einhergehender schlechter Prognose [Schwartz *et al.* 2000, Xi *et al.* 2003]. Ebenso treten Fernmetastasen bei circa 20 % der Erkrankten auf sowie Sekundärtumore [Reuter *et al.* 2007]. Die mittlere Überlebensdauer bei Tumorrezidiv oder nach Auftreten von Fernmetastasen liegt bei sechs bis neun Monaten, welche in den letzten drei Dekaden nicht signifikant verbessert werden konnte [Reuter *et al.* 2007].

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Entwicklung von Malignomen im Kopf-Hals-Bereich unterliegt einem multifaktoriellen Geschehen. Sowohl die Exposition gegenüber Karzinogenen als auch Ernährung, (Mund-)Hygiene, Infektionserreger, Familienanamnese und individuelle körperliche Verfassung spielen eine individuelle und auch eine kombinierte Rolle in der Entstehung eines HNSCC [Pai *et al.* 2009]. In der Vergangenheit konnten einige Risikofaktoren identifiziert werden.

Alkohol und Tabak

Der größte Risikofaktor für die Entstehung eines Oropharynxkarzinoms ist in 80 % der Fälle der Konsum von Alkohol und Tabak [Blot *et al.* 1988, Rodriguez *et al.* 2004]. Dabei spielt die Feldkanzerisierung eine entscheidende Rolle. Der einwirkende Noxenabusus induziert auf zellulärer und subzellulärer Ebene mutagene Veränderungen, die eine maligne Transformation präneoplastischer Areale zur Folge haben. Dadurch lassen sich syn- oder metachrone Zweitkarzinome sowie Rezidive erklären [Braakhuis *et al.* 2003, Slaughter *et al.* 1953].

Der alleinige Alkoholkonsum hat einen moderaten Einfluss auf die Tumorgenese im Vergleich mit dem alleinigen Tabakgenuss [Castellsague *et al.* 2004, Spitz *et al.* 1988]. Personen mit starkem Alkoholkonsum (> 90 g/Tag) haben ein fünffach erhöhtes Risiko an einem Karzinom im Kopf-Hals-Bereich zu erkranken [Rodriguez *et al.* 2004]. Ethanol wirkt auf die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakts sowohl als Beschleuniger, als auch als möglicher Initiator [Hecht 2003, Lubin *et al.* 2009]: bei der Alkoholoxidation entsteht über

Einleitung

die Alkoholdehydrogenase der erste Metabolit Acetaldehyd, welcher kanzerogene, mutagene und toxische Wirkung auf die Oropharynxschleimhaut hat [Castellsague *et al.* 2004, Lubin *et al.* 2009, Seitz *et al.* 2010]. Alkohol dient zudem als chemisches Lösungsmittel für andere Karzinogene, die dadurch besser in die Mucosazellen eindringen können [Castellsague *et al.* 2004, Hecht 2003, Lubin *et al.* 2009, Maier *et al.* 1988]. Durch die Induktion von Cytochrom P 450-Enzymen werden schädigende Stoffe, wie z. B. Tabakkarzinogene metabolisch aktiviert und erhalten oder verstärken ihre kanzerogene Wirkung [Lubin *et al.* 2009, Seitz *et al.* 2009].

Tabak gilt als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Malignoms des oberen Aerodigestivtraktes. Hierzu gehören Tabakrauchen (Zigarette, Zigarre und Pfeife) sowie Schnupf- und Kautabak, wobei inhalatives Rauchen gefährlicher ist als rauchfreier Tabakkonsum [Hecht 2003]. So haben Personen mit stark (> 20 Zigaretten pro Tag) inhalativem Tabakkonsum ein zwanzigfach höheres Risiko an einem Malignom des Oropharynx zu erkranken [Rodriguez *et al.* 2004]. Tabak ist weltweit ein stark verbreitetes Suchtmittel: in Entwicklungsländern nimmt die Anzahl an Rauchern jährlich um etwa 2 % zu [Martin *et al.* 1999] und in Süd- und Ost-Europa kommt es zu einer steigenden Prävalenz [Gillison *et al.* 2015]. Der eindeutige Zusammenhang zwischen Tabakprodukten und Karzinomen im Allgemeinen resultiert aus einer starken Allianz der Faktoren Nikotin und Karzinogenen, wobei Nikotin abhängig machend und giftig ist, jedoch nicht karzinogen [Hecht 2003]. Durch 69 kanzerogene Inhaltsstoffe, darunter verschiedene polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe [1986, Humans 2010], Nitrosamine und aromatische Amine ist Tabakrauch genotoxisch [Hecht 2003]. Das Risiko für ein tabakassoziiertes Karzinom steigt mit Intensität (Zigaretten pro Tag), als auch mit Dauer des Konsums [1986, Hecht 2003, Pai *et al.* 2009].

Durch einen gemeinsamen Konsum beider genannter Genussmittel addieren sich die Einzelrisiken nicht einfach auf, sondern stehen vielmehr in einem multiplikativen Verhältnis zueinander [Blot *et al.* 1988, Castellsague *et al.* 2004, Hashibe *et al.* 2009]. Personen mit kombiniertem Tabak- und Alkoholkonsum haben ein 48-fach höheres Risiko gegenüber Nichtrauchern an einem oropharyngealen Karzinom zu erkranken [Rodriguez *et al.* 2004].

Arbeits- und Umweltstoffe

Als weitere Kanzerogene konnten in der Vergangenheit einige Arbeits- und Umweltstoffe wie zum Beispiel Asbest oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe identifiziert werden [Gustavsson *et al.* 1998, Purdue *et al.* 2006]. Insbesondere Personen, die bei ihrer Arbeit häufig einer Vielzahl anorganischer und organischer chemischer Substanzen [Maier *et al.* 1997] sowie verschiedener Arten von Staub ausgesetzt sind [Purdue *et al.* 2006],

haben ein höheres Risiko an einem Karzinom im Kopf-Hals-Bereich zu erkranken. Das Zusammenspiel aus individuellen berufsfernen (z. B. Tabakrauch) und beruflichen (z. B. Zementstaub) Risikofaktoren, hat ebenfalls einen synergistischen Effekt auf das Karzinomrisiko [Maier *et al.* 1999, Purdue *et al.* 2006, Sturgis *et al.* 2005].

Virale Infektionen

Das onkogene Humane Papillom-Virus (HPV), insbesondere Typ 16, kann als ursächlicher Erreger in bis zu 70 % der oropharyngealen Karzinome nachgewiesen werden [D'Souza *et al.* 2007, Gillison *et al.* 2000, Kreimer *et al.* 2005]. In den vergangenen Jahren veränderte sich die Meinung über den Zusammenhang von HPV und HNSCC von einer starken Assoziation hin zu einem offensichtlich kausalen Zusammenhang - zumindest für einen Teilbereich der Kopf-Hals-Karzinome [Gillison *et al.* 2015, Gillison *et al.* 2000, Gillison *et al.* 1999, Herrero *et al.* 2003, Kreimer *et al.* 2005]. Die HPV-Prävalenz unterscheidet sich nicht zwischen Europa, Nordamerika und Südamerika, Asien und Afrika [Herrero *et al.* 2003]. Das HP-Virus gilt als unabhängiger Risikofaktor für Kopf-Hals-Karzinome [D'Souza *et al.* 2007, Gooi *et al.* 2016, Herrero *et al.* 2003, Mork *et al.* 2001, White *et al.* 2007]. Das HPV-assoziierte Oropharynxkarzinom kann aus einer oropharyngealen HPV-Infektion mit Hochrisiko-Subtypen entstehen und scheint mit den Faktoren Promiskuität und bestimmten sexuellen Praktiken zu korrelieren, da diese eine wiederholte Virusexposition erleichtern [Baumeister *et al.* 2014, D'Souza *et al.* 2007, Gillison *et al.* 2008, Heck *et al.* 2010]. Von den circa 40 bekannten HPV-Typen, die eine Infektion der Schleimhautoberfläche verursachen können, werden 14 als „high-risk“- oder onkogene Typen eingestuft [Walboomers *et al.* 1999]. Bei Patienten mit HNSCC ist insbesondere die HPV-16 Infektion ein gewichtiger Risikofaktor [D'Souza *et al.* 2007, Kreimer *et al.* 2005] und verlagert die Demografie der Erkrankung in Richtung jüngerer Patienten, die wenig oder keinen Tabak und/oder Alkohol konsumieren [D'Souza *et al.* 2007]. Eine HPV-18-Infektion spielt eine untergeordnete Rolle [Kreimer *et al.* 2005] im Vergleich zu HPV-Typ 16, welcher bei nahezu 90 % der HPV-positiven Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden konnte [Herrero *et al.* 2003]. Neben den genannten Virustypen werden andere onkogene HPV-Typen sehr selten bei HNSCC aufgefunden [Kreimer *et al.* 2005]. Ein HPV-positives HNSCC weist ein weniger aggressives lokales Tumorwachstum und eine bessere Prognose auf. Aufgrund der geringen oder fehlenden Schadstoffbelastung ist die Feldkanzerisierung weniger bis gar nicht ausgeprägt, so dass das Risiko eines Rezidivs oder Zweitkarzinoms deutlich geringer ist [Fakhry *et al.* 2008, Fakhry *et al.* 2014, Licitra *et al.* 2006, Ragin *et al.* 2007b, Schwartz *et al.* 2001, Weinberger *et al.* 2006]. Seit 2017 werden HPV-positive und

Einleitung

HPV-negative Oropharynxkarzinome unterschieden und als zwei unterschiedliche Entitäten subkategorisiert [Gillison *et al.* 2008, Marur *et al.* 2016, Westra *et al.* 2017].

Eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) ist vor allem mit der Entstehung lymphoepithelialer Karzinome im Nasopharynx assoziiert und insbesondere im asiatischen Raum hochprävalent [Wei *et al.* 2005].

Genetische Suszeptibilität

Obwohl Nikotin- und Alkoholabusus die dominantesten Risikofaktoren für die Entstehung eines Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich darstellen, erkrankt nur ein Anteil von circa 10 - 15 % der Raucher an einem solchem Tumor [Hsu *et al.* 1991]. Wahrscheinlich spielen hier Variationen in der individuellen genetischen Suszeptibilität gegenüber exogenen Kanzerogenen eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes. Zu den bekanntesten genetischen Veränderungen zählen:

- Inaktivierung von CDKN2A(p16) durch Methylierung, Deletion und/oder Mutation
- Amplifikation von 11q13
- Verlust oder Mutation des Tumorsuppressorgens TP53

[Forastiere *et al.* 2001, Gollin 2001, Kim *et al.* 2004].

Eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 wurde in bis zu 50 % der HNSCC gefunden und wird mit einem verringerten Überleben assoziiert [Boyle *et al.* 1993, Poeta *et al.* 2007]. Bei Fanconi-Anämie-Patienten besteht durch Mutationen in Genen, die für DNA-Reparatur und für genomische Stabilität zuständig sind, ein 500-fach erhöhtes Risiko an Kopf-Hals-Malignomen zu erkranken und eine 14-prozentige Wahrscheinlichkeit ein HNSCC bis zum 40. Lebensjahr zu entwickeln [Kutler *et al.* 2003]. Ebenso sind Oropharynxkarzinome assoziiert mit einer familiären Vorbelastung für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich [D'Souza *et al.* 2007]. Das Risiko ist höher, falls ein Verwandter ersten Grades erkrankt [Negri *et al.* 2009].

Lebensumstände

Grüngemüse, Frischobst und β -Carotin haben durch einen hohen Gehalt an Antioxidantien einen präventiven Effekt auf die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakts [Kreimer *et al.* 2006, Rodriguez *et al.* 2004]. Eine ungesunde Ernährung hingegen erhöht das Risiko ein Karzinom im Kopf-Hals-Bereich zu entwickeln [Macfarlane *et al.* 1996], genauso wie schlechte Mundhygiene [D'Souza *et al.* 2007, Gillison *et al.*

2008], ein schlechter Zahnstatus sowie bakterielle Koinfektionen, wie beispielsweise Parodontitis in der Mundhöhle [D'Souza *et al.* 2007].

1.1.3 Therapie

Zur Therapie maligner Kopf-Hals-Karzinome sind grundsätzlich folgende Therapieoptionen vorhanden:

- Chirurgische Tumoresektion mit/ohne Neck Dissection
- Strahlentherapie (Radiatio) mit/ohne
- Zytostatischer bzw. zytotoxischer Chemotherapie
- Zielgerichtete Therapie mit Antikörpern

Aufgrund der anatomisch schwierigen und beengten Verhältnisse im Kopf-Hals-Bereich sollte die funktionelle sowie ästhetische Integrität der Strukturen bei der Wahl der Behandlungsmodalität sowie die damit verbundene posttherapeutische Lebensqualität eine entscheidende Rolle spielen. Jede Therapieempfehlung für Kopf-Hals-Tumorpatienten ist letzten Endes sehr individuell. Prinzipiell werden frühe Tumorstadien unimodal, fortgeschrittene Stadien multimodal therapiert [DGMKG 2012, Leemans *et al.* 2011, Myers 2010a, b].

Die wichtigste kurative Therapiemodalität ist die chirurgische Tumoresektion mit elektiver, beziehungsweise therapeutischer Neck Dissection. Durch eine R0-Resektion kann eine Heilung erreicht werden [DGMKG 2012, Marur *et al.* 2008, Pfister *et al.* 2013].

Eine Strahlentherapie kann entweder als primäre Behandlung oder postoperativ (adjuvant) eingesetzt werden. Eine alleinige Bestrahlung wird bei Tumoren in kleinem Stadium (Stadium I und II) in kurativer Intention angewandt, kann bei stark fortgeschrittenen Tumorerkrankungen aber auch der Palliation dienen [DGMKG 2012, Marur *et al.* 2008, Pfister *et al.* 2013].

In postoperativen Hochrisikosituationen sollte zur Radiatio simultan eine Chemotherapie erfolgen. Diese adjuvante Radiochemotherapie (RCTx) wird vor allem in fortgeschrittenen Stadien (Stadium III und Stadium IV) eingesetzt sowie bei knappen oder positiven Resektionsrändern, perineuraler Invasion, Gefäßinvasion und/oder Lymphknotenbefall und insbesondere bei extrakapsulärem Tumorstadium, wodurch das Rezidivrisiko gesenkt werden soll. Eine Radiochemotherapie kann auch als primäre Therapieoption empfohlen werden als nicht-chirurgische Alternative oder auch bei chirurgisch nicht-resektablen Tumoren in höheren Stadien sowie sekundär, das heißt adjuvant nach einer

Operation [Bernier *et al.* 2005, Blanchard *et al.* 2011, DGMKG 2012, Marur *et al.* 2008, Pfister *et al.* 2013].

Zytostatische Chemotherapeutika modulieren die Strahlensensitivität der Tumorzellen, wobei unter anderem die DNA-Reparaturfähigkeit der strahlengeschädigten Zellen inhibiert wird. Diese können in der strahlensensiblen Phase synchronisiert und durch die simultane Radiatio mortalisiert werden [Hitt *et al.* 2005, Lamont *et al.* 2001]. Die am häufigsten verwendeten Medikamente sind Cis- oder Carboplatin, oft in Kombination mit Taxanen oder 5-Fluoruracil [Pignon *et al.* 2007, Reuter *et al.* 2007].

Die zusätzliche Gabe des spezifisch wirkenden monoklonalen Antikörpers (MAb, *Monoclonal Antibody*) Cetuximab ist in fortgeschrittenen und palliativen Krankheitsstadien zugelassen und zielt auf den EGF-Rezeptor ab [DGMKG 2012, Myers 2010a, Pai *et al.* 2009, Sacco *et al.* 2015]. Wird Cetuximab zusammen mit Cis-, beziehungsweise Carboplatin und 5-Fluoruracil gegeben, erhöht dies das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben der auf diese Weise behandelten Patienten verglichen mit Patienten, die ausschließlich mit einer Chemotherapie behandelt wurden [Vermorken *et al.* 2008]. Darüber hinaus erhöht Cetuximab den Erfolg einer primären Strahlentherapie [Bonner *et al.* 2006, Bonner *et al.* 2010]. Jahrelang war die palliative Systemtherapie mit Cetuximab bei stark fortgeschrittenen und/oder metastasierten HNSCC die Therapie der Wahl, wurde allerdings durch die Kombinationstherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren abgelöst [Burtneß *et al.* 2019].

1.2 Der *Epidermal Growth Factor* (EGF)-Rezeptor

Verschiedene molekular ausgerichtete Therapiestrategien wurden und werden beim HNSCC erforscht, mit dem Ziel eines selektiven Wirkmechanismus bei gleichzeitig niedrigerer Toxizität. Potentielle Angriffspunkte dabei sind einerseits Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Signaltransduktion, Zellzyklus, Proteindegradation, Angiogenese, Prostaglandin-Synthese sowie andererseits die Immunmodulation und die Hypoxie. Ein bekannter Rezeptor ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). Dieser ist von Bedeutung für die Aufrechterhaltung normaler zellulärer Funktionen sowie das Zellüberleben. In humanen Tumoren ist der EGFR häufig dysreguliert [Reuter *et al.* 2007].

1.2.1 Geschichte

Der EGFR ist ein Vertreter der Tyrosinkinase-Rezeptoren, welcher bei der Signaltransduktion sowie bei der Steuerung einer Vielzahl von biologischen Prozessen eine bedeutende Rolle spielt [Lemmon *et al.* 2010]. Rezeptortyrosinkinasen übermitteln

extrazelluläre Signale in intrazelluläre Antworten [Harari 2004]. Stanley Cohen isolierte 1962 ein Protein aus der Unterkieferspeicheldrüse von Mäusen, welches das Öffnen der Augenlider sowie das Wachstum der Schneidezähne bei neugeborenen Mäusen beschleunigte. Das Protein bekam den Namen epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*), da es ebenso die Proliferation von Epithelzellen stimulierte [Cohen 1962]. Nach der Identifikation der Aminosäuresequenz des EGF wurde dessen spezifische Bindungsstelle an der Zellmembran von Graham Carpenter im Jahr 1975 bestätigt. Drei Jahre später identifizierten Cohen et al. den EGF-Rezeptor als ein 179 kDa großes Protein [Gschwind et al. 2004].

1.2.2 Einteilung und Aufbau der EGF-Rezeptor-Familie

Der EGF-Rezeptor, auch unter dem Namen ErbB1 (*erythroblastic leukemia viral oncogene homologue*) oder HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*) bekannt, gehört zur HER-Familie/ErbB-Rezeptor-Familie, welche zur Superfamilie der transmembranösen Rezeptortyrosinkinasen gehört. Zur HER-Familie/ErbB-Rezeptor-Familie zählen neben dem EGFR noch ErbB-2 (HER2neu), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4) [Ferguson et al. 2003, Olayioye et al. 2000, Overman et al. 2007]. Es sind derzeit elf Liganden identifiziert, die an die Rezeptoren der ErbB-Familie binden. Die Einteilung erfolgt anhand ihres spezifischen Bindungsverhaltens in vier Gruppen:

- Liganden, die spezifisch nur an den EGF-Rezeptor binden (EGF, TGF α , *transforming growth factor*, Amphiregulin und Epigen)
- Liganden, die sowohl an den EGF-Rezeptor als auch an den ErbB4-Rezeptor binden (HB-EGF, Heparin-bindendes EGF, Epiregulin, Betacellulin)
- Liganden, die sowohl an den ErbB3- als auch an den ErbB4-Rezeptor binden (Neureguline NRG1 und NRG 2)
- Liganden, die ausschließlich an den ErbB4-Rezeptor binden (Neureguline NRG3 und NRG4)

[Hynes et al. 2005]

Im Rahmen aktueller Forschung wird die Liste der EGFR-Liganden erweitert. Jüngst wurde die extrazelluläre Domäne des Zelladhäsionsmoleküls EpCam (*Epithelial Cell adhesion molecule*) als Ligand des EGF-Rezeptors detektiert, der die EGF-induzierte Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) inhibiert [Pan et al. 2018]. Tumorzellen erhalten über dieses Differenzierungsprogramm eine migratorische Kapazität und dadurch ein erhöhtes invasives Potential [Hay 1995]. Für den ErbB2-Rezeptor ist bis dato kein direkter Ligand bekannt [Hynes et al. 2005, Klapper et al. 1999]. Die Ergebnisse

Einleitung

langjähriger Forschung zeigen, dass die Rezeptoren der EGFR-Familie nicht wie angenommen prototypische Rezeptortyrosinkinasen sind, sondern sehr außergewöhnlich mit unikalen Prozessen interagieren [Lemmon *et al.* 2014].

Der EGFR entsteht aus einem Polypeptid-Vorläufer und wird nach Abspaltung der N-terminalen Sequenz in die Zellmembran eingebracht [Ullrich *et al.* 1984]. Beim humanen EGFR bildet eine 1.186 Aminosäuren umfassende Polypeptidkette das Grundgerüst, welche als monomeres Glykoprotein in der Zellmembran verankert ist. Es handelt sich um eine baukastenartige aufgebaute Struktur mit vier funktionellen Domänen:

- die extrazelluläre, N-terminale, Liganden-bindende Domäne
- die hydrophobe, transmembranöse Domäne (TM)
- die zytoplasmatische, intrazelluläre Tyrosin-Kinase Domäne (TKD)
- die C-terminale und juxtamembranöse (JM) regulatorische Domäne

[Gschwind *et al.* 2004, Lemmon *et al.* 2010, Ullrich *et al.* 1984]

ErbB2/Her2, ErbB4/Her4 und EGFR sind Kinase-aktiv. Trotz Ligandenbindung ist der ErbB3/Her3 hingegen nicht [Schlessinger 2002, Yarden *et al.* 2001], beziehungsweise nur schwach Kinase-aktiv [Shi *et al.* 2010]. Der EGFR ist stark N-glykosyliert, wodurch eine charakteristische Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Proteinligand und dem Rezeptor in einer dreidimensionalen Konfiguration stattfinden kann [Cummings *et al.* 1985].

Abbildung 1 zeigt den charakteristischen Aufbau des EGF-Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus vier unterschiedlichen Proteinsubdomänen zusammen. Diese bestehen aus je zwei homologen Leucin-reichen L-Subdomänen und zwei Cystein-reichen CR-Subdomänen. Sie werden Domänen I, II, III und IV genannt [Ward *et al.* 1995].

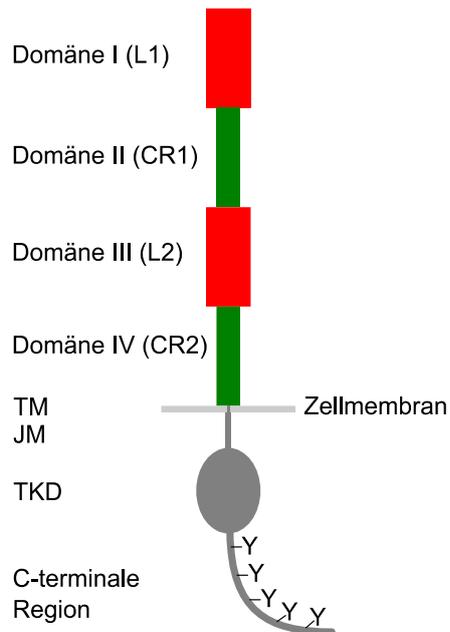


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des EGFR nach [Burgess *et al.* 2003, Lemmon *et al.* 2014]

Eine Bindung des Liganden findet an den L-Subdomänen (I und III) statt [Ferguson *et al.* 2003], wobei die größte Rolle bei der Bindung der Domäne III (L2) zufällt [Kim *et al.* 2002, Lax *et al.* 1989]. Die CR-Subdomänen (II und IV) hingegen sind für die Regulation der Dimerisierung des Rezeptors verantwortlich [Ferguson *et al.* 2003] (siehe 1.2.4). Eine einzelne transmembranöse Domäne (TM) verbindet die extrazelluläre Rezeptorregion mit der intrazellulären Tyrosin-Kinase Domäne (TKD) [Lemmon *et al.* 2014]. Diese macht ungefähr 50 % der intrazellulären Region aus. Den Rest umfasst die Carboxy (C)-terminale Region, sowie die zytoplasmatische juxtamembranöse Region (JM), wobei die C-terminale Region vor allem die Autophosphorylierungsstellen (Y) beherbergt.

1.2.3 Vorkommen

Den ErbB-Rezeptoren kommt eine bedeutende Rolle während der Embryonalentwicklung zu und sie werden in verschiedenen Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs von gesunden Zellen im adulten Organismus für die Regulation von vielen metabolischen und physiologischen Prozessen exprimiert [Hynes *et al.* 2005, Olayioye *et al.* 2000, Singh *et al.* 2005, Wells 1999]. Bei EGFR-Gen Knock-out-Mäusen kam es während der Embryonalentwicklung, neben einer hohen embryonalen Letalität, zu Defekten im Knochen, Gehirn, Herz und einer Vielzahl an Epithelien, vor allem an Haut, Haar, Augen und Lunge [Sibilia *et al.* 2007, Sibilia *et al.* 1995, Threadgill *et al.* 1995].

Der EGFR liegt an der Zellmembran als Monomer vor. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird eine Rezeptoraktivierung durch eine räumliche und zeitliche Expression der Liganden kontrolliert [Hynes *et al.* 2005]. Die Liganden werden dabei entweder von

derselben, ebenso EGFR-exprimierenden, Zelle produziert (autokrine Sekretion) oder von umliegenden Zellen (parakrine Sekretion) [Olayioye *et al.* 2000]. Weitere Sekretionsmechanismen sind bis dato beschrieben. Durch Ligandenbindung resultiert eine Aktivierung nachgeschalteter Tyrosinkinase, welche unter anderem Proliferation, Wachstum und Differenzierung physiologisch regulieren. Im Anschluss erfolgt die clathrin-vermittelte Internalisierung des Rezeptors in das Endosom, wo der Rezeptor abgebaut wird [Burke *et al.* 2001, Lemmon *et al.* 2010].

Neben membran-gebundenen EGF-Rezeptoren existieren auch gelöste Isoformen, denen das transmembranöse und intrazelluläre Segment fehlt. Diese gelösten Rezeptoren entstehen entweder durch alternatives mRNA-Spleißen oder durch proteolytische Spaltung des Oberflächenrezeptors, was auch als *ectodomain shedding* bezeichnet wird [Adamczyk *et al.* 2011, Maramotti *et al.* 2012, Wells 1999, Wilken *et al.* 2013]. Der EGFR fungiert zudem als Transkriptionsfaktor im Zellkern [Weinberger *et al.* 2004] und interagiert dort mit STAT3, einem Transkriptions-initiiierendem Protein [Lin *et al.* 2001].

Ein hohes Expressionslevel des EGF-Rezeptors korreliert beim HNSCC mit einem höherem Tumorstadium, einer fortgeschrittenen Lymphknotenmetastasierung und schließlich mit einem kürzerem rezidiv-freiem Überleben und einem kürzerem Gesamtüberleben [Ang *et al.* 2002, Grandis *et al.* 1998b, Grandis *et al.* 1993, Psyrri *et al.* 2005].

1.2.4 Aktivierung des EGF-Rezeptors

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors führt zu dessen Aktivierung. EGFR-Moleküle werden als Monomere sezerniert, liegen in der aktiven Form jedoch als Dimere vor [Ward *et al.* 1995]. Des Weiteren kann der EGFR auch durch andere Rezeptortyrosinkinase, wie beispielsweise dem Insulin-like Growth-factor-1-Rezeptor oder durch Adhäsionsmoleküle wie dem E-Cadherin oder den Integrinen sowie durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden.

Mechanismus der Liganden-induzierten EGFR-Dimerisierung der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors

Etwa 95 % der Liganden-ungebundenen EGF-Rezeptoren liegen in der kompakten autoinhibierten Form vor, welche auch als „angebundene Konformation“ (*tethered conformation*) bezeichnet wird [Burgess *et al.* 2003, Ferguson *et al.* 2003]. Dabei reagieren die CR-Subdomänen (Domäne II und Domäne IV) intramolekular miteinander und bilden eine taschenartige Struktur, so dass der für die Dimerisierung des Rezeptors wichtige

Dimerisierungsarm (Domäne II) nicht erreichbar ist [Burgess *et al.* 2003, Ferguson *et al.* 2003, Garrett *et al.* 2002, Ogiso *et al.* 2002].

Bei den restlichen 5 % der Liganden-ungebundenen EGF-Rezeptoren ist diese angebundene Konformation aufgebrochen, was als „ungebundene Konformation“ (*untethered conformation*) bezeichnet wird. Die L-Subdomänen liegen hier räumlich eng beieinander, was eine Interaktion der beiden CR-Subdomänen verhindert. Somit sind die L-Subdomänen (I und III) für eine Bindung EGF-spezifischer Liganden zugänglich [Ferguson *et al.* 2003]. Abbildung 2 zeigt die beiden beschriebenen Konformationen sowie den Mechanismus der Dimerisierung der Rezeptoren.

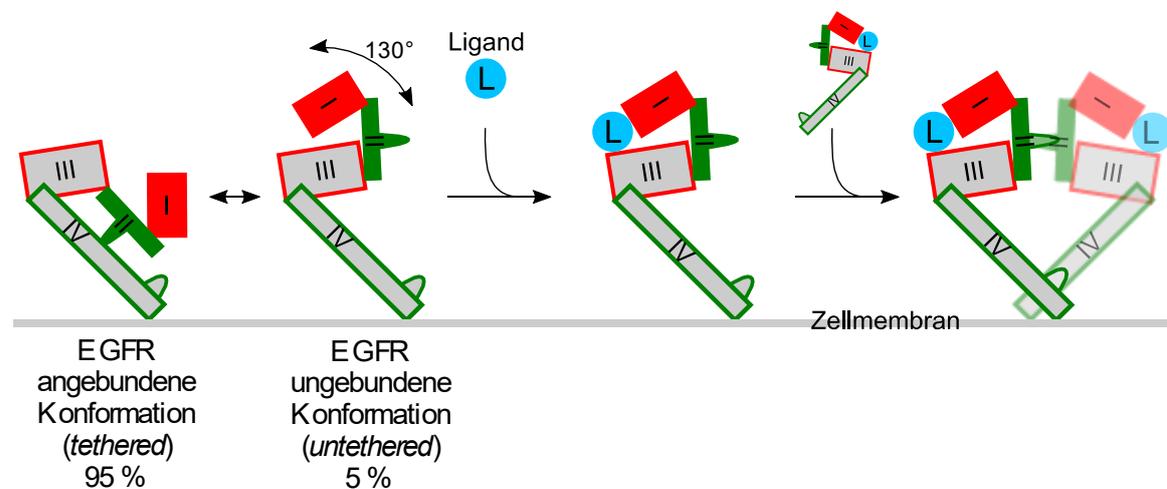


Abbildung 2: Mechanismus der Liganden-induzierten Dimerisierung der extrazellulären Domäne des EGFR nach [Li *et al.* 2005]

EGFR-Liganden liegen als Dimere vor und präferieren die ungebundene Konformation des Rezeptors. Sie können gleichzeitig an die Subdomänen L1 und L2 binden [Garrett *et al.* 2002, Ogiso *et al.* 2002]. Eine Bindung des Liganden an den Rezeptor stabilisiert die „ungebundene Konformation“ der extrazellulären Domäne des EGFR, führt zu einer Liganden-induzierten Konformationsänderung und leitet die Rezeptordimerisierung über den Dimerisierungsarm in Domäne II ein [Burgess *et al.* 2003, Lemmon *et al.* 2014]. Die Dimerisierung von zwei Rezeptoren ist ausschließlich rezeptorvermittelt, da weder die Liganden untereinander in Kontakt stehen, noch eine Interaktion eines Liganden mit beiden Rezeptoren möglich ist [Burgess *et al.* 2003, Garrett *et al.* 2002, Gschwind *et al.* 2004, Lemmon *et al.* 1997, Ogiso *et al.* 2002]. Die Dimerisierung der extrazellulären Region ist anders als bei anderen Rezeptortyrosinkinasen vollständig durch einen Rezeptor-Rezeptor-Kontakt vermittelt und wird auch als 2:2-Liganden-EGFR-Komplex an der Zelloberfläche bezeichnet [Lemmon *et al.* 2014, Sako *et al.* 2000]. Ein Dimer besteht

Einleitung

immer aus zwei Liganden und zwei Rezeptoren, die im Zentrum über die direkte Interaktion der CR1-Subdomäne (Domäne II) des Rezeptors verbunden sind [Brown *et al.* 1994, Domagala *et al.* 2000, Lemmon *et al.* 1997]. Eine Bindung verschiedener Liganden führt zu der Bildung von Rezeptor-Homo- oder Heterodimeren.

Die Regulation der Dimerisierung ist ein komplexer Prozess und wird auch als Transmodulation bezeichnet: EGFR kann mit einem anderen EGFR dimerisieren (Homodimer) oder EGFR interagiert mit einem der drei anderen homologen Mitglieder der ErbB-Familie (Heterodimer). Zudem binden unterschiedliche ErbB-spezifische Liganden an die ErbB-Rezeptoren. Durch die Kombination mehrerer Liganden und Rezeptoren miteinander entsteht eine Vielzahl an unterschiedlichen Signalwegen [Garrett *et al.* 2002, Ogiso *et al.* 2002, Yarden 2001]. Die Art des generierten Signals ist bedingt durch den Liganden, durch den von ihm gebundenen Rezeptor und durch den zweiten Rezeptor bei der Dimerisierung. Im Anschluss lagern sich in Abhängigkeit des entstandenen Dimers bestimmte zytoplasmatische Signalpeptide an die C-terminale Domäne an [Jorissen *et al.* 2003, Yarden 2001].

Allosterische Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne

Die Dimerisierung stimuliert eine Aktivität der intrinsischen Tyrosinkinase und löst eine Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Regulationsdomäne des Rezeptors aus [Mitsudomi *et al.* 2010]. Anders als andere Rezeptortyrosinkinasen benötigt der EGFR keine Phosphorylierung auf seiner Aktivierungsschleife (oder anderswo) für die Regulation seiner allosterischen Aktivierung [Schlessinger 2002, Zhang *et al.* 2006]. Abbildung 3 verdeutlicht den Mechanismus der allosterischen Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne vom inaktiven Monomer zum aktiven Dimer.

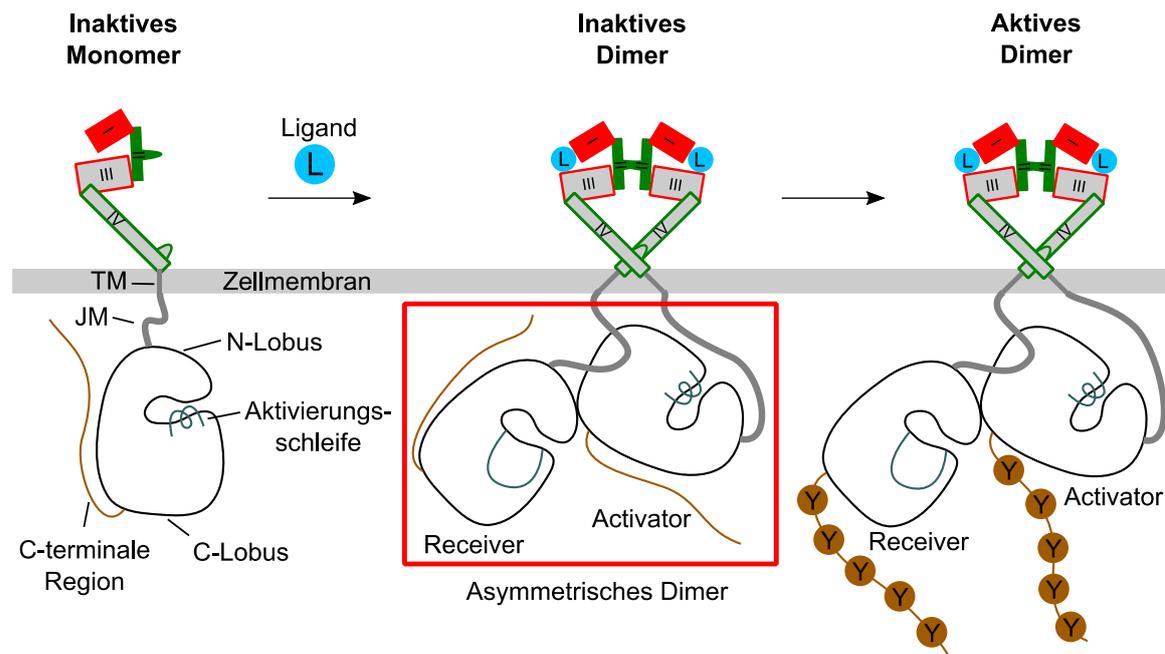


Abbildung 3: Mechanismus der allosterischen Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne nach [Jura *et al.* 2009]

Die konformationelle Veränderung von der *tethered* in die *untethered* Konfiguration induziert eine 140°-Rotation der Transmembran-Domäne (TM), was zu einer Reorientierung der intrazellulären Kinase-Domäne von einer symmetrischen, inaktiven Konfiguration hin zu einer asymmetrischen, aktiven Form führt. Dieser Vorgang wird als Rotation bezeichnet [Purba *et al.* 2017]. Die EGFR-Tyrosinkinase-Domäne formt ein asymmetrisches Dimer, in dem der C-Lobus der einen Tyrosinkinase-Domäne, „Activator“ genannt, in engen Kontakt tritt mit dem N-Lobus der zweiten, „Receiver“ genannten, Tyrosinkinase-Domäne [Zhang *et al.* 2006]. Dieser direkte Kontakt induziert Konformationsänderungen im N-Lobus der „Receiver“-Domäne, was zu einer Unterbrechung des autoinhibitorischen Zusammenspiels im Monomer führt. Folglich kann die „Receiver“-Kinase die charakteristische aktive Konfiguration annehmen [Jura *et al.* 2009, Red Brewer *et al.* 2009]. Eine intermolekulare Interaktion begünstigt folglich die Aktivierung. Der „Receiver“ wird im Anschluss selbst zum „Activator“, wodurch beide EGFR-Moleküle innerhalb des Dimers aktiviert werden. Innerhalb der EGF-Rezeptor Familie führt die paarweise Fähigkeit der Kinasen-Domäne als „Activator“ oder „Receiver“ füreinander zu fungieren zu einer schlagkräftigen kombinatorischen Antwort auf eine Vielzahl von Liganden [Zhang *et al.* 2006].

Phosphorylierungsstellen des EGFR am C-terminalen Ende des EGF-Rezeptors

Durch die Aktivität der intrinsischen Tyrosinkinase wird eine Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne, beziehungsweise am C-terminalen Ende des Rezeptors, ausgelöst [Mitsudomi *et al.* 2010]. Das C-terminale Ende besitzt fünf Phosphorylierungsstellen und eine sechste befindet sich in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne, was aber nicht essentiell für die Enzymaktivität ist [Kim *et al.* 2012]. Die Autophosphorylierung von Phosphateinheiten des Adenosintri-phosphates (ATP) auf Tyrosinreste des EGFR findet in trans-Position und in einer präzisen Ordnung statt [Favelyukis *et al.* 2001, Furdai *et al.* 2006, Gajiwala 2013, Honegger *et al.* 1989]. Die resultierenden, aktivierten Phosphorylierungsstellen dienen als Andockstellen für verschiedene nachgeschaltete Moleküle [Gajiwala 2013, Wagner *et al.* 2013] und leiten damit die Signaltransduktion ein [Yarden *et al.* 2001].

1.2.5 Signaltransduktion und Funktion des aktivierten EGFR

Der EGFR übt seine Funktion in der zellulären Umgebung aus [Jorissen *et al.* 2003]. Verschiedene aktivierte Rezeptor-Liganden-Komplexe variieren sowohl in der Stärke als auch in der Art der induzierten zellulären Antworten [Yarden 2001]. Die nachfolgenden Signalwege auf EGFR-Signale sind pleiotrop und entscheiden größtenteils über das Schicksal der Zelle. Sie beinhalten die Mitogenese, die Apoptose, eine veränderte zelluläre Motilität, die Proteinsekretion und die Differenzierung oder die Dedifferenzierung [Schneider *et al.* 2009, Wells 1999, Zeng *et al.* 2014].

Eine Aktivierung bestimmter Signalwege entsteht durch die Interaktion der Phosphotyrosinreste mit PH- (*Pleckstrin Homology*), SH2- (*Src Homology 2*) beziehungsweise PTB- (*Phosphotyrosine Binding*) Domänen unterschiedlicher Effektorproteine [Citri *et al.* 2006, Riese *et al.* 1998, Schlessinger *et al.* 2003, Wagner *et al.* 2013]. Dabei existieren zwei Gruppen von Effektorproteinen, die an den phosphorylierten EGF-Rezeptor binden. Einerseits gibt es Proteine ohne intrinsische enzymatische Aktivität, welche die Plattform zur Rekrutierung von Signalproteinen an die Zellmembran stellen [Wagner *et al.* 2013] und andererseits Proteine mit intrinsischer enzymatischer Aktivität. Zu letzteren gehören Src (*Sarcoma*)-Kinasen, Phosphatasen, Phospholipasen und Ras-GAPs (*GTPase Activating Protein*). Bindet ein derartiges Protein an den phosphorylierten EGFR führt dies zur Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung des Effektorproteins. Dadurch wird seine enzymatische Aktivität entfaltet. Die Enzymaktivität kann außerdem durch die Bindung des Effektorproteins und der daraus resultierenden Konformationsänderung ausgelöst werden. Dadurch besitzt der EGF-Rezeptor eine

Vielzahl an Einflussmöglichkeiten auf gewisse Signalwege [Kouhara *et al.* 1997, Pawson 1995, Pawson *et al.* 1993, Schlessinger 1994, Sun *et al.* 1993, Wagner *et al.* 2013].

Welche Signalproteine aktiviert werden, ist determiniert durch den Liganden, dessen Konzentration sowie durch den heterodimeren Partner des Rezeptors [Olayioye *et al.* 1998]. Die EGFR-Liganden sind nicht nur für die Stimulation bestimmter EGFR-Signalwege verantwortlich, sondern auch für die Deregulierung des EGFR-Signals (siehe 1.2.6) [Sorkin *et al.* 2009, Wilson *et al.* 2009]. Die genauen ErbB-Rezeptor-Signalwege sind kompliziert und ein deterministisches Modell des Netzwerks dafür bis dato nicht vorhanden [Lemmon *et al.* 2010]. Bestimmte durch den EGFR aktivierte Signalkaskaden entstehen an der Plasmamembran, während andere eine EGFR Internalisierung benötigen, um die volle Aktivierung zu erhalten [Jones *et al.* 2014]. Abbildung 4 zeigt die Wege der Signaltransduktion eines EGFR-Homodimers, welche komplexe, miteinander verbundene, dynamische Signalkaskaden durch Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren sind. Durch die nachgeschaltete Kinaseaktivität werden folgende Signalwege aktiviert:

- der Ras/Raf/MAPK (*mitogen activated protein kinase*) - Signalweg
- der PLC γ (*Phospholipase C gamma*) - Signalweg
- die Phosphatidylinosit-3-Kinase (PI3K) und Akt (Proteinkinase B, PKB)
- oder der STAT (*signal transducers and activators of transcription*) - Signalweg

[Gschwind *et al.* 2004, Jones *et al.* 2014, Lemmon *et al.* 2010, Singh *et al.* 2005].

Einleitung

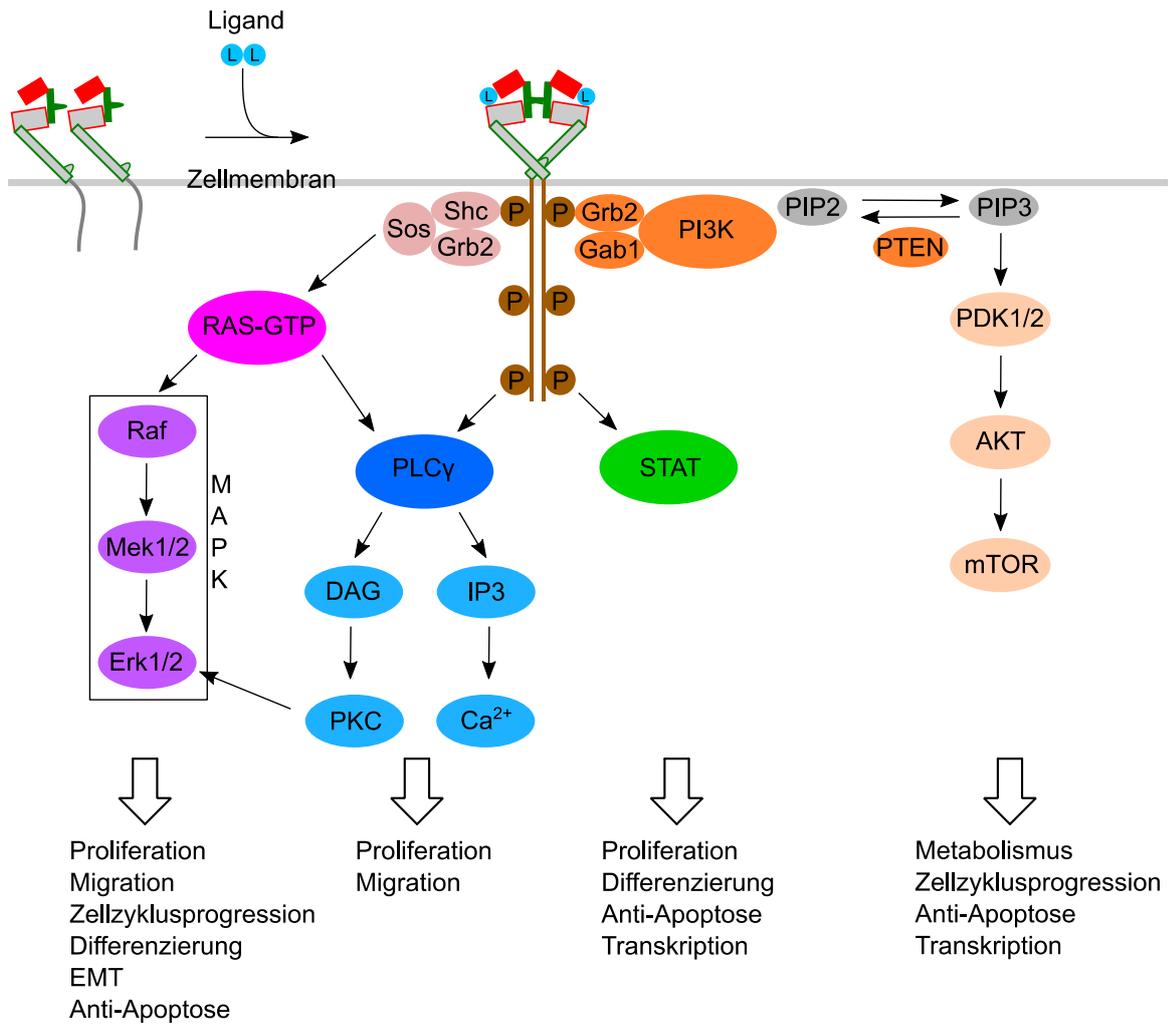


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Liganden-induzierten Signaltransduktionswege eines aktivierten EGFR-Homodimers nach [Jones *et al.* 2014, Reuter *et al.* 2007, Singh *et al.* 2005]

EGFR-abhängige Aktivierung des Ras/Raf/MAP-Kinasen-Signalweges

Der MAP-Kinasen-Signalweg stellt den Hauptsignalweg des EGFR dar und ist umfassend analysiert [Alroy *et al.* 1997, Jorissen *et al.* 2003, Lurje *et al.* 2009]. Ein Schlüsselspieler für diesen Signalweg und gleichzeitig eine Verbindung zu anderen EGFR-abhängigen Signalwegen ist das Adapterprotein Shc (*Src Homology domain-containing protein C*) [Jorissen *et al.* 2003, Lowenstein *et al.* 1992]. Shc bindet zusammen mit im Zytosol lokalisiertem Grb2 (*Growth factor Receptor-Bound protein2*) direkt an phosphorylierte Tyrosinreste (P) des EGFR, welche wiederum den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sos (*Son Of Sevenless*) rekrutieren [Batzer *et al.* 1994, Jorissen *et al.* 2003, Sasaoka *et al.* 1994]. Dieser ist ein Ras-GTP-Austauschfaktor und durch die Bindung von GTP (*Guanosine Triphosphate*) wird das ras-Protein in seine aktive Form gebracht. Das proto-onkogene ras-Protein dient als molekularer Schalter. [Jorissen *et al.* 2003, Rozengurt

2007, Wells 1999]. Das aktivierte Ras führt durch eine Serie intermediärer Kinasen zur Aktivierung von drei Kinasen der MAP-Kinasen-Kaskade in folgender Reihenfolge: Raf (*rat fibrosarcoma*), Mek (*MAPK/Erk kinase1*) und Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) [Hallberg *et al.* 1994, Jiang *et al.* 2002, Jorissen *et al.* 2003, McKay *et al.* 2007]. Aktiviertes Erk1/2 gelangt in den Zellkern und reguliert dort Zellzyklusprogression, Zellmigration und Zelldifferenzierung [Johnson *et al.* 1994, McKay *et al.* 2007, Mendoza *et al.* 2011, Ramos 2008, Rozengurt 2007]. Aktuelle Forschung beschreibt durch die Aktivierung der Erk1/2 die Möglichkeit einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von Tumorzellen des HNSCC, die dadurch eine höhere migratorische Kapazität und somit ein erhöhtes invasives Potential erhalten [Hay 1995, Pan *et al.* 2018].

EGFR-abhängige Aktivierung des PLC γ -Signalweges

Das beschriebene Erk1/2 kann über zwei phosphorylierte Tyrosinreste des EGFR auch durch einen ras-unabhängigen Weg aktiviert werden: Ein Andocken von PLC γ 1 (*Phospholipase C Gamma 1*) an die autophosphorylierten Tyrosinreste des EGFR katalysiert die Freisetzung der sekundären Botenstoffe (*second messenger*) Inosit-(1,4,5)-Triphosphat (IP $_3$) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) aus dem Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat [Chattopadhyay *et al.* 1999, Kamat *et al.* 1997, Park *et al.* 2012]. IP $_3$ gelangt ins Cytosol und bindet an spezifische IP $_3$ -Kanäle des endoplasmatischen Retikulums, was resultierend zu einem Calciumioneneinstrom aus intrazellulären Speichern ins Cytosol führt. Ein hohes Ca $^{2+}$ -Niveau führt zu einer Änderung der Konformation und Affinität von Proteinkinasen mit weiteren nachgeschalteten Ca $^{2+}$ -abhängigen Reaktionen [Hofer *et al.* 1998, Park *et al.* 2012, Sun *et al.* 1998]. Durch das an der Plasmamembran lokalisierte DAG werden Isoformen der Proteinkinase C (PKC) aktiviert, welche resultierend Erk1/2, unabhängig vom ras-Weg, aktivieren [Marais *et al.* 1998, Park *et al.* 2012].

EGFR-abhängige Aktivierung des PI3K-mTOR-Akt-Signalweges

Über die heterodimere PI3-Kinase (PI3K), welche aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit besteht, läuft ein wichtiger Signalweg des aktivierten EGF-Rezeptors ab [Singh *et al.* 2005]. Eine Aktivierung der PI3K kann dabei über verschiedene Mechanismen erfolgen. Eine direkte Aktivierung erfolgt durch die Heterodimerisierung von EGFR mit ErbB3 [Hellyer *et al.* 1998, Kim *et al.* 1994]. Die indirekte Aktivierung findet über Gab1 (*Grb2-associated-binding protein 1*) statt. Gab1 bindet an bestimmte phosphorylierte Tyrosinreste des EGFR und rekrutiert PI3K zur Zellmembran, allerdings in einem geringeren Ausmaß als bei direkter Aktivierung [Lemmon *et al.* 2010, Mendoza *et al.* 2011, Rodrigues *et al.* 2000]. Die regulatorische Untereinheit von PI3K generiert

mithilfe der Phosphatase PTEN (*Phosphatase Protein Homologue to Tensin*) die Phosphorylierung des Phosphatidylinosit-4,5-Phosphat (PIP₂) zum *second messenger* Phosphatidylinosit-3,4,5-triphosphat (PIP₃) [Djordjevic *et al.* 2002]. Dies bewirkt die Rekrutierung des Akt-Aktivators PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1*) und der Kinase Akt [Jones *et al.* 1991, Newton 2009, Nicholson *et al.* 2002]. Akt ist wichtig für die Kontrolle der Zellvermehrung und Zellproliferation und ist außerdem ein bedeutender Mediator beim programmierten Zelltod [Jorissen *et al.* 2003, Lemmon *et al.* 2010].

Erst wenn PDK1 die Kinase Akt und zusätzlich die Kinase mTORC2 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 2*) phosphoryliert, wird die vollständige Kinaseaktivität von Akt erreicht [Mendoza *et al.* 2011, Sarbassov *et al.* 2005]. Die Kinase mTORC2 ist ein Sensor für das Nährstoffangebot und garantiert ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen dem Nährstoffangebot und dem Zellwachstum. Durch die resultierenden Proteine, welche am Zellzyklus und an der Translation beteiligt sind, erhöht sich die Translationsaktivität bei einem ausreichendem Nährstoff-, O₂ - und Energieangebot [Alessi *et al.* 2009]. Die Apoptose kann über den PI3K/Akt Signalweg ausgehend von der Kinase Akt inhibiert werden. Der Phosphatidylinosit-3-Kinase Signalweg ist der am häufigsten veränderte Signalweg beim HNSCC [Iglesias-Bartolome *et al.* 2013, Lui *et al.* 2013, Molinolo *et al.* 2009, Reuter *et al.* 2007].

EGFR-abhängige Aktivierung des STAT3-Signalweges

Manche Proteine, wie beispielsweise die STAT Transkriptionsfaktoren, verweilen in der Zelle in einem Ruhezustand und werden erst durch eine Ligandenbindung am EGFR aktiviert oder zu anderen Zellorten, wie beispielsweise dem Nukleus, transloziert [Blume-Jensen *et al.* 2001, Olayioye *et al.* 1999, Xia *et al.* 2002]. STAT3 gehört zur STAT-Proteinfamilie, welche eine Rolle bei der Transkription von Genen der Immunantwort, des Wachstums und des Schicksals der Zelle spielen. Neben einer großen Anzahl von Zytokinen kann STAT3 auch von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise dem EGF [David *et al.* 1996], und von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie dem EGFR, phosphoryliert und somit aktiviert werden [Blume-Jensen *et al.* 2001, Jorissen *et al.* 2003]. Der Transkriptionsfaktor kann auch indirekt über die Src-Kinase aktiviert werden [David *et al.* 1996]. Im Anschluss findet eine Translokation des STAT-Dimers in den Nukleus statt, wo es mit DNA-Konsensus-Elementen interagiert und somit die Expression verschiedener Gene reguliert. Die beeinflussten Gene sind verantwortlich für das Zellüberleben, die Zelldifferenzierung, die Zellproliferation und die DNA-Reparatur [Reich *et al.* 2006, Vigneron *et al.* 2008].

1.2.6 Inaktivierung des EGFR-Signals

Die Stärke und die Dauer der intrazellulären Aktivität des EGFR kann auf unterschiedliche Arten reguliert werden. Erstens über das Vorhandensein eines Ligandentypus am Rezeptor selbst sowie dessen Konzentration und Dauer der Stimulierung [Jones *et al.* 2014, Sigismund *et al.* 2008, Singh *et al.* 2005]. Zweitens über die Regulation der Aktivität der Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors, zum einen über intrazellulär gelegene Serin- oder Threoninreste [Jorissen *et al.* 2003, Theroux *et al.* 1992] und andererseits über die indirekte Reduktion der Aktivität des Rezeptors über Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) [Singh *et al.* 2005]. Diese dephosphorylieren die Autophosphorylierungsstellen, wodurch bestimmte Signalwege des EGF-Rezeptors inaktiviert werden [Brautigan *et al.* 1981, Faure *et al.* 1992, Zandi *et al.* 2007].

Durch die sogenannte Endozytose, also die Entfernung des Liganden-Rezeptor-Komplexes von der Zelloberfläche, kann die Inaktivierung des EGFR-Signals ebenfalls erfolgen [Lenferink *et al.* 1998]. Die Internalisierung des EGF-Rezeptors unterscheidet sich wiederum davon, welcher Ligand gebunden ist. Die induzierte Internalisierung durch EGF, TGF α , Amphiregulin und Epregrulin erfolgt Clathrin-vermittelt [Henriksen *et al.* 2013]. Unter den meisten physiologischen Bedingungen sind die Clathrin-vermittelten Signalwege die Hauptwege der EGFR-Internalisierung. Die Clathrin-unabhängigen Signalwege werden als alternative Mechanismen der Endozytose des EGFR beschrieben [Orth *et al.* 2006, Sigismund *et al.* 2005]. Nach der Internalisierung werden aktivierte Rezeptortyrosinkinasen dephosphoryliert, ubiquityliert und der zuvor aktivierende Ligand wird im niedrigen pH-Milieu des Endosomen dissoziiert. Das Stadium im endozytischen Weg, bei dem dies geschieht, variiert je nach Ligand und Rezeptor. In Abhängigkeit des gebundenen Liganden kann der Rezeptor wieder an die Oberfläche gebracht (Recycling) oder abgebaut werden (Degradation) [Lemmon *et al.* 2010]. Die Clathrin-vermittelte Endozytose verlängert dabei die Dauer des EGFR-Signals durch Lenkung des Rezeptors hin eher zu einer Recyclingoption als zu einer Degradation [Sigismund *et al.* 2008]. Die Hauptaufgabe der Ubiquitylierung ist im Allgemeinen einen aktivierten EGF-Rezeptor eher für die Degradation zu erfassen als die Internalisierung selbst zu lenken. Vor allem Mono-Ubiquitylierungen sind das Hauptsignal für die EGFR-Endozytose und die anschließende Degradation [Huang *et al.* 2007, Mosesson *et al.* 2003].

Zudem wird das Schicksal des Rezeptors durch die Zusammensetzung des Dimers und des aktivierenden Liganden determiniert [Henriksen *et al.* 2013]. Entstehen durch die Bindung von EGF an den Rezeptor EGFR-Homodimere, wird nach der Liganden-stimulierten Endozytose der lysosomale Abbau der Liganden-Rezeptor-Komplexe

eingeleitet. Bei den EGFR-ErbB2-Heterodimeren hingegen entgehen die Rezeptoren der Degradation und werden von Endosomen aus zurück zur Zelloberfläche transportiert [Lenferink *et al.* 1998, Roepstorff *et al.* 2009, Wells 1999]. Der Ligand EGF stimuliert eine größere EGFR-Ubiquitylierung und resultiert in einer größeren Degradation, im Vergleich zu dem Liganden Amphiregulin [Baldys *et al.* 2009, Roepstorff *et al.* 2009, Stern *et al.* 2008, Willmarth *et al.* 2009]. Die Bindung von TGF α an den EGF-Rezeptor führt durch den schnellen Zerfall des TGF α im sauren Milieu des Endosomen [Ebner *et al.* 1991] und der daraus resultierenden De-Ubiquitylierung des Rezeptorkomplexes, zum Transport der Rezeptoren zurück zur Oberfläche. Dies geschieht sowohl für Homo- als auch Heterodimere [Decker 1990, Lenferink *et al.* 1998, Longva *et al.* 2002, Roepstorff *et al.* 2009, Wells 1999]. Der Ligand Epireregulin führt genauso wie TGF α zu einem kompletten Rezeptor-Recycling [Roepstorff *et al.* 2009]. Der Ligand Amphiregulin führt ebenso zu keiner lysosomalen Degradation des EGFR, sondern verursacht sowohl ein schnelles als auch hauptsächlich ein langsam wirkendes Recycling des Rezeptors zur Zelloberfläche [Roepstorff *et al.* 2009]. Durch dieses Rezeptor-Recycling kann die Signalstärke moduliert werden, da Rezeptoren, die der lysosomalen Degradation entgehen zurück zur Oberfläche gebracht werden. Diese können rascher für eine erneute Aktivierung genutzt werden [Singh *et al.* 2005, Waterman *et al.* 1998]. Eine kontinuierliche Signalwirkung und ein potenteres mitogenes Signal sind die Folge [Waterman *et al.* 1998].

1.2.7 Karzinogenese und Rolle des EGF-Rezeptors

Die Karzinogenese ist ein komplexer mehrstufiger Prozess abhängig von genetischen und epigenetischen Faktoren, bei denen, sowohl bei Onkogenen als auch bei Tumorsuppressorgenen für die Initiierung und Progression verschiedene aktivierende und inaktivierende Ereignisse stattfinden müssen [Hanahan *et al.* 2000, 2011]. Dazu zählt unter anderem eine Aktivierung von Onkogenen und deren Produkte, wie beispielsweise dem EGFR [Partridge *et al.* 1997, Zandi *et al.* 2007]. Im Allgemeinen ist bekannt, dass die Mehrzahl der Karzinomzellen aus einer klonalen Expansion, einer anhaltenden Teilung einer einzelnen oder von wenigen tumor-initiiierenden Zellen entstehen, welche eine Selbsterneuerungskapazität wiedererlangt haben [Lobo *et al.* 2007, Molinolo *et al.* 2009]. Der EGFR spielt eine kritische Rolle in der Regulation der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Zellmigration, weshalb die Dysregulation seiner Aktivität mit einer Vielzahl an humanen Tumorerkrankungen assoziiert ist, wie beispielsweise den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen [Gomez *et al.* 2013, Mok 2011], dem Mamma-Karzinom, Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Lokalisation und dem Glioblastom sowie weiteren malignen Erkrankungen [Blume-Jensen *et al.* 2001, Yarden 2001]. Die Signaltransduktionswege des aktivierten EGF-Rezeptors sind potente onkogene

Regulatoren von Tumorzellwachstum, Gewebstinvasion, Angiogenese, Metastasierung und Apoptose [Jones *et al.* 2014, Kalyankrishna *et al.* 2006, Salomon *et al.* 1995, Wells 1999, Woodburn 1999]. Die Expression, die Regulation und die Aktivierung der EGF-Rezeptoren sind in vielen epithelialen Tumoren verändert [Harari 2004, Hynes *et al.* 2005]. Eine erhöhte Expression von EGFR bereits in dysplastischen Schleimhautarealen sowie gut und mäßig differenzierten Tumorzellen lässt vermuten, dass eine vermehrte Expression des EGFR ein früher Schritt in der Karzinogenese des HNSCC ist [Christensen 1998, Shin *et al.* 1994]. Letztlich zeigen bis zu 90 % der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome eine starke Expression des Rezeptors [Grandis *et al.* 1996, Grandis *et al.* 1998b] und hohe Expressionslevel korrelieren mit einem schlechteren klinischen Outcome der Patienten [Ang *et al.* 2004, Bracher *et al.* 2013, Grandis *et al.* 1998b, Lo *et al.* 2006].

Es existiert eine Vielzahl von Wegen, welche die strenge Regulation der EGFR-Signalwege außer Kraft setzen, so dass eine onkogene, permanente EGFR-Aktivierung induziert wird. Die Mechanismen sind dabei sehr oft spezifisch für den jeweiligen Karzinomtyp. Eine Rezeptor-Überexpression findet sich in den meisten epithelialen Malignomen, eine erhöhte autokrine oder parakrine Liganden-Produktion führt zu einer konstitutiven Aktivierung der Signalwege. Diese kann ebenfalls über eine EGFR-Transaktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, durch konstitutiv aktivierte EGFR-Mutanten sowie durch eine Liganden-unabhängige Aktivierung durch andere heterologe Rezeptorsysteme erfolgen, wie beispielsweise dem ErbB2/HER2 [Kalyankrishna *et al.* 2006, Molinolo *et al.* 2009, Rogers *et al.* 2005, Zandi *et al.* 2007].

Erhöhte Expression des EGFR

Während eine gesunde Zelle zwischen 40.000 und 100.000 EGF-Rezeptoren exprimiert, kann eine Tumorzelle bis zu zwei Millionen exprimierte Rezeptoren aufweisen [Kawamoto *et al.* 1983]. Neben Dimeren wurden auch Tetramere in EGFR-überexprimierenden Zellen detektiert, wobei deren funktionelle Bedeutung noch ungeklärt ist [Clayton *et al.* 2005]. In Abwesenheit eines Liganden wird ein EGF-Rezeptor mit einer metabolischen Halbwertszeit von circa 30 Minuten konstitutiv internalisiert und schnell zur Zelloberfläche transportiert, was dazu führt, dass 80 - 90 % der Rezeptoren sich dauerhaft an der Zelloberfläche befinden [Sundvall *et al.* 2008]. Die Halbwertszeit eines EGF-Rezeptors einer Tumorzelle beträgt 20 Stunden, was bedeutet, dass jeder einzelne Rezeptor innerhalb seiner Lebenszeit vielfach den endozytotischen Weg durchläuft [Suo *et al.* 2002].

Eine erhöhte EGFR-Expression kann durch verschiedene Mechanismen in den Tumorzellen entstehen. Erstens über eine EGFR-Gen-Amplifikation, wobei vermutet wird, dass eine Gen-Amplifikation nicht pathogenetisch ausschlaggebend ist für die Überexpression des EGFR. Eine Amplifikation des EGFR-Gens wurde in 10 - 58 % aller Patienten mit HNSCC detektiert und wird als möglicher Indikator für eine schlechtere Überlebensrate, lokoregionäre Tumorausbreitung und Bestrahlungsresistenz genannt [Chung *et al.* 2006a, Mrhalova *et al.* 2005, Temam *et al.* 2007, Wheeler *et al.* 2012]. Zweitens kann der EGFR transkriptionell überproduziert werden. Es zeigte sich, dass Wild-Typ- und mutante p53-Proteine die Transkription durch eine spezifische Bindung des EGFR-Promoters direkt beeinflussen. Durch diese Bindung resultiert eine starke und kontinuierliche Aktivierung des EGFR-Promoters und dadurch eine erhöhte Rezeptor-Expression [Ludes-Meyers *et al.* 1996, Rodrigo *et al.* 1996, Sheikh *et al.* 1997, Zandi *et al.* 2007]. Ebenfalls kann durch ein posttranslationales Recycling eine erhöhte EGFR-Expression hervorgerufen werden [Johnston *et al.* 1999]. Beispielsweise zeigten laryngeale Papillom-Zellen, welche benigne epitheliale Tumore verursachen, nach Infektion mit dem humanen Papillom-Virus (HPV) und einer Stimulation mit EGF erhöhte EGFR-Level, vermutlich infolge eines gesteigerten Recyclings [Johnston *et al.* 1999]. Das Phosphorylierungslevel des EGFR beruht auf dem Gleichgewicht zwischen dem EGFR-Status und der inhibierend wirkenden Phosphatasen-Aktivität. Sobald EGFR überexprimiert ist, übersteigt das Phosphorylierungsniveau der vorhandenen EGFR die Kapazität der Phosphatasen, so dass resultierend eine erhöhte Aktivität des EGFR auch in Abwesenheit eines Liganden vorliegt [Knebel *et al.* 1996, Purba *et al.* 2017].

Erhöhte Ligandenproduktion durch autokrine/parakrine Ligandenexpression

Davon abgesehen existiert in Tumorzellen sehr häufig eine gesteigerte Produktion der EGFR-Liganden. Die Dysregulation des Rezeptors durch auto- und/oder parakrine Stimulation hat weitreichende Konsequenzen [Grandis *et al.* 1998a, Salomon *et al.* 1995, Umekita *et al.* 2000] (siehe 1.3). Beispielsweise ist eine TGF α -Überproduktion mit einer hyperproliferativen Antwort verbunden, führt aber nicht immer zur malignen Transformation in murinen Versuchen. Sogar in transgenen Modellen, bei denen TGF α -assoziierte Tumore beobachtet wurden, waren die Latenzperiode lang und die Inzidenz niedrig. Eine zelluläre Transformation scheint sowohl von der EGFR-Expression als auch von der Art und Konzentration der EGFR-Liganden abhängig zu sein. Die hochexprimierten Liganden stellen alleine nur eine schwache, transformierende Kraft in Zellen mit moderater EGFR-Expression dar [Rosenthal *et al.* 1986]. Neben alledem findet eine neoplastische Transformation nur statt, wenn ebenso der Genpool anderer Zellen innerhalb des betroffenen Gewebes mutiert sind. Dies lässt vermuten, dass die TGF α -

vermittelte EGFR-Stimulation nur einen einzelnen Schritt in der Mehrschritt-Kanzerogenese darstellt [Jorissen *et al.* 2003, Zandi *et al.* 2007].

Transaktivierung des EGF-Rezeptors

Eine vermehrte Abspaltung der Liganden-Vorläuferproteine durch Proteasen von der Zelloberfläche verursacht ebenso eine erhöhte Verfügbarkeit an Liganden [Adrain *et al.* 2014, Gullick 1991, Salomon *et al.* 1995]. Dieser Schritt erfolgt als Antwort auf diverse Stimuli, unter anderem auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, was wiederum als Transaktivierung des EGFR bezeichnet wird [Daub *et al.* 1996]. EGFR wird als Antwort auf eine Vielzahl von physikalischen Stimuli transaktiviert. Dazu gehören osmotischer Stress, oxidativer Stress, UV-Strahlung und viele mehr [Fischer *et al.* 2004, McCole *et al.* 2002, Singh *et al.* 2009].

Konstitutiv aktivierte Mutanten des EGF-Rezeptors

Manche Tumore exprimieren Liganden-unabhängige Isoformen des EGFR, wie beispielsweise die konstitutiv aktive tumorspezifische Isoform EGFR vIII, die ausschließlich von Tumorzellen exprimiert wird und in mehreren Karzinomtypen, wie beispielsweise der Lunge, der Brust und der Prostata nachgewiesen werden konnte [Kuan *et al.* 2001, Voldborg *et al.* 1997]. Das Protein EGFR vIII – auch bekannt als de2-7 EGFR oder D2-7EGFR – entsteht durch Deletion des Exons 2-7, welches Subdomäne I und zwei Drittel der Subdomäne II des EGFR kodiert [Wong *et al.* 1992]. EGFR vIII ist in der Folge konstitutiv ohne Ligandenbindung phosphoryliert, aktiviert den PI3K-Akt Signalweg oder den Ras-Raf-Mek-Erk-Signalweg und verlängert durch fehlende Ubiquitylierung die Signaldauer [Grandal *et al.* 2007, Pedersen *et al.* 2005, Zandi *et al.* 2007]. Das Vorkommen dieser karzinomspezifischen Mutante in HNSCC scheint umstritten. Die Häufigkeit variiert in klinischen Studien von 0 % [Hama *et al.* 2009, Khattri *et al.* 2015] bis 42 % [Chau *et al.* 2011, Sok *et al.* 2006]. Sok *et al.* fanden in bis zu 42 % der 33 untersuchten HNSCC-Tumore EGFR vIII, die dadurch zwar eine vielversprechende Angriffsstelle für eine targeted-Therapie bieten, allerdings wird auch eine Resistenz gegenüber Cetuximab sowie Cisplatin beschrieben [Sok *et al.* 2006].

Weitere Mutationen im EGFR-Gen sind in humanen Karzinomzelllinien nachweisbar, bei denen eine Deletion, eine Sequenzduplikation oder ein defektes regulatorisches Kinase-Signal als Ursache einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors detektiert wurden [Agrawal *et al.* 2011, Jorissen *et al.* 2003, Purba *et al.* 2017]. Die molekularen Mechanismen der EGFR-Aktivierung erklären, wie onkogene Mutationen zu einer spontanen Aktivierung des Rezeptors führen. Dies erfolgt in Abwesenheit eines

gebundenen Liganden und/oder durch die Mutation ohne Rezeptor-Dimerisierung. Viele der Mutationen destabilisieren die symmetrische inaktive dimere Struktur der intrazellulären Domäne und sorgen für deren Reorientierung in eine asymmetrische aktive dimere Konfiguration [Purba *et al.* 2017].

Aktivierung durch heterologe Rezeptorsysteme

Der Rezeptor ErbB2 ist in 3 - 29 %, der ErbB3 in 21 % und der ErbB4 in 26 % des HNSCC überexprimiert, wobei in den meisten Fällen zwei oder mehr der Rezeptoren simultan stark exprimiert sind, was eine Heterodimerisierung der Rezeptoren vereinfacht [Bei *et al.* 2004, Bei *et al.* 2001]. Eine gleichzeitige Überexpression verschiedener ErbB-Rezeptoren zeigt, verglichen mit der Expression eines Rezeptors bei Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen, ein schlechteres klinisches Outcome [Xia *et al.* 1999]. Eine Überexpression des ErbB2 tritt bei einer Vielzahl von Karzinomtypen auf und verschiebt das Gleichgewicht der EGFR-Dimere hin zu EGFR/ErbB2-Heterodimeren [Worthylake *et al.* 1999]. Anders als ein durch Liganden aktivierter EGF-Rezeptor wird ein aktivierter ErbB2-Rezeptor nicht durch Endozytose deaktiviert und verhindert in Folge bei einer Heterodimerisierung zusammen mit EGFR die Dämpfung des EGFR-Signals [Haslekas *et al.* 2005, Wang *et al.* 1999, Worthylake *et al.* 1999]. Dieser Umstand könnte ebenso eine Erklärung für ein erhöhtes Expressionslevel von EGFR an der Oberfläche von Karzinomzellen sein.

Veränderte karzinogene Signaltransduktion beim HNSCC

Eine erhöhte Expression von EGFR korreliert mit einer fortgeschrittenen Tumorgroße und einem höheren Tumorstadium [Santini *et al.* 1991, Todd *et al.* 1989]. Eine Aktivierung des EGFR ist assoziiert mit einer verstärkten Sekretion des VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), einem wichtigen Stimulator der Tumor-Angiogenese [Petit *et al.* 1997]. Zudem spielt der EGFR nicht nur eine wichtige Rolle in Tumorzellen des HNSCC, sondern auch im Tumorstroma, wodurch eine unterstützende Umgebung für ein Tumorwachstum geschaffen wird [Kalyankrishna *et al.* 2006]. Eine vermehrte Expression des EGF-Rezeptors wird auch in normalem, an den Tumor angrenzenden Epithel nachgewiesen, was die Hypothese der Feldkanzerisierung untermauert [Grandis *et al.* 1993]. Die EGFR-Expression unterscheidet sich auch nach anatomischer Lage des Karzinoms: in laryngealen Tumoren war die Expression niedriger, verglichen mit Malignomen des Pharynx oder der Mundhöhle [Takes *et al.* 1998]. Im Allgemeinen korrelieren hohe Expressionslevel von EGFR oder des Liganden TGF- α mit einer schlechten Prognose: Patienten zeigen ein fortgeschrittenes Tumorstadium, eine schnellere Metastasierung in Lymphknoten, ein reduziertes rezidiv-freies Überleben, eine hohe lokale Rekurrenz und

ein vermindertes Gesamtüberleben [Ang *et al.* 2002, Chung *et al.* 2006b, Grandis *et al.* 1998b, Grandis *et al.* 1993, Psyrri *et al.* 2005].

Eine Serie genetischer Veränderungen beeinflusst Schlüsselmoleküle und biologische Signalwege in der Karzinogenese des HNSCC [Agrawal *et al.* 2011, Gold *et al.* 2009, Stransky *et al.* 2011]. Trotz der großen Komplexität der genetischen Veränderungen beim HNSCC fallen die meisten auf wenige, bedeutende Signalwege zurück. In fortgeschrittenen Stadien können Tumore gleichzeitig genomische Veränderungen in mehr als nur einer Komponente des Signalweges aufweisen. [Iglesias-Bartolome *et al.* 2013, Lui *et al.* 2013] Die meisten genetischen Veränderungen betreffen die folgenden vier Einflussfaktoren der biologischen Prozesse. Einerseits den mitogenen Signalweg mit Schwerpunkt auf der fehlerhaften Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges. Das HNSCC besitzt dabei mit 30 - 50 % die höchste Inzidenz bezüglich der Alterationen dieses Signalweges unter allen soliden Malignomen [Iglesias-Bartolome *et al.* 2013, Lui *et al.* 2013, Seiwert *et al.* 2015]. Eine fehlerhafte Zelldifferenzierung sowie eine mit 94 % fast universal auftretende Dysregulation des Zellzyklus existieren als weitere veränderte Prozesse beim HNSCC. Zudem existiert eine genomische Instabilität durch den Verlust von TP53 und anderer Gene, welche an der DNA- Fehlerdetektion und -Reparatur beteiligt sind [Iglesias-Bartolome *et al.* 2013, Pickering *et al.* 2013].

Die autokrine Aktivierung des EGFR ist eine frühe Veränderung in der Entwicklung des HNSCC [Grandis *et al.* 2000] und dessen Überexpression ist mittlerweile ein etablierter negativer prognostischer Marker [Keck *et al.* 2015, Kong *et al.* 2009]. Nachgeschaltete Effektoren des EGFR, wie beispielsweise ERK1/2, AKT oder STAT3, sind beim HNSCC aktiviert [Grandis *et al.* 2000, Kalyankrishna *et al.* 2006, Molinolo *et al.* 2007, Mriouah *et al.* 2010]. In mehr als 80 % der HNSCC-Fälle ist der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, unabhängig vom HPV-Status, der am meisten aktivierte Signalweg [Amornphimoltham *et al.* 2005, Goessel *et al.* 2005, Molinolo *et al.* 2007, Molinolo *et al.* 2012]. Zusätzlich spielt der PI3K-Signalweg in der erworbenen Resistenz bei der anti-karzinogenen Therapie eine Rolle [Burriss 2013]. Auffälligerweise korreliert eine Mutation im PI3K-Signalweg mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, was einen Zusammenhang mit der Tumorprogression nahelegt [Lui *et al.* 2013].

1.3 Liganden des EGF-Rezeptors

Die EGFR-Liganden initiieren, sowohl in Zellkultur als auch *in vivo*, divergierende biologische Antworten. Diese funktionelle Selektivität der Liganden ist auf Unterschiede in der Konformation des Rezeptor-Liganden-Komplexes und folglich auf Abweichungen des

Phosphorylierungsstatus, in der Dimerisierung der Rezeptoren, bis hin zu unterschiedlich aktivierten Signaleffektoren, zurückzuführen [Wilson *et al.* 2009] (siehe 1.2.4).

1.3.1 Allgemein

Der humane EGF-Rezeptor wird durch mindestens sieben verschiedene aktivierende Liganden reguliert, die für unterschiedliche biologische Effekte in derselben Zelle verantwortlich sind:

- *Epidermal growth factor* (EGF) selbst
- *Transforming growth factor alpha* (TGF α)
- *Epiregulin* (EREG)
- *Amphiregulin* (AREG)
- *Betacellulin* (BTC)
- *Heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF)
- und *Epigen* (EGN)

[Harris *et al.* 2003, Higashiyama *et al.* 1992, Massague 1990, Schneider *et al.* 2009, Shoyab *et al.* 1988, Strachan *et al.* 2001, Toyoda *et al.* 1995, Wilson *et al.* 2009]

Diese sieben Liganden können ebenso auf Basis ihrer Affinität zum EGF-Rezeptor unterteilt werden: die Liganden EGF, HB-EGF, TGF α und BTC weisen eine hohe Affinität für den EGFR auf, wohingegen EGN, AREG und EREG eine zehnfach bis hundertfach niedrigere Affinität besitzen [Jones *et al.* 1999, Wilson *et al.* 2009]. Abbildung 5 verdeutlicht den strukturellen Aufbau der EGFR-Liganden. Jeder einzelne Ligand besitzt als zentralen, strukturellen und funktionellen Abschnitt eine EGF-ähnliche Domäne, die für die Bindung und Aktivierung des Rezeptors verantwortlich ist. Die EGF-ähnlichen Domänen sind nicht begrenzt auf die Liganden des EGFR, sondern sind in einfacher oder mehrfacher Kopie in einer Vielzahl von strukturell und funktionell nicht verwandten Proteinen, wie beispielsweise in Proteinen der extrazellulären Matrix, in Zelladhäsionsproteinen, in Blutgerinnungsfaktoren und in Proteinen der Immunantwort zu finden [Davis 1990, Engel 1989]. Daneben besteht jeder Ligand aus einem N-terminalen Ende, einem kurzen juxtamembranen Abschnitt, einer hydrophoben transmembranösen Domäne sowie einem Carboxy-terminalen Fragment, welches auch als cytoplasmatischer Schwanz bezeichnet wird [Harris *et al.* 2003].

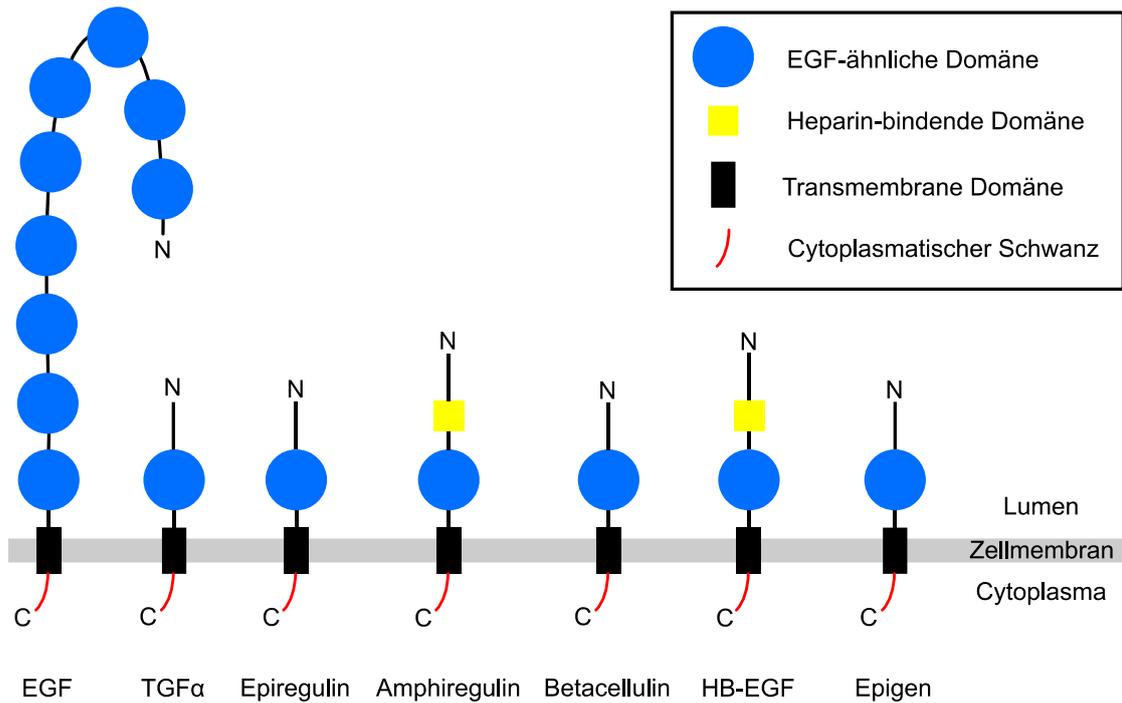


Abbildung 5: Struktureller Aufbau der EGFR- Liganden nach [Adrain *et al.* 2014, Schneider *et al.* 2009]

Die Peptid-Liganden werden durch verschiedene Gene codiert. Sie weisen Unterschiede in der Rezeptoraffinität auf und entfalten eine außerordentliche Rezeptorbindungs-Spezifität [Wilson *et al.* 2009]. Die EGFR-Liganden werden als membrangebundene Vorläuferproteine produziert [Harris *et al.* 2003], werden durch Proteasen an der Zelloberfläche gespalten, posttranslational modifiziert, um resultierend den Charakter des aktiven, gelösten Wachstumsfaktors zu erhalten [Adrain *et al.* 2014]. Die Verfügbarkeit der Liganden kann dabei auf drei verschiedenen Ebenen reguliert werden: Erstens auf transkriptioneller Ebene durch die Bindung von Aktivatoren und Repressoren an verschiedenen Regionen der Promotoren der Liganden-Gene. Zweitens auf posttranskriptionellem Level durch eine Modulation der mRNA-Stabilität und zuletzt auf posttranslationaler Ebene durch kovalente Modifikationen sowie durch die Regulation der Abspaltung der Liganden und deren Verteilung [Berasain *et al.* 2014, Harris *et al.* 2003].

Die gelösten EGFR-Liganden agieren, binden und aktivieren Rezeptoren über kurze Distanzen entweder an der Ursprungszelle (autokriner Signalweg), an den benachbarten Zellen (parakriner Signalweg) oder über eine systemische Freisetzung an weiter entfernten Zellen (endokriner Signalweg). Eine Abspaltung des Wachstumsfaktors ist unerlässlich [Dong *et al.* 1999]. Die Liganden agieren meist über den parakrinen oder autokrinen Signalweg [Harris *et al.* 2003]. Manche Wachstumsfaktoren wie TGF α und AREG sind nicht nur in ihrer gelösten Form aktiv, sondern auch in ihrer Form als transmembranöses Vorläufer-Molekül an angrenzenden Zellen über einen juxtakrinen

Signalweg [Anklesaria *et al.* 1990, Harris *et al.* 2003, Inui *et al.* 1997]. Bei dieser interzellulären Interaktion wird ein anderes biologisches Ergebnis der Zelle ausgelöst, im Vergleich mit dem Ergebnis der gelösten Wachstumsfaktoren [Singh *et al.* 2005, Singh *et al.* 2004]. Manche EGFR-Liganden, beispielsweise AREG und TGF α , können auch in extrazelluläre Vesikel, sogenannten Exosomen, verpackt werden und folglich über einen extrakrinen (*exosomal targeted receptor activation*) Signalmodus agieren [Cao *et al.* 2008, Higginbotham *et al.* 2011, Singh *et al.* 2014b].

Wachstumsfaktoren bevorzugen die *untethered* Konformation des EGFR und stabilisieren dadurch den Rezeptor in der Konformation, welche die Dimerisierung durch den exponierten Dimerisierungsarm begünstigt [Li *et al.* 2005]. Beim HNSCC geht die Überexpression von EGFR einher mit einer aberranten autokrinen Produktion von EGFR-Liganden, wie beispielsweise dem EGF, dem TGF α , dem AREG und dem EREG [O. Charoenrat *et al.* 2000a, Schneider *et al.* 2009]. Durch ein Netzwerk der autokrinen Stimulation können Karzinomzellen der externen Wachstumskontrolle entfliehen [Awwad *et al.* 2003]. Im Folgenden werden die einzelnen EGFR-Liganden näher charakterisiert, sofern diese für den experimentellen Teil der Arbeit relevant sind.

1.3.2 Epidermal Growth Factor (EGF)

Der humane *Epidermal Growth Factor* ist ein Einzelstrang-Polypeptid, bestehend aus 53 Aminosäuren [Ullrich *et al.* 1984], entsteht durch die Abspaltung eines langen Vorläuferproteins, dem sogenannten prepro-EGF, und ist als bioaktives EGF-Protein ungefähr 6 kDa schwer [Dempsey *et al.* 1997]. Der EGF ist als Protein unter den Liganden einzigartig, da er im Ganzen neun hintereinander folgende EGF-Domänen besitzt, wobei nur die erste als EGFR-Bindungsdomäne fungieren kann [Harris *et al.* 2003]. Sowohl prepro-EGF als auch EGF sind in einer Vielzahl von Geweben durch Rezeptorbindung am EGFR biologisch aktiv [Kwan *et al.* 1999]. Der EGF verfügt über zwei Rezeptor-Bindungsstellen am EGF-Rezeptor [Lin *et al.* 1986]: eine hochaffine spezifische Bindungsstelle ($K_D = 10\text{-}50$ pM) sowie eine weniger affine und weniger spezifische Bindungsstelle ($K_D = 1\text{-}2$ nM). Der Rezeptor-vermittelte Mechanismus der EGFR-Dimerisierung funktioniert für EGF sowie für TGF α [Schlessinger 2002] durch die Bindung des N-Terminus an die L1 Domäne des EGF-Rezeptors [Garrett *et al.* 2002, Ogiso *et al.* 2002].

Das Protein EGF ist physiologisch in relativ wenigen adulten Geweben vorhanden, unter anderem in den Submandibular-Drüsen, in exokrinen Drüsen des Gastrointestinaltraktes und in serösen Azini des Nasenraums [Harris *et al.* 2003]. Der EGF fungiert als Initiator der epithelialen Migration, der zellulären Differenzierung und als Mitogen. Aktuelle

Forschung beschreibt, dass HNSCC-Zellen im Gewebe zunächst Monozyten rekrutieren und diese in Makrophagen umwandeln, welche unter anderem EGF sezernieren. Diese Makrophagen erleichtern durch die Ausbildung subzellulärer Pseudopodien an der Plasmamembran die Zerstörung der extrazellulären Matrix. Über diesen parakrinen Mechanismus zwischen den HNSCC-Zellen und den Makrophagen, der abhängig von EGF ist, findet eine Zellmigration und lokale Invasion statt. [Gao *et al.* 2016, Zeng *et al.* 2014]. Sowohl EGF als auch TGF α , besitzen angiogenetische Aktivität [Fox *et al.* 1996].

1.3.3 Transforming Growth Factor alpha (TGF α)

Der TGF α wurde als Komponente des *Sarcoma growth factor* von retroviral transformierten Fibroblasten als zweiter EGFR-Ligand, neben EGF, im Jahr 1978 identifiziert [de Larco *et al.* 1978]. Dieser ist einer der meist untersuchten EGFR-Liganden [Singh *et al.* 2014a] im HNSCC und wird sowohl mit der Karzinogenese als auch mit der zellulären Proliferation des HNSCC in Zusammenhang gebracht [Grandis *et al.* 1998a, Grandis *et al.* 1993, Song *et al.* 2001]. Der TGF α wird als wichtigster Ligand für die Regulation der Aktivität des EGFR bezeichnet [Herbst *et al.* 2002]. Neben TGF α existiert ein zweites Peptid mit einer transformierenden Wachstumsfaktor-Aktivität, TGF β . Dieses fungiert, im Gegensatz zu TGF α , an epithelialen Zellen als Wachstumsinhibitor [Roberts *et al.* 1983].

TGF α wird als 5,6 kDa großes Peptid freigesetzt und hinterlässt nach dessen Abspaltung einen 13 - 15 kDa großen Rest an der Zelloberfläche [Anklesaria *et al.* 1990, Dempsey *et al.* 1994]. Der N-Terminus von TGF α bindet, genauso wie EGF, an die L1-Domäne des EGF-Rezeptors [Garrett *et al.* 2002, Ogiso *et al.* 2002]. Allerdings scheint es so, dass eine Liganden-spezifische Konformation in der extrazellulären Region des EGFR besteht. Studien konnten nachweisen, dass sich die Konformation der extrazellulären Subdomäne II zwischen dem EGFR-EGF-Komplex und dem EGFR-TGF α -Komplex minimal unterscheidet [Garrett *et al.* 2002, Harte *et al.* 1995, Ogiso *et al.* 2002]. Folglich führen der EGF und der TGF α zu einer unterschiedlichen räumlichen Verknüpfung der beiden EGFR-Monomere innerhalb des Rezeptor-Dimers [Dawson *et al.* 2005]. TGF α bindet mit einer niedrigeren Affinität an EGFR als EGF, dennoch ist TGF α in seiner Funktion wirksamer [Schreiber *et al.* 1986]. Die Eigenschaften des TGF α sind eine kurzzeitige Bindung, eine rasche Abspaltung sowie eine autokrine und parakrine Aktivität [Harris *et al.* 2003, McCole *et al.* 2002]. Eine Stimulation mit TGF α resultiert in einer geringen Phosphorylierung und Ubiquitylierung des EGF-Rezeptors und führt zu dessen Recycling [Roepstorff *et al.* 2009] (siehe 1.2.6).

Einleitung

TGF α wird von Gewebe ektodermalen Ursprungs produziert und wird, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, von Keratinozyten [Coffey *et al.* 1987] und durch epitheliale Zellen des Aerodigestivtrakts freigesetzt [Booth *et al.* 2001]. Neben der Rolle des TGF α in der Haut, der Brust, des Pankreas, der Hypophyse, der Leber, der bestehenden Stammzellen und des Augenepithels wurde dieser in Bronchial- sowie Kolonmukosa nachgewiesen. Die Zellen des Immunsystems produzieren ebenfalls TGF α [Booth *et al.* 2007, Dempsey *et al.* 1994, Harris *et al.* 2003]. TGF α ist durch die Aktivierung der EGFR Signalwege in einer Vielzahl von zellulären Signalwegen involviert, unter anderem an einer erhöhten Zellproliferation und Migration, sowohl in der Embryogenese als auch in der Organentwicklung, Wundheilung und Knochenresorption. Die Expression des TGF α ist durch die Transformation von normalen hin zu malignen Zellen nicht nur auf die Karzinomzellen beschränkt, sondern findet auch in normalen Epithelzellen statt. Die muköse Speichelproduktion sowie die Inhibition der Sekretion von Magensäure gehören ebenso zu Funktionen des TGF α [Coffey *et al.* 1987].

Bei einer erhöhten Expression fungiert TGF α als Onkogen und seine Dysregulation spielt eine kausale Rolle in verschiedenen epithelialen Karzinomen [Singh *et al.* 2014a]. TGF α hat dabei nicht nur die Rolle des epithelspezifischen autokrinen Mitogens, sondern agiert auch auf eine parakrine Weise und moduliert dadurch die Mikroumgebung des Tumors. Dies ermöglicht die Kommunikation zwischen dem Tumor und dem umgebenden Stroma sowie Immunsystem, wodurch die Metastasierung begünstigt wird [Booth *et al.* 2001, Sasaki *et al.* 2013, Sasaki *et al.* 2008]. Ebenso konnte eine konstitutive STAT3-Aktivierung bei Patienten mit HNSCC durch Signalwege des TGF α und EGFR nachgewiesen werden, wodurch STAT3 als Onkogen im Rahmen der Mehrschritt-Kanzerogenese des HNSCC bezeichnet werden kann [Song *et al.* 2000]. Die Expression des EGFR und seines Liganden TGF α ist ein früher Schritt in der Kanzerogenese des HNSCC [Grandis 2007, Grandis *et al.* 1993] und beide sind meist hochreguliert [Partridge *et al.* 1989, Yoshida *et al.* 1990]. Erhöhte Expressionslevel von EGFR und TGF α korrelieren beim HNSCC mit einer schlechten Prognose, einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schnelleren lymphogenen Metastasierung [Ang *et al.* 2002, Grandis *et al.* 1998b, Grandis *et al.* 1993, Jedlinski *et al.* 2013, Wheeler *et al.* 2012]. Ebenfalls konnte eine erhöhte Radioresistenz detektiert werden [Ang *et al.* 2002, Bentzen *et al.* 2005, Jedlinski *et al.* 2013]. Tabakrauch erhöht die Expression von TGF α , genauso wie von AREG, in oralen Epithelzellen [Du *et al.* 2005], was zu einer EGFR-Aktivierung führt und zu einer erhöhten Konzentration von Cyclooxygenase2 und Prostaglandin E2. Diese wiederum transaktivieren den EGFR [Kalyankrishna *et al.* 2006]. Präklinische Studien zeigen, dass eine Induktion von TGF α beim HNSCC die Signalwege des EGFR aufrechterhalten und eine Resistenz gegenüber

dem monoklonalen Antikörper Cetuximab begünstigen [Hatakeyama *et al.* 2010]. Ekblad *et al.* detektierten eine überwiegend wachstumsinhibierende Wirkung des TGF α auf Zelllinien des HNSCC in Abhängigkeit vom präklinischen Zellkulturmodell [Ekblad *et al.* 2015].

1.3.4 Epiregulin (EREG)

Der Ligand Epiregulin ist ein aus 46 Aminosäuren bestehendes Peptid und die strukturelle Organisation ähnelt stark der von TGF α [Conti *et al.* 2006, Toyoda *et al.* 1995]. Ebenso wie die anderen EGFR-Liganden wird Epiregulin durch die ADAM-Enzyme von einer transmembranen Proform des Proteins von der Zelloberfläche gespalten. Epiregulin bindet als bispezifischer Ligand neben EGFR auch ErbB4 und aktiviert beide Rezeptoren, allerdings schwächer als EGF [Hynes *et al.* 2005, Toyoda *et al.* 1995, Wilson *et al.* 2009]. Epiregulin gilt, verglichen mit EGF als effizienter Stimulus für die Zellproliferation und die DNA-Synthese, womöglich durch eine verlängerte EGFR-Phosphorylierung und die Aktivität der MAP-Kinase. Es ist ein autokriner Wachstumsfaktor in normalen humanen Keratinozyten und die Expression im adulten Gewebe ist begrenzt, mit einer niedrigen Expression in der Epidermis, im Kolon, in der Lunge und in den peripheren Blut-Makrophagen [Lukk *et al.* 2010, Shirakata *et al.* 2000, Toyoda *et al.* 1997].

Epiregulin hat eine Vielzahl von Funktionen, sowohl in der normalen Physiologie als auch in pathologischen Gegebenheiten. Es zeigt duale biologische Aktivität, indem es einerseits die Proliferation von Fibroblasten, Hepatozyten, glatten Muskelzellen und Keratinozyten stimuliert und andererseits das Wachstum verschiedener Karzinomzelllinien inhibiert [Lee *et al.* 2004, Riese *et al.* 2014, Toyoda *et al.* 1997, Toyoda *et al.* 1995]. Neben *Platelet-derived Growth Factor A* sind Epiregulin und Amphiregulin die Liganden des AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) [John *et al.* 2014], welcher eine Transkription des Epiregulin auch in HNSCC-Zelllinien stimuliert [John *et al.* 2014, Patel *et al.* 2006]. Eine Inhibition der EREG-Sekretion konnte durch einen AHR-Antagonisten bei ausgewählten HNSCC-Zelllinien erzielt werden [John *et al.* 2014]. Der Ligand Epiregulin scheint die Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen des Atmungstraktes, vor allem unter pathologischen Bedingungen, zu regulieren. Normale humane Fibroblasten der Lunge exprimieren Epiregulin und induzieren darüberliegende Zellen zur epithelialen Differenzierung über einen parakrinen oder juxtakrinen EGFR-Signalmechanismus [Vermeer *et al.* 2006]. Das Differenzierungsprogramm humaner Epithelzellen kann somit verändert werden, beispielsweise durch die Exposition gegenüber polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, über eine Stimulation der Epiregulin-Expression und über EGFR-Signalwege [Patel *et al.* 2006]. Dies konnte auch in HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden [John *et al.* 2014, Patel *et*

et al. 2006]. Die Expression von Epiregulin ist in oralen Plattenepithelkarzinomen höher als in normaler Gingiva oder oralen Epitheldysplasien. Ebenso korreliert die Tumorgroße mit der Expression des Epiregulin und bei höheren Tumorstadien konnte eine erhöhte Konzentration von Epiregulin detektiert werden. Diese Tatsachen legen bei steigender Epiregulin-Expression eine vermehrte Aggressivität des Tumors sowie ein schlechteres klinisches Outcome der Patienten nahe [Shigeishi *et al.* 2008]. Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen legen eine Abhängigkeit der Wirksamkeit einer Therapie mit dem monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab von der Expression von EREG und AREG nahe. Der Grad der peritherapeutischen Hautreaktion wird ebenfalls mit der Konzentration von EREG und AREG korreliert. Ein niedriges Serumlevel ist indirekt proportional zu der entwickelten Hauttoxizität der Patienten [Jacobs *et al.* 2009, Khambata-Ford *et al.* 2007, Takahashi *et al.* 2015].

1.3.5 Amphiregulin (AREG)

Der Ligand Amphiregulin wurde als EGFR-Ligand erstmals in einer humanen Adenokarzinom-Zelllinie der Brust identifiziert [Plowman *et al.* 1990, Shoyab *et al.* 1988]. Die Expression, Transkription und Freisetzung des AREG werden durch eine Vielzahl von Stimuli induziert, unter anderem durch Entzündungsfaktoren [Shao *et al.* 2003], durch Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren [Ornskov *et al.* 2006, Qin *et al.* 2005b], Tabakrauch [Du *et al.* 2005] und durch Xenobiotika [Blanchet *et al.* 2004]. Ein autostimulatorischer Feedback-Mechanismus durch AREG selbst am EGF-Rezeptor oder durch andere Mitglieder der EGF-Familie wird für epitheliale Zellen beschrieben [Barnard *et al.* 1994, Willmarth *et al.* 2006].

Das vollständige Amphiregulin besteht nach proteolytischer Spaltung durch ADAM-17 aus 78 - 84 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 43 kDa [Brown *et al.* 1998, Sahin *et al.* 2004]. AREG enthält proximal zur EGF-ähnlichen Domäne eine Heparin-bindende Domäne. Diese ermöglicht eine Interaktion mit Heparin und Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix [Higashiyama *et al.* 1991]. Hieraus resultiert eine limitierte Diffusion des AREG, wodurch seine lokale Konzentration erhöht wird [Brown *et al.* 1998, Piepkorn *et al.* 1998]. Gebundenes Amphiregulin am EGFR ist, verglichen mit allen anderen EGFR-Liganden, der schnellste von der Zelloberfläche internalisierte Komplex [Singh *et al.* 2014b]. Es kann über einen juxtakrinen Signalweg membranverankert an benachbarten Zellen agieren [Inui *et al.* 1997, Willmarth *et al.* 2006], allerdings überwiegt der autokrine oder der parakrine Signalweg. Eine sogenannte extrakrine Wirkung über Exosomen wurde nachgewiesen [Cao *et al.* 2008, Higginbotham *et al.* 2011, Singh *et al.* 2014b]. Das AREG bindet genauso wie EGF und TGF α spezifisch nur an den EGFR [Hynes *et al.* 2005],

allerdings ist die Bindungsaffinität von Amphiregulin mehrfach niedriger [Neelam *et al.* 1998, Shoyab *et al.* 1989, Thompson *et al.* 1996]. EGF und AREG teilen sich eine gemeinsame Bindungsstelle am EGFR [Johnson *et al.* 1993, Shoyab *et al.* 1989] und es scheint, als sei EGF ein partieller Antagonist von AREG [Wilson *et al.* 2012]. Durch Bindung an den EGFR kann über eine Dimerisierung eine Aktivierung von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 stattfinden [Riese *et al.* 1998, Yotsumoto *et al.* 2010], wodurch viele intrazelluläre Signalwege aktiviert werden [Busser *et al.* 2011]. Die Bindung von AREG führt bei der Inaktivierung des Komplexes überwiegend zum langsamen Recycling des Rezeptors [Baldys *et al.* 2009, Roepstorff *et al.* 2009, Stern *et al.* 2008], was verbunden ist mit einer schwächeren und kürzeren EGFR-Phosphorylierung [Roepstorff *et al.* 2009]. Die veränderte Dynamik der Degradation und des Recyclings des Rezeptors, verglichen mit anderen Liganden, hat einen Einfluss auf die folgenden Signalkaskaden [Andreu-Perez *et al.* 2011].

Physiologisch moduliert Amphiregulin die Zellproliferation, die Apoptose und die Migration von Epithelzellen, Fibroblasten und Immunzellen. Eine physiologische Expression von AREG wurde in Plazenta, Eierstöcken, Hoden, Herz, Pankreas, Knochenmark, Milz, Blut, Niere, Lunge und Brust detektiert [Peterson *et al.* 2012, Plowman *et al.* 1990]. AREG ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt [Schneider *et al.* 2009]. AREG gilt als potenter Wachstumsfaktor für Prä-Osteoblasten und reguliert die finale Knochenmasse [Qin *et al.* 2005a, Qin *et al.* 2003, Qin *et al.* 2005b, Zhu *et al.* 2012]. Eine chronisch erhöhte Expression des AREG ist mit entzündlichen, auto-immunen und neoplastischen Erkrankungen assoziiert. Tabakrauch und Feinstaub erhöhen die Expression von AREG in oralen Epithelzellen [Du *et al.* 2005, Val *et al.* 2012]. TGF α und AREG sind in der oralen Mukosa von Rauchern erhöht [Moraitis *et al.* 2005]. AREG ist in einer Vielzahl von Malignomen überexprimiert, unter anderem in Karzinomen der Brust, der Lunge, der Leber, der Prostata, der Blase [Busser *et al.* 2011] und des Aerodigestivtraktes [Fontanini *et al.* 1998, Saeki *et al.* 1995], wobei es als Onkogen fungiert [Du *et al.* 2005, Hanahan *et al.* 2011, Shao *et al.* 2003].

Analog zu Epiregulin ist die Expression des Amphiregulin in oralen Plattenepithelkarzinomen, im Vergleich zu normaler Gingiva oder oralen Epitheldysplasien, erhöht [Shigeishi *et al.* 2008]. Cao *et al.* fanden heraus, dass Amphiregulin über den exosomalen Signalweg im Vergleich zu TGF α fünffach potenter ist, eine Invasivität der stimulierten Tumorzelle voranzutreiben [Cao *et al.* 2008]. Amphiregulin wird überwiegend im Zytoplasma und/oder im Nukleus der Tumorzellen detektiert [Ebert *et al.* 1994, Ishikawa *et al.* 2005]. Es begünstigt im Tiermodell die Proliferation von Fibroblasten, Tumorzellen und epidermalen Keratinozyten, inhibiert allerdings das

Wachstum von normalen und neoplastischen Zelllinien. Eine durch Amphiregulin vermittelte autokrine Aktivierungsschleife in Karzinomen wurde auch für HNSCC nachgewiesen [Castillo *et al.* 2006, Funatomi *et al.* 1997, Plowman *et al.* 1990, Wen *et al.* 2016]. In Versuchen mit Karzinomzellen stimuliert AREG eine vermehrte Motilität und eine verstärkte Invasivität [Willmarth *et al.* 2006]. Eine vermehrte Abspaltung von TGF α und AREG wurde in Epithelzellen des Aerodigestivtraktes [Blanchet *et al.* 2004, Chokki *et al.* 2005] und in HNSCC-Zelllinien gezeigt [Zhang *et al.* 2004], wobei die Aktivität von ERK, beziehungsweise MAPK1, ausschlaggebend war [Gusenbauer *et al.* 2015]. Eine erhöhte Sekretion von AREG in HNSCC wirkt sich kritisch auf eine EGFR-Transaktivierung und dessen Kommunikation aus [Zhang *et al.* 2004]. AREG überexprimierende NSCLC- und HNSCC-Zelllinien sind, verglichen mit Zellen, die ein niedriges Expressionslevel an AREG besitzen, sensibler gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren und Cetuximab [Chang *et al.* 2011, Wen *et al.* 2016, Yonesaka *et al.* 2008]. TGF α und AREG stimulieren die Aggressivität der Tumorzellen und deren Chemoresistenz [Zhang *et al.* 2004], wohingegen EGF dies in einem geringeren Ausmaß tut oder sogar die Wirkung von TGF α und AREG antagonisiert [Wilson *et al.* 2012, Yonesaka *et al.* 2008].

1.4 Inhibitoren des EGF-Rezeptors

Die zentrale Rolle des EGFR-Netzwerks in der Entwicklung von humanen Tumoren, die Möglichkeit der gezielten Manipulation sowie ein detailliertes Verständnis der zugrundeliegenden Biochemie haben das EGFR-Netzwerk zum Ziel pharmakologischer Interventionen gemacht. Mehrere pharmazeutische Substanzen, welche EGFR targetieren, wurden in den letzten Jahren entwickelt und in der Therapie des HNSCC zugelassen [Bonner *et al.* 2010]. Bis dato existieren zwei Hauptmechanismen, über welche die Aktivierung und Signaltransduktion des EGF-Rezeptors selektiv inhibiert werden können [Hynes *et al.* 2005, Reuter *et al.* 2007, Zandi *et al.* 2007]:

- Kleinmolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), die intrazellulär mit ATP um die Tyrosinkinase-Domäne konkurrieren, wie beispielsweise Erlotinib, Gefitinib und Lapatinib
- Monoklonale Antikörper (MAb, *Monoclonal Antibody*), die an die extrazelluläre Domäne des EGFR binden, wie beispielsweise Cetuximab und Panitumumab

[Lemmon *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2007]

Weitere Mechanismen zur Inhibition von EGFR-Signalwegen im HNSCC inhibieren den Transport zur Zellmembran oder die EGFR-Proteinsynthese durch Antisense Oligonukleotide oder kleine RNA-Moleküle [Herbst *et al.* 2002, Reuter *et al.* 2007]. Aktuell

zeigen viele andere Substanzen, wie beispielsweise Immunkonjugate, Peptide, Nanobodies und Affibodies, die Fähigkeit zur EGFR-Inhibition [Yewale *et al.* 2013]. Darüber hinaus wurden Agentien zur dualen Inhibition des EGFR entwickelt, die, sowohl auf die innere als auch auf die äußere Domäne des EGFR abzielen [Blumenberg 2014]. Präklinische Studien zeigen, dass die gleichzeitige Gabe von Erlotinib beziehungsweise Gefitinib und Cetuximab Zellproliferation und Tumorwachstum sogar in Cetuximab-resistenten Modellen inhibiert [Huang *et al.* 2004, Matar *et al.* 2004]. Der Beweis der klinischen Wirksamkeit dieser neueren Therapieansätze steht jedoch noch aus.

In präklinischen Modellen führte die Behandlung von Tumorzellen mit ErbB-gerichteten Tyrosinkinaseinhibitoren und Antikörpern zu einer schnellen Inhibition des Akt-, Src-, MAPK-Signalwegs sowie zur Inhibition bei Signaltransduktoren und Aktivatoren des STAT-Signalwegs. Dadurch wird die Proliferation der Tumorzellen reduziert [Hynes *et al.* 2005]. Nichtsdestotrotz sind zelluläre Antworten auf die Inhibition des EGFR heterogen. Die Sensitivität verschiedener Zelllinien stellte sich als sehr variabel heraus [Bishop *et al.* 2002]. Obwohl die Mehrheit der HNSCC den EGF-Rezeptor überexprimieren ist die klinische Wirksamkeit einer Anti-EGFR-Therapie mitunter nur wenig effektiv [Egloff *et al.* 2009].

1.4.1 Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)

Tyrosinkinaseinhibitoren sind niedrigmolekulare synthetische Substanzen, welche die intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors direkt hemmen, in dem die Autophosphorylierung der Tyrosinreste durch kompetitive Bindung an die intrazelluläre ATP-Bindungsstelle des Rezeptors reversibel verhindert wird. Resultierend wird die nachfolgende Signalkaskade und Aktivierung nachgeschalteter Proteine blockiert [Ciardiello *et al.* 2001, Denny 2002, Noonberg *et al.* 2000].

Gefitinib (Iressa™) und Erlotinib (Tarceva™) sind die am besten charakterisierten TKI. Beide sind zur Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms in der Drittlinientherapie (Gefitinib), beziehungsweise in der Zweit- und Drittlinientherapie (Erlotinib) zugelassen. In Kombination mit Gemcitabine erhalten Patienten mit lokal fortgeschrittenem, nicht-resezierbarem oder metastasiertem Pankreaskarzinom Erlotinib. Der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (Tykerb™) ist in Kombination mit Capecitabine für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Mamma-Karzinom in der Zweitlinientherapie zugelassen. Im Allgemeinen ist die Wirkung der einmal täglich oral eingenommenen TKI bei Patienten mit HNSCC nur gering [Arteaga 2003, Van Cutsem *et al.* 2008, Yewale *et al.* 2013].

1.4.2 Antikörper

Antikörper blockieren kompetitiv die Bindung der Liganden an den EGFR und verhindern dadurch die Aktivierung des Rezeptors und nachgeschalteter Signalwege [Bier *et al.* 1998, Garrett *et al.* 2002, Ogiso *et al.* 2002]. Durch Internalisierung des gebildeten EGFR-Antikörper-Komplexes wird dieser abgebaut. Abschließend findet eine potentielle Stimulation einer immunologischen Antwort durch die Rekrutierung von Makrophagen und Monozyten statt [Harari 2004, Hynes *et al.* 2005]. Cetuximab (ErbixTM) und Panitumumab (VectibixTM) sind die in Forschung und Klinik populärsten Antikörper [Yewale *et al.* 2013]. Panitumumab ist ein IgG2 monoklonaler Antikörper und wird in der Therapie von EGFR-überexprimierenden metastasierten kolorektalen Karzinomen eingesetzt. Er ist für die Therapie von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches nicht zugelassen [Jones *et al.* 2014, Sacco *et al.* 2015].

Cetuximab zeigte vielversprechende Ergebnisse in klinischen Studien und wurde von der FDA (*Food and Drug Administration*) für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen (CRC) sowie mit HNSCC zugelassen [Astsaturov *et al.* 2006, Wong 2005, Zandi *et al.* 2007].

Der Therapieeinsatz von Cetuximab erfolgt generell bei zwei Patientengruppen mit HNSCC. Bonner *et al.* konnten einen positiven Effekt des Cetuximab bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumorstadien (Stadium III und IV, nicht-metastasierter Tumor) in Kombination mit einer Bestrahlung nachweisen [Bonner *et al.* 2006, Bonner *et al.* 2010]. Die Cetuximab-Radiotherapie gilt als Alternative zu einer Platin-basierten Radio-Chemotherapie, vor allem für Patienten älter als 70 Jahre oder in einem schlechten allgemeinmedizinischen Zustand, die sich für die toxischere Behandlung mit Cisplatin nicht qualifizieren [Argiris *et al.* 2008, Bozec *et al.* 2009]. Die zweite Indikation sind Patienten mit einem rekurrenten oder metastasierten HNSCC, die Cetuximab in Kombination mit einer konventionellen Chemotherapie verabreicht bekommen [Herbst *et al.* 2005, Vermorken *et al.* 2008]. In den USA ist die Gabe von Cetuximab als Monotherapie für die Therapie von Patienten mit einem rekurrenten oder metastasierten, Platin-resistenten HNSCC zugelassen. Eine Zugabe von Cetuximab bei primärer Strahlentherapie oder palliativer Chemotherapie erhöht das Gesamtüberleben der Patienten [Bonner *et al.* 2006, Vermorken *et al.* 2008]. Bemerkenswert ist zudem, dass trotz des klinischen Nutzens keine Minderung der Lebensqualität eintritt. Die günstige Auswirkung zeigt sich hauptsächlich bei Patienten mit oropharyngealen Karzinomen, nicht in dem Maße bei Patienten mit laryngealen oder hypopharyngealen Karzinomen [Curran *et al.* 2007]. Im

Folgendes wird lediglich der für diese Arbeit relevante Antikörper Cetuximab genauer charakterisiert.

Aufbau und Struktur von Cetuximab

Cetuximab (ErbixTM) ist ein chimäres, human (65 %) - murines (35 %) Derivat des murinen monoklonalen Antikörpers M225 [Sato *et al.* 1983]. Es ist ein wirksamer Inhibitor der Proliferation von Karzinomzellen, die eine autokrine EGFR-Aktivierung zeigen. Als monoklonaler Antikörper ist Cetuximab ein Immunglobulin G1 (IgG1). Es ist ein 156 kDa schweres Molekül und besteht neben dem Antigen-bindenden Fragment (Fab) aus vier Polypeptidketten: zwei identischen schweren Ketten (V_H) und zwei identischen leichten Ketten (V_L) (siehe Abbildung 5) [Goldstein *et al.* 1995, Humblet 2004]. Cetuximab wird in der targeted-Chemotherapie des HNSCC mit einer Dosis von 200 - 400 mg/m² intravenös verabreicht. Als makromolekulare Proteine werden monoklonale Antikörper im Gastrointestinaltrakt degradiert und können daher nicht oral verabreicht werden. Cetuximab hat eine Halbwertszeit von circa 75 - 188 Stunden, wodurch ein einmal wöchentliches Behandlungsschema möglich ist [Baselga 2001, Baselga *et al.* 2000].

Mechanismus der Bindung von Cetuximab am EGF-Rezeptor

Cetuximab bindet ausschließlich an die L2-Subdomäne (Domäne III) der extrazellulären Domäne des EGFR, wobei sich sowohl die leichte als auch die schwere Kette des Cetuximab an der Interaktion beteiligen. Eine Anlagerung findet nur statt, wenn der Rezeptor in der angebundenen Konformation, *tethered conformation*, vorliegt [Li *et al.* 2005], was bei ungefähr 95 % der EGF-Rezeptoren physiologischerweise der Fall ist [Burgess *et al.* 2003, Ferguson *et al.* 2003]. Die restlichen 5 % der EGF-Rezeptoren liegen in der ungebundenen Konformation, *untethered conformation*, vor, an welche die Liganden binden können, um den EGF-Rezeptor zu aktivieren [Burgess *et al.* 2003, Ferguson *et al.* 2003]. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Rezeptor vom Liganden gebunden und somit aktiviert wird, sinkt durch das Vorhandensein von Cetuximab [Ferguson *et al.* 2003]. Abbildung 5 zeigt wie Cetuximab die Konformationsänderung der extrazellulären Domäne von der angebundenen in die ungebundene Konformation verhindert und weshalb eine hoch-affine Liganden-Bindung mit anschließender Aktivierung des Rezeptors nicht mehr erfolgen kann [Li *et al.* 2005].

Einleitung

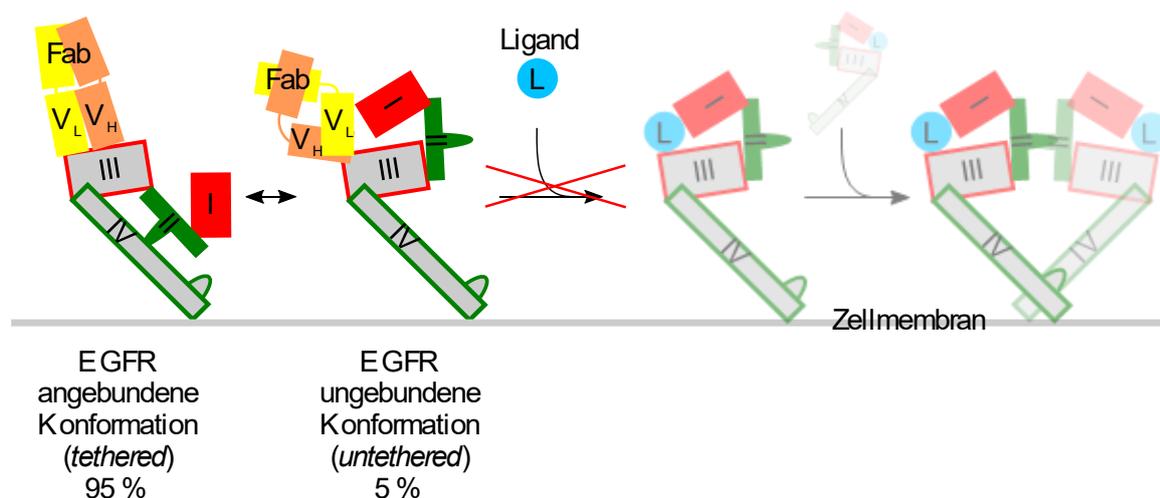


Abbildung 6: Hemmung der Liganden-induzierten Dimerisierung des EGFR durch Cetuximab nach [Li *et al.* 2005]

Cetuximab bindet am EGFR hochspezifisch und mit einer höheren Affinität als TGF α und EGF. Die Affinität von Cetuximab zum EGFR ist in etwa 50-mal höher als die von EGF [Goldstein *et al.* 1995, Kim *et al.* 2001, Li *et al.* 2005]. Die Bindung von Cetuximab an den Rezeptor führt zu keiner Strukturänderung des Antikörpers oder Rezeptors. Die Liganden-bindende Domäne I bleibt unbeeinflusst. Es scheint so, als sei die Blockade der Subdomäne III ausreichend, um den EGFR effizient zu inhibieren. Diese selektive Interaktion des Cetuximab resultiert, verglichen mit anderen Inhibitoren des EGFR, in einer geringeren Toxizität [Li *et al.* 2005].

Folgen der Cetuximab-Bindung

Cetuximab blockiert die Liganden-induzierte EGFR-Dimerisierung und hierdurch die Tyrosinkinase-abhängige Signaltransduktion. Resultierend werden Zellzyklusprogression, Zellmigration und Zellüberleben inhibiert [Fan *et al.* 1994]. Präklinische Studien beweisen die Inhibition der Proliferation EGFR-überexprimierender Karzinomzelllinien durch einen Zellzyklusarrest, Antiangiogenese, Antiapoptose und Inhibition der Tumorzellinvasion und Metastasierung *in vitro* und im Tiermodell [Baselga *et al.* 2000, Huang *et al.* 1999a, Huang *et al.* 2000, Mendelsohn 2001, Vincenzi *et al.* 2008].

Cetuximab führt durch Bindung an den EGFR zu dessen Internalisierung [Harding *et al.* 2005]. Physiologisch wird die Bindung von EGF an den Rezeptor im Endosom bei einem pH-Wert von 5 gelöst [Ferguson *et al.* 2003]. Die Bindung von Cetuximab und EGFR bleibt bei einem pH-Wert von 5 - 7 jedoch unverändert, eine Dissoziation von EGFR und Cetuximab findet nicht statt und der Komplex wird zum lysosomalen Abbau transportiert [Li *et al.* 2005]. Diese Degradation resultiert in einer Inhibition der Zellproliferation, was

sich in einem Arrest in der G1-Phase widerspiegelt und in einer Abnahme der EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche, was wiederum zum apoptotischen Zelltod führt [Fan *et al.* 1997, Harding *et al.* 2005, Huang *et al.* 1999a, Sunada *et al.* 1986]. Die inhibitorischen Eigenschaften des Cetuximab sind nicht nur auf Wild-Typ EGF-Rezeptoren beschränkt [Huang *et al.* 1999a]. Der Antikörper bindet auch an die Tumor-spezifische Isoform EGFR vIII, induziert dadurch eine fast vollständige Aufhebung der Phosphorylierung und führt zu einer Internalisierung des Antikörper-Rezeptor-Komplexes, wobei der genaue Wirkmechanismus noch nicht eindeutig geklärt werden konnte [Zhu *et al.* 2010].

Zusätzlich zur EGFR-Blockade kann Cetuximab aktivierte Immunzellen in Tumorzellen rekrutieren. Dabei spielen die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) und die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC, *Complement Dependent Cytotoxicity*), welche spezifisch für IgG1-Isotypen ist, eine wichtige Rolle. Sie führen zur Zellyse und damit zu einem vermehrten Untergang an Tumorzellen [Goldstein *et al.* 1995, Li *et al.* 2005, Lopez-Albaitero *et al.* 2009, Reuter *et al.* 2007]. Bei der ADCC wird die Lyse durch natürliche Killerzellen oder durch Makrophagen erreicht, die zwar *in vitro*, allerdings nicht eindeutig *in vivo*, für viele monoklonale Antikörper nachgewiesen werden konnte. Bei der CDC wird durch einen Membran-Angriffskomplex durch die aktivierte Komplement-Kaskade ebenfalls die Zellyse eingeleitet. Allerdings fällt bei der Gabe von Cetuximab sowohl *in vivo* als auch *in vitro* diese Wirkung sehr mild aus [Adams *et al.* 2005, Levy *et al.* 2009].

Cetuximab blockiert den nukleären Import von EGF-Rezeptoren und verhindert dadurch die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen, welche die Karzinomzellen vor Radio- oder Chemotherapie induzierten DNA-Schäden schützen [Chen *et al.* 2007, Dittmann *et al.* 2005, Foon *et al.* 2004]. Viele *in vitro*- und *in vivo*-Studien zeigen, dass Cetuximab den Effekt von Radio- und Chemotherapie synergistisch unterstützt [Baselga *et al.* 1993, Fan *et al.* 1993, Huang *et al.* 2000, Milas *et al.* 2004]. Chung *et al.* detektierten bei kolorektalen Karzinomen, dass Cetuximab auch bei Tumorpatienten wirkte, welche EGFR nicht exprimierten. Demzufolge determiniert die Expression des EGFR das Ansprechen von Cetuximab nicht [Chung *et al.* 2005, Cunningham *et al.* 2004, Wierzbicki *et al.* 2011]. Der Mangel eines klaren Zusammenhangs zwischen der Expression des EGFR und der klinischen Prognose wird mit der Aktivität von Cetuximab und dessen Einfluss auf das Karzinomzellüberleben verbunden, wobei beides durch eine Vielzahl an Mechanismen, abgesehen von einer erhöhten Rezeptorexpression, amplifiziert werden kann [Vincenzi *et al.* 2010].

Molekulare prädiktive Biomarker der Wirksamkeit

Epidemiologische Daten zeigen, dass lediglich 10 - 15 % der Patienten mit HNSCC von einer Cetuximab-Therapie profitieren. Bei nahezu 85 % zeigt eine derartige Therapie hingegen keinen Nutzen bei gleichzeitig erhöhtem Toxizitätsrisiko [Vincenzi *et al.* 2010]. Ein molekularer prädiktiver Marker ist nur schwer zu finden. Lediglich ein peri-therapeutischer Hautausschlag ist ein anerkannter prädiktiver Marker für ein positives Ansprechen auf EGFR-targeted Medikamente [Cohen *et al.* 2003, Van Cutsem *et al.* 2012, Yokota 2014]. Licitra *et al.* evaluierten den Nutzen der Anzahl der EGFR-Kopien und des Expressionslevels beim HNSCC. Es bestand kein Zusammenhang mit dem Überleben oder dem Therapieansprechen. Die Wirkung von Cetuximab, zusätzlich zur Chemotherapie, bestand unabhängig vom Expressionslevel des EGFR [Licitra *et al.* 2011, Licitra *et al.* 2013]. Die konstitutiv aktive Mutante EGFR vIII ist beim HNSCC zu selten vorhanden, um als prädiktiver Marker benutzt werden zu können [Khattari *et al.* 2015].

Im Gegensatz zum CRC konnte beim HNSCC für den Mutationsstatus des KRAS-, BRAF-Gens und anderer Gene des EGFR-Signalweges kein prädiktiver Wert für eine Wirkung des Cetuximab nachgewiesen werden [Bissada *et al.* 2013, Smilek *et al.* 2012, Weber *et al.* 2003, Yokota 2014]. Eine Inaktivierung des PTEN des PTEN/PI3K/AKT-Signalnetzwerkes, welches als Regulator für das Zellüberleben fungiert, ist ein potentieller prädiktiver Biomarker für die Resistenz gegenüber EGFR-Antagonisten. Der Verlust der PTEN-Funktion verursacht in vielen Tumoren eine Erhöhung von PIP₃ und eine persistierende Aktivierung der PI3K-Effektoren, vor allem von AKT, und führt zu anti-apoptotischen Wirkungen. Für das HNSCC ist dieser Biomarker jedoch umstritten [Bianco *et al.* 2003, Pernas *et al.* 2009, She *et al.* 2003, Yewale *et al.* 2013].

Nebenwirkungen von EGFR-Inhibitoren

Die häufigsten Nebenwirkungen von EGFR-Inhibitoren in der Klinik sind Dermatoxizitäten, was auf die Hemmung der EGFR-Signalwege im epidermalen Gewebe zurückgeführt werden kann. Eine Rötung und ein Akne-ähnlicher Ausschlag, einhergehend mit Follikulitis, seborrhoischer Dermatitis und Diarrhö sind häufig [Baselga *et al.* 2002, Tan *et al.* 2004]. Der Schweregrad des Akne-Ausschlags, beziehungsweise jede Art von Hautreaktion nach Therapie mit Cetuximab, korreliert mit einer besseren Antwortrate sowie einem besseren Erkrankungsverlauf des HNSCC [Bonner *et al.* 2010, Vermorken *et al.* 2007]. Der Hautausschlag befindet sich im Allgemeinen im Kopf-Halsbereich und Oberkörper und tritt innerhalb der ersten beiden Wochen der Behandlung auf. Nach ein bis drei Monaten nach Ende der Therapie ist dieser bei der Mehrheit der Patienten abgeklungen [Herbst *et al.* 2002]. Die Verabreichung von Cetuximab kann zu einer

schweren Asthenie, Erschöpfungserscheinungen, Übelkeit, Leukopenie, Erhöhung der Transaminasen-Werte oder zu einer Elektrolytstörung führen, bei der ein unphysiologisch niedriges Niveau an Magnesium im Blut vorhanden ist [Herbst *et al.* 2005, Reuter *et al.* 2007].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In mehr als 90 % der Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes findet sich eine Überexpression des EGF-Rezeptors [Sacco *et al.* 2015] und der EGFR-Liganden [Kalyankrishna *et al.* 2006]. Einhergehend mit der infausten Überlebensprognose von rekurrenten und metastasierten HNSCC ist die Blockade des EGF-Rezeptors als zielgerichtete personalisierte molekulare Tumorthherapie ein wichtiger Therapiebestandteil. Die Expressionslevel des Rezeptors korrespondieren mit fortgeschrittenen Karzinomstadien und schlecht differenzierten Tumoren [Kalyankrishna *et al.* 2006]. Da sich die überwiegende Mehrheit der HNSCC-Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Stadium III-IVb) befindet, sind weitere Erkenntnisse zur Wirkweise des Antikörpers Cetuximab essentiell [Argiris *et al.* 2008, Seiwert *et al.* 2005].

Der monoklonale Antikörper Cetuximab ist für die Therapie von lokoregionär fortgeschrittenem HNSCC, in Kombination mit einer Strahlentherapie oder bei Patienten mit Tumorrezidiven und/oder stattgehabter Fernmetastasierung, in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, zugelassen [Baselga *et al.* 2000, Bonner *et al.* 2006, Lievre *et al.* 2006]. Eine Monotherapie als kurativer Therapieansatz konnte dagegen keine bessere Wirksamkeit gegenüber der Leitlinientherapie zeigen [Tang *et al.* 2015]. Da diese kostspielige Therapie lediglich den Progress der Erkrankung aufhalten kann und in nur 15 – 20 % der Fälle zu einem verlängerten Überleben führt [Licitra *et al.* 2013], sind prädiktive Marker sowie weiterführende Erkenntnisse über die Signalwege des EGFR notwendig.

Aktuelle experimentelle Arbeiten weisen nach, dass Cetuximab unter gewissen Bedingungen proliferativfördernd wirken kann [Ekblad *et al.* 2015]. Diese Wirkung ist offenbar von der Anwesenheit autokrin sezernierter, physiologischer EGFR-Liganden abhängig, da diese mit Cetuximab um die Rezeptorbindung konkurrieren. Über das Zusammenspiel der zielgerichteten Inhibition des EGFR und dem physiologischen Vorhandensein der Liganden ist bisher wenig bekannt. Hoch-affine Liganden, wie beispielsweise EGF und TGF α , limitieren, zusammen mit koexprimierten niedrig-affinen Liganden, die Wirkkapazität monoklonaler Antikörper in epithelialen Tumoren durch eine nachgeschaltete Signalamplifikation [Kearns *et al.* 2015]. Ebenso konnten Saki *et al.*, sowohl für TGF α als auch für Amphiregulin, eine Abhängigkeit der Resistenz von HNSCC-

Einleitung

Zelllinien gegenüber Cetuximab von der autokrinen Produktion der beiden EGFR-Liganden detektieren [Saki *et al.* 2013]. Ansell *et al.* weisen für EGF, Amphiregulin und Epiregulin in drei Zelllinien nach, dass durch eine exogene Zufuhr die Resistenz gegenüber Cetuximab steigt [Ansell *et al.* 2016]. Es scheint folglich ein direkter Zusammenhang zwischen den autokrin sezernierten Liganden und der therapeutischen Wirksamkeit von Cetuximab zu existieren. Präklinische Studien zeigten, dass eine Induktion von TGF α die Signalwege des EGFR aufrechterhalten und eine Resistenz gegenüber Cetuximab begünstigen kann [Hatakeyama *et al.* 2010]. Andererseits führt eine hohe Expression der mRNA von Amphiregulin und von Epiregulin mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem guten Ansprechen von Cetuximab in einer Subgruppe von Patienten mit kolorektalem Karzinom [Jacobs *et al.* 2009, Khambata-Ford *et al.* 2007] und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen [Kakiuchi *et al.* 2004]. In der vorliegenden Arbeit wird über den ELISA-Test detektiert, welcher Ligand *in vitro* die größte Rolle in der autokrinen Sekretion zweier HNSCC-Zelllinien spielt. Für diesen Liganden wird im Anschluss die singuläre Wirkung sowie die Wirkung in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen getestet.

Die Variabilität genetischer Veränderungen und die Heterogenität der Tumorzellen in realen Tumoren können nur unzureichend von den gängigen *in vivo*- und *in vitro*-Modellen abgebildet werden. Oft werden passagierte und somit stark veränderte und gealterte Zelllinien herangezogen, so dass nur wenig verlässliche Aussagen über die tatsächliche Wirkung auf reale Tumorzellen getroffen werden können. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb eine über Jahrzehnte eingesetzte und etablierte Zelllinie FaDu mit der laborintern erst kürzlich generierten Zelllinie PiCa verglichen.

Des Weiteren wird in der vorliegenden Arbeit ein dreidimensionales (3D) Kulturmodell mit Monolayer-Kulturen (2D) verglichen, da dreidimensionale Kulturmodelle vermutlich die räumliche Konfiguration von *in vivo*-Tumorzellverbänden hinreichender abbilden können [Kelm *et al.* 2003, Kunz-Schughart *et al.* 2004, Lin *et al.* 2008, Weiswald *et al.* 2015]. Die oben genannten Wechselwirkungen werden genauso im 3D-Tumormodell evaluiert, um eine möglichst realitätsnahe Tumorphysiologie zu konstruieren, welche auf die Abbildung der konfiguralen Anordnung der Karzinomzellen *in vivo* abzielt. Diese Ergebnisse können somit einer aussagekräftigeren Interpretation von bisherigen *in vitro*-Arbeiten dienen und zur Klärung der widersprüchlichen Behandlungserfolge mit Cetuximab beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien

2.1.1 PiCa

Die im Jahr 2012 an der Ludwig-Maximilians-Universität München etablierte Zelllinie PiCa wurde aus Primärtumorzellen eines chirurgisch entfernten Larynxkarzinoms generiert. Die intermediäre Zelllinie ist HPV-negativ, EBV-negativ und wächst als Monolayer adhärent vergleichbar mit anderen gängigen Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien. Die für jede Zelllinie individuelle Expression verschiedener Zelloberflächenmarker ergab für die PiCa-Zellen ein hohes Expressionsmuster für epitheliale Zellmarker, wie beispielsweise dem EGF-Rezeptor [Mack *et al.* 2013].

2.1.2 FaDu

Die international vielfach verwendete und etablierte Zelllinie FaDu stammt aus Tumorzellen eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx eines 56-jährigen Hindu-asiatischen Mannes, der im Chittarangan Cancer Hospital in Kalkutta 1968 operiert wurde [Fogh *et al.* 1977, Rangan 1972]. Die etablierte Zelllinie ist HPV-negativ, stark positiv in der Expression des EGFR und positiv für Her2 und Her3, allerdings negativ für Her4. Die Sensitivität gegenüber Cetuximab wird als stark positiv angegeben. Bei *in vivo*-Studien ergab sich eine Tumor-formierende Kapazität für FaDu-Zellen [Pogorzelski *et al.* 2014]. Die Zellen weisen adhärentes Wachstum als Monolayer auf. Als Spheroide besitzen sie einen großen Durchmesser, sind rund geformt und durch einen eher lockeren Zellverbund hinsichtlich der Handhabung eher fragil [Pan *et al.* 2018, Schmidt *et al.* 2016].

2.2 Materialien

2.2.1 Kultivierungsmedien, Liganden, Enzyme und Chemikalien

Kultivierungsmedien, Liganden, Enzyme und Chemikalien	Hersteller
Accutase	StemPro, California, USA
Aminosäuren, nicht essentiell	Biochrom, Berlin
Aqua bidest.	LMU-Klinikapotheke
Cetuximab, Erbitux™ 5 mg/ml Infusionslösung 20 ml	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Flüssigmedium	Biochrom, Berlin
Fetales Kälber Serum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
L-Glutamin 200mM	Biochrom, Berlin
Natrium-Pyruvat 100mM	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung 10.000µg/l	Biochrom, Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
TGFα (100µg)	PromoCell, Heidelberg
Trypanblau 0,4 %	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin

Tabelle 1: Kultivierungsmedien, Liganden, Enzyme und Chemikalien

2.2.2 Verbrauchsmaterialien und Test-Kits

Verbrauchsmaterialien und Test-Kits	Hersteller
96-Well Zellkulturplatte	Eppendorf, Hamburg
96-Well Spheroid-Miniplatte	Corning, Massachusetts, USA
Combitips	Eppendorf, Hamburg
ELISA Kit human Amphiregulin Quantikine	PromoKine, Heidelberg
ELISA Kit humanEGF Quantikine	PromoKine, Heidelberg
ELISA Kit human Epiregulin, EREG	Cusabio, Wuhan, China
ELISA Kit human TGF- α Quantikine	PromoKine, Heidelberg
Gewebekulturflaschen 25cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten 7ml unsteril	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen (10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l) steril	Brand, Wertheim
Röhrchen mit Schraubverschluss (15ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50ml)	Greiner, Frickenhausen
Eppendorf-Standardreaktionsgefäße (1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg
Kryo-Tubes, 1,8 ml, unsteril	Nalgene, Rochester, USA
WST-8 Test	PromoCell, Heidelberg

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Test-Kits

2.2.3 Geräte und Zubehör

Gerätebezeichnung und Zubehör	Hersteller
Accu-Jet	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank Function Line	Heraeus, Hanau
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	
Combitip	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-85 °C)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kühlschrank (+4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroskop (Standard)	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop (Inversion) DM IRB	Leica, Herbruggen, Schweiz
Mikroskop Objektive 40 x / 0,5 10 x / 0,22 4 x / 0,1	Leica, Herbruggen, Schweiz
Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm-Filter) Versa Max	Molecular Devices, California, USA
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Programm SoftMax Pro 6.1	Molecular Devices, California, USA
Programm Excel	Microsoft, Washington, USA
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific, New York, USA
Spiegelreflexkamera Nikon D7100	Nikon, Tokio, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zellzählkammer (Neubauer)	Merck, Darmstadt
Zentrifuge Varifuge 3.0 OR	Heraeus, Hanau

Tabelle 3: Geräte und Zubehör

2.3 Methoden

2.3.1 Studienübersicht

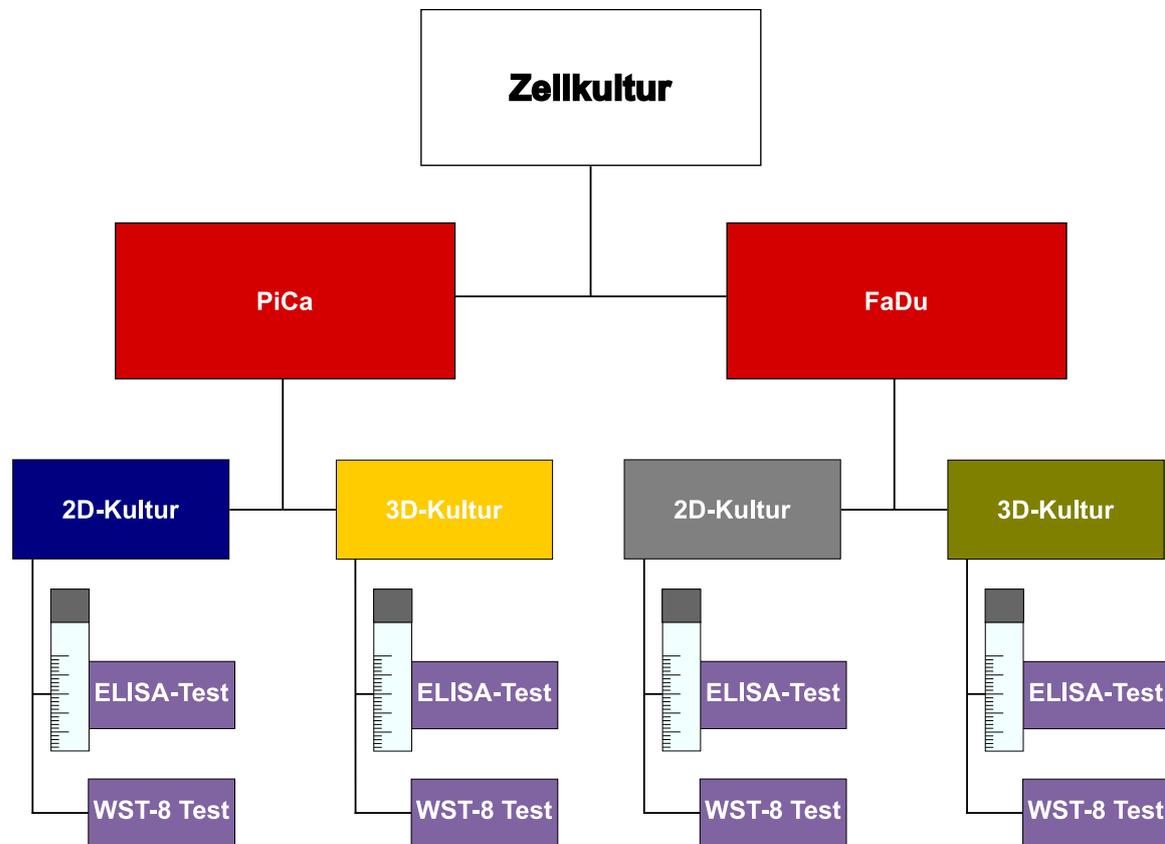


Abbildung 7: Studienübersicht

Abbildung 7 zeigt eine Darstellung des Studienaufbaus: essentiell war dabei die durchgeführte Zellkultivierung beider Tumorzelllinien PiCa und FaDu. Diese war Voraussetzung für die anschließende zwei- beziehungsweise dreidimensionale Modellkultur. In den jeweiligen Kulturmodellen erfolgte, dem Studienprotokoll entsprechend, zunächst eine Analyse der Konzentrationen von vier gängigen EGFR-Liganden (ELISA-Test) in den jeweiligen Kulturüberständen an charakteristischen Tagen (siehe Punkt 2.3.3). Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem EGFR-Liganden TGF α , beziehungsweise dem EGFR-Inhibitor Cetuximab, einzeln und in Kombination. Nach Abschluss der jeweiligen Kultivierungsphase wurden die Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit der jeweiligen Substanzen über den WST-8 Test untersucht.

2.3.2 Zellkultur

Zellkultivierung

Alle Schritte der Kultivierung und der nachfolgenden Studienversuche an den Tumorzellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierungsphase fand in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturflaschen mit modifiziertem DMEM-Medium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM, Nährmedium) statt (siehe Tabelle 4).

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i> (4,5g/l D-Glucose; 25mM Hepes; 3,7g/l NaHCO ₃ ; 4,4g/l NaCl)
+ 5 ml Penicillin-/ Streptomycin- Lösung 10.000 µg/ml
+ 5 ml nicht essentielle Aminosäuren 100 x
+ 5 ml L-Glutamin 200 mM
+ 5 ml Natrium-Pyruvat 100 mM
+ 50 ml <i>Fetales Kälber Serum (FCS)</i>

Tabelle 4: Inhalt des modifizierten DMEM-Nährmediums

Alle 72 Stunden wurde das Nährmedium erneuert um optimale Wachstumsbedingungen für die adhären wachsenden Tumorzellen zu gewährleisten. Durch regelmäßige mikroskopische Kontrolle konnte eine etwaige mikrobielle Besiedelung frühzeitig detektiert werden. Bei einer Konfluenz von 80 - 90 % konnten die Zellen gesplittet werden. Die Kultivierungsdauer in den Gewebekulturflaschen betrug in der Regel drei bis vier Tage.

Splitten und Passagierung

Das vorhandene DMEM wurde mit Einweg-Pasteurpipetten aus der Gewebekulturflasche aspiriert und die vollständige Entfernung des Nährmediums durch zwei Waschschrte mit *Phosphat Buffered Saline (PBS)* gewährleistet. Dieser Schritt stellte sicher, dass *Fetales Kälber Serum (FCS)* nahezu vollständig eliminiert wurde. FCS könnte das anschließend hinzugefügte Enzym Trypsin zur Lösung der Zellen am Boden der Kulturflasche blockieren.

Nach Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte die 5-minütige Inkubation im Brutschrank. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 2 ml DMEM-Lösung gestoppt. Mit weiteren 2 ml DMEM konnten die gelösten Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche gewaschen werden, so dass eine Zell-Trypsin-DMEM-Suspension von 6 ml entstand. Diese wurde nachfolgend für 10 min bei 900 U/min und 24 °C zentrifugiert. Der flüssige

Überstand wurde anschließend dekantiert und das Zellpellet mit 1000 µl DMEM-Nährmedium zusammen resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl Suspension mit 50 µl Trypan-Blau vermischt und mittels Neubauer-Zellzählkammer unter dem Mikroskop ausgewertet (insgesamt 16 Kleinquadrate in vier Großquadraten). Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl (in Mio. in 1.000 } \mu\text{l)} = \text{gezählte Zellzahl} \cdot 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \cdot 1.000 \text{ (Umrechnungsfaktor)}$$

Da die Eigenfarbe des Trypanblau durch die Zellmembran einer vitalen Zelle nicht eindringen kann und deren Cytosol dadurch farblos bleibt, konnte die Vitalität der Zellen bestimmt werden; bei Zellen mit geschädigter Zellmembran zeigte sich ein charakteristischer zytoplasmatischer blauer Farbumschlag.

Auf Grundlage der Zellzahl-Berechnung wurden eine Million Zellen aus der gewonnenen Zellsuspension in frische Gewebekulturflaschen ausgesät und diese mit mindestens 8 ml DMEM-Nährmedium gefüllt. Die Passagierung beider Zelllinien erfolgte zweimal wöchentlich.

2.3.3 Nachweis der Konzentration von EGFR-Liganden in den Kulturüberständen: ELISA-Test

Die Bestimmung der Konzentration der EGFR-Liganden in den Kulturüberständen in Proben der beiden Kulturmodelle wurde mit Hilfe des jeweiligen ELISA-Kits für EGF, TGF α , Amphiregulin und Epiregulin einzeln durchgeführt.

Der ELISA- (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) Test ist ein antikörperbasierter *in vitro*-Test, der auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht und zur quantitativen Erfassung einer humanen Proteinkonzentration in Flüssigkeitsproben verwendet wird.

Bei der sogenannten Sandwich-ELISA-Technik werden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an zwei unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Antigens binden. Der erste Antikörper (*coat antibody*) ist dabei an eine feste Phase, meist eine 96-well-Mikrotiterplatte, gebunden und bildet seinerseits mit jedem vorhandenen Protein, beziehungsweise dessen Antigen, einen Antikörper-Antigen-Komplex. Ein Biotin-konjugierter, spezifischer zweiter Antikörper (*detection antibody*) wird im Anschluss hinzugegeben und bindet an den vorherigen Komplex, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Durch Zugabe einer Streptavidin-HRP (*Horseradish Peroxidase*) wird über das chromogene sogenannte TMB (Tetramethylbenzidine)-One-

Material und Methoden

Stop-Substrat eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst, welche zu einem Farbumschlag führt und bei 450 nm photometrisch bestimmt werden kann. Da lediglich vollständig gebildete Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe erfasst werden, gibt der Test Aufschluss über die Konzentration des Proteins in der Probe. Für einen quantitativen Nachweis wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen (Standardreihe) durchgeführt, um eine Standardkurve zur Kalibrierung des gemessenen Wertes zu erhalten [Kakiuchi *et al.* 2004].

Die aus den Kulturüberständen der jeweiligen Kulturmodelle gewonnene Flüssigkeit wurde zwischenzeitlich bei -80 °C gelagert und für den ELISA-Test bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach Zugabe von 100 µl Probelösung in Wells der jeweils speziell für die Liganden vorbeschichteten ELISA-Mikrotiterplatte erfolgte die Inkubation abgedeckt auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für 2 Stunden (EGF), beziehungsweise 2,5 Stunden (TGF α , Amphiregulin). Für den Epiregulin-Test erfolgte die Inkubation 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Im Anschluss erfolgte für alle Tests eine weitere Inkubation für 24 Stunden bei 4 °C. Für den Test von EGF, TGF α und Amphiregulin wurde jedes Well nach Entfernung der flüssigen Überstände viermal mit einer 300 µl Waschlösung gewaschen. Für den Epiregulin-Test waren keine Waschschriffe notwendig. Nach Zugabe von 100 µl jeweils spezifischer Antikörper-Lösung wurde die 96-Well-Platte abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (EGF, TGF α , Amphiregulin), beziehungsweise für eine Stunde im Brutschrank (Epiregulin).

Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde mit 200 µl (EGF), beziehungsweise 300 µl (TGF α , Amphiregulin) Waschlösung jedes Well viermal gewaschen. Für Epiregulin erfolgte der Waschschriff dreimal mit 200 µl Waschlösung, wobei der Waschpuffer jeweils zwei Minuten einwirkte. 100 µl HRP-Streptavidin-Lösung inkubierte im Anschluss für 45 Minuten bei Raumtemperatur (EGF, TGF α , Amphiregulin), beziehungsweise für 1 Stunde im Brutschrank (Epiregulin). Nachdem der flüssige Überstand in allen Wells verworfen wurde, erfolgte ein weiterer Waschschriff viermal mit je 300 µl Waschlösung (EGF, TGF α , Amphiregulin). Für Epiregulin erfolgte der Waschschriff fünfmal mit 200 µl Waschlösung, wobei der Waschpuffer jeweils zwei Minuten stehen belassen wurde.

Bei EGF, TGF α und Amphiregulin erfolgte nach Zugabe von 100 µl TMB-Substratlösung in jedes Well eine Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Für Epiregulin wurden in jedes Well 90 µl TMB-Substratlösung hinzupipettiert und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl *Stop*-

Solution wurde die Enzym-Substrat-Reaktion gestoppt und die 96-Well-Platte jeweils photometrisch bei 450 nm mit Hilfe des Programms „*SoftMax Pro 6.1*“ sofort ausgelesen.

Die Sensitivität der verschiedenen ELISA-Kits für die vier EGFR-Liganden betrug nach Herstellerangaben:

Sensitivität der ELISA-Kits	
EGF	< 1 pg/ml
TGF- α	< 3 pg/ml
Epiregulin	< 3,9 pg/ml
Amphiregulin	< 10 pg/ml

Tabelle 5: Sensitivität der ELISA-Kits für die vier EGFR-Liganden

Für jeden ELISA-Test existierten jeweils 2 Replikate bei 2 unterschiedlichen Passagen pro Kulturmodell und resultierend 4 Replikate ($n = 4$) für jeden Liganden und für jeden charakteristischen Kultivierungstag.

Kulturüberstände im 2D-Tumormodell

Zur Gewinnung der Kulturüberstände im 2D-Tumormodell (siehe Abbildung 8) erfolgten analog zur Zellkultur im 2D-Studienmodell beim WST-8 Test (siehe 2.3.4) folgende Schritte, jedoch ohne Verwendung des EGFR-Liganden TGF α :

Nach eingangs beschriebener Vorkultur (siehe 2.3.2) wurden am Tag 0 im Anschluss an die Passagierung jeweils 2.000 Zellen aus der Zellsuspension beider verwendeter Zelllinien FaDu und PiCa in eine herkömmliche 96-Well-Standardzellkulturplatte in reines modifiziertes DMEM pipettiert. Für jede Zelllinie wurden jeweils zwei unterschiedliche Passagen zu je 11 Replikaten angesetzt. Nach 72 Stunden (1. Kultivierungsphase) Kultur fand ein Medienwechsel statt und für jede Zelllinie und für jede Passage wurden 10 x je 220 μ l Kulturflüssigkeit abpipettiert und in Kryotubes bei -80 °C gelagert. 11 Replikate erhielten an Tag 4 je Zelllinie und je Passage 10 μ l Cetuximab mit einer Konzentration von 10 μ g/ml (siehe Tabelle 6) für 24 Stunden, während den Kontrollen keine zusätzliche Lösung verabreicht wurde.

Cetuximab, Erbitux™ 5 mg/ml (Infusionslösung)
Stammlösung: (c = 1.000 µg/ml) 400 µl Aqua bidest. + 100 µl Cetuximab
Gebrauchslösung: (c =100 µg/ml) 900 µl Aqua bidest. + 100 µl Stammlösung

Tabelle 6: Stamm- und Gebrauchslösung von Cetuximab, Erbitux™

Nach einem erneuten Medienwechsel an Tag 5, bei dem alle 2 x 11 Replikate je Zelllinie reines modifiziertes DMEM erhielten, wurden nach erneuten 48 Stunden (2. Kultivierungsphase beziehungsweise 2. Kultivierungsphase + Cetuximab) die Kulturüberstände von 5 Kontrollen und 5 mit Cetuximab behandelten Replikaten zu je 220 µl abpipettiert und in Kryo-Tubes bei -80 °C gelagert. Die Gewinnung der Kulturüberstände ist in Abbildung 8 dargestellt.

Kulturüberstände im 3D- Tumormodell

Die Kulturüberstände im 3D-Tumormodell wurden analog zur Kultivierung im 3D-Studienmodell (siehe Abbildung 10) durchgeführt und beinhalteten folgende Schritte, jedoch nur unter Verwendung von reinem modifiziertem DMEM:

An Tag 0 wurden nach beschriebener Vorkultur (siehe 2.3.2) jeweils 2.000 Zellen (FaDu), beziehungsweise 1.000 Zellen (PiCa) in *ultra-low attachment*-Kulturplatten in reinem modifiziertem DMEM angesetzt. Für jede Zelllinie wurden jeweils zwei unterschiedliche Passagen zu je 11 Replikaten in Wells pipettiert. Nach einem Mediumwechsel an Tag 4 und nach weiteren 72 Stunden (1. Kultivierungsphase) wurde an Tag 7 für jede Zelllinie und für jede Passage 10 x je 220 µl Kulturflüssigkeit abpipettiert und in Kryo-Tubes bei -80 °C aufbewahrt.

An Tag 10 erhielten 2 x 11 Replikate (1x 11 je Zelllinie) je 10 µl Cetuximab mit einer Konzentration von 10 µg/ml, wobei weitere 2 x 11 Replikate kein Cetuximab verabreicht bekamen und als Kontrollen dienten. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit Cetuximab behandelten Zellen an Tag 11, ein Mediumwechsel mit reinem modifiziertem DMEM.

An Tag 13, folglich nach 48 Stunden (2. Kultivierungsphase beziehungsweise 2. Kultivierungsphase + Cetuximab), wurde von 5 Kontrollen und von 5 mit Cetuximab

behandelten Zellen die Kulturflüssigkeit abpipettiert und zur Aufbewahrung in Kryo-Tubes bei -80 °C gegeben.

An Tag 16, folglich nach 120 Stunden seit dem letztmaligen Mediumwechsel, wurde ebenfalls von 5 Kontrollen und von 5 mit Cetuximab behandelten Zellen 220 µl Kulturflüssigkeit in Kryo-Tubes gegeben und bei -80 °C aufbewahrt. Die Gewinnung der Kulturüberstände entsprach, mit Ausnahme an Tag 13 als Zwischenergebnis, exakt der Studie im 2D-Kulturmodell. Abbildung 10 veranschaulicht den Ablauf der Gewinnung der Kulturüberstände im 3D-Tumormodell.

2.3.4 Nachweis der Vitalität: WST-8 Test

Beim WST-8 (*Water-Soluble Tetrazolium 8*) Test handelt es sich um eine etablierte Methode, die anhand kolorimetrischer Analysen der Zellstoffwechsel-Aktivität Rückschlüsse auf die Zytotoxizität und somit Lebensfähigkeit von Zellen zulässt. Der Test beruht auf der Reduktion des gelbfarbigen, wasserlöslichen Tetrazoliums (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) (= WST-8) außerhalb der Zelle zu einem orangefarbenen, wasserlöslichen Formazan. Diese enzymatische Umwandlung durch die NADH-abhängige Oxidoreduktase findet nur durch lebende stoffwechselaktive Zellen über einen Plasma-Membran-Elektronen-Transport statt. Das gebildete Formazan kann bei 450 nm im Kulturmedium photometrisch bestimmt werden. Dabei korreliert die gemessene Konzentration des Formazan direkt mit der Zellvitalität [Ishiyama *et al.* 1997, PromoCell 12/2016].

Sowohl bei den 2D-Versuchen als auch bei den 3D-Versuchen wurde vor Beginn des Tests das entsprechende Medium (mit jeweiligem Ligand TGF α beziehungsweise ohne Ligand TGF α bei den Kontrollen) in den einzelnen Wells (100 µl) gewechselt. Nach Zugabe von jeweils 10 µl WST-8 Lösung je Well wurde die Zellkulturplatte für eine Stunde (2D) beziehungsweise zwei Stunden (3D) im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der 96-Well-Platte im Photometer bei 450 nm mithilfe des Programms „*SoftMax Pro 6.1*“. Als Negativkontrolle wurden Wells mit Medium und unbehandelten Zellen herangezogen. Wells mit DMEM-Medium dienten als „*Blank*“.

Studiendesign: 2D-Tumormodell

Abbildung 8 veranschaulicht das Studiendesign für das 2D-Kulturmodell für jeweils beide Kulturmodelle.

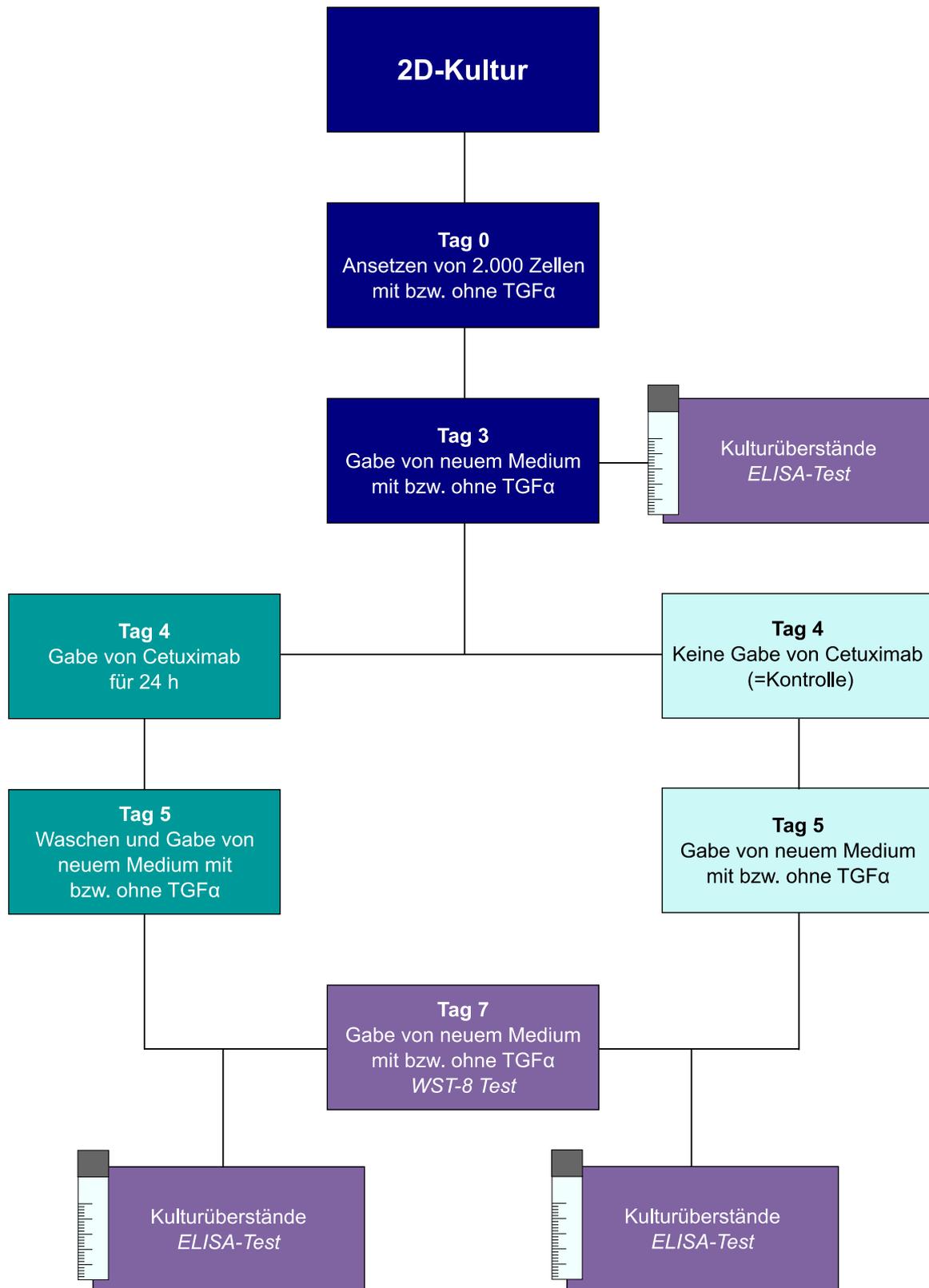


Abbildung 8: Übersicht 2D-Studiendesign

Liganden

Für die 2D-Kultur wurden bereits bei Aussaat an Tag 0 das jeweilige Liganden- und Kontroll-Medien-Gemisch eingesetzt. Die Kontrollen befanden sich in reinem modifizierten DMEM (siehe Tabelle 4). Nach eigenen im Labor durchgeführten Versuchen im Vorfeld der Studie zeigte sich bei folgender Konzentration des hochaffinen Liganden TGF α (siehe Tabelle 7) ein geeignetes Dosis-Wirkung-Verhältnis.

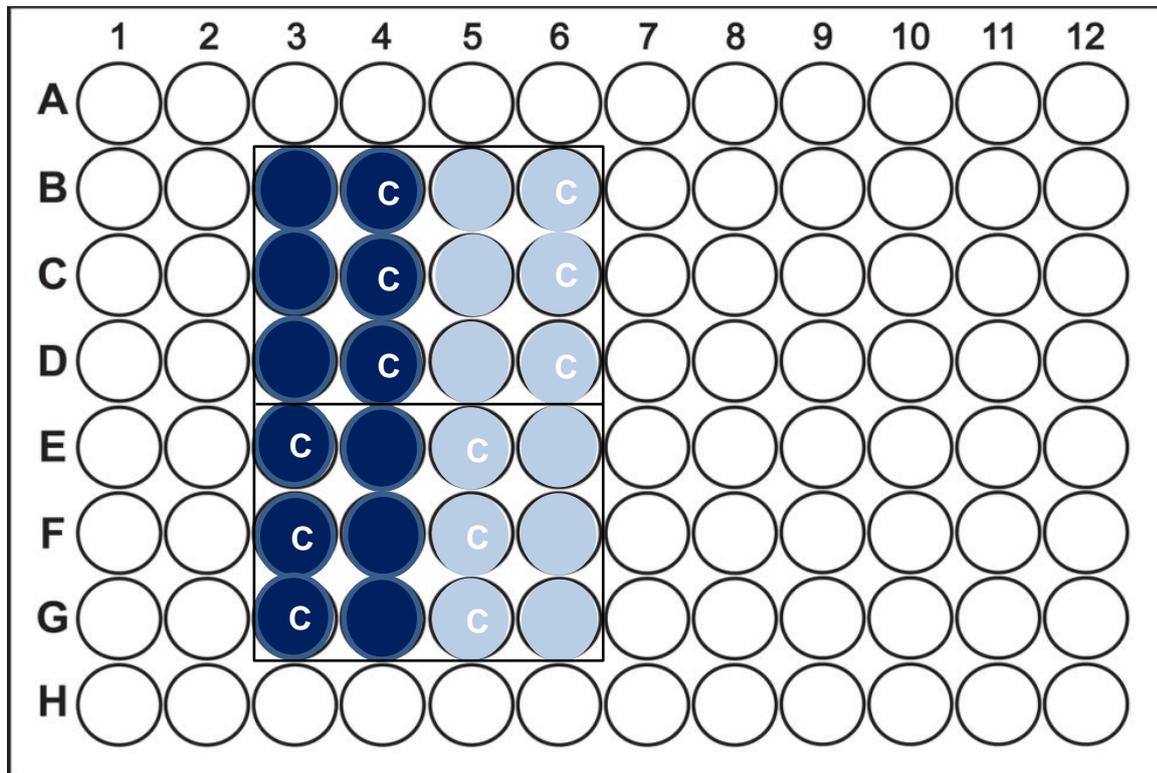
Konzentration des Liganden TGF α	
TGF- α	5 ng/ml

Tabelle 7: Konzentration des Liganden TGF α

Aussaat der Zellen an Tag 0

Nach eingangs beschriebener Vorkultur (siehe Punkt 2.3.2) wurden an Tag 0, im Anschluss an die Passagierung, jeweils 2.000 Zellen aus der Zellsuspension in eine herkömmliche 96-Well-Standardzellkulturplatte pipettiert. Nach Aussaat der Zellen haften diese am Boden der Wells an und bilden einen zweidimensionalen Zellrasen.

Abbildung 9 zeigt das Schema des 2D-Versuches mit Ligand TGF α , Kontrolle und in Kombination mit Cetuximab.



96-Well Standard-Kulturplatte	
	Wells mit reinem modifizierten DMEM bzw. Wells eines anderen Versuches einer anderen Passage mit demselben Schema
	Kontroll-Wells ohne TGF α bzw. Wells mit Cetuximab-Behandlung an Tag 4
	Wells mit TGF α bzw. Wells mit Cetuximab-Behandlung an Tag 4

Abbildung 9: Schema des 2D-Versuches mit Ligand TGF α und Cetuximab für eine Passage einer Zelllinie

Kultivierung und Behandlungsschema

Die Zellkulturplatten lagerten die komplette Studienzeit über im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 %-Luftfeuchtigkeit. An Tag 3 erfolgte ein entsprechender Mediumwechsel (Medium mit beziehungsweise ohne TGF α). 10 μ l Cetuximab wurden an Tag 4 für eine 24-stündige Inkubationszeit mit einer Konzentration von 10 μ g/ml (siehe Tabelle 6) in die entsprechenden Wells hinzupipettiert. Nach einem erneuten entsprechenden Mediumwechsel an Tag 5 (24 Stunden nach Cetuximab-Gabe) erfolgte an Tag 7 der WST-8 Test (siehe Punkt 2.3.4.)

Je Versuch existierten drei Einzel-Replikate für jeden Ansatz (Kontrollen, Ligand TGF α und dieser in Kombination mit Cetuximab) und somit nach sieben Gesamtversuchen 21 Replikate ($n = 21$) für jeden Test.

Studiendesign: 3D-Tumormodell

Abbildung 10 verdeutlicht den Studienaufbau des 3D-Kulturmodells für die beiden Zelllinien PiCa und FaDu.

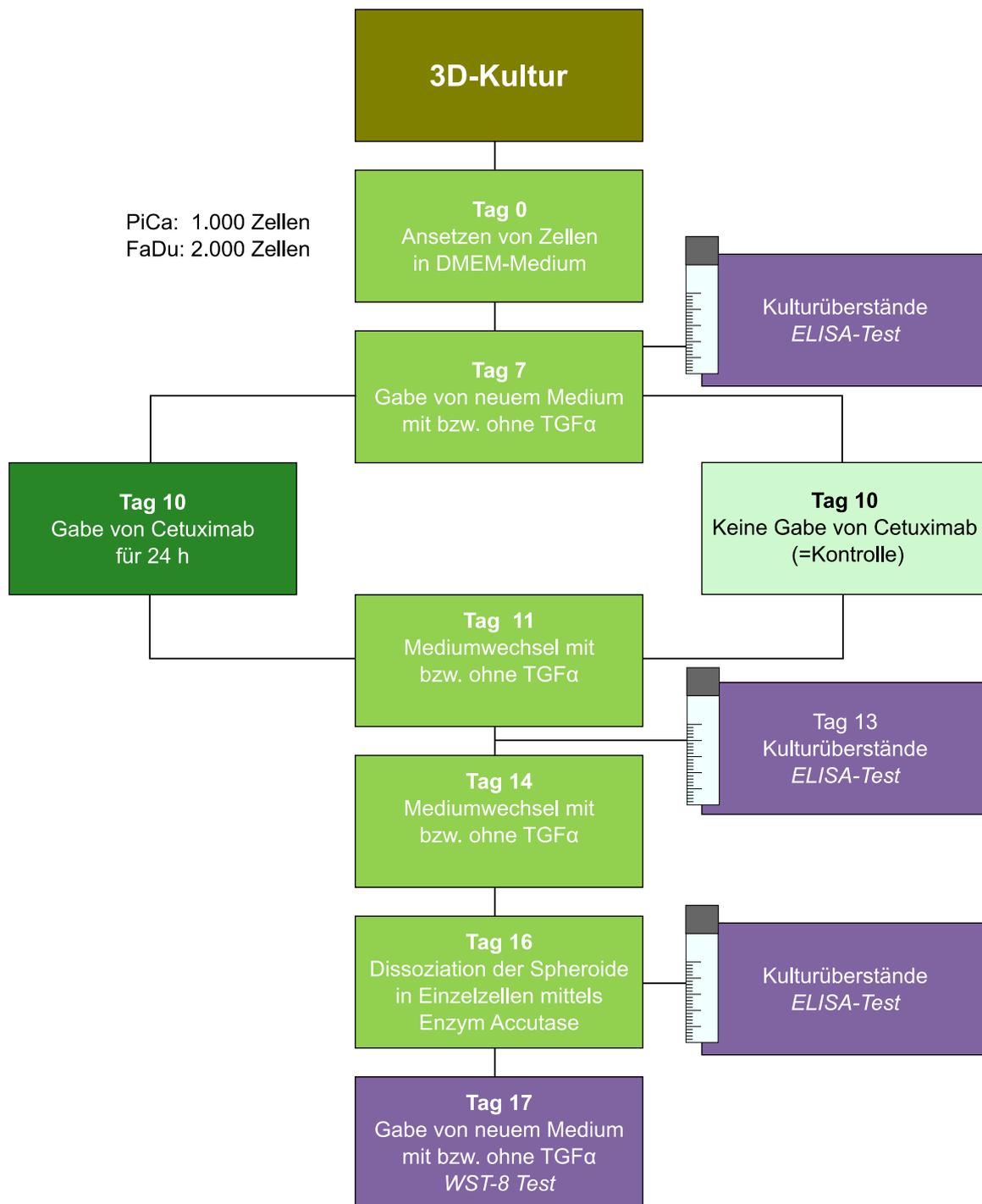


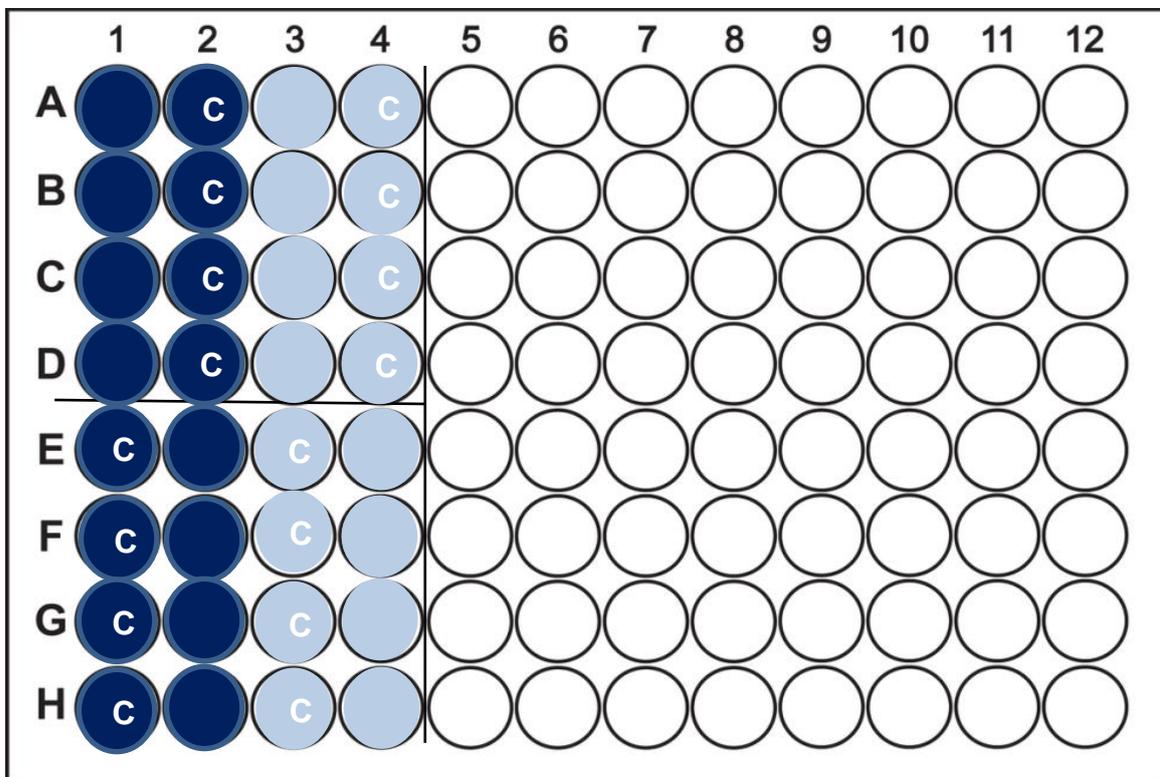
Abbildung 10: Übersicht 3D-Studiendesign

Liganden

Im Gegensatz zum 2D-Modell wurde der Ligand TGF α in seiner Konzentration (siehe Tabelle 7) beim 3D-Studienmodell ab Tag 7 erst eingesetzt. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Kultivierung der 3D-Spheroide in speziellen *ultra-low attachment*-Kulturplatten in reinem modifiziertem DMEM, so dass sich die Spheroide unter gleichen Bedingungen bilden konnten.

Aussaat der Zellen an Tag 0 in reinem DMEM

An Tag 0 wurden im Anschluss an die Passagierung jeweils 2.000 Zellen (für Zelllinie FaDu) bzw. 1.000 Zellen (für Zelllinie PiCa) aus der Zellsuspension in eine spezielle 96-Well-Spheroid-Kulturplatte pipettiert. Nachdem die Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl in die Platten eingebracht wurde, verhinderte die spezielle Beschichtung ein Anheften der adhärenenten Zellen. Dadurch wurden die Zellen gezwungen zu aggregieren und bildeten dreidimensionale, kugelförmige Gebilde aus. Diese Spheroide konnten in der 96-Well-Spheroid-Kulturplatte für die darauffolgenden Experimente ab Tag 7 weiterverwendet werden. Abbildung 11 zeigt das Plattenschema des 3D-Versuches mit Kontrolle, Ligand TGF α ab Tag 7 und in Kombination mit Cetuximab.



96-Well-Spheroid-Kulturplatte	
	Wells eines anderen Versuches einer anderen Passage mit demselben Schema
	Kontroll-Wells ohne TGF α bzw. Wells mit Cetuximab-Behandlung an Tag 10
	Wells mit TGF α ab Tag 7 bzw. Wells mit Cetuximab-Behandlung an Tag 10

Abbildung 11: Schema des 3D-Versuches mit Ligand TGF α und Cetuximab für eine Passage einer Zelllinie

Kultivierung und Behandlungsschema

Die Spheroid-Kulturplatten lagerten analog zu den 2D-Studienversuchen die komplette Studienzeit über im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. An Tag 7 erfolgte ein erster entsprechender Mediumwechsel (Medium mit beziehungsweise TGF α). 10 μ l Cetuximab wurden an Tag 10 für eine 24-stündige Inkubationszeit mit einer Konzentration von 10 μ g/ml (siehe Tabelle 6) in entsprechende Wells hinzupipettiert. An Tag 11 erfolgte ein entsprechender Mediumwechsel (Medium mit beziehungsweise ohne TGF α). Auch an Tag 14 wurde das Medium mit beziehungsweise ohne TGF α nochmals entsprechend gewechselt. Um das Zellwachstum im 3D-Modell an Tag 17 quantifizieren zu können, musste zunächst eine Einzelzellisolation aus dem Zellverband der Spheroiden erfolgen.

Dissoziation der Spheroiden

Die Auftrennung der 3D-Spheroiden erfolgte in sogenannten Safe Lock-Tubes, in welche jeder Spheroid einzeln aus der Kulturplatte überführt werden musste. Nach Zentrifugation von 2,5 min bei 3.000 U/min in der Tischzentrifuge konnte der flüssige Überstand in jedem Tube abpipettiert werden. Im Anschluss wurde jeder Spheroid mit 100 μ l PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation konnte wiederum der Überstand abgesaugt werden. Nach Zugabe von 100 μ l von im Brutschrank vorgewärmter Accutase und einer Inkubationszeit des Enzyms von 8 Minuten im Brutschrank konnten die Zell-Zell-Verbindungen der Spheroiden wieder aufgelöst werden. Die Enzym-Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l DMEM gestoppt und das Enzym-DMEM-Gemisch konnte nach nochmaliger Zentrifugation als Überstand abpipettiert werden. Die isolierten Einzelzellen aus dem Zellverband wurden mit 100 μ l DMEM resuspendiert und für 24 h zur Anheftung auf Standard-Zellkulturplatten angesetzt. Diese konnten an Tag 17 durch die jeweiligen Tests ausgewertet werden.

Je Versuch existierten vier Einzel-Replikate für jeden Ansatz (Kontrollen, TGF α und dieser in Kombination mit Cetuximab) und somit nach fünf Gesamtversuchen 20 Replikate (n = 20) für jeden Test.

2.4 Statistische Testverfahren und graphische Darstellung

Die Ergebnisse des ELISA-Tests wurden mit dem Programm Microsoft Excel™ graphisch dargestellt. Die Höhe der Säulen im Diagramm stellt den Mittelwert dar. Der zusätzlich eingezeichnete Fehlerbalken entspricht der dazugehörigen Standardabweichung.

Die statistische Auswertung des Vitalitätstests wurde mit Hilfe des Programms SPSS Statistics 23.0™ durchgeführt. Die Normalverteilung metrischer Werte wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test ermittelt. Um Unterschiede normal verteilter Werte zu testen, wurde der T-Test angewandt. Der Wilcoxon-Test wurde für alle nicht normal verteilten Werte durchgeführt. Das globale Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ definiert. Der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben diente zum Vergleich der Daten beider Zelllinien und beider Kulturmodelle.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse für den Vitalitätstest wurden Boxplots verwendet, die mit dem Programm SPSS Statistics 23.0™ angefertigt wurden. Innerhalb jeder Box im Boxplot liegen 50 % der Werte (unteres und oberes Quartil), wobei die Länge der Box als Interquartilsabstand (IQR) bezeichnet wird. Der Median als durchgehender horizontaler Strich in der Box veranschaulicht die Verteilung der Einzelwerte. Der Whisker wurde als Begrenzung jener Datenwerte gewählt, die sich innerhalb des eineinhalbfachen Interquartilsabstands ($1,5 \times \text{IQR}$) befinden. Liegen alle Werte des Versuchs in diesem Bereich, endet der Whisker am niedrigsten (unterer Whisker) beziehungsweise am höchsten Wert (oberer Whisker). Sogenannte Ausreißerwerte, die um mehr als eineinhalb Kastenlängen außerhalb des Interquartilsabstands liegen ($>1,5 \times \text{IQR}$), werden durch einen Kreis [°] gekennzeichnet. Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb der Box liegen ($>3 \text{ IQR}$), sind durch einen Stern [*] markiert.

3. Ergebnisse

3.1 Konzentrationen der vier EGFR-Liganden (ELISA)

3.1.1 Konzentration von EGF in den Kulturüberständen

Alle ermittelten Daten lagen deutlich unterhalb der Nachweisgrenze von 1 pg/ml, weshalb keine Konzentration von EGF in den Kulturüberständen bestimmbar war.

3.1.2 Konzentration von TGF α , EREG und AREG in den Kulturüberständen

2D-Kulturmodell

Tabelle 8 zeigt die Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu.

Die Messung der Liganden-Konzentration an Tag 3 erfolgte nach 72 Stunden Kultivierung in reinem DMEM-Medium (Kontrolle T3). Nach weiteren 48 Stunden in reinem DMEM-Medium und nach einem Mediumwechsel an Tag 4 erfolgte die Messung an Tag 7 (Kontrolle T7). Die Kulturüberstände der Zellen, welche für 24 Stunden Cetuximab an Tag 4 verabreicht bekamen, wurden nach weiteren 48 Stunden ausgewertet (Cetux T7).

2D-Kulturmodell		PiCa Mittelwert in pg/ml	FaDu Mittelwert in pg/ml
TGFα	Kontrolle Tag 3	6,07	6,44
	Kontrolle Tag 7	27,41	17,65
	Cetuximab Tag 7	207,68 (658 %)	54,25 (207 %)
EREG	Kontrolle Tag 3	48,96	39,43
	Kontrolle Tag 7	680,86	557,15
	Cetuximab Tag 7	654,69 (-4 %)	621,05 (11 %)
AREG	Kontrolle Tag 3	11,63	23,77
	Kontrolle Tag 7	16,61	29,28
	Cetuximab Tag 7	33,46 (101 %)	42,65 (46 %)

Tabelle 8: Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4). Werte in Klammern zeigen die prozentuale Veränderung der Liganden-Konzentration in den Kulturüberständen von Cetuximab Tag 7 im Vergleich zu Kontrolle Tag 7

Abbildung 12-14 zeigen graphisch die Liganden-Konzentration von TGF α , EREG und AREG in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu.

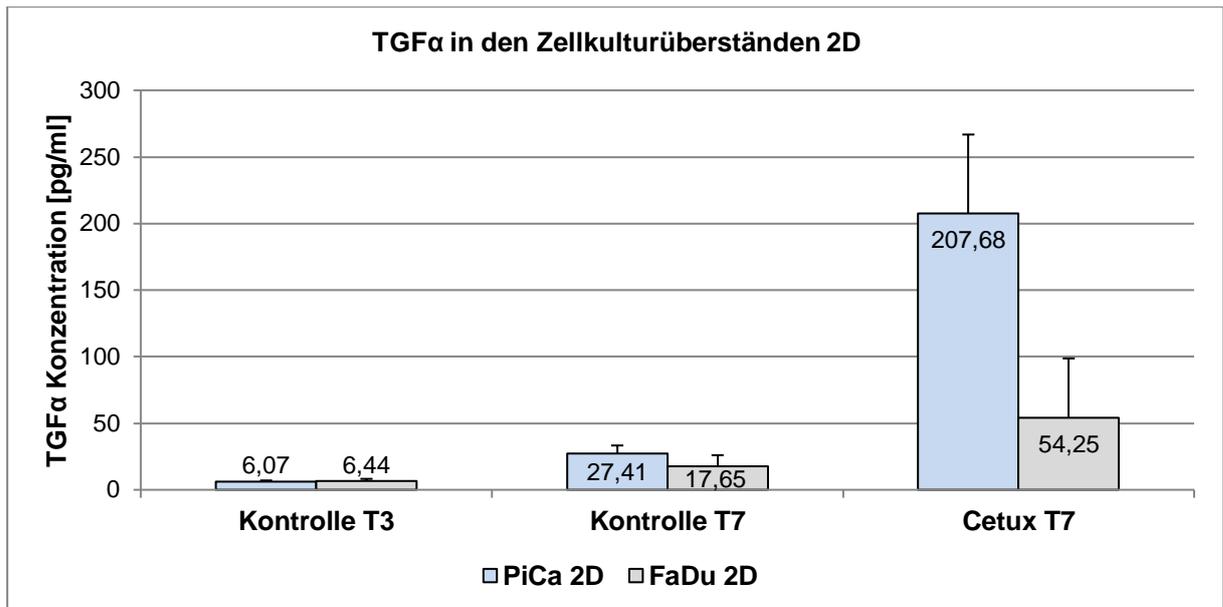


Abbildung 12: Konzentration des Liganden TGF α und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4)

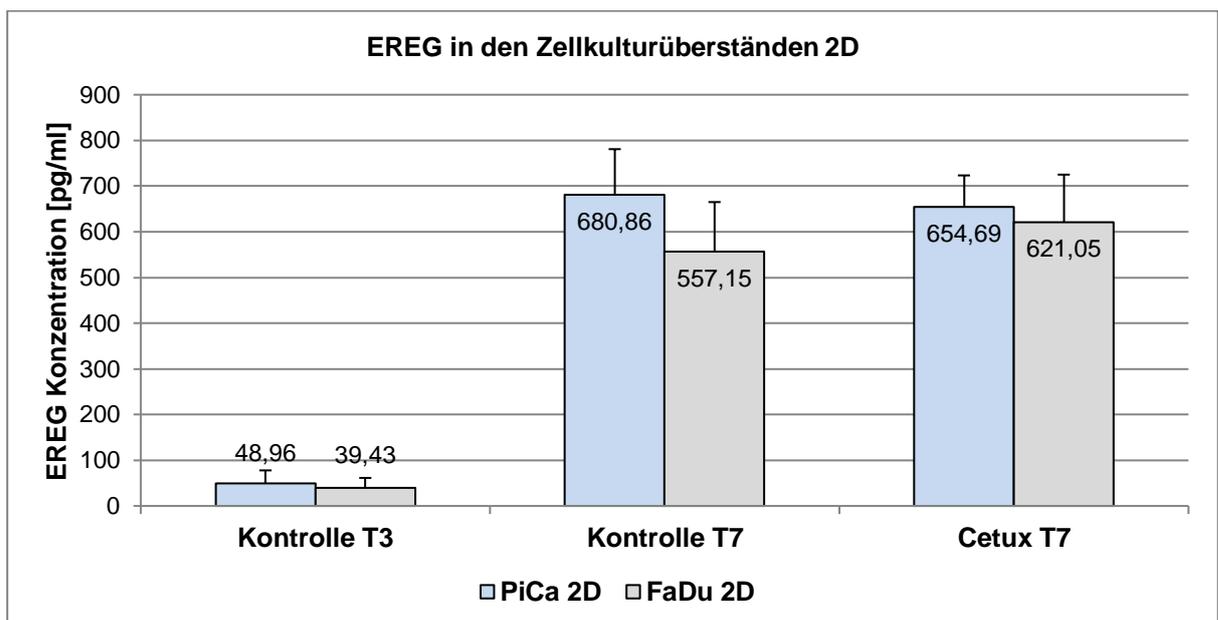


Abbildung 13: Konzentration des Liganden Epiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4)

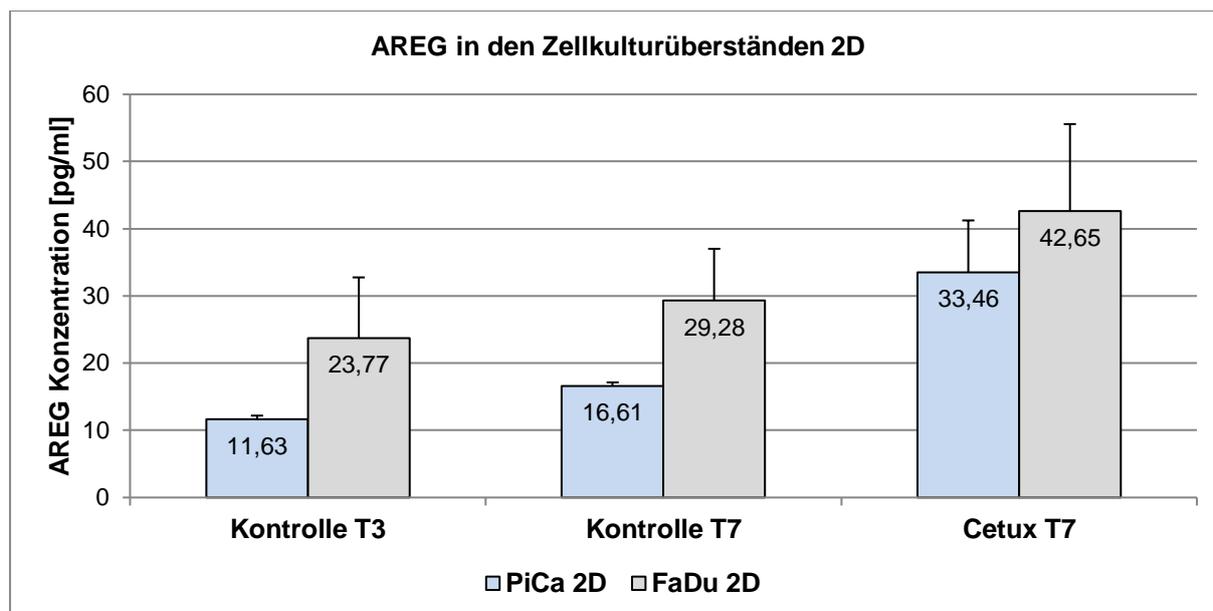


Abbildung 14: Konzentration des Liganden Amphiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4)

3D-Kulturmodell

Tabelle 9 zeigt die Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu.

Die Messung der Liganden-Konzentration im 3D-Kulturmodell an Tag 7 erfolgte nach 72 Stunden Kultivierung (Kontrolle T7). Nach einem Mediumwechsel an Tag 11 und nach weiteren 48 Stunden Kultivierung wurde die Liganden-Konzentration in den Zellkulturüberständen an Tag 13 (Kontrolle T13) bestimmt. Die Kulturüberstände der Zellen, die an Tag 10 für 24 Stunden Cetuximab verabreicht bekamen, wurden nach weiteren 48 Stunden an Tag 13 ausgewertet (Cetux T13). Nach weiteren 120 Stunden wurde die Konzentration der Kontrollgruppe an Tag 16 (Kontrolle T16) ermittelt. Die Liganden-Konzentration in den Kulturüberständen von Zellen, welche an Tag 10 für 24 Stunden Cetuximab verabreicht bekamen, wurden ebenfalls nach 120 Stunden detektiert (Cetux T16).

3D-Kulturmodell		PiCa Mittelwert in pg/ml	FaDu Mittelwert in pg/ml
TGFα	Kontrolle Tag 7	7,47	3,88
	Kontrolle Tag 13	39,09	16,45
	Cetuximab Tag 13	167,51 (329 %)	54,53 (231 %)
	Kontrolle Tag 16	76,81	48,25
	Cetuximab Tag 16	210,26 (174 %)	93,33 (93 %)
EREG	Kontrolle Tag 7	31,93	69,26
	Kontrolle Tag 13	678,49	550,01
	Cetuximab Tag 13	634,07 (-7 %)	584,91 (6 %)
	Kontrolle Tag 16	522,25	804,58
	Cetuximab Tag 16	632,49 (21 %)	824,41 (2 %)
AREG	Kontrolle Tag 7	6,97	5,41
	Kontrolle Tag 13	10,19	8,23
	Cetuximab Tag 13	19,55 (92 %)	11,15 (35 %)
	Kontrolle Tag 16	23,98	15,73
	Cetuximab Tag 16	33,80 (41 %)	21,16 (35 %)

Tabelle 9: Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4). Werte in Klammern zeigen die prozentuale Veränderung der Liganden-Konzentration in den Kulturüberständen von Cetuximab Tag 13 im Vergleich zu Kontrolle Tag 13, beziehungsweise von Cetuximab Tag 16 im Vergleich zu Kontrolle Tag 16

Abbildung 15 - 17 verdeutlichen graphisch die Liganden-Konzentration von TGF α , EREG und AREG in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu.

Ergebnisse

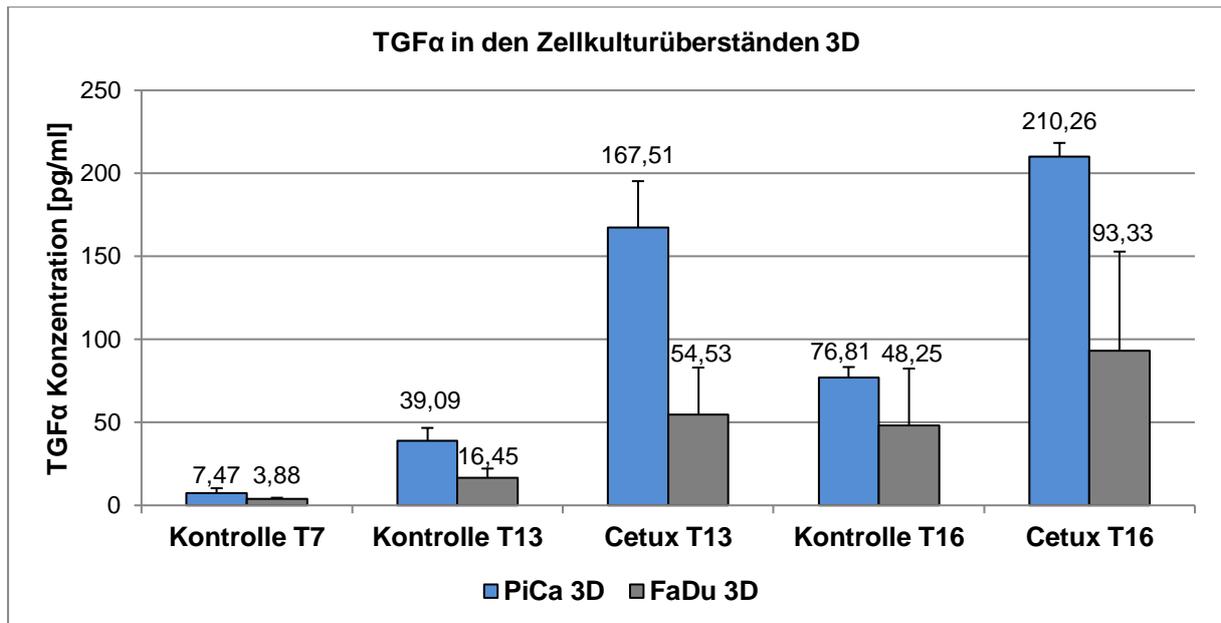


Abbildung 15: Konzentration des Liganden TGF α und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4)

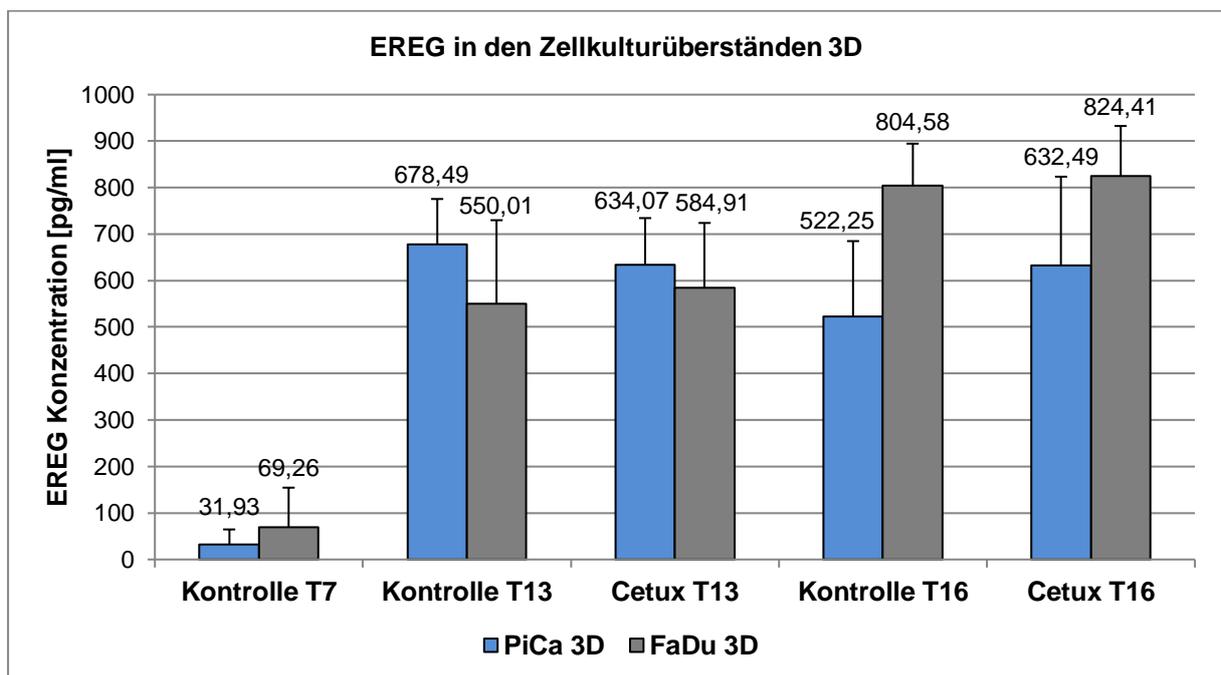


Abbildung 16: Konzentration des Liganden Epiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4)

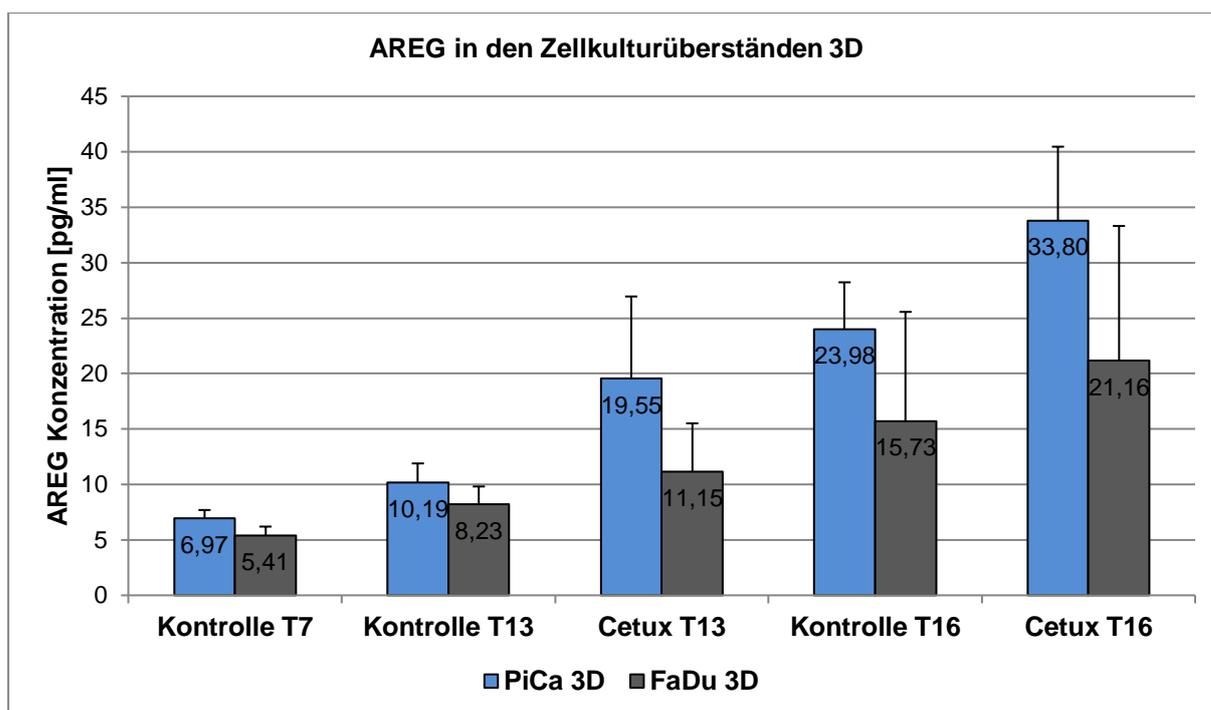


Abbildung 17: Konzentration des Liganden Amphiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4)

Vergleich der beiden Kulturmodelle für PiCa

Tabelle 10 zeigt die Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen von 2D- und 3D-Kulturmodell für die Zelllinie PiCa.

Die Messung der Liganden-Konzentration für die 1. Kulturperiode erfolgte nach 72 Stunden Kultivierung für das 2D-Kulturmodell an Tag 3 und für das 3D-Kulturmodell an Tag 7 (1. Kulturperiode). Die Liganden-Konzentration für die 2. Kulturperiode wurde nach einem Mediumwechsel im 2D-Kulturmodell an Tag 7 und im 3D-Kulturmodell an Tag 13 nach jeweils 48 Stunden Kultivierung gemessen (2. Kulturperiode). Die Kulturüberstände der Zellen, welche an Tag 4 im 2D-Kulturmodell, beziehungsweise an Tag 10 im 3D-Kulturmodell, Cetuximab für 24 Stunden verabreicht bekamen, wurden nach einer Kulturperiode von 48 Stunden an Tag 7 (2D), beziehungsweise an Tag 13 (3D), ausgewertet (2. Kulturperiode + Cetuximab).

PiCa		2D Mittelwert in pg/ml	3D Mittelwert in pg/ml
TGFα	1. Kulturperiode: 72 h (Tag 3 bzw. Tag 7)	6,07	7,47
	2. Kulturperiode: 48 h (Tag 7 bzw. Tag 13)	27,41	39,09
	2. Kulturperiode: 48 h + Cetuximab (Tag 7 bzw. Tag 13)	207,68	167,51
EREG	1. Kulturperiode: 72 h (Tag 3 bzw. Tag 7)	48,96	31,93
	2. Kulturperiode: 48 h (Tag 7 bzw. Tag 13)	680,86	678,49
	2. Kulturperiode: 48 h + Cetuximab (Tag 7 bzw. Tag 13)	654,69	634,07
AREG	1. Kulturperiode: 72 h (Tag 3 bzw. Tag 7)	11,63	6,97
	2. Kulturperiode: 48 h (Tag 7 bzw. Tag 13)	16,61	10,19
	2. Kulturperiode: 48 h + Cetuximab (Tag 7 bzw. Tag 13)	33,46	19,55

Tabelle 10: Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie PiCa (n = 4)

Abbildung 18 - 20 verdeutlichen graphisch die Konzentration von TGF α , EREG und AREG im 2D- und 3D-Kulturmodell für die Zelllinie PiCa.

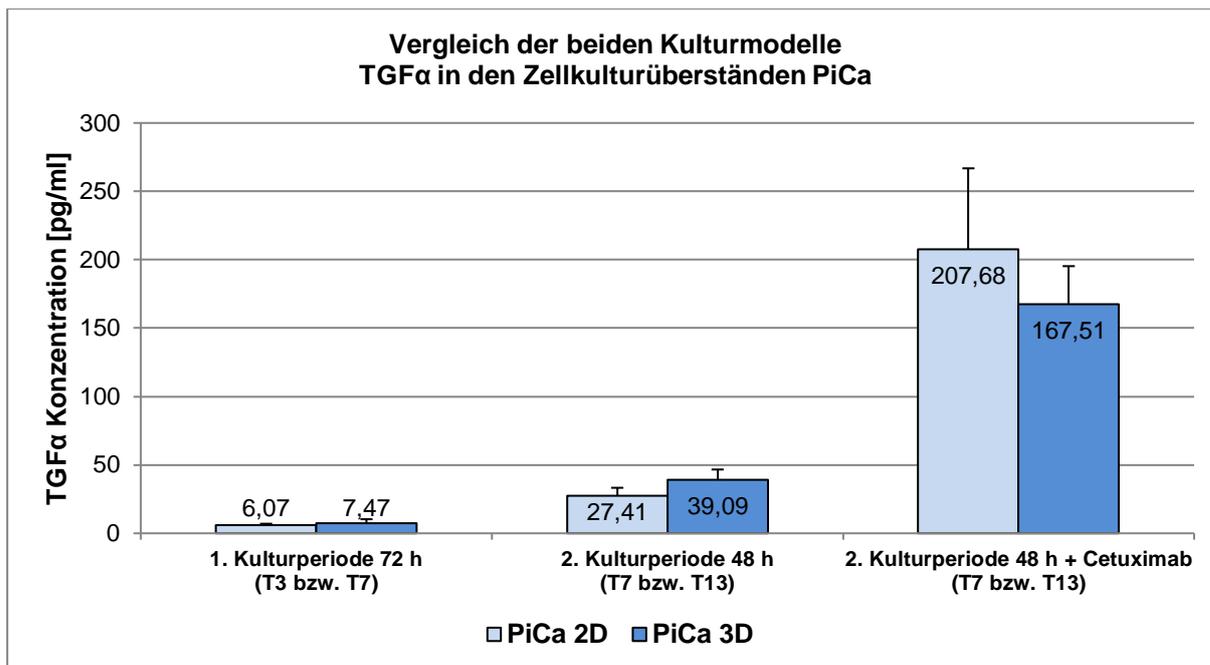


Abbildung 18: Konzentration des Liganden TGF α und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie PiCa (n = 4)

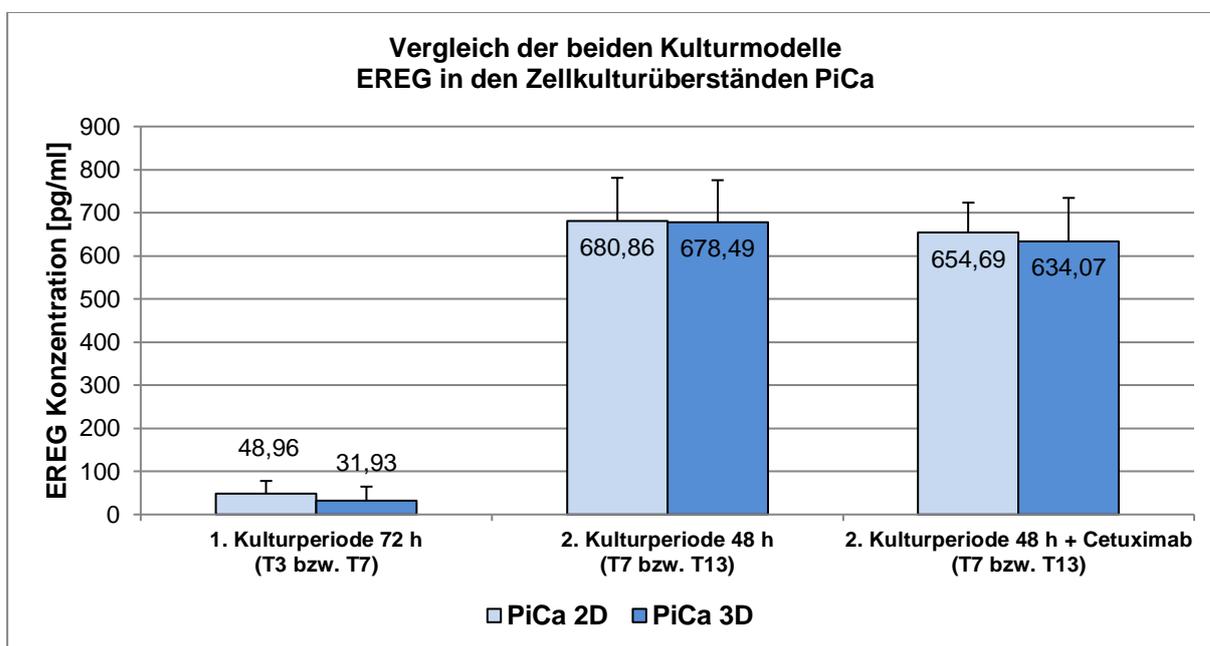


Abbildung 19: Konzentration des Liganden Epiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie PiCa (n = 4)

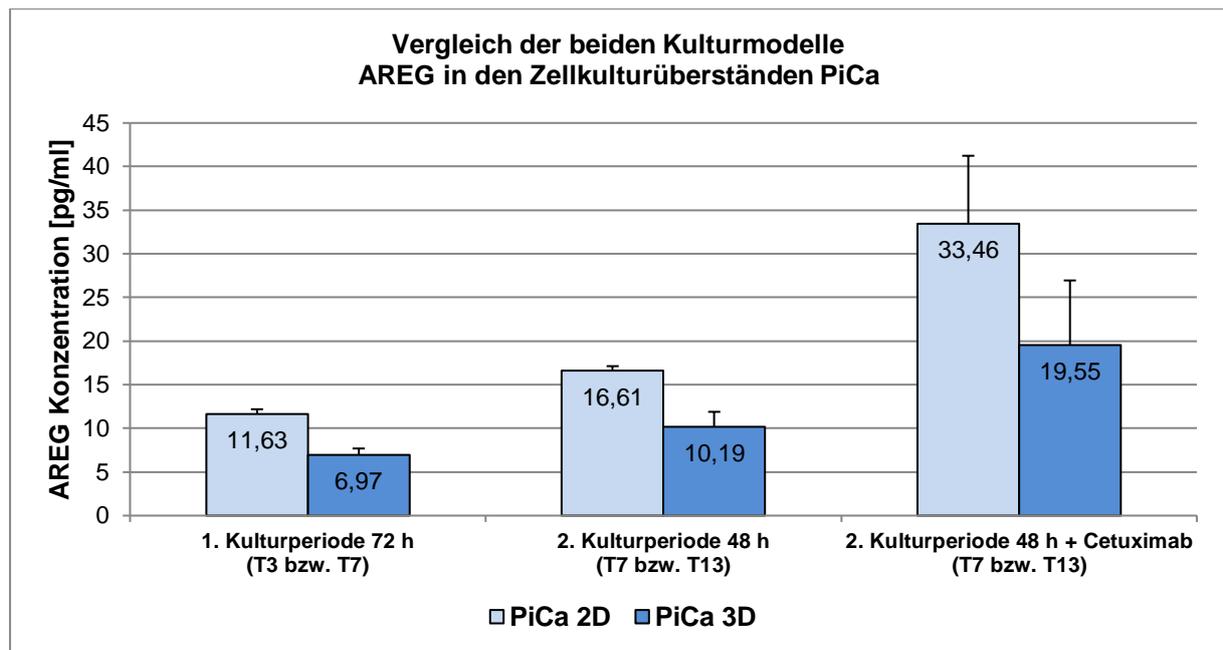


Abbildung 20: Konzentration des Liganden Amphiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie PiCa (n = 4)

Vergleich der beiden Kulturmodelle für FaDu

Tabelle 11 stellt die Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen von 2D- und 3D-Kulturmodell für die Zelllinie FaDu dar.

Analog zur Zelllinie PiCa wurden die Messdaten für die jeweilige Kulturperiode im 2D- und 3D-Kulturmodell ermittelt.

FaDu		2D Mittelwert in pg/ml	3D Mittelwert in pg/ml
TGFα	1. Kulturperiode: 72 h (Tag 3 bzw. Tag 7)	6,44	3,88
	2. Kulturperiode: 48 h (Tag 7 bzw. Tag 13)	17,65	16,45
	2. Kulturperiode: 48 h + Cetuximab (Tag 7 bzw. Tag 13)	54,25	54,53
EREG	1. Kulturperiode: 72 h (Tag 3 bzw. Tag 7)	39,43	69,26
	2. Kulturperiode: 48 h (Tag 7 bzw. Tag 13)	557,15	550,01
	2. Kulturperiode: 48 h + Cetuximab (Tag 7 bzw. Tag 13)	621,05	584,91
AREG	1. Kulturperiode: 72 h (Tag 3 bzw. Tag 7)	23,77	5,41
	2. Kulturperiode: 48 h (Tag 7 bzw. Tag 13)	29,28	8,23
	2. Kulturperiode: 48 h + Cetuximab (Tag 7 bzw. Tag 13)	42,65	11,15

Tabelle 11: Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie FaDu (n = 4)

Abbildung 21 - 23 zeigen graphisch die Konzentration von TGF α , EREG und AREG im 2D- und 3D-Kulturmodell in den Zellkulturüberständen für die Zelllinie FaDu.

Ergebnisse

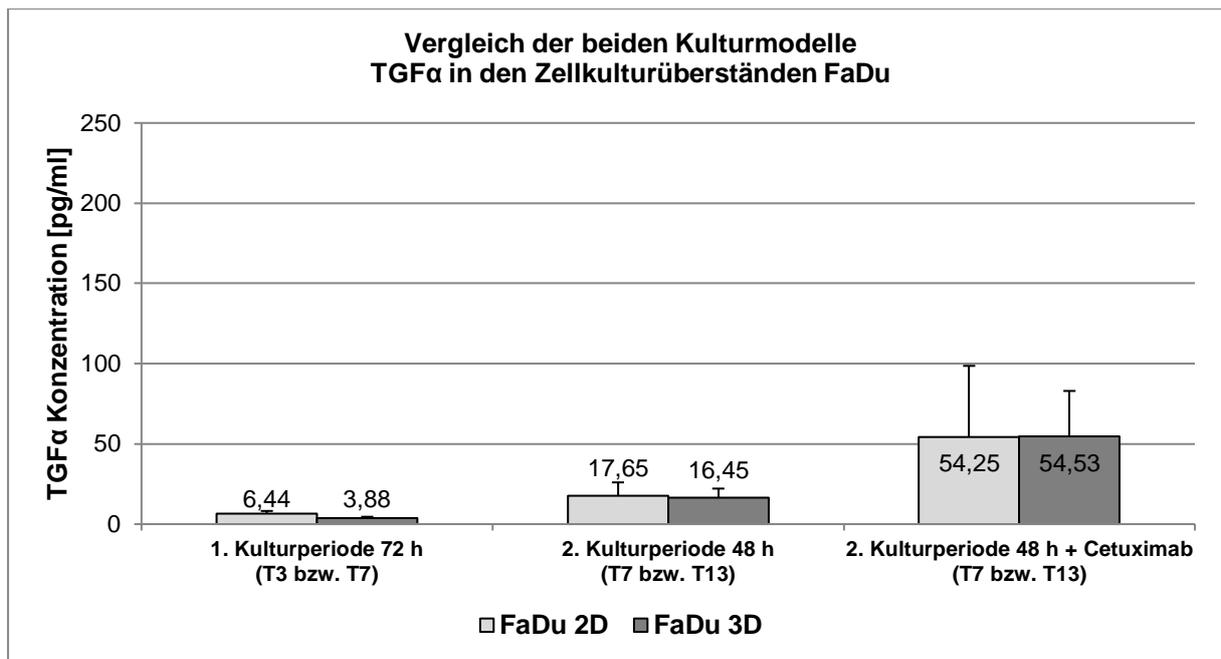


Abbildung 21: Konzentration des Liganden TGF α und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie FaDu (n = 4)

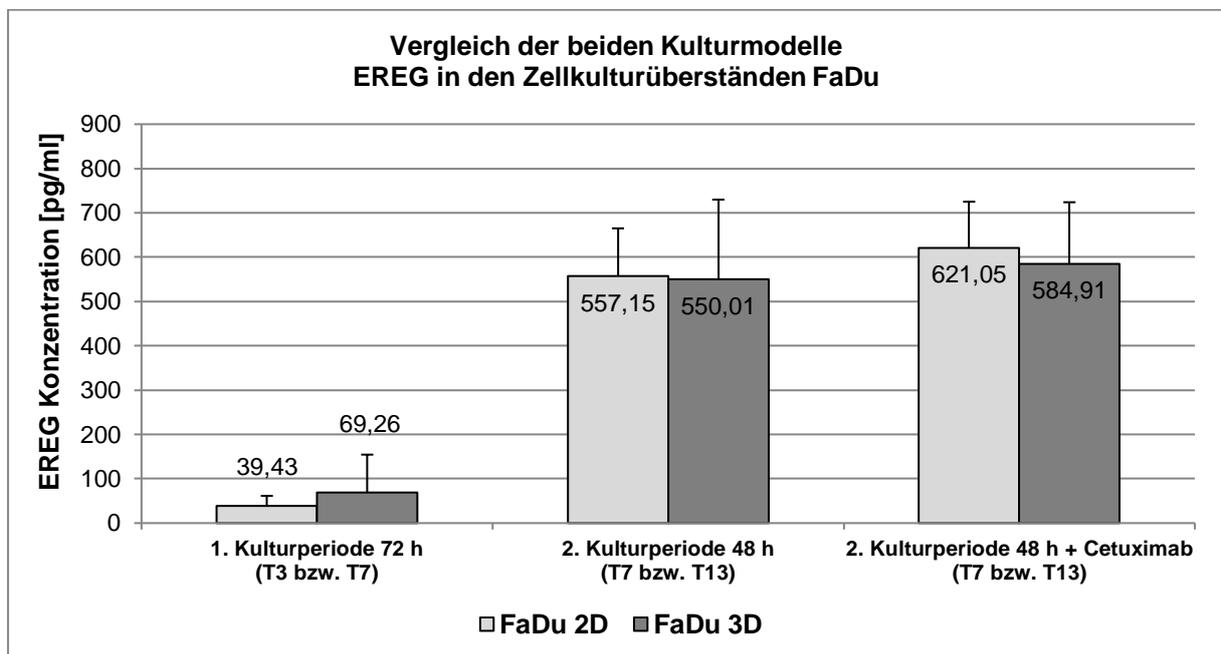


Abbildung 22: Konzentration des Liganden Epiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie FaDu (n = 4)

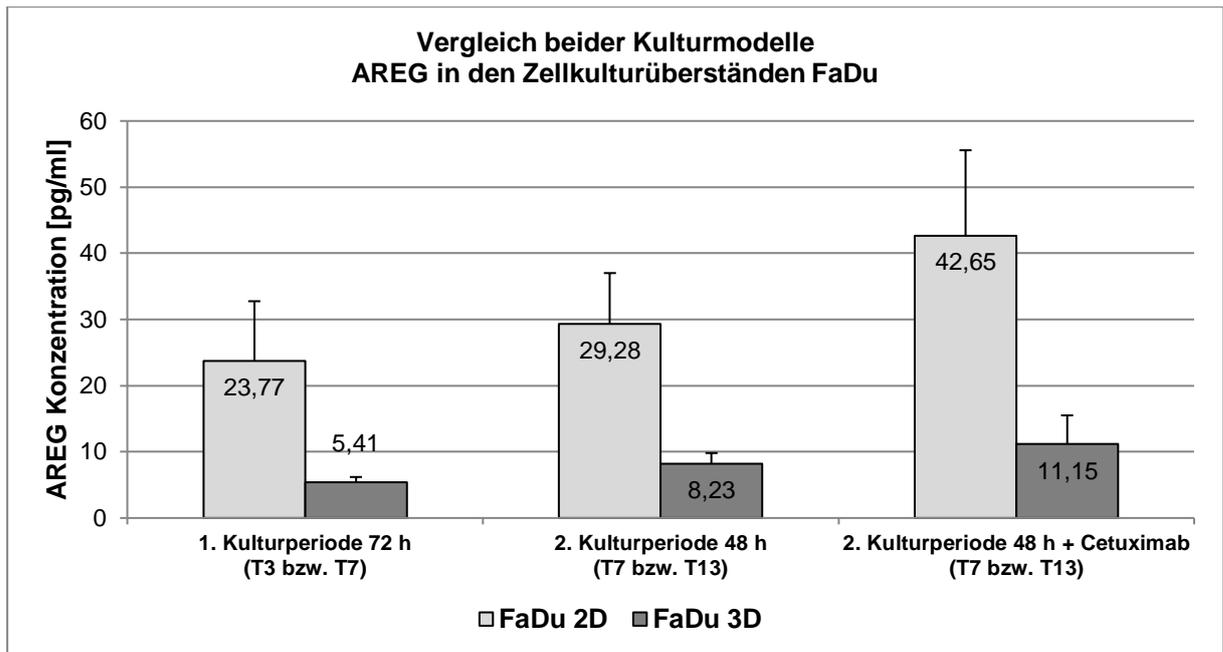


Abbildung 23: Konzentration des Liganden Amphiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie FaDu (n = 4)

3.2 Vitalität der Zellen nach TGF α -Gabe und Behandlung mit Cetuximab

3.2.1 Vitalität im 2D-Tumormodell (WST-8)

Ergebnisse PiCa

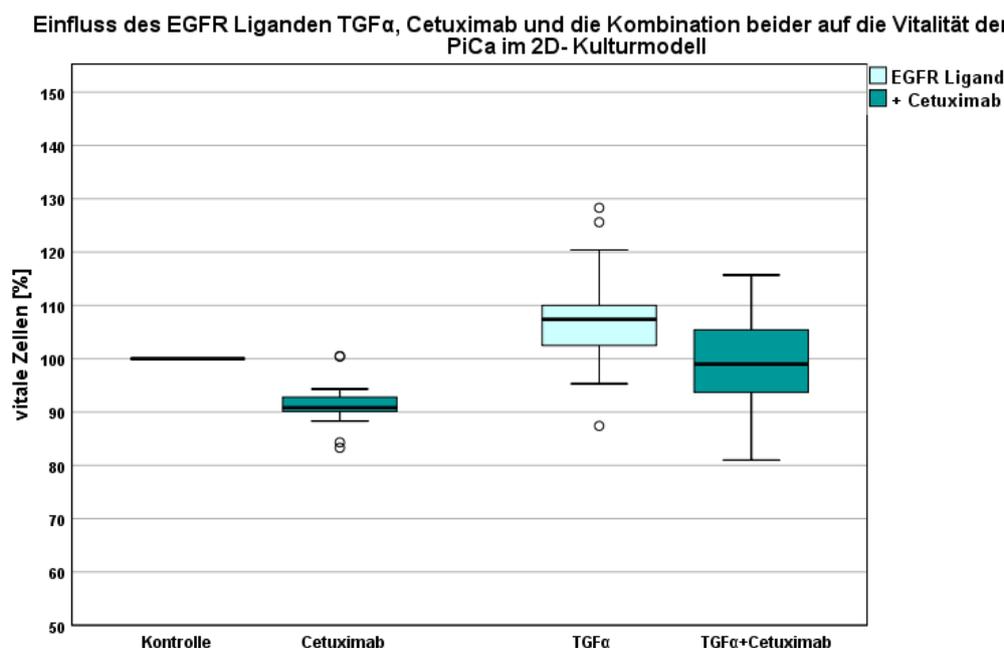


Abbildung 24: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und die Kombination beider auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Als vitale Zellen gelten diejenigen Zellen der Zelllinie, die nach Behandlung im Studiendesign noch lebend und stoffwechselaktiv sind und zu einem Farbumschlag im WST-8 Test führen. Der Farbumschlag, beziehungsweise die Konzentration des gebildeten Formazans (siehe 2.3.4), korreliert dabei mit der Anzahl der vitalen Zellen. Eine Erhöhung der Zellzahl führt zu einer Zunahme der Gesamt-Vitalität im WST-8 Test, eine Verminderung der Zellzahl dementsprechend zu einer Minderung der Gesamt-Vitalität im Boxplot.

Nach alleiniger Liganden-Gabe (vgl. Tabelle 12) kam es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl (Signifikanz < 0,004) der PiCa-Zellen.

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Kontrolle	100,00	0,004
TGFα	107,02	

Tabelle 12: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Bei TGF α in Kombination mit Cetuximab ergab sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl (Signifikanz $\leq 0,001$) verglichen mit den Zellen, die alleinig Cetuximab erhielten (vgl. Tabelle 13).

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Cetuximab	91,39	0,001
TGFα + Cetuximab	99,52	

Tabelle 13: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zu den mit Cetuximab behandelten Zellen im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Die alleinige Gabe von Cetuximab führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der PiCa-Zellen zu einer signifikanten Minderung der Zellzahl (vgl. Tabelle 14). Vergleicht man die Zellen, welche TGF α in Kombination mit Cetuximab erhielten, mit den Zellen, welche den Liganden allein verabreicht bekamen, so waren für PiCa im 2D-Kulturmodell signifikant weniger Zellen vorhanden (Signifikanz $< 0,000$).

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Kontrolle	100,00	$\leq 0,000$
Cetuximab	91,39	
TGFα	107,02	$\leq 0,000$
TGFα + Cetuximab	99,52	

Tabelle 14: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Liganden-Gabe im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Ergebnisse FaDu

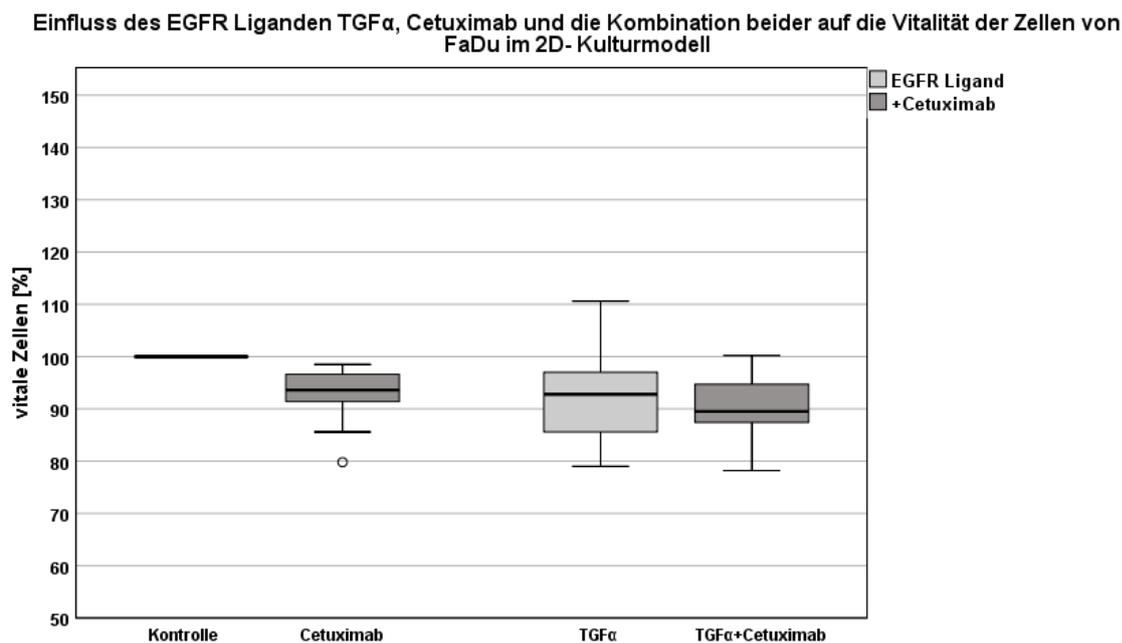


Abbildung 25: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und die Kombination beider auf die Vitalität der Zellen von FaDu im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Nach alleiniger Gabe von TGF α folgte eine signifikante Abnahme vitaler FaDu-Zellen (Signifikanz < 0,001) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (vgl. Tabelle 15) im 2D-Kulturmodell.

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Kontrolle	100,00	0,001
TGFα	92,29	

Tabelle 15: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Vergleicht man die Zellen, welche den Liganden in Kombination mit Cetuximab erhielten, mit den Zellen, welche alleinig Cetuximab verabreicht bekamen (vgl. Tabelle 16), so wird deutlich, dass TGF α in Kombination mit Cetuximab zu keiner Veränderung der Zellzahl führt (Signifikanz > 0,287).

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Cetuximab	92,85	0,287
TGFα + Cetuximab	90,66	

Tabelle 16: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zu den mit Cetuximab behandelten Zellen im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Die alleinige Gabe von Cetuximab ergab im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen signifikanten Verlust vitaler Zellen (vgl. Tabelle 17). Beim Vergleich Ligand TGF α versus dessen Kombination mit Cetuximab konnte keine statistische Veränderung der Zellzahl (Signifikanz $> 0,216$) detektiert werden.

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Kontrolle	100,00	$\leq 0,000$
Cetuximab	92,85	
TGFα	92,29	0,216
TGFα + Cetuximab	90,66	

Tabelle 17: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Liganden-Gabe im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Vergleich der Vitalität im 2D-Kulturmodell beider Zelllinien

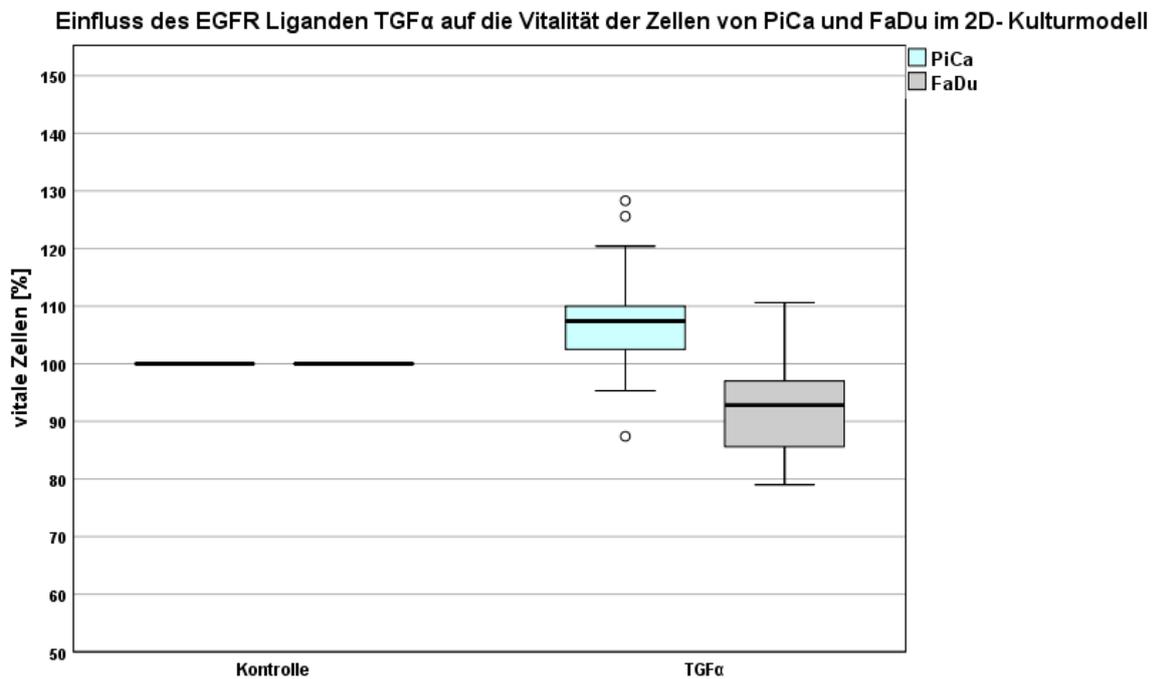


Abbildung 26: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Im Gegensatz zur Wirkung von TGF α in PiCa-Zellen, wo die Gabe der Liganden zu einer Zunahme der vitalen Zellen führte (vgl. Tabelle 18), reduzierte der EGFR-Ligand TGF α die Zahl der vitalen FaDu-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Signifikanz $\leq 0,000$).

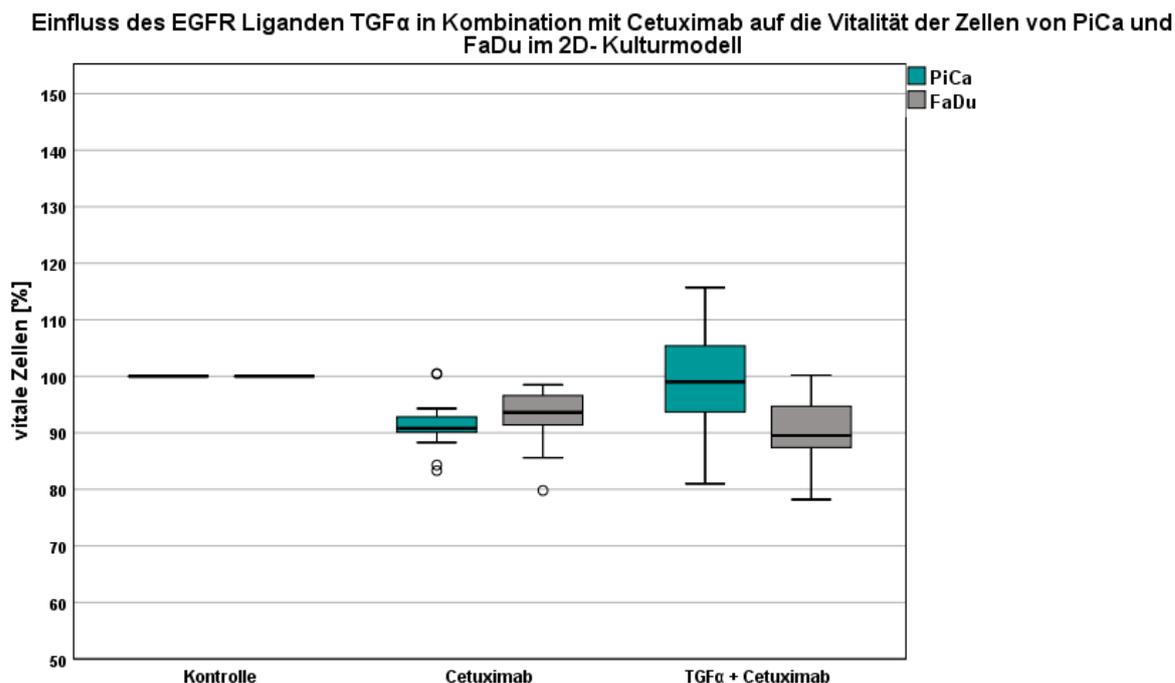


Abbildung 27: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 2D-Kulturmodell (n = 21)

Die alleinige Gabe von Cetuximab führte, sowohl bei PiCa- als auch bei FaDu-Zellen, zu einer Verminderung des Anteils vitaler Zellen (vgl. Tabelle 18) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz zur Wirkung der Kombination von TGF α und Cetuximab in PiCa-Zellen, wo die Liganden-Gabe zu keiner Veränderung der Anzahl der vitalen Zellen führte, reduzierte die Kombination aus TGF α und Cetuximab die Zahl der vitalen FaDu-Zellen (Signifikanz < 0,001) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

	PiCa	FaDu	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
	Mittelwert in %	Mittelwert in %	
Kontrolle	100,00	100,00	
Cetuximab	91,39	92,85	0,063
TGFα	107,02	92,29	$\leq 0,000$
TGFα + Cetuximab	99,52	90,66	0,001

Tabelle 18: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und des Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 2D-Kulturmodell (n = 21)

3.2.2 Vitalität im 3D-Tumormodell (WST-8)

Ergebnisse PiCa

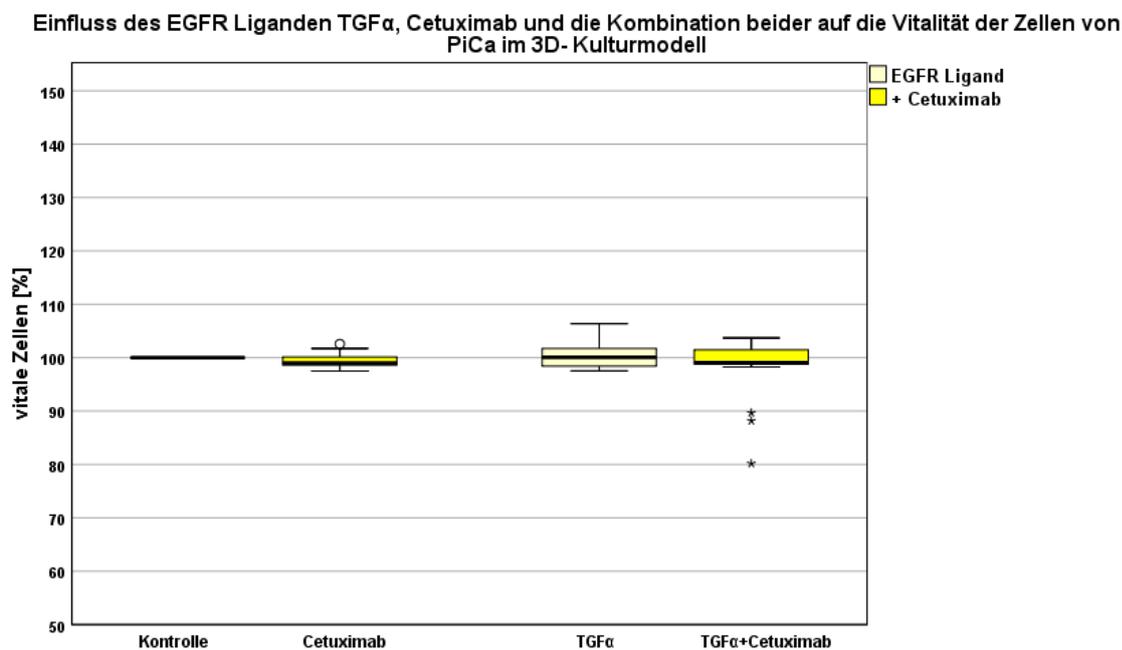


Abbildung 28: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und die Kombination beider auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Analog zum 2D-Kulturmodell gilt für die Ergebnisse im 3D-Kulturmodell, dass als vitale Zellen diejenigen Zellen der Zelllinie gelten, die nach Behandlung im Studiendesign noch lebend und stoffwechselaktiv sind und zu einem Farbumschlag im WST-8 Test führen. Dieser Farbumschlag korreliert mit der Vitalität der Zellen. Eine Erhöhung der Anzahl vitaler Zellen führt dabei zu einer Zunahme der Gesamt-Vitalität im WST-8 Test, eine Verminderung der Anzahl der Zellen dementsprechend zu einem Vitalitätsverlust.

Nach alleiniger Liganden-Gabe (vgl. Tabelle 19) kam es zu keiner statistischen Veränderung der Anzahl vitaler Zellen von PiCa (Signifikanz > 0,512).

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Kontrolle	100,00	0,512
TGF α	100,35	

Tabelle 19: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Bei der Gabe von TGF α in Kombination mit Cetuximab kam es im 3D-Kulturmodell zu keiner Veränderung der Zellzahl (Signifikanz > 0,022) verglichen mit den PiCa-Zellen, die alleine Cetuximab erhielten (vgl. Tabelle 20).

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Cetuximab	99,49	0,409
TGFα + Cetuximab	98,22	

Tabelle 20: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zu den mit Cetuximab behandelten Zellen im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Die alleinige Gabe von Cetuximab (vgl. Tabelle 21) im 3D-Kulturmodell führte, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der PiCa-Zellen, zu keiner statistischen Veränderung der Zellzahl (Signifikanz < 0,116). Beim Vergleich der Zellen, welche TGF α in Kombination mit Cetuximab erhielten, mit den Zellen, welche den Liganden allein verabreicht bekamen, kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der Zellzahl (Signifikanz > 0,227).

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Kontrolle	100,00	0,116
Cetuximab	99,49	
TGFα	100,35	0,227
TGFα + Cetuximab	98,22	

Tabelle 21: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Liganden-Gabe im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Ergebnisse

Ergebnisse FaDu

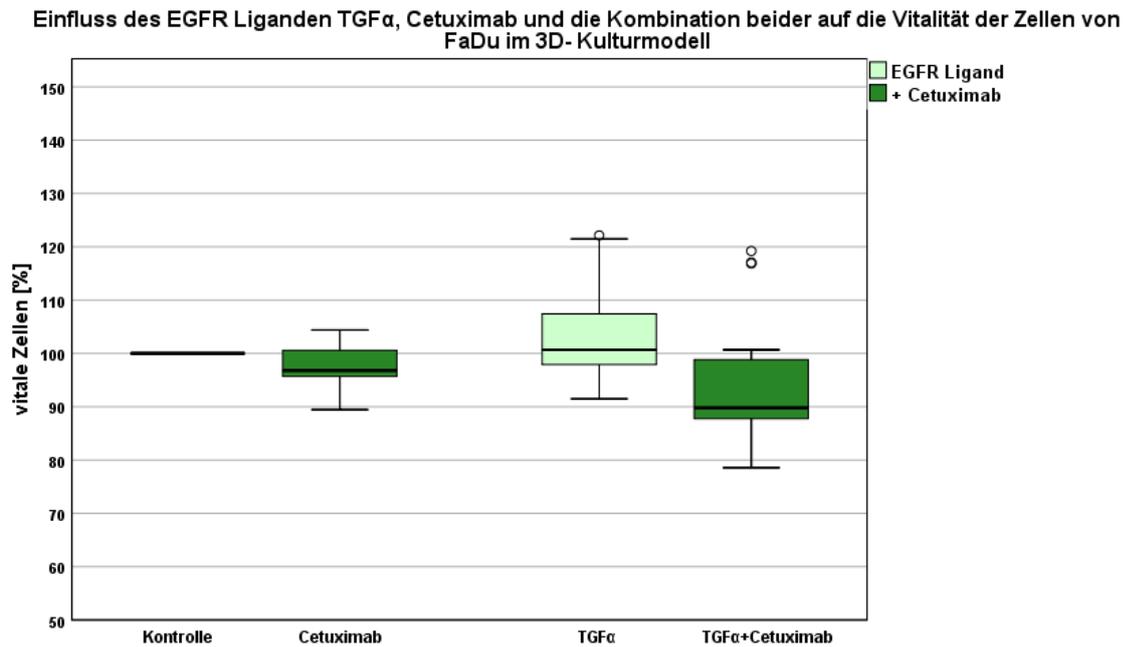


Abbildung 29: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und die Kombination beider auf die Vitalität der Zellen von FaDu im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Nach alleiniger TGF α -Gabe folgte im 3D-Kulturmodell (vgl. Tabelle 22) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine statistische Veränderung der Zellzahl für die FaDu-Zellen.

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Kontrolle	100,00	0,314
TGF α	103,12	

Tabelle 22: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Vergleicht man die Anzahl der Zellen, welche den Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab erhielten, mit der Anzahl der Zellen, welche alleinig Cetuximab verabreicht bekamen (vgl. Tabelle 23), kam es zu keiner statistischen Veränderung der Zellzahl (Signifikanz > 0,231).

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Cetuximab	97,25	0,231
TGFα + Cetuximab	94,41	

Tabelle 23: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zu den mit Cetuximab behandelten Zellen im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Die alleinige Gabe von Cetuximab im 3D-Kulturmodell führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der FaDu-Zellen (vgl. Tabelle 24) zu einer signifikanten Minderung der Zellzahl (Signifikanz < 0,019). Bei der Gabe von TGF α in Kombination mit Cetuximab ergab sich im Vergleich zur alleinigen TGF α -Gabe eine signifikante Minderung des Anteils vitaler FaDu-Zellen.

	Mittelwert in %	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
Kontrolle	100,00	0,019
Cetuximab	97,25	
TGFα	103,12	$\leq 0,000$
TGFα + Cetuximab	94,41	

Tabelle 24: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Liganden-Gabe im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Vergleich der Vitalität im 3D-Kulturmodell beider Zelllinien

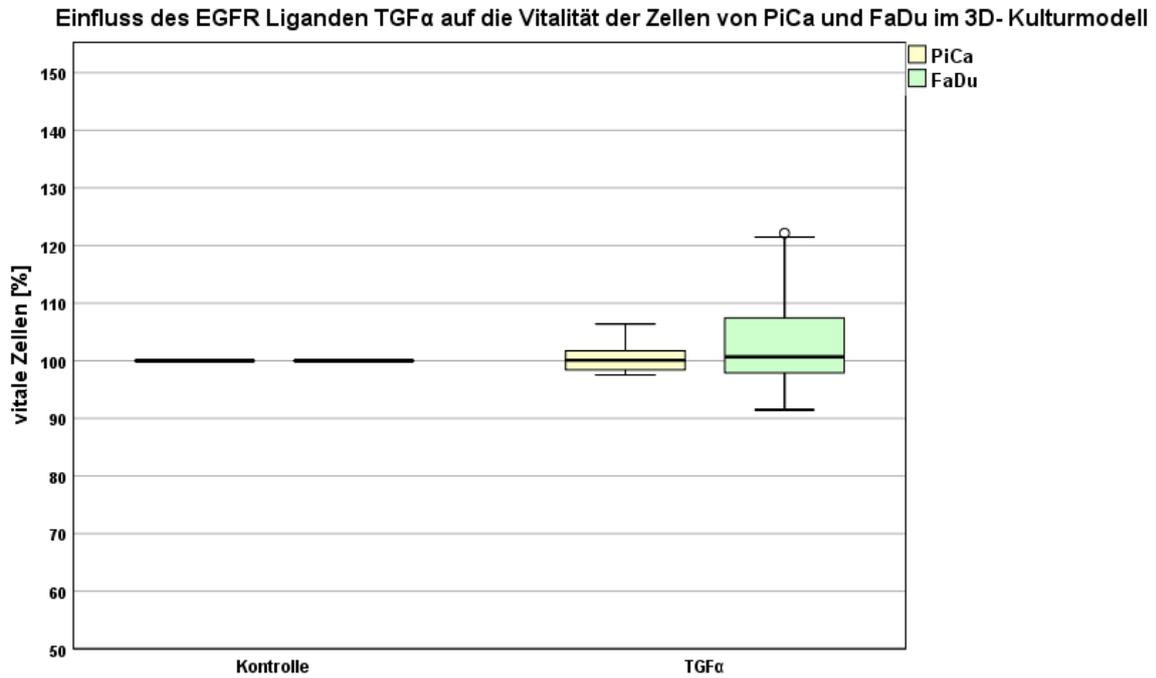


Abbildung 30: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Die Wirkung der alleinigen Gabe von TGF α war, sowohl für PiCa- als auch für FaDu-Zellen, gleich. Es kam zu keiner Änderung der Zellzahl in beiden Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (vgl. Tabelle 25).

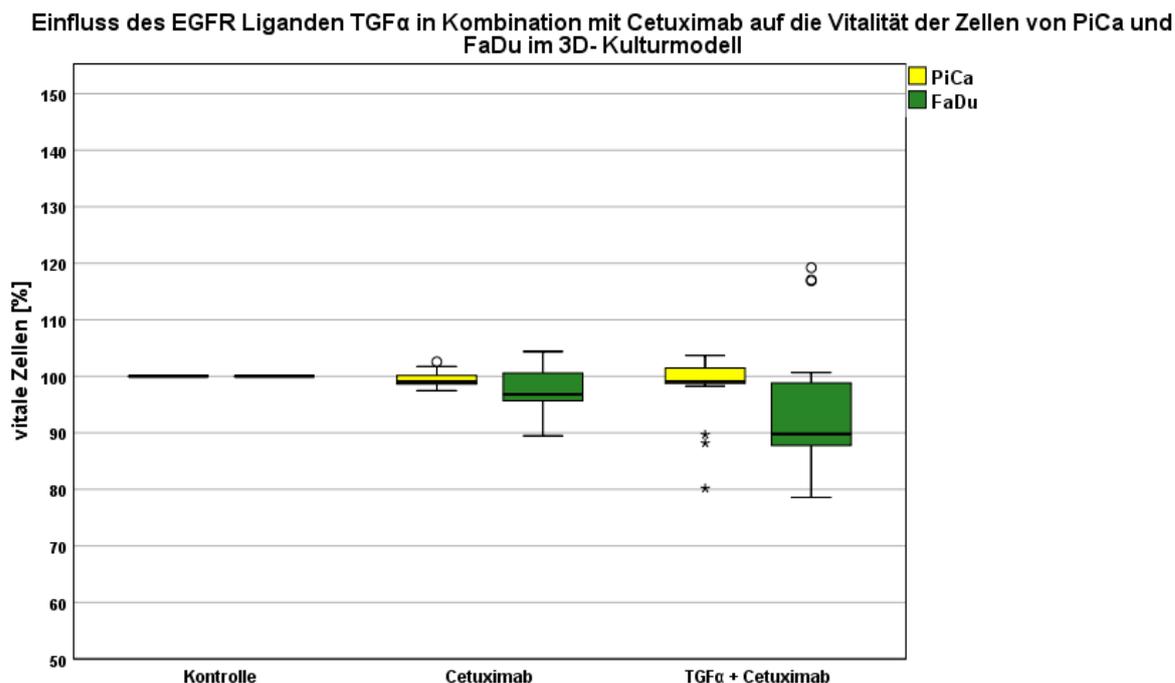


Abbildung 31: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 3D-Kulturmodell (n = 20)

Im Gegensatz zur Wirkung von Cetuximab in PiCa-Zellen (vgl. Tabelle 25), wo die Gabe des Antikörpers zu keiner Veränderung der Zellzahl führte, reduzierte die Gabe von Cetuximab den Anteil vitaler FaDu-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Signifikanz < 0,016). Die Kombination aus TGF α mit Cetuximab im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte bei PiCa-Zellen zu keiner Veränderung der Zellzahl, bei FaDu-Zellen hingegen zu einer Minderung des Anteils vitaler Zellen (Signifikanz < 0,030).

	PiCa	FaDu	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
	Mittelwert in %	Mittelwert in %	
Kontrolle	100,00	100,00	
Cetuximab	99,49	97,25	0,016
TGFα	100,35	103,12	0,589
TGFα + Cetuximab	98,22	94,41	0,030

Tabelle 25: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und des Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 3D-Kulturmodell (n = 20)

3.2.3 Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Kulturmodell

Ergebnisse PiCa

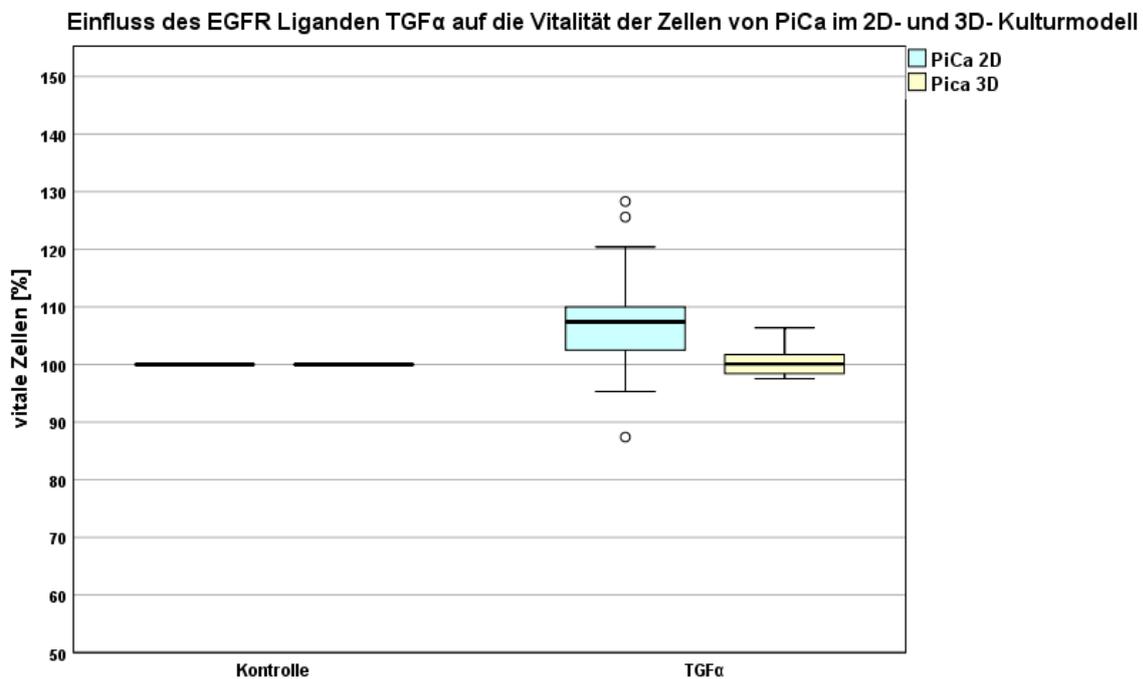


Abbildung 32: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell

Im Gegensatz zur Wirkung des EGFR-Liganden TGF α im 2D-Kulturmodell, wo es zu einer Zunahme vitaler PiCa-Zellen kam (vgl. Tabelle 26), konnte keine Wirkung des Liganden TGF α im 3D-Kulturmodell im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektiert werden.

Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D- und 3D- Kulturmodell

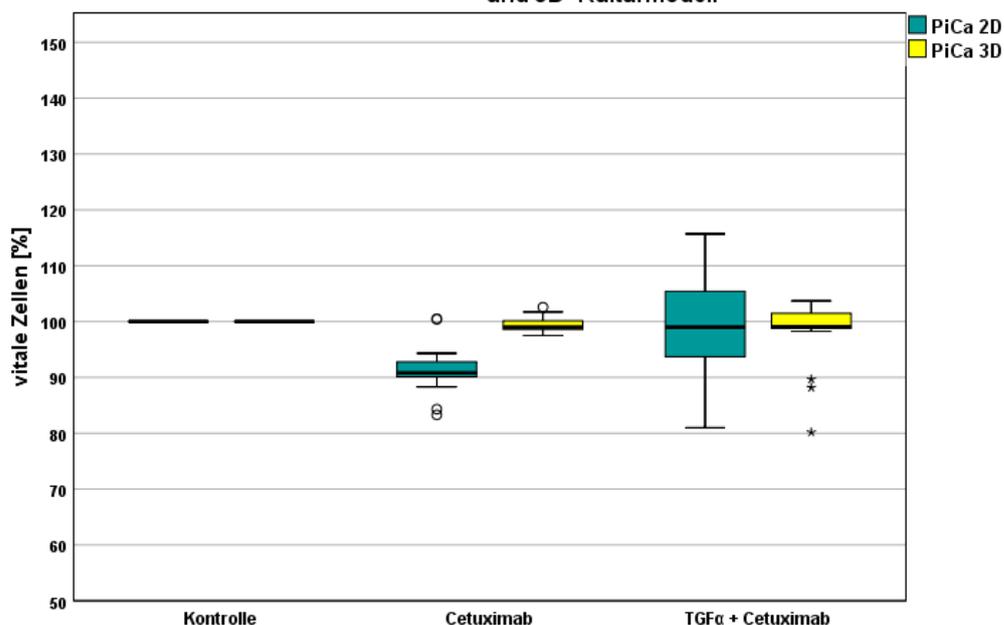


Abbildung 33: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell

Die Wirkung des Antikörpers Cetuximab (vgl. Tabelle 26) führte im 2D-Kulturmodell zu einer Minderung des Anteils vitaler PiCa-Zellen, jedoch konnte die Wirkung des Cetuximab im 3D-Kulturmodell nicht nachgewiesen werden (Signifikanz $\leq 0,000$). Die Kombination aus TGF α mit Cetuximab im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte bei PiCa-Zellen, sowohl im 2D- als auch im 3D-Kulturmodell, zu keiner Veränderung der Zellzahl (Signifikanz $> 0,903$).

	2D	3D	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
	Mittelwert in %	Mittelwert in %	
Kontrolle	100,00	100,00	
Cetuximab	91,39	99,49	$\leq 0,000$
TGFα	107,02	100,35	0,007
TGFα + Cetuximab	99,52	98,22	0,903

Tabelle 26: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell

Ergebnisse FaDu

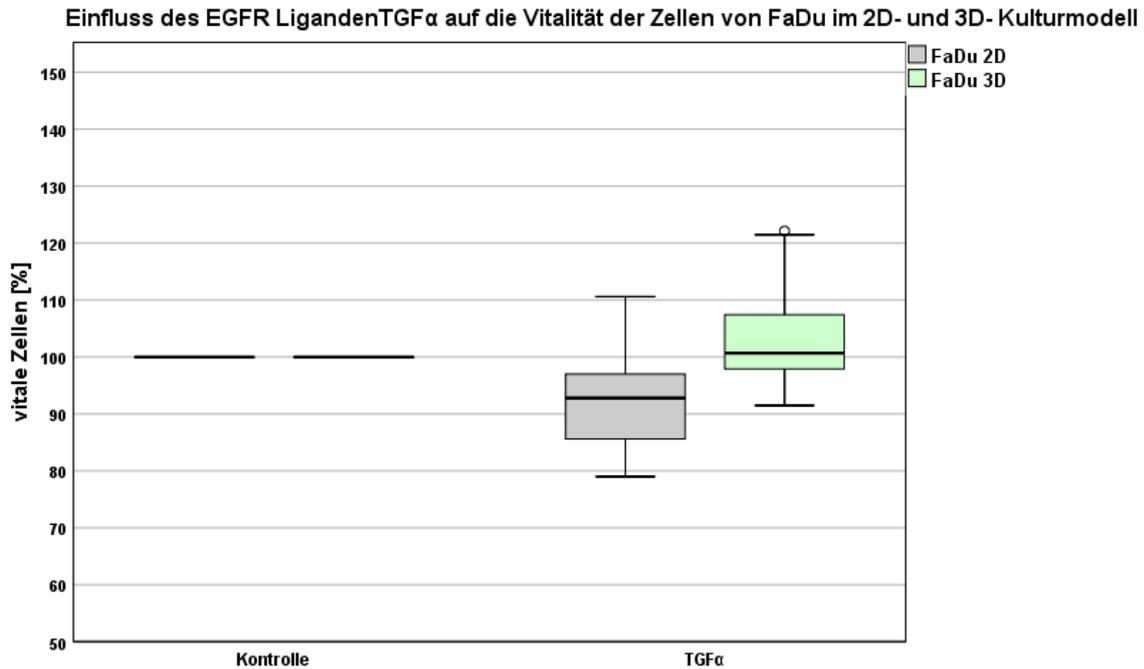


Abbildung 34: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von FaDu im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell

Im Gegensatz zur Wirkung des Liganden TGF α (vgl. Tabelle 27) im 2D-Kulturmodell, wo es zu einer Minderung der Anzahl vitaler FaDu-Zellen kam, konnte keine Wirkung des EGFR-Liganden im 3D-Kulturmodell im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden (Signifikanz < 0,002).

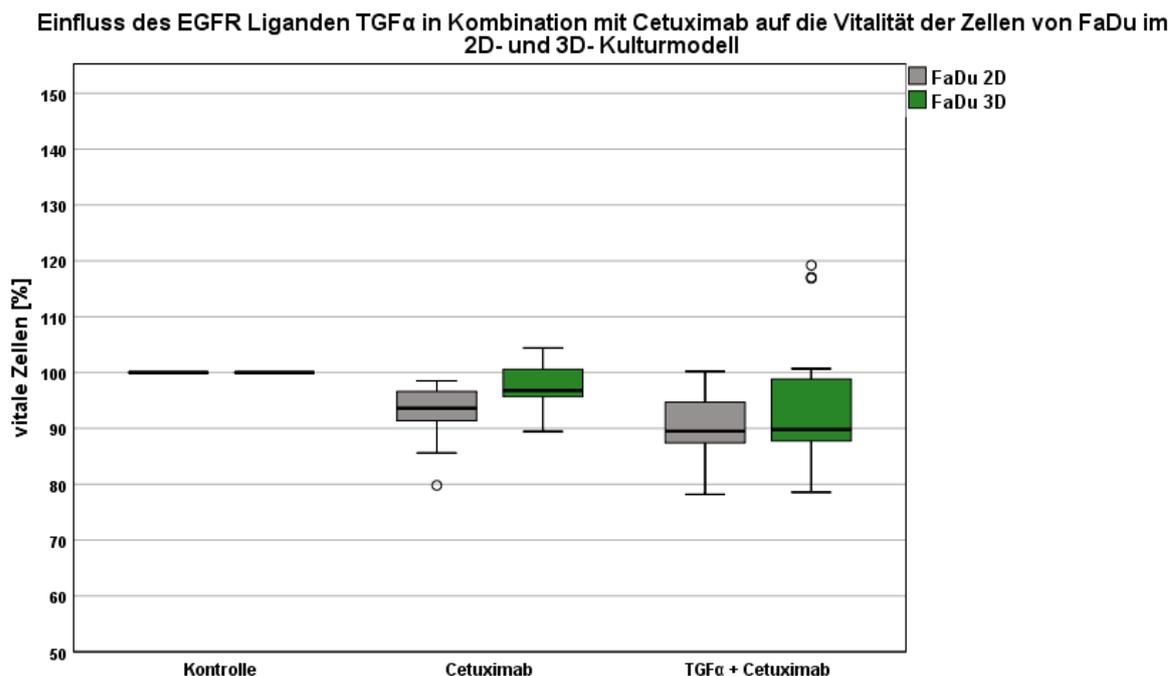


Abbildung 35: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell

Die Wirkung des Cetuximab (vgl. Tabelle 27) im 2D-Kulturmodell, wo eine Verminderung der Zellzahl der FaDu-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden konnte, wurde ebenfalls im 3D-Kulturmodell, allerdings in einem geringeren Ausmaß, detektiert. Die Gabe von TGF α in Kombination mit Cetuximab führte, sowohl im 2D- als auch im 3D-Kulturmodell, zu einer Minderung der Anzahl vitaler FaDu-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

	2D	3D	Signifikanz (p-Wert) (Niveau $p \leq 0,05$)
	Mittelwert in %	Mittelwert in %	
Kontrolle	100,00	100,00	
Cetuximab	92,85	97,25	0,014
TGFα	92,29	103,12	0,002
TGFα + Cetuximab	90,66	94,41	0,253

Tabelle 27: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Sowohl der ELISA- als auch der WST-8 Test gelten als gängige methodische Verfahren in der präklinischen Tumor-Forschung. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration des exogen zugeführten TGF α für die Vitalitätsversuche folgte der von Harris *et al.* getroffenen Einteilung der Liganden auf Basis ihrer Affinität [Harris *et al.* 2003]. TGF α benötigte, als hochaffiner Ligand, nur eine niedrige exogen zugeführte Konzentration, um eine Aktivierung des EGFR zu induzieren. Vorab durchgeführte Versuche ergaben eine geeignete Dosis-Wirkungs-Kurve. Es wurde eine Konzentration von 5 ng/ml gewählt. Beim Vergleich der vorliegenden Arbeit mit derjenigen von Kearns *et al.* erschien die Konzentration des TGF α plausibel [Kearns *et al.* 2015]. Lee *et al.* wählten für ihre dreidimensionalen Versuche eine Konzentration von 10 ng/ml, ließen TGF α hingegen vier Tage, anstatt 24 Stunden, einwirken [Lee *et al.* 2011]. Roepstorff *et al.* verwendeten für ihre Arbeit TGF α in einer Stoffmengen-Konzentration von 10 nM [Roepstorff *et al.* 2009], bei der vorliegenden Dissertation betrug diese 0,91 nM. Kritisch betrachtet werden sollte die Konzentration hinsichtlich der unterschiedlichen Aktivitäten des EGFR in Abhängigkeit der exogen zugeführten TGF α -Konzentration, wie Ekblad *et al.* beschrieben [Ekblad *et al.* 2015]. Dieser Umstand der konzentrationsabhängigen Aktivität des EGFR wurde in der vorliegenden Arbeit nicht genauer berücksichtigt und könnte in Zukunft für TGF α und weitere EGFR-Liganden näher untersucht werden.

Die verwendete Konzentration des Cetuximab erschien mit 10 μ g/ml geeignet. Bei Mutsaers *et al.* zeigten sich bei dieser Konzentration die aussagekräftigsten Ergebnisse [Mutsaers *et al.* 2009]. Ebenfalls führten Yonesaka *et al.* ihre Versuche mit dieser Cetuximab-Konzentration durch [Yonesaka *et al.* 2008]. Diese Konzentration war im Plasma von Karzinompatienten detektierbar, die eine Standardtherapie mit Cetuximab erhielten [Baselga *et al.* 2000]. Die 24-stündige Inkubationszeit des Cetuximab in den Versuchen erschien als sinnvoll [Baselga 2001, Baselga *et al.* 2000]. Es sollte jedoch beachtet werden, dass klinische Studien mit Cetuximab über mehrere Monate andauerten, wohingegen in dieser Studie die Zellen mit einer Single-Dosis und einer maximalen Lebenszeit von lediglich zwei Wochen behandelt wurden.

Im Vergleich mit anderen Studien ist an der vorliegenden Arbeit besonders hervorzuheben, dass die Tumorzellen nicht vorbehandelt wurden, um die singuläre Wirkung des zugegebenen Agens untersuchen zu können. Um die Ergebnisse jedoch

komplett mit anderen Studien vergleichen zu können, wäre neben dem vorliegenden WST-8 Test vor allem der Proliferationstest der HNSCC-Zellen für die Zukunft sinnvoll. Zudem sollte die Wirkung nicht nur für TGF α sondern auch für alle weiteren Liganden des EGFR detektiert werden. Auch die Kombination der Wirkung mehrerer Liganden am EGFR könnte zu entscheidenden Aussagen führen. Ebenso müssten weitere Antikörper, beispielsweise Panitumumab, genauer untersucht werden. Des Weiteren wären Versuche über Therapiekombinationen des HNSCC notwendig. Ekblad *et al.* stellten beispielsweise fest, dass die Wirkung des Cetuximab bei CRC-Zellen von der EGFR-Expression abhängig war. Diese stieg direkt proportional mit dem Level der erworbenen Resistenz gegenüber Oxaliplatin. CRC-Zellen schienen sensitiv gegenüber Cetuximab zu sein, sobald sie eine Resistenz gegenüber Oxaliplatin entwickelten [Ekblad *et al.* 2012]. Ob diese Ergebnisse auf das HNSCC übertragbar sind, müsste geklärt werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Im ersten Teil der Diskussion wird auf die endogene Produktion der vier Liganden EGF, TGF α , Epiregulin und Amphiregulin im Zellkulturmedium der beiden Zelllinien PiCa und FaDu eingegangen. Zunächst wird die bestehende Literatur beschrieben, die Ergebnisse werden jeweils für das zweidimensionale und das dreidimensionale Kulturmodell diskutiert und im Anschluss mit anderen Studien verglichen.

Der für die autokrine Sekretion bedeutendste Ligand TGF α wird im zweiten Teil näher untersucht. Es wird die singuläre Wirkung des Liganden, die singuläre Wirkung des Cetuximab und die Wirkung der Kombination aus TGF α und Cetuximab auf die beiden Zelllinien des HNSCC und für beide Kulturmodelle diskutiert. Im Anschluss werden analog dazu Unterschiede der beiden Zelllinien aufgezeigt. Abschließend werden die beiden Kulturmodelle und die zugrundeliegenden Hintergründe verglichen.

4.2.1 Endogene Produktion der vier Liganden

Die geringe therapeutische Antwort auf den monoklonalen Antikörper Cetuximab stellt im Allgemeinen ein großes Problem in der Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen dar. Ein möglicher Grund hierfür könnte die interindividuelle Variation in der Expression der Liganden des EGFR im Tumorgewebe sein. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie die Rolle von EGF, TGF α , Epiregulin und Amphiregulin für das Zellwachstum und die Antwort auf die Behandlung mit dem Antikörper Cetuximab untersucht. Zunächst wurde die autokrine Sekretion jedes Liganden in den Zellkulturüberständen der beiden Zelllinien detektiert.

Keine autokrine Sekretion des Liganden EGF im Zellkulturmedium

Für beide Zelllinien in beiden Kulturmodellen war kein EGF im Zellkulturmedium durch den ELISA-Test detektierbar. Alle erfassten Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze, was darauf schließen ließ, dass die EGF-Expression wenn überhaupt nur sehr gering bis nicht vorhanden war für diese Zelllinien. Die freigesetzten Liganden könnten sehr rasch internalisiert und deshalb nur schwierig nachgewiesen werden. Ansell *et al.* konnten in ihrer Arbeit ebenso keine endogene Expression des Liganden EGF nachweisen [Ansell *et al.* 2016]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde eine Konzentration unter oder nahe der Nachweisgrenze auch von anderen Autoren für Zelllinien des HNSCC beschrieben [Jedlinski *et al.* 2013, Oshima *et al.* 2012, Wen *et al.* 2016]. Jedlinski *et al.* belegten für EGF die größte Varianz des Expressionslevels aller Liganden in den 25 von ihnen untersuchten Zelllinien [Jedlinski *et al.* 2013]. Wen *et al.* beschrieben bei ihren Versuchen über die autokrine Sekretion der Liganden des EGFR, dass sowohl EGF als auch TGF α unterhalb der Nachweisgrenze lagen und deshalb nicht genauer in den Kulturüberständen detektiert werden konnten [Wen *et al.* 2016]. Auch in der Studie von Oshima *et al.* lagen die Konzentrationen des EGF bei acht unterschiedlichen Zelllinien immer unterhalb der Nachweisgrenze [Oshima *et al.* 2012]. O-Charoenrat *et al.* vermuteten eine EGFR-vermittelte Aufnahme und dadurch eine Minderung des autokrin-sezernierten Liganden. Auch für eine Brustkarzinom-Zelllinie wurde dieser Effekt für bestimmte Liganden beschrieben [O. Charoenrat *et al.* 2000a].

Selbst eine Blockierung des EGFR mit dem Antikörper Cetuximab führte in der vorliegenden Arbeit zu keiner Veränderung der Ergebnisse. Dieser Sachverhalt wurde durch die Arbeit von Hatakeyama *et al.* bestätigt. Diese detektierten keine signifikanten Veränderungen der EGF-Konzentration vor, beziehungsweise nach Gabe des Antikörpers Cetuximab sowie eine extrem niedrige EGF-Konzentration im Zellkulturmedium (unter 20 pg/ml). Diese Ergebnisse wurden in Tumorproben, bei denen die Konzentration von EGF sehr niedrig war, bestätigt [Hatakeyama *et al.* 2010]. Der Ligand EGF agierte nicht wie AREG, EREG und TGF α vor allem parakrin und autokrin, sondern auch systemisch endokrin und war durch diesen Sekretionsmechanismus in der Zellkultur schwer bis gar nicht nachzuweisen [Olayioye *et al.* 2000].

Veränderung der Konzentration des Liganden TGF α im Zellkulturmedium

Die Liganden des EGFR, insbesondere TGF α , wurden in mehreren Karzinomarten als potentielle Biomarker für eine auf den EGFR abzielende Therapie untersucht. Die Ergebnisse waren jedoch sehr konträr und stark abhängig vom jeweiligen Tumortyp, den verschiedenen klinischen Proben und der verwendeten Methodik. Mutsaers *et al.*

detektierten erhöhte Plasmawerte an TGF α bei Patienten mit CRC während der Therapie mit Cetuximab [Mutsaers *et al.* 2009]. Jedoch korrelierte ein erhöhter Wert an TGF α nicht mit dem Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab [Chan *et al.* 2011]. Hatakeyama *et al.* zeigten, dass eine Hochregulation von TGF α beim HNSCC die Signalwege des EGFR aufrechterhielt und eine Resistenz gegenüber Cetuximab begünstigte [Hatakeyama *et al.* 2010]. Eine Überexpression des EGFR und des TGF α korrelierte beim HNSCC mit einer schlechten klinischen Prognose [Grandis *et al.* 1998b]. In der vorliegenden Dissertation ergaben sich für die endogene Produktion des TGF α folgende Sachverhalte:

Im 2D-Kulturmodell war in der zweiten Kultivierungsphase bis Tag 7 mit 48 Stunden Kulturzeit, im Vergleich zur ersten Kultivierungsphase mit 72 Stunden, eine höhere Produktion des TGF α detektierbar. Dies erklärte sich durch eine Doubling Time von circa 24 Stunden und der dadurch höheren Anzahl von Zellen in der zweiten Kultivierungsphase. Im Vergleich zu den Kontrollproben (Kontrolle T7) beider Zelllinien, die kein Cetuximab erhielten, ergab sich in der dritten Kultivierungsphase bis Tag 7 für Zellen, die für 24 Stunden Cetuximab erhielten und im Anschluss 48 Stunden kultiviert wurden, eine Erhöhung der Konzentration des TGF α von 658 % für PiCa, beziehungsweise von 207 % für FaDu. Die Gabe von Cetuximab generierte eine starke Zunahme der Konzentration von TGF α , vor allem der Zelllinie PiCa.

Im 3D-Kulturmodell zeigte sich, im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der zweiten Kultivierungsphase bis Tag 13, nach 48 Stunden Kultivierung, eine erhöhte Konzentration des Liganden TGF α bei Zellen, die an Tag 11 für 24 Stunden den Antikörper Cetuximab erhielten. Für Pica betrug die Zunahme 329 % und für FaDu 231 %. Im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 16 ohne Cetuximab-Gabe an Tag 11, war für die dritte Kultivierungsphase (Nachkultur) eine Zunahme der Konzentration des TGF α von 174 % für PiCa und von 93 % für FaDu detektierbar. Dies ließ vermuten, dass der Effekt des Cetuximab auf TGF α mit der Zeit wieder abnahm. Der insgesamt höhere Wert der TGF α -Konzentration an Tag 16 ließ sich durch eine erhöhte Zellzahl bei längerer Kultur erklären.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen detektierten Mutsaers *et al.* nach einer Behandlung der Zellen mit Cetuximab einen starken Anstieg der Konzentration des TGF α in unterschiedlichen Zelllinien [Mutsaers *et al.* 2009]. Es stellte sich folglich die Frage, welche Mechanismen für den Anstieg der Konzentration des EGFR-Liganden TGF α und weiterer Liganden in Zellkulturmedien nach einer EGFR-Blockade verantwortlich sind. Eine erste Erklärung wäre eine erhöhte Produktion und Sekretion des Liganden durch die Tumorzellen. Es stellt sich darüber hinaus die Frage, ob der EGFR beispielsweise Einfluss auf die Transkription seiner Liganden hat. Zweitens könnte bei dem Konzentrationsanstieg

schlichtweg der Umstand beschrieben werden, dass der Ligand durch einen verminderten Abbau und eine verminderte Internalisierung durch die fehlende EGFR-Bindung im Zellkulturmedium akkumuliert. Es fanden sich für beide Mechanismen mögliche Anhaltspunkte in der Literatur.

Für die erste Annahme, dass die Liganden-Produktion und -Sekretion der Tumorzellen den Anstieg der TGF α -Konzentration nach EGFR-Blockade verursacht, sprechen folgende Sachverhalte: Analog zu den vorliegenden Ergebnissen waren die Erkenntnisse von Oshima *et al.* Verglichen mit Kontrollen, deren TGF α -Konzentrationen nahe an der Nachweisgrenze lagen, setzten vier Zelllinien des HNSCC eine hohe bis sehr hohe Konzentration frei, sobald sie mit Cetuximab behandelt wurden. Den zugrundeliegenden Mechanismus beschrieben die Autoren jedoch nicht genauer. Sie gingen von einer autokrinen Produktion der Liganden aus. Es erfolgte eine Messung der Konzentration analog zur vorliegenden Dissertation mit entsprechenden ELISA-Kits der Liganden [Oshima *et al.* 2012]. Ebenfalls ermittelten Hobor *et al.*, dass nach Blockade des EGFR die Sekretion von TGF α und AREG durch CRC-Zellen anstieg. Sie folgerten, dass CRC-Zellen die Liganden TGF α und AREG sezernierten, so dass Nachbarzellen über diesen parakrinen protektiven Mechanismus vor der EGFR-Blockade geschützt wurden. Dieser Mechanismus konnte auch in dreidimensionalen Kulturmodellen nachgewiesen werden [Hobor *et al.* 2014]. Eine Interaktion der verschiedenen Liganden wurde in der vorliegenden Dissertation nicht berücksichtigt. Lediglich die Kombination des Liganden TGF α mit Cetuximab wurde untersucht. Wie die Liganden sich untereinander beeinflussten blieb offen. Verglichen mit Patienten, die besser auf die Therapie mit Cetuximab ansprachen, war der mRNA-Status des TGF α in Tumorproben von Patienten mit einem fortgeschrittenen, metastasierten CRC nach der Therapie signifikant erhöht [Tabernero *et al.* 2010]. Viele Autoren beschrieben für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich eine TGF α -Überexpression, sowohl der mRNA als auch des Proteins [Bergler *et al.* 1996, Grandis *et al.* 1996, Grandis *et al.* 1993, O. Charoenrat *et al.* 2000a, Todd *et al.* 1989]. Schon früh war bekannt, dass Tumorzellen mehr TGF α sezernierten als normale Keratinozyten [Prime *et al.* 1994]. Genauere Untersuchungen sind für die Zukunft notwendig, um eine autokrine Liganden-Produktion nach EGFR-Blockade mit Cetuximab zu beweisen.

Für die zweite Annahme, dass eine Akkumulation des Liganden im Zellkulturmedium durch eine EGFR-Blockade stattfindet, finden sich ebenfalls Hinweise in der Literatur. Es ist bekannt, dass der freigesetzte Ligand schnell internalisiert wird und daher kaum im Zellmedium detektiert werden kann, solange die EGFR-Bindungsstelle nicht durch einen kompetitiven Antikörper, wie beispielsweise Cetuximab, blockiert wird [Grandis *et al.*

1998a]. Bestätigt wurde dies in einer Studie von Cohen *et al.*, in der Veränderungen des Serumlevels von TGF α bei Patienten mit HNSCC mit einer Resistenz gegenüber dem Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib klinisch korrelierten [Cohen *et al.* 2005, Khambata-Ford *et al.* 2007, Troiani *et al.* 2013]. Für Zellen des HNSCC detektierten Hatakeyama *et al.* eine stark erhöhte Konzentration des TGF α nach Gabe von Cetuximab sowie keine Veränderung der Konzentration vor Cetuximab-Gabe. Diese Autorengruppe und auch Mutsaers *et al.* korrelierten das erhöhte Niveau an TGF α mit einer erhöhten Aktivität seiner Protease TACE/ADAM17. Nach der Inhibition dieser Protease, auch in Kombination mit Cetuximab, war der Effekt des Cetuximab nur leicht erhöht. Dies ließ vermuten, dass ein erhöhtes Level an TGF α nach Gabe von Cetuximab nicht zwingend zur Resistenz gegenüber Cetuximab beitrug. Dies könnte daran gelegen haben, dass die Bindung des TGF α durch Cetuximab am EGF-Rezeptor verhindert wurde und dadurch eine erniedrigte Internalisierung des TGF α /EGFR-Komplexes erfolgte [Hatakeyama *et al.* 2010, Mutsaers *et al.* 2009, Sahin *et al.* 2004].

Die Diskrepanz der vorliegenden Ergebnisse zu den Ergebnissen von Yonesaka *et al.* konnte durch die fehlende Blockierung der Bindungsstelle des EGFR erklärt werden [Yonesaka *et al.* 2008]. Neuere Studien durch Troiani *et al.* zeigten, dass eine Überexpression des Liganden TGF α zu einer Resistenz von Zellen des CRC gegenüber Cetuximab beitrug. Dies erfolgte durch eine EGFR-MET Interaktion mit darauffolgender Aktivierung des MET-Signalweges. Der Ligand TGF α spielte somit eine wichtige Rolle in der erworbenen Resistenz gegenüber Cetuximab [Troiani *et al.* 2013].

Veränderung der Konzentration des Liganden Epiregulin im Zellkulturmedium

Schon früh wurde in oralen Plattenepithelkarzinomen eine erhöhte Expression von Epiregulin detektiert [Toyoda *et al.* 1997]. Neuere Studien legten nahe, dass ein erhöhtes Niveau an Epiregulin mit einem reduzierten Überleben der Patienten mit HNSCC assoziiert ist [Shigeishi *et al.* 2008]. Jedoch fanden einige Autoren unterschiedliche Ergebnisse der Expression des Epiregulin in Zusammenhang mit der Wirkung des Cetuximab. Das Therapieansprechen von Cetuximab korrelierte signifikant mit der mRNA-Expression von Epiregulin, wobei eine niedrige EREG-Expression zu einer Resistenz gegenüber Cetuximab führte [Jedlinski *et al.* 2013]. Eine erhöhte Expression von AREG und EREG in kolorektalen Karzinomen korrelierte mit der Cetuximab-Sensitivität [Khambata-Ford *et al.* 2007]. Der prädiktive Wert der Expression von EREG und AREG wurde von Jacobs *et al.* für kolorektale Karzinome bestätigt [Jacobs *et al.* 2009]. In der vorliegenden Dissertation ergaben sich für die gemessene EREG-Konzentration folgende Ergebnisse:

Im zweidimensionalen Kulturmodell ergab sich für die zweite Kultivierungsphase bis Tag 7, analog zu den Ergebnissen für TGF α , eine generell höhere EREG-Konzentration. Im Vergleich zu Kontrollen beider Zelllinien, die kein Cetuximab erhielten, ergab sich in der dritten Kultivierungsphase eine Verminderung der Konzentration von Epiregulin von 4 % für PiCa, beziehungsweise eine Erhöhung der Konzentration von EREG von 11 % für FaDu. Für Pica-Zellen konnte somit eine andere Wirkung (-4 %) des Cetuximab auf die Konzentration des niedrig-affinen Liganden Epiregulin detektiert werden. Für Fadu-Zellen fand durch Cetuximab-Zugabe eine leichte Zunahme der Konzentration an Epiregulin im Kulturmedium statt. Diese Tendenz der Ergebnisse für PiCa und FaDu wurde auch im 3D-Kulturmodell bestätigt.

Im dreidimensionalen Kulturmodell bewirkte die Gabe von Cetuximab bei PiCa-Zellen eine Verminderung der Konzentration um 7 %. In der Nachkultur der PiCa-Zellen war hingegen eine Zunahme der Konzentration um 21 % nachweisbar. Demzufolge verhinderte der Antikörper Cetuximab, sowohl im 2D- als auch im 3D-Modell, eine Zunahme der EREG-Konzentration bei PiCa-Zellen innerhalb der ersten 48 Stunden. Für Zellen von FaDu hingegen fand durch Cetuximab eine leichte Zunahme der Konzentration von EREG (+6 % in der zweiten Kultivierungsphase, beziehungsweise +2 % in der dritten Kultivierungsphase) statt. Für FaDu-Zellen wurde die Konzentration von EREG durch Cetuximab nicht erniedrigt, sondern, wie bei TGF α , erhöht, allerdings in einem geringeren Maß.

Zusammenfassend gab es nur wenig Literatur, die sich mit der endogenen Produktion des Epiregulin beschäftigt, wobei keine vergleichenden Studien gefunden werden konnten. Die Ergebnisse der Zelllinie FaDu lassen sich, analog zu TGF α , durch die beiden schon genannten Mechanismen erklären. Entweder fand durch die EGFR-Blockade mit Cetuximab eine erhöhte EREG-Produktion und -Sekretion der FaDu-Zellen statt oder ein verminderter Abbau mit verminderter Internalisierung und dadurch eine Akkumulation des Liganden. Tabernero *et al.* fanden heraus, dass bei Patienten, die auf eine Cetuximab-Therapie in der Erstlinientherapie ansprachen, im Vergleich zu Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung, der Status der mRNA von EREG und AREG in Tumorproben des CRC signifikant höher war [Tabernero *et al.* 2010], was ein Hinweis auf eine höhere endogene Liganden-Produktion sein könnte. Für die Zelllinie PiCa erscheint der Mechanismus, bei dem der EGFR Einfluss auf die Transkription seiner Liganden hat und somit deren Produktion und Sekretion erhöht, realistisch, denn warum sollte ausgerechnet der niedrig-affine Ligand Epiregulin in Konkurrenz um die EGFR-Bindungsstelle Cetuximab verdrängen und dadurch mehr EREG am EGFR gebunden

werden. Weitere methodische Aufarbeitung erscheint für die Zukunft essentiell, um diese These stützen zu können.

Veränderung der Konzentration des Liganden Amphiregulin im Zellkulturmedium

Bei kolorektalen Karzinomen korrelierte eine erhöhte Expression von AREG und EREG mit der Sensitivität gegenüber dem Antikörper Cetuximab [Khambata-Ford *et al.* 2007]. In Karzinomen des Pankreas, des Kolons und bei hepatozellulären Karzinomen wurde eine autokrine Schleife mit EGFR/AREG beschrieben. Auch bei Mammakarzinomen wurde diese autokrine Schleife mit der Progression des Tumors assoziiert [Castillo *et al.* 2006, Funatomi *et al.* 1997, Johnson *et al.* 1993, Ma *et al.* 2001, Willmarth *et al.* 2006]. Ebenfalls war für Karzinomzellen der Brust und des Kolons ein extrakriner Signalweg des Liganden Amphiregulin beschrieben. Die Exosomen des AREG erhöhten gegenüber Exosomen des TGF α die Invasivität der Empfängerzellen um das Vierfache [Higginbotham *et al.* 2011]. Für das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich spielte außerdem der Signalweg von AREG eine Rolle, welcher durch Tabakrauch induziert wurde und in der Folge über verschiedene Zwischenschritte die Transkription von Amphiregulin förderte [Du *et al.* 2005].

Bei der vorliegenden Arbeit zeigte sich im 2D-Kulturmodell in der zweiten Kultivierungsphase bis Tag 7, analog zu den Ergebnissen des ELISA-Tests des Liganden TGF α , eine generell erhöhte Produktion des Liganden Amphiregulin durch eine höhere vorhandene Zellzahl. Nach der dritten Kultivierungsphase wurde, im Vergleich zu Kontrollproben beider Zelllinien, eine Erhöhung der Konzentration des Liganden AREG von 101 % für PiCa- und von 46 % für FaDu-Zellen detektiert. Für beide Zelllinien galt in Konsequenz, dass eine Gabe von Cetuximab für 24 Stunden an Tag 4 die AREG-Konzentration, im Vergleich zur Kontrolle, erhöhte. Dies wurde auch für das 3D-Kulturmodell bestätigt.

In der zweiten Kultivierungsphase bis Tag 13 zeigte sich, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine erhöhte Konzentration von AREG bei Zellen, welche an Tag 11 Cetuximab erhielten, nämlich eine Erhöhung von 92 % für PiCa und 35 % für FaDu. Der Antikörper Cetuximab beeinflusste, analog zum 2D- Kulturmodell, die Liganden-Konzentration des AREG positiv. Nach der dritten Kultivierungsphase ergab sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Zunahme der Konzentration von AREG von 41 % für PiCa-Zellen und 35 % für FaDu-Zellen. Der Effekt des Cetuximab auf die AREG-Konzentration nahm mit der Zeit wieder ab (PiCa), beziehungsweise blieb gleich (FaDu).

Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen wurde in der Literatur eine signifikant erhöhte Konzentration von AREG nach der Gabe von Cetuximab beschrieben [Hatakeyama *et al.* 2010]. Ebenfalls detektierten Mutsaers *et al.* nach einer 24-stündigen Behandlung der Zellen mit Cetuximab einen starken Anstieg der Konzentration von Amphiregulin [Mutsaers *et al.* 2009]. Welcher der beiden schon genannten Mechanismen genau zugrundeliegt, wurde analog zu den Ergebnissen von TGF α von keinem der Autoren näher untersucht. In Studien an Zellen des NSCLC und des HNSCC, die Amphiregulin überexprimierten und sensitiver gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren und dem EGFR-spezifischen Antikörper Cetuximab reagierten, konnte der oben beschriebene Zusammenhang bestätigt werden [Chang *et al.* 2011, Yonesaka *et al.* 2008]. Die Liganden TGF α und Amphiregulin stimulierten die Aggressivität der Tumorzellen und deren Chemo-Resistenz, wohingegen der Ligand EGF dies mit einem geringeren Ausmaß induzierte oder sogar die Stimulation des pathogenen EGFR-Signalweges durch TGF α und AREG antagonisierte [Wilson *et al.* 2012, Yonesaka *et al.* 2008]. Im Detail wurden HNSCC-Zellen, die eine Konzentration von 20 pmol/l Amphiregulin produzierten, verglichen mit Zellen, welche nur weniger oder gar kein Amphiregulin produzierten, sowohl von Gefitinib als auch von Cetuximab, wachstumshemmt. Der Signalweg von ERK1/2 wurde inhibiert, jedoch nicht der Signalweg von Akt [Yonesaka *et al.* 2008]. Die vorliegenden Ergebnisse des AREG schwankten minimal um den in der Studie angegebenen Schwellenwert von 20 pmol/l. Im Gegensatz zu vorherigen Autoren konnten Oshima *et al.* hingegen keinen generellen Zusammenhang zwischen der Freisetzung von AREG und der Sensitivität gegenüber Cetuximab feststellen [Oshima *et al.* 2012]. Im klinischen Gebrauch wurde die erworbene Resistenz gegenüber Cetuximab funktionell mit einer Runterregulierung der Expression von Amphiregulin und Epiregulin assoziiert [Oliveras-Ferraro *et al.* 2012]. Im Gegensatz dazu korrelierte bei Patienten mit HNSCC eine hohe Expression von Amphiregulin mit einer schlechten Antwort auf die Kombinationstherapie aus Docetaxel und Cetuximab [Tinhofer *et al.* 2011]. Zusätzlich zeigte sich bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen, dass AREG die Resistenz gegenüber EGFR-Therapien durch die Inaktivierung eines speziellen pro-apoptischen Proteins induzierte [Busser *et al.* 2011]. Zhang *et al.* legten bei Zellen des HNSCC dar, dass eine erhöhte Sekretion von Amphiregulin entscheidend war für eine Transaktivierung des EGFR [Zhang *et al.* 2004]. In diesen Zellen war der Signalweg der MAPK ausschlaggebend für die AREG-Produktion [Gusenbauer *et al.* 2015]. Wen *et al.* konnten den Mechanismus über MAPK teilweise bestätigen [Wen *et al.* 2016].

Der Vergleich beider Kulturmodelle war für den Liganden Amphiregulin besonders interessant. Es zeigte sich für die Zelllinie PiCa, dass die Konzentration des Liganden nach

der ersten Kulturperiode im 3D-Kulturmodell um 41 % niedriger war als im 2D-Kulturmodell. Auch in der zweiten Kulturperiode war die Konzentration um 39 % niedriger. Erhielten die Zellen für 24 Stunden Cetuximab war in der zweiten Kulturperiode die Konzentration im 3D-Kulturmodell ebenfalls um 42 % vermindert. Für FaDu-Zellen war nach der ersten Kulturperiode die Konzentration von AREG im 3D-Kulturmodell um 77 % vermindert. Für die zweite Kulturperiode war die Konzentration im 3D-Modell ebenfalls um 72 % niedriger als im 2D-Kulturmodell. Nach Cetuximab-Gabe in der zweiten Kulturperiode war die Konzentration ebenso um 74 % im 3D-Kulturmodell vermindert. Für beide Zelllinien galt, dass Zellen im 3D-Kulturmodell, im Vergleich zum zweidimensionalen Kulturmodell, unabhängig von der Behandlung mit Cetuximab und egal zu welchem Zeitpunkt, eine um circa 40 % (PiCa), beziehungsweise um circa 70 % (FaDu), verminderte Konzentration von Amphiregulin besaßen.

Zusammenfassung der Liganden-Konzentrationen (ELISA-Test)

Für den EGFR-Liganden EGF war keine endogen sezernierte Konzentration im Zellkulturmedium durch den ELISA-Test detektierbar. Dies deckt sich mit der vorhandenen Literatur. Im Allgemeinen verminderte Cetuximab die Konzentration der drei Liganden TGF α , EREG und AREG nicht, sondern erhöhte diese innerhalb der ersten 48 Stunden nach Cetuximab-Gabe. Die einzige Ausnahme war die Wirkung des Cetuximab bei Epiregulin für die Zelllinie PiCa mit -4 % und -7 % und generell niedrigeren Werten für diesen Liganden. Es stellte sich die Frage, ob die vorhandenen Werte präzise genug messbar waren, da nur Mittelwert und Standardabweichung methodisch detektiert werden konnten. Entweder fand durch die EGFR-Blockade mit Cetuximab eine erhöhte Liganden-Produktion und -Sekretion der Zellen statt oder ein verminderter Abbau mit verminderter Internalisierung und dadurch eine Akkumulation des Liganden im Kulturmedium. Eine genauere Untersuchung der autokrinen Liganden-Aktivität, als eine reine Expressionsbestimmung über die Konzentration in den Kulturmedien, wäre von Vorteil, um die Ergebnisse genauer einordnen zu können.

Bei Patienten unter Cetuximab-Therapie werden die Tumorzellen dem Antikörper Cetuximab über mehrere Monate kontinuierlich ausgesetzt. Die vorliegenden *in vitro*-Daten mit lediglich einer einzigen 24-stündigen Cetuximab-Inhibition deuten darauf hin, dass Tumorzellen des HNSCC als Antwort auf eine EGFR-Blockade verschiedene EGFR-Liganden autokrin sezernieren. Hobor *et al.* sehen darin einen parakrinen Protektionsmechanismus gegenüber der EGFR-Blockade [Hobor *et al.* 2014]. Dieser Effekt zeigte sich vor allem bei EREG. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass eine erhöhte Konzentration von EGFR-Liganden lediglich ein Mechanismus der unmittelbaren

Antwort auf die EGFR-Blockade war. Hatakeyama *et al.* beschrieben zwar, dass eine Überexpression von HB-EGF als möglicher Mechanismus der Resistenz gegenüber Cetuximab beim HNSCC angesehen werden konnte [Hatakeyama *et al.* 2010], aber bei der vorliegenden Arbeit konnten auch mindestens zwei weitere untersuchte Liganden als mögliche Faktoren der Cetuximab-Resistenz angeführt werden. HB-EGF wurde in der vorliegenden Arbeit bewusst nicht untersucht. Eine *in vivo*-Konzentration war nicht für alle Liganden bekannt. Die vorliegenden Konzentrationen erschienen jedoch physiologisch und pathophysiologisch relevant [Roepstorff *et al.* 2009]. Vor allem für TGF α erhöhte sich die Konzentration durch die Gabe von Cetuximab (+658 % und +207 % im 2D-Kulturmodell, beziehungsweise +329 % und +231 % im 3D-Kulturmodell). Die Wirkung des Cetuximab nahm allerdings innerhalb der ersten 48 Stunden wieder ab. Die höheren Absolutwerte, im Vergleich zu EREG und AREG, waren womöglich durch die unterschiedlichen Affinitäten zu erklären: TGF α gilt als hochaffin gegenüber EGFR und reagiert deshalb sensibler auf Reize innerhalb des Zellverbundes [Harris *et al.* 2003].

TGF α war folglich der wichtigste Ligand hinsichtlich der Erhöhung der Ligandenkonzentration der vier untersuchten Liganden, wodurch eine genauere Betrachtung in der Zellkultur in beiden unterschiedlichen Kulturmodellen für beide Zelllinien relevant wurde.

4.2.2 Wirkung des Liganden TGF α , des monoklonalen Antikörpers Cetuximab und deren Kombination auf die Vitalität der Zellen

Ansell *et al.* wiesen bei Zungenkarzinomen in drei Zelllinien durch die Zugabe der beiden Liganden EGF und Epiregulin deren Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen nach. Für Amphiregulin hingegen konnte kein statistisch signifikanter Effekt auf das Zellwachstum aufgezeigt werden [Ansell *et al.* 2016]. Der Ligand TGF α war der am besten untersuchte Ligand im Zusammenhang mit dem HNSCC und wurde sowohl mit der Karzinogenese als auch der zellulären Proliferation in Verbindung gebracht [Ekblad *et al.* 2015, Grandis *et al.* 1998a, Grandis *et al.* 1993, Song *et al.* 2001]. Es stellte sich in der vorliegenden Dissertation folglich die Frage, welche Wirkung der bei Ansell *et al.* nicht untersuchte Ligand TGF α auf die Vitalität der Zellen hatte. Weiterhin wurde untersucht, welche Rolle Cetuximab als therapeutischer Inhibitor des EGF-Rezeptors einnahm und in der Konsequenz die Wirkung der Kombination aus TGF α und Cetuximab.

Alleinige Gabe des Liganden TGF α

Dadurch, dass in den Experimenten keine zytotoxischen Substanzen verwendet wurden und auch Cetuximab allenfalls im Zusammenspiel mit zytotoxischen Zellen zum Absterben

von Zellen führen kann, wird mit dem WST-8 Test zwar die Zellvitalität bestimmt, die aber in diesen Experimenten gleichzusetzen ist mit der Anzahl vitaler Zellen. Eine exogene Zufuhr von TGF α mit einer Konzentration von 5 ng/ml im 2D-Kulturmodell führte bei PiCa zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl. FaDu-Zellen hingegen reagierten mit einer signifikanten Verringerung der Zellzahl. Bei Betrachtung der TGF α -Konzentration in den ELISA-Ergebnissen fiel auf, dass Zellen der Kontrollgruppe an Tag 7 eine gemessene TGF α -Konzentration von lediglich 27,41 pg/ml für PiCa und 17,65 pg/ml für FaDu hatten. Die exogene Zufuhr war in der vorliegenden Arbeit mit einer in wissenschaftlichen Studien gängigen Konzentration von 5 ng/ml vergleichsweise hoch. Im 3D-Kulturmodell führte, sowohl bei PiCa als auch bei FaDu, die Zugabe von TGF α mit einer Konzentration von 5 ng/ml zu keiner statistischen Veränderung der Zellzahl. FaDu-Zellen im 3D-Kulturmodell hatten zwar eine deutlich höhere Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Streuung der Ergebnisse war hierfür zu stark.

Die allgemein angenommene Hypothese, dass Liganden des EGFR vor allem eine wachstumsstimulierende Wirkung auf Tumorzellen haben, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Auf die alleinige Gabe von TGF α reagierten die Zellen in den jeweiligen Kulturmodellen heterogen. Lediglich für das 2D-Kulturmodell ergab sich eine statistische Signifikanz. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle nahmen PiCa-Zellen hinsichtlich ihrer Zellzahl zu, FaDu-Zellen durch die exogene Zufuhr des Wachstumsfaktors TGF α wider Erwarten sogar ab. Manche Autoren gingen sogar einen Schritt weiter und beschrieben einen wachstumshemmenden Effekt von TGF α und anderer Liganden auf Zelllinien des HNSCC [Kamata *et al.* 1986, Korc *et al.* 1987, Masui *et al.* 1993, Rabiasz *et al.* 1992]. Ekblad *et al.* zeigten ebenfalls, dass die Mehrzahl ihrer untersuchten HNSCC-Zelllinien nach Gabe von TGF α im Wachstum inhibiert wurden. Lediglich zwei der acht untersuchten Zelllinien wurden durch eine Zugabe von TGF α im Wachstum stimuliert [Ekblad *et al.* 2015]. Als mögliche Erklärung hierfür wurde angeführt, dass die Signalwege und die Inaktivierung des EGFR größtenteils abhängig waren von der Konzentration der Liganden [Sigismund *et al.* 2008]. Bei hohen Ligandenkonzentrationen (ab 20 ng/ml) wurde EGFR ubiquityliert und über die Clathrin-unabhängige Endozytose internalisiert, wohingegen bei niedrigen Konzentrationen (1-2 ng/ml) der EGFR nicht ubiquityliert wurde, sondern über eine Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wurde [Sigismund *et al.* 2005]. Über diese Endozytose wurde der EGFR überwiegend recycelt und sein Signal verlängert. Bei einer Clathrin-unabhängigen Endozytose hingegen wurde der EGFR abgebaut, was zu einer Abschwächung des Signals führte [Jones *et al.* 2014, Sigismund *et al.* 2008]. In der vorliegenden Dissertation konnten beide Mechanismen im 2D-Kulturmodell detektiert werden. Für PiCa-Zellen fand

wahrscheinlich eine EGFR-Signalverlängerung über ein Rezeptor-Recycling statt, so dass die Zellzahl höher war als in der unbehandelten Kontrolle. Bei FaDu-Zellen führte die Gabe von TGF α zu einer andauernden Internalisierung des EGFR und somit zu dessen Signalabschwächung, so dass FaDu-Zellen soweit inhibiert wurden, dass deren Anzahl vitaler Zellen geringer war als die der unbehandelten Kontrolle. Abgesehen von der Konzentration des Liganden darf nicht außer Acht gelassen werden, dass vorhandene Studien überwiegend die Zellproliferation der Zelllinien des HNSCC untersuchten, in der vorliegenden Dissertation hingegen ausschließlich deren Zellzahl betrachtet wurde.

Alleinige Gabe des Cetuximab

Eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit Cetuximab führte im 2D-Kulturmodell, im Vergleich mit unbehandelten Zellen, sowohl für PiCa- als auch für FaDu-Zellen, zu einer signifikanten Minderung der Zellzahl. Im 3D-Kulturmodell reagierten FaDu-Zellen ebenfalls mit einer signifikanten Minderung der Zellzahl. Lediglich PiCa-Zellen zeigten im 3D-Kulturmodell keine Veränderung ihrer Zellzahl nach einer exogenen Zufuhr von Cetuximab.

Die Messung nach einer singulären Zufuhr von Cetuximab mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (70 nM) für 24 Stunden bestätigte in der vorliegenden Arbeit zunächst die allgemein in der Literatur angenommene Wirkung des Cetuximab - außer im 3D-Kulturmodell der Pica-Zellen. Cetuximab verhindert die Signaltransduktionswege des EGFR und führt dadurch zu einer wachstumsinhibierenden Wirkung auf die Zellen und somit zu einer Reduzierung der Zellzahl im WST-8 Test. Raju *et al.* fanden eine konzentrationsabhängige Wirkung des Cetuximab auf Zelllinien des HNSCC, unter anderem auch für FaDu, wobei die EGFR-Expression nicht mit der Wirkung des Cetuximab korrelierte. Ab einer Konzentration von 15 nmol/l (15 nM) war die Zellvitalität von FaDu reduziert [Raju *et al.* 2015]. Die Cetuximab-Bindung an den EGFR führte weder zu einer strukturellen Veränderung des Antikörpers noch an der L2-Subdomäne des EGFR [Li *et al.* 2005] (siehe Abbildung 2). Allerdings erschienen die Liganden des EGFR in der Interaktion flexibel: Studien über die Kristallstruktur von EGF und TGF α beschrieben die Bindung zum EGFR als ungeordnet. Die Liganden hatten eine vererbte Flexibilität, die durch Wirkstoffe nicht nachgeahmt werden konnte. Ein Peptid, welches ein rigides Baugerüst besaß und gleichzeitig die hoch-affine Interaktion des Cetuximab mit EGFR nachahmen konnte, erschien inhibitorisch erfolgreicher als ein Ligandenanalogon [Li *et al.* 2005]. Dafür gab es mehrere Gründe. Einerseits bedeckte Cetuximab, im Vergleich zu EGF oder TGF α , als Molekül ein größeres Areal der L2-Subdomäne des EGFR. Andererseits bildeten sich bei der Bindung mit Cetuximab doppelt so viele

Wasserstoffbrückenbindungen aus und die gebildete Grenzfläche war polarer [Goldstein *et al.* 1995, Kim *et al.* 2001, Li *et al.* 2005]. Cetuximab ist folglich nicht bloß ein Konkurrent um die EGFR-Bindungsstelle mit den EGFR-Liganden. Aus biochemischer Sicht ist die Bindung des Cetuximab bei dessen Anwesenheit wahrscheinlicher als die Bindung eines Liganden [Li *et al.* 2005].

Kombination aus TGF α und Cetuximab

Dassonville *et al.* vertraten bereits die Meinung, dass der Präsenz von EGFR-Liganden bei Untersuchungen mit EGFR-gezielten Medikamenten eine wichtige Rolle zukommt [Dassonville *et al.* 2007]. Hoch-affine EGFR-Liganden, wie beispielsweise EGF und TGF α , limitierten zusammen mit ko-exprimierten niedrig-affinen Liganden in epithelialen Tumoren die Wirkkapazität monoklonaler Antikörper durch eine nachgeschaltete Signal-Amplifikation [Kearns *et al.* 2015]. Dies liegt unter anderem am Wettbewerb um die Bindungsstelle am EGFR. Für kolorektale Karzinome war beschrieben, dass der EGFR-Inhibitor Cetuximab, in Anwesenheit von EGF, auf die Karzinomzellen eine schwächere Wirkung zeigt. Solmi *et al.* formulierten, dass sich die Behandlung mit Cetuximab in Zelllinien umgekehrt zu der Behandlung mit EGF verhielt [Solmi *et al.* 2008]. Auch Saki *et al.* konnten bei HNSCC-Zellen, sowohl für TGF α als auch für Amphiregulin, eine Abhängigkeit der Cetuximab-Resistenz der Zellen von der autokrinen Produktion der beiden EGFR-Liganden detektieren [Saki *et al.* 2013]. Autoren vermuteten daher eine Aktivierung des PI3K/AKT- vermittelten Zellüberlebens [Minjgee *et al.* 2011, Toulany *et al.* 2007]. Liu *et al.* beschrieben bei Zellen des kolorektalen Karzinoms, dass der durch Cetuximab herbeigeführte apoptotische Zelluntergang durch die exogene Zugabe von EGF ins Kulturmedium reduziert wurde [Liu *et al.* 2001]. Dies bedeutete im WST-8 Test eine Zunahme der Zellzahl trotz exogener Zugabe von Cetuximab. Es stellt sich die Frage, ob diese bereits für das CRC formulierten Annahmen auf die vorliegende Dissertation mit Zellen des HNSCC und auf den Liganden TGF α übertragbar sind.

Für PiCa-Zellen im 2D-Kulturmodell traf die Aussage von Liu *et al.* beim Vergleich von TGF α in Kombination mit Cetuximab mit den Zellen, die nur Cetuximab erhielten, zu. Es fand eine Zunahme der Zellzahl bei Zugabe von TGF α zusätzlich zu Cetuximab statt. Die Wirkung des Cetuximab war durch die Zugabe von TGF α für diesen Fall aufgehoben. Korrelierte man hingegen das Ergebnis von TGF α in Kombination mit Cetuximab mit den Zellen, die nur den Wachstumsfaktor TGF α erhielten, so war die Zellzahl signifikant vermindert und somit die Aussage von Liu *et al.* widerlegt. Die wachstumshemmende Wirkung des Cetuximab war in diesem Fall bewiesen. Für Zellen von FaDu im 2D-Kulturmodell ergab sich bei der Kombination aus TGF α mit Cetuximab, sowohl im

alleinigen Vergleich zu Cetuximab als auch im Vergleich zu TGF α , eine leicht verminderte Zellzahl, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Zellzahl nahm durch die Kombination von TGF α mit Cetuximab tendenziell ab. Eine Wirkung des Cetuximab lag nahe, konnte jedoch nicht bewiesen werden.

Im 3D-Kulturmodell der PiCa-Zellen ergab sich keine statistische Veränderung der Zellvitalität beim Vergleich der Kombination aus TGF α und Cetuximab mit der Wirkung des Cetuximab alleine. Verglich man die Wirkung der Kombination mit der Wirkung des TGF α alleine, stellte man lediglich eine leicht verminderte Zellzahl fest, allerdings ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Für Zellen der Zelllinie Fadu ergab sich im 3D-Kulturmodell zwar keine statistisch signifikante Veränderung der Zellvitalität beim Vergleich der Wirkung der Kombination aus TGF α und Cetuximab mit der Wirkung des Cetuximab alleine, jedoch konnte eine leicht verringerte Zellzahl detektiert werden. Korrelierte man die Wirkung der Kombination mit der singulären Wirkung des Wachstumsfaktors TGF α , so wurde eine signifikant verminderte Zellzahl festgestellt. Die Wirkung des Cetuximab wurde in diesem Fall bestätigt.

Zusammenfassend kann bei den vorliegenden Ergebnissen festgestellt werden, dass keine pauschale Aussage über den Einfluss des Cetuximab in Kombination mit TGF α getroffen werden kann. Einzig im 2D-Modell für PiCa und im 3D-Modell für FaDu konnte eine Wirkung des Cetuximab in Kombination mit TGF α , im Vergleich zum singulären Einsatz von TGF α , signifikant nachgewiesen werden. Die Signalwege des EGFR wurden durch Cetuximab nicht aktiviert, wodurch die Zellzahl vermindert wurde. Oben genannte Aussage von Liu *et al.* wurde lediglich bei einer einzigen Kombination in der vorliegenden Arbeit signifikant bestätigt, nämlich für PiCa im 2D-Modell beim Vergleich zur singulären Gabe von Cetuximab. Dies wiederum bedeutet, dass TGF α funktionell unterschiedliche Rollen einnahm, je nach Tumortyp (CRC versus HNSCC), je nach individuellem Tumor (HNSCC untereinander) und sogar je nach Kulturmodell. Ansonsten konnte lediglich die tendenzielle Aussage getroffen werden, dass die Kombination aus TGF α und Cetuximab, im Vergleich zur singulären Wirkung des Cetuximab, beziehungsweise im Vergleich zur singulären Wirkung des TGF α , zu einer Verminderung der Zellzahl führte.

Diese Ergebnisse sind mit zahlreichen Ergebnissen in der Literatur vergleichbar. Oshima *et al.* charakterisierten in acht verschiedenen eigenen Zelllinien den Effekt des Cetuximab und die Korrelation mit der autokrinen Produktion verschiedener EGFR-Liganden. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der autokrinen Sekretion des TGF α , Amphiregulin und Epiregulin und dem wachstumshemmenden Effekt des Cetuximab in den Cetuximab-sensitiven Zelllinien des HNSCC. Dabei hatte auch TGF α das höchste prädiktive Potential

im ELISA-Test, was mit den vorhandenen Daten übereinstimmte. Allerdings war eine Kombination mit Epigen notwendig, um eine volle Prädiktivität zu erlangen. Die Expression des EGFR korrelierte jedoch nur bedingt mit der Sensitivität gegenüber Cetuximab [Oshima *et al.* 2012]. Im Unterschied zur vorliegenden Studie betrug die Zeit der Inkubation des Cetuximab keine 24 Stunden, sondern 48 Stunden für den ELISA-Test, beziehungsweise 4 - 7 Tage für den Wachstumstest. Ein Vergleich der Ergebnisse war dadurch nur bedingt möglich.

Ekblad *et al.* detektierten in ihrer jüngsten HNSCC-Studie [Ekblad *et al.* 2015], dass TGF α alleine und in Kombination mit Cetuximab, sowohl eine wachstumsinhibierende als auch eine wachstumsstimulierende Wirkung, selbst in derselben Zelllinie, hatte. Diese Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Zunächst wiesen Ekblad *et al.* die inhibierende Wirkung des Cetuximab auf die Proliferation in einer Zelllinie nach. Diese Inhibition wurde durch die Zugabe einer hohen Konzentration an TGF α beseitigt. In derselben Zelllinie wiesen sie ebenfalls nach, dass die alleinige Gabe von TGF α die Zellproliferation inhibierte. Dieser inhibitorische Effekt konnte durch die Zugabe von Cetuximab ebenfalls antagonisiert werden. Dies war abhängig von Präsenz und Konzentration des jeweiligen Stoffes am EGFR. Die Wirkung des Cetuximab auf zellulärer Ebene entstand folglich durch den Wettbewerb mit Liganden, welche an den EGFR banden. Nachdem Ekblad *et al.* weitere Proteinrezeptoren für diese beschriebene Wirkung ausschließen konnten, vermuteten sie hinter dieser Doppelfunktion von Cetuximab und TGF α zwei funktionell unterschiedliche Aktivitäten des EGF-Rezeptor-Proteins. Sie folgerten für die Klinik weiter, dass die Mikroumgebung innerhalb eines Tumors den wachstumsinhibierenden Effekt des Cetuximab beeinflusst. Die Produktion von TGF α und weiterer Liganden durch die Tumorzellen selbst, beziehungsweise durch Nachbarzellen innerhalb des Tumors, veränderte den Gesamteffekt der Therapie [Ekblad *et al.* 2015]. Beim Vergleich der vorliegenden Daten mit denen von Ekblad *et al.* ergaben sich einige Unterschiede in der Konzeption: Ekblad *et al.* untersuchten alleinig Monolayer-Kulturen, wohingegen in der vorliegenden Arbeit sowohl zwei- als auch dreidimensionale Kulturmodelle vergleichend verwendet wurden. Ekblad *et al.* generierten acht eigene Zelllinien, in der vorliegenden Studie wurde hingegen eine eigens generierte „junge“ Zelllinie einer über Jahre etablierten Zelllinie gegenübergestellt. In der vorliegenden Dissertation wurden die Zellen ab Tag 0 mit TGF α inkubiert und mit Cetuximab 24-stündig behandelt, wohingegen Ekblad *et al.* die Zellen erst ab Tag 3 mit TGF α behandelten, wobei keine Angabe über die Einwirkzeit des Cetuximab erfolgte. Nicht zu vernachlässigen war zudem die Art der Testung, wobei Ekblad *et al.* die Proliferation der Zellen detektierten, in der vorliegenden Arbeit jedoch die Vitalität der Zellen untersucht wurde.

Der Proliferationstest nach Gabe von Cetuximab in Kombination mit den exogenen Liganden AREG und TGF α ergab bei Hatakeyama *et al.* folgende Ergebnisse [Hatakeyama *et al.* 2010]: Bei TGF α reichte eine geringe Konzentration (10 - 100 pM) aus, um eine Resistenz gegenüber Cetuximab zu erreichen. Dies wurde durch die höhere Affinität des TGF α , im Vergleich zum Liganden AREG, zum EGFR erklärt. Bei AREG hingegen führte eine niedrige Konzentration zu keiner Resistenz, erst bei höheren Konzentrationen war lediglich eine geringe Resistenz gegenüber Cetuximab detektierbar. In der vorliegenden Dissertation war die Stoffmenge des verwendeten TGF α mit 0,91 nM hoch. Bei Hatakeyama *et al.* wurde eine Cetuximab-Konzentration von 15 μ g/ml verwendet. Bei der vorliegenden Dissertation betrug diese 10 μ g/ml. Die Zellzahl, die bei Hatakeyama *et al.* bei bis zu 400.000 Zellen am Tag 0 lag, war zudem sehr stark divergierend. Neben TGF α müssten weitere Liganden getestet werden, um Ergebnisse in der vorliegenden Dissertation zu verifizieren. Zudem entsprach die Vitalität der Zellen nicht der Proliferation. Für einen genauen Vergleich wären für die Zukunft Proliferationstests notwendig, da in vorhandenen Studien überwiegend diese Art der Testung methodisch verwendet wurde [Hatakeyama *et al.* 2010].

Detaillierte Studien durch Albeck *et al.* stellten fest, dass für die Inhibition des EGFR ein Schwellenwert von 90 % der Erk-Aktivität notwendig war. Erst dann wurde die Zellproliferation durch den EGFR-Inhibitor beeinflusst [Albeck *et al.* 2013]. Folgerichtig ließ sich der Schluss ziehen, dass Cetuximab die Proliferation, welche durch niedrig-affine Liganden vorangetrieben wurde, stark inhibierte. Hoch-affine Liganden, wie beispielsweise EGF und TGF α , zeigten eine Resistenz gegenüber dem monoklonalen Antikörper Cetuximab [Kearns *et al.* 2015]. Dem widerspricht eine Studie von Ansell *et al.* Diese wiesen analog zur vorliegenden Dissertation für EGF, Amphiregulin und Epiregulin nach, dass durch eine exogene Zufuhr die Resistenz der Behandlung mit Ceuximab stieg [Ansell *et al.* 2016]. Allerdings wurden ihre Zellen erst nach 24 Stunden Kultur mit den Liganden und Cetuximab in der Stoffmenge 30 nM behandelt, in der vorliegenden Arbeit hingegen mit 70 nM. Eine Testung mit weiteren Liganden wäre notwendig, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Eine Koexpression des Rezeptors und des Liganden im Tumorgewebe ließ vermuten, dass der autokrine Signalweg des TGF α /EGFR eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und der Progression des HNSCC spielte, ebenso wie weitere Liganden [O. Charoenrat *et al.* 2000a, Yonesaka *et al.* 2008]. Die Liganden-Stimulation war Voraussetzung für den wachstumsinhibierenden Effekt von rezeptorbindenden Mitbewerbern und eine autokrine Aktivität der EGFR-Liganden stellte folglich eine wichtige Determinante für die Sensitivität gegenüber Cetuixmab dar [Oshima *et al.* 2012]. Yonesaka *et al.* korrelierten die

Sensitivität gegenüber Cetuximab mit der Freisetzung von EGF, TGF und Amphiregulin bei Zelllinien des HNSCC. Dabei kristallisierte sich AREG als möglicher Marker heraus. Überstieg dessen autokrine Sekretion eine Konzentration von 20 pmol/l, erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit, dass Cetuximab wachstumshemmend auf die Zelllinie wirkte. Yonesaka *et al.* zeigten ebenfalls, dass das Wachstum durch die Neutralisation mit einem AREG-Antikörper oder durch eine Eliminierung der Genexpression, inhibiert wurde [Yonesaka *et al.* 2008]. Diese Teilergebnisse verdeutlichten anhand des realitätsnahen Tumormodells, dass die erfolgreiche Inhibition des EGFR-Signalweges durch Cetuximab in großem Maße von lokalen Wechselwirkungen abhängig war, was einen entscheidenden Erklärungsansatz für die selektive Wirksamkeit der Antikörpertherapie darstellte. Die Rezeptorblockade durch Liganden mit hoher Affinität zum EGFR, wie TGF α , könnte die Bindung von Cetuximab im lokalen Tumormilieu erschweren. Grandis *et al.* konnten bereits nachweisen, dass der Proteinstatus von TGF α und EGFR, sowohl im Tumor als auch in histologisch normaler Mukosa, Zentimeter entfernt vom Primärtumor, erhöht ist [Grandis *et al.* 1993].

Im Allgemeinen konkurrieren Cetuximab, TGF α und weitere EGFR-Liganden lediglich um die Bindungsstelle des EGFR. Je nach Affinität zum Rezeptor und Konzentration, sowohl von Cetuximab als auch der Liganden und in Abhängigkeit von deren autokrinen Sekretion, hat der monoklonale Antikörper unterschiedliche Wirkungen.

4.2.3 Zelllinie: Pica versus FaDu für den Liganden TGF α

Mriouah *et al.* beschrieben für die Zelllinie FaDu eine Resistenz gegenüber dem monoklonalen Antikörper Cetuximab [Mriouah *et al.* 2010]. Pogorzelski *et al.* beschrieben hingegen *in vitro* und *in vivo* ein gegenteiliges Ergebnis. Sie detektierten *in vitro* bei FaDu-Zellen eine Suppression der Phosphorylierung von ERK und AKT durch Cetuximab. Dadurch wurde die Proliferation von FaDu-Zellen inhibiert. Auch *in vivo* ergab sich bei Gabe von Cetuximab eine Tumor-Regression mit einem signifikant verlängerten Überleben der Mäuse [Pogorzelski *et al.* 2014].

Im 2D-Kulturmodell führte die alleinige Gabe von TGF α zu einer niedrigeren Zellzahl der FaDu-Zellen im Vergleich zu PiCa-Zellen, deren Zellzahl zunahm. FaDu-Zellen reagierten auf den Wachstumsfaktor anders als Zellen von PiCa. Hingegen war die Wirkung des Cetuximab im 2D-Kulturmodell in beiden Zelllinien gleich. Die Kombination aus TGF α und Cetuximab führte bei Zellen der Zelllinie FaDu zu einer verminderten Zellzahl. PiCa-Zellen hingegen veränderten ihre Zellzahl nicht. Dies bedeutet, dass die Kombination aus Cetuximab und TGF α bei FaDu-Zellen eine größere Wirkung hatte als bei PiCa. Im Großen und Ganzen reagierten FaDu-Zellen im zweidimensionalen Kulturmodell mit einer

Verminderung der Zellzahl, egal welche Behandlung stattfand. Dies lässt sich bei FaDu womöglich dadurch erklären, dass sie eine über Jahrzehnte unter *in vitro*-Bedingungen selektierte Zelllinie ist. FaDu ist zwar eine über Jahrzehnte anerkannte Zelllinie, die sehr stark beforscht wurde, nichtdestotrotz stimmten *in vitro*-Ergebnisse mit *in vivo*- oder klinischen Ergebnissen nicht überein. Die Ergebnisse der Zelllinie PiCa könnten näher an der eigentlichen *in vivo* Situation sein, da sie weniger passagiert und damit sehr viel kürzere Zeit unter *in vitro*-Bedingungen selektiert wurde.

Im 3D-Kulturmodell führte die alleinige Gabe von TGF α , sowohl für PiCa- als auch für FaDu-Zellen zu keiner Veränderung der Zellzahl. Die Gabe von Cetuximab führte zu einer signifikant verminderten Zellzahl auf Seiten der FaDu-Zellen, was bedeutet, dass die Wirkung des Cetuximab im 3D-Kulturmodell bei Zellen von FaDu größer war als bei Zellen von PiCa, deren Zellzahl sich nicht veränderte. Ebenfalls führte die Kombination aus TGF α und Cetuximab bei FaDu-Zellen zu einer verminderten Zellzahl, im Vergleich zu PiCa-Zellen, deren Zellzahl nur leicht vermindert wurde. FaDu-Zellen organisierten sich als Spheroide anders als PiCa-Zellen und reagierten dadurch sensibler auf äußere Einflüsse.

Eine Resistenz gegenüber Cetuximab, wie Mriouah *et al.* sie beschrieben, konnte weder für das 2D-Kulturmodell noch für das 3D-Kulturmodell bei FaDu-Zellen detektiert werden. Mriouah *et al.* benutzten eine Cetuximab-Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ nach 5 Tagen Zellkultur, wohingegen in der vorliegenden Arbeit lediglich eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ nach Tag 4 (2D), beziehungsweise Tag 10 (3D), für je 24 Stunden benutzt wurde [Mriouah *et al.* 2010]. Die vorhandenen Ergebnisse bestätigen die Aussage von Pogorzelski *et al.*, wobei keine Testung der Proliferation stattfand, sondern ein Vitalitätstest. Die Einwirkzeit von Cetuximab von lediglich 24 Stunden reichte aus, um ähnliche Ergebnisse zu erhalten. Pogorzelski *et al.* hatten Cetuximab hingegen 72 Stunden inkubiert [Pogorzelski *et al.* 2014].

4.2.4 Kulturmodell: 2D versus 3D für den Liganden TGF α

Bei Betrachtung aller Ergebnisse ist ein anderer, nicht zu vernachlässigender Gesichtspunkt der Unterschied des Verhaltens der Zellen *in vivo* und *in vitro*. Wie bereits oben erwähnt spielte die Mikroumgebung des Tumors eine Rolle bei den unterschiedlichen Antworten auf Cetuximab. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht über das 3D-Studienmodell, möglichst nahe an *in vivo*-Bedingungen anzuknüpfen. Beim Vergleich der Ergebnisse herkömmlicher 2D-Studienbedingungen mit den Ergebnissen aus modernen 3D-Versuchen zeigten sich enorme Unterschiede:

Für PiCa-Zellen ergab sich im 3D-Kulturmodell bei der alleinigen Liganden-Gabe von TGF α keine signifikante Veränderung der Zellzahl. PiCa-2D-Zellen konnten den Liganden TGF α besser nutzen und reagierten mit einer Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu den 3D-Zellen. Dies liegt sehr wahrscheinlich am charakteristischen Aufbau der jeweiligen Zellverbände. Intern durchgeführte Immunhistochemie mit Ki67 eines 3D-Spheroids von PiCa zeigte, dass die Peripherie des Spheroids eine höhere Proliferationsrate als im zentralen Anteil aufwies. Dies korreliert mit der Nährstoffverteilung in mukosalen Tumoren, bei denen nekrotische Anteile im Tumorkern vorhanden waren [Hagemann *et al.* 2017]. Dies entsprach ebenfalls der typischen Architektur eines Spheroids mit einer inneren, nicht-proliferierenden und einer äußeren, proliferierenden Zellschicht [Kunz-Schughart *et al.* 2004, Santini *et al.* 1999, Weiswald *et al.* 2015]. Im 2D-Kulturrasen war folglich eine höhere EGFR-Zahl verfügbar, an welche der Ligand TGF α andocken konnte. Im 3D-Kulturmodell war dies nicht im selben Umfang möglich. Die Gabe von Cetuximab hingegen führte zu keiner Veränderung der Zellzahl der 3D-Zellen, im Gegensatz zu PiCa-Zellen im Monolayer, deren Zellzahl reduziert wurde. Hierfür ist der typische Aufbau der Zellverbände ebenfalls ein wesentlicher Grund. Durch die kugelig-dreidimensionale Struktur waren Spherioide "geschützter" und organisierter gegenüber der Wirkung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab. Der Zellkulturrasen war dessen Wirkung komplett ausgesetzt, wodurch eine wesentlich verminderte Zellzahl detektiert werden konnte. Dieser Mechanismus der Resistenz wurde auch als "multizelluläre Resistenz" beschrieben, der zurückzuführen ist auf Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrix-Kontakte und die dreidimensionale Form des Gebildes. Im Allgemeinen gilt, dass Tumore gegenüber einer Cetuximab-Therapie resistenter waren als Karzinomzellen, welche als Monolayer kultiviert wurden [Minchinton *et al.* 2006, Phung *et al.* 2011]. Die Kombination aus TGF α und Cetuximab ergab keine signifikante Veränderung der Zellzahlen im Vergleich beider Kulturmodelle.

Für Zellen der Zelllinie FaDu führte die alleinige Gabe des Liganden TGF α zu einer verminderten Zellzahl der 2D-Zellen, verglichen mit Zellen des 3D-Kulturmodells, deren Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht verändert wurde. Durch die Gabe von TGF α wurden 2D-FaDu-Zellen in ihrer Zellzahl durch eine verstärkte Internalisierung des EGFR vermindert. 3D-Zellen konnten durch ihre Spheroidstruktur vor der verstärkten Internalisierung bewahrt werden. Weitere Immunhistochemie könnte näheren Aufschluss über die unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit der Spherioide liefern. Über eine Durchflusszytometrie für beide Kulturmodelle beider Zelllinien könnte die womöglich unterschiedliche Expression des EGF-Rezeptors näher untersucht werden. Die Gabe von Cetuximab für 24 Stunden führte zu einer verminderten Zellzahl der 2D-Zellen und zu

keiner Veränderung der Anzahl der 3D-Zellen. Eine Wirkung des Cetuximab war im 3D-Kulturmodell, im Gegensatz zum 2D-Kulturmodell, nicht vorhanden. Die Spheroide konnten sich vor der Wirkung des Cetuximab schützen. Hierfür könnte, wie für PiCa bereits beschrieben, der Aufbau der Zellverbände verantwortlich sein. Die Kombination aus TGF α und Cetuximab führte bei beiden Kulturmodellen zu einer Minderung der Zellzahl, wodurch eine Wirkung bewiesen ist.

In vitro-Ergebnisse von Tumorzelllinien beschrieben die wachstumshemmende Wirkung des Cetuximab als moderat (15 - 50 %) [Dassonville *et al.* 2007]. Die *in vivo*-Wirksamkeit von Cetuximab war, verglichen mit den Ergebnissen von Tumorzelllinien *in vitro*, ausgesprochen vergrößert. Als Beispiel konnten hierfür Studien zu A431-Zellen angeführt werden, bei denen EGFR hochexprimiert war. Die Behandlung mit Cetuximab führte *in vitro* je nach Studienbedingungen zu einer Inhibition von 30 - 40 % [Bos *et al.* 1997, Prewett *et al.* 1996]. Im Gegensatz dazu zeigten murine Versuche eine komplette Arretierung des Tumorwachstums und eine Regression von gut ausgebildeten Tumoren [Goldstein *et al.* 1995]. Es ist also wahrscheinlich, dass die *in vivo*-Wirksamkeit des Cetuximab weniger ein Ergebnis des direkten Einflusses auf die Zellproliferation war, sondern eher der Effekt der Inhibition von tumorähnlichen Prozessen, wie Zellmigration und Neovaskularisation. Ebenso konnte die Anti-Tumor-Aktivität der ADCC zugeschrieben werden [Milano 2005]. Ekblad *et al.* beschrieben eine Limitierung von *in vitro*-Studien für die Vorhersagbarkeit der Wirkung des Cetuximab genau aus diesem Grund [Ekblad *et al.* 2012]. *In vivo* könnten verschiedene Faktoren innerhalb der unmittelbaren Tumorumgebung die Therapieantwort beeinflussen [Yano *et al.* 2011]. Zum Beispiel führten Karzinom-assoziierte Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, CAFs) bei Lungenkarzinomzellen zu einer Cetuximab-Resistenz und Zelllinien des HNSCC zeigten eine niedrigere Antwortrate auf Cetuximab in Anwesenheit von CAFs [Jedlinski *et al.* 2013]. Weitere Testung im dreidimensionalen Kulturmodell erscheint für die Zukunft durchaus sinnvoll, um weitere Zusammenhänge der Tumorumgebung und -kommunikation genauer eruieren zu können.

4.3 Schlussfolgerung

4.3.1 Mögliche Ursachen der Resistenz

Trotz des offensichtlichen Zusammenhangs der EGFR-Expression und -Inhibition weist die Wirkung momentaner EGFR-Inhibitoren beim HNSCC nur bedingten Therapieerfolg auf. Obwohl die Mehrzahl der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich den EGF-Rezeptor überexprimieren, sind diese Tumore nicht ausschließlich auf eine Aktivität des EGF-

Rezeptors angewiesen. Viele molekulare Zwischenschritte der Signalwege des EGFR-Systems können transaktiviert werden. Beim CRC zeigte sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der EGFR-Expression und der Antwort des Tumors auf eine Therapie mit Cetuximab. Diese Ergebnisse bekräftigten die Annahme, dass andere Charakteristika des EGFR, wie beispielsweise der Aktivitätsgrad, Phosphorylierungsgrad und das Zusammenspiel mit anderen Effektoren wichtiger sind als die absolute EGFR-Zahl bei der Antwort auf die Wirkstoffe selbst [Ciardiello *et al.* 2003, Saltz *et al.* 2004]. Deshalb wurde eine duale Inhibition des EGFR, welche sowohl auf die innere als auch auf die äußere Domäne des EGFR abzielt, entwickelt. Präklinische Studien zeigten, dass die Zugabe von Gefitinib oder Erlotinib in Kombination mit Cetuximab die Zellproliferation und das Tumorstadium zusätzlich reduzierte [Matar *et al.* 2004]. Dies zeigte sich vor allem bei Tumormodellen, welche hoch resistent gegenüber Cetuximab waren [Huang *et al.* 2004, Wang *et al.* 2012].

Trotz des berechtigten Einwands von Li *et al.*, dass Antikörper, verglichen mit Ligandenanaloga, aus biochemischer Sicht effektiver in der Blockade des EGFR-Signals waren [Li *et al.* 2005], halten manche Autoren nicht nur das Antagonisieren des EGFR für sinnvoll, sondern auch eine Blockade von EGFR-Liganden [Miyamoto *et al.* 2009]. Eine erhöhte Expression der Liganden selbst sowie eine veränderte Expression der ADAM-Enzyme tragen zur Pathologie und Therapieresistenz des HNSCC bei [Hatakeyama *et al.* 2010, Li *et al.* 2009]. EGFR-Liganden werden von der zytoplasmatischen Membran durch die Aktivierung des TACE (*tumor necrosis factor- α converting enzyme*) freigesetzt. [Hinkle *et al.* 2004]. Die Verhinderung dieser Freisetzung durch den TACE-Inhibitor TAP12 [Li *et al.* 2009] könnte ein weiterer Angriffspunkt in der Überwindung der Resistenz gegenüber Cetuximab sein. Kearns *et al.* entwickelten einen oligoklonalen Anti-EGFR Antikörper um die beschriebene Signalamplifikation durch EGFR-Liganden zu umgehen. Hoch-affine Liganden wurden dabei effektiver antagonisiert als beim monoklonalen Antikörper Cetuximab. Zudem fand eine Runterregulierung des EGFR statt und eine Funktion als Immun-Effektor konnte nachgewiesen werden [Kearns *et al.* 2015].

In der Therapie des HNSCC führte die Einführung der targeted-Wirkstoffe gegen den EGFR und die daraufhin festgestellte Resistenz zu einer neuen therapeutischen Herausforderung. Eine primäre Resistenz gegenüber Cetuximab ist in 13 - 35 % der Fälle vorhanden [Vermorken *et al.* 2008, Vermorken *et al.* 2007]. Eine erworbene Resistenz entwickelt sich während der Behandlung durch Mechanismen, die sehr komplex sind und bis dato nur teilweise verstanden werden. Dies stellt ein großes Problem dar, wobei eine Vielzahl potentieller Mechanismen für Zelllinien mit HNSCC beschrieben werden. Viele dieser Resistenzmechanismen beinhalten eine Aktivierung anderer ErbB-Rezeptoren

(ErbB2 und/oder ErbB3) [Erjola *et al.* 2006, Yonesaka *et al.* 2011], eine Aktivierung anderer Signalwege (VEGF, MET) [Bozec *et al.* 2007, Krumbach *et al.* 2011] oder nachgeschalteter Signalwege (PI3/AKT, RAS/MAPK/ERK, mTor, STAT) [Rebucci *et al.* 2011, Schmitz *et al.* 2014, Wang *et al.* 2014] oder eine Überexpression der Aurora-Kinase A. [Cohen 2014, Kalyankrishna *et al.* 2006, Wheeler *et al.* 2008, Yonesaka *et al.* 2011] Nimmt man all diese Faktoren zusammen, werden neue Ansätze für eine Kombination aus Wirkstoffen, vor allem für Cetuximab-resistente Karzinome, dringend benötigt.

Eine Heterodimerisierung des EGFR mit HER-2, HER-3 oder HER-4 könnte für die limitierte Wirkung von monoklonalen Antikörpern verantwortlich sein. Die Möglichkeit mehr als nur einen HER-Rezeptor zu blockieren, könnte von großer Bedeutung werden [Schmitz *et al.* 2014]. Bevorzugter Bindungspartner des EGFR ist der ErbB2 (HER-2)-Rezeptor, der charakteristischerweise nur Heterodimere formt [Ferguson *et al.* 2000]. Die heterodimere Kombination weist eine erhöhte Liganden-Affinität im Vergleich zu EGFR-Homodimeren auf, woraus eine verlängerte Signaldauer resultiert [Graus-Porta *et al.* 1997, Graus-Porta *et al.* 1995]. Ebenso ist diese Kombination an der Zelloberfläche wesentlich stabiler als die anderen gebildeten Komplexe der EGFR-Familie [Lenferink *et al.* 1998, Schlessinger 2002]. Sowohl der Ligand EGF als auch TGF α lenken den EGFR zur Formation eines Heterodimers mit ErbB2 [Macdonald-Obermann *et al.* 2014]. Die Verstärkung der Rezeptorsignale durch EGFR/Her-2-Heterodimere und die damit verbundene Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren gilt als gesichert [Gold *et al.* 2009]. Irreversible Tyrosinkinaseinhibitoren, wie beispielsweise Afatinib, ein dualer Inhibitor gegen EGFR und Her2, haben in Xenotransplantat-Modellen bei Cetuximab-resistenten Blasenkarzinomen eine inhibitorische Aktivität gezeigt, genauso wie die kombinierte Therapie von Afatinib mit Cetuximab [Quesnelle *et al.* 2011]. Eine Phase-3-Studie bei Patienten mit rekurrentem oder metastasiertem HNSCC konnte für Afatinib ebenfalls, im Vergleich zu Methotrexat, einen Vorteil im progressionsfreien Überleben nachweisen [Clement *et al.* 2016]. Eine EGFR-Amplifikation wurde dabei als möglicher negativer prognostischer Biomarker detektiert [Cohen *et al.* 2017]. Die postoperative adjuvante Gabe von Lapatinib mit simultaner Radio-Chemotherapie und einer Lapatinib-Monotherapie im Anschluss hatte hingegen keinen effektiven Vorteil bei Patienten mit einem chirurgisch ersttherapierten HNSCC. Zusätzliche Toxizitäten traten auf [Cohen 2014, Harrington *et al.* 2015, Weiss *et al.* 2018]. Nagaoka *et al.* beschrieben für kolorektale Karzinome, vor allem über eine Heterodimerisierung mit ErbB2 und ErbB3, eine Signalwirkung und schlugen deren effektive zusätzliche Blockierung in der targeted-Therapie vor [Nagaoka *et al.* 2016]. Zhang *et al.* wiesen ebenfalls nach, dass eine

Aktivierung des Signalweges von Akt durch ErbB2/ErbB3 die Effektivität der Inhibition des EGFR senkte [Zhang *et al.* 2014].

Der EGF-Rezeptor spielt zwar eine große Rolle in der Progression des HNSCC, jedoch variiert der Aktivierungsstatus des EGFR-Signalweges sehr stark zwischen 5 % - 90 % [Kong *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2005]. Molinolo *et al.* konnten nachweisen, dass nur 50 % der untersuchten Proben des HNSCC über den aktivierten EGFR-Signalweg interagieren, was die Existenz eines oder mehrerer EGFR-unabhängigen Signalwege und deren Aktivierung nahelegt. Diese könnten das Wachstum und das Überleben der Tumorzellen des HNSCC begünstigen. Resultierend erscheint ein einzeln eingesetzter EGFR-Inhibitor, wie beispielsweise Cetuximab, als singuläres therapeutisches Medikament nicht effektiv [Kalyankrishna *et al.* 2006, Molinolo *et al.* 2007]. Zudem ist der wachstumshemmende Effekt des Cetuximab bei Tumor-Xenotransplantaten sehr oft ausgeprägter als in der beobachteten Zellkultur, was zusätzliche antitumorale Mechanismen vermuten lässt. Einer dieser Mechanismen beruht auf der Anti-Angiogenese [Huang *et al.* 1999b, Mendelsohn 2001]. EGF-Rezeptoren befinden sich auch an vaskulären Endothelzellen, weshalb EGFR-Signalwege ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Angiogenese spielen [Petit *et al.* 1997, Schreiber *et al.* 1986]. Auf zellulärer Ebene führt eine Aktivierung des EGFR durch EGF und TGF α zu einer erhöhten VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Expression und damit zu einer Stimulation der Angiogenese [Bancroft *et al.* 2002]. Dies korreliert mit einer Resistenz gegenüber Anti-EGFR-Agentien [O. Charoenrat *et al.* 2000b]. Cetuximab inhibiert die Produktion des VEGF in epidermoiden Karzinomzellen, was unter anderem in einer Reduktion der Anzahl der Tumorblutgefäße und einer Runterregulierung des VEGF resultiert [Perrotte *et al.* 1999, Petit *et al.* 1997]. *In vitro*-Studien zeigten bei einer dualen Inhibition des VEGF und des EGFR einen Anstieg der Apoptose, einen Abfall der Zellproliferation und der vaskulären Permeabilität sowie eine verbesserte zytostatische Aktivität [Ciardiello *et al.* 2006]. Inhibitoren mit einem erweiterten Wirkungsspektrum werden beforscht [Gold *et al.* 2009, Heydar *et al.* 2018, Newman *et al.* 2009, Trafalis *et al.* 2018].

Weiterhin spielt die Blockade des IGF-1 (*Insulin-growth factor type-1*)-Rezeptors eine wichtige Rolle. Dieser ist in epithelialen Tumoren überexprimiert und stimuliert, wie der EGFR, den AKT/mTor-Signalweg und den Ras/MAPK-Signalweg. Dessen Blockade verursacht eine Apoptose der Tumorzellen, eine Inhibition der Tumorgenese und verhindert Tumorinvasion und Metastasierung [Baserga *et al.* 2003]. Eine duale Inhibition des EGFR und des IGF-1R zeigte in Zelllinien des HNSCC hingegen keinen therapeutischen Vorteil bei einer Radioresistenz [Raju *et al.* 2015]. Eine erhöhte Expression der Aurora-Kinase A beim HNSCC hat zu einer kombinierten Inhibition des

EGFR durch Cetuximab und Inhibition der Aurora-Kinase A geführt und zeigte sich von Vorteil bei einer Subgruppe der Patienten mit HNSCC [Hoellein *et al.* 2011].

Die konstitutiv aktive EGFR-Mutante EGFRvIII (EGFRvariantIII) ist beim HNSCC die häufigste alterierte Form des EGFR [Jedlinski *et al.* 2013, Sok *et al.* 2006]. Diese alterierte Form des EGFR wird in Tumorzelllinien nicht exprimiert [Boeckx *et al.* 2014, Lammering *et al.* 2004a, Lammering *et al.* 2004b] und wurde deshalb in der Studie auch nicht berücksichtigt. Allerdings sind Tumore, die EGFRvIII exprimieren, resistent gegen vorhandene, auf den EGFR abzielende, Therapien [Sok *et al.* 2006]. Der Einfluss von EGFRvIII ist in der Therapie des HNSCC immer noch unklar und sollte in klinischen Studien näher betrachtet werden.

Die Resistenz gegenüber Cetuximab wurde unter anderem auch der nukleären Translokation des EGFR zugeschrieben. Es galt als gesichert, dass eine Therapie mit Cetuximab die nukleäre Lokalisation des EGF-Rezeptors fördert [Li *et al.* 2009, Li *et al.* 2010, Liao *et al.* 2009] und, dass Zelllinien mit intrinsischer Resistenz ein hohes Level an nukleärem EGFR besitzen [Li *et al.* 2009]. Li *et al.* berichteten, dass eine erworbene Cetuximab-Resistenz mit der Src-Aktivität und der Src-abhängigen nukleären Translokation des EGFR durch hochregulierte Liganden der HER-Familie assoziiert war [Li *et al.* 2009]. Nukleäres EGFR korrelierte mit einer schlechten klinischen Prognose bei verschiedenen Karzinomtypen, unter anderem auch bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx und Ösophagus [Hoshino *et al.* 2007, Psyrri *et al.* 2008, Psyrri *et al.* 2005]. Ebenso trug nukleäres EGFR zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen Karzinomtherapien, wie beispielsweise Cetuximab, bei. Cetuximab-resistente Zellen überexprimierten dabei Liganden wie EGF, Amphiregulin und andere [Li *et al.* 2009]. Im Allgemeinen ist nur sehr wenig darüber bekannt, in wieweit die einzelnen Liganden und deren Kombination eine Rolle spielten [Brand *et al.* 2013, Faria *et al.* 2016]. Erstaunlicherweise waren AREG und EREG die EGFR-Liganden mit einem besseren Therapieansprechen und sie waren auch diejenigen, die eine nukleäre Translokation von EGFR nicht stimulierten [Faria *et al.* 2016]. Dasatinib, ein starker Src-Inhibitor, konnte beim HNSCC die nukleäre EGFR-Translokation durch Cetuximab oder Radiotherapie blockieren. Diese Erkenntnis ließe den Schluss zu, dass durch Dasatinib die Kombination aus Radiotherapie und Cetuximab in der Therapie des HNSCC effektiver wird [Li *et al.* 2010]. *In vitro*-Ergebnisse bestätigten bei HNSCC-Zellen diese Annahme [Johnson *et al.* 2005]. Während der Entwicklung eines Karzinoms erfahren Zellen multiple Mutationen, wobei jede einzelne ihren Beitrag zur Malignität gibt. Deshalb ist es sehr unwahrscheinlich, durch ein Targeting einer einzelnen Veränderung, die Malignität einzudämmen. Dadurch lässt sich klinisch eine eher moderate Antwortrate der EGFR-gerichteten Therapien

erklären [Hanahan *et al.* 2000, 2011, Harari *et al.* 2007, Hynes *et al.* 2005]. Zudem aktiviert der EGFR die Transkription direkt durch Umgehung der Protein Phosphorylierungskaskade. EGFR-reiche Tumore könnten daher auf EGFR Inhibition nicht reagieren, da nur das rezeptorvermittelte Signal geblockt wird und nicht das Signal ausgehend vom Zellkern [Psyri *et al.* 2005].

Zusammenfassend formieren ErbB-Proteine und deren Liganden ein komplexes System, bei dem die Interaktionen zwischen dem Rezeptor und den Liganden die Art und die Dauer des aktivierten intrazellulären Signals beeinflussen [Normanno *et al.* 2006]. Die Signalkomplexität durch die Interaktionen zwischen vier Rezeptoren und zehn Liganden macht es schwierig, eine definitive Aussage über die eigentliche Signalwirkung in jedem einzelnen humanen Tumor zu treffen [Donnadieu *et al.* 2016, Earp *et al.* 2003]. Ebenso variiert das nachgeschaltete Signal: Eine Tumorzelle benutzt EGFR um beispielsweise den AKT-Signalweg zu aktivieren, wohingegen eine andere Tumorzelle den Ras-MAPK-Signalweg induziert [Leemans *et al.* 2011]. Diese Pleiotropie kann die Rolle des EGFR, sowohl in der Tumorzelle als auch im Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie, beeinflussen. In einigen Beispielen der vorliegenden Dissertation zeigte sich sogar, dass Cetuximab-Gabe nicht nur ineffizient war, sondern sogar nachteilig, was wiederum zeigt, dass eine Cetuximab-Gabe bei Patienten nur nach reiflicher Überlegung eingesetzt werden sollte. Es bleibt also die Frage wie man Patienten mit HNSCC identifizieren kann, die geeignet sind für eine targeted-Therapie mit Cetuximab.

4.3.2 Individuelle Betrachtung einzelner Entitäten

Das HNSCC ist eine heterogene Erkrankung aus einer Vielzahl an anatomischen Lokalisationen des oberen Aerodigestiftrakts, jede einzelne mit einem einzigartigen, heterogenen, pathologischen Profil. Diese molekularen genetischen Unterschiede der unterschiedlichen Entitäten könnten die Expression des EGF-Rezeptors, sowie die Antwort auf eine Therapie, beeinflussen. Bei der vorliegenden Dissertation konnte keine einheitliche Aussage bezüglich der Wirkung des Cetuximab sowie der Kombination mit EGFR-Liganden getroffen werden. Die Ergebnisse im Vergleich beider Zelllinien verdeutlichen dies. Aus diesen Erkenntnissen heraus sollte eine Evaluation des prädiktiven Biomarkers bezüglich der Therapieantwort für jede anatomische Subgruppe separat erfolgen. Für die Zukunft wird die individuelle Betrachtung jedes einzelnen Tumors immer wichtiger werden. Gängige experimentelle Modelle entsprechen nur unzureichend der realen Tumorsituation, wodurch sich auch unterschiedliche klinische und präklinische Ergebnisse erklären lassen.

5. Zusammenfassung

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist ein Rezeptor an der Zelloberfläche und gehört zur ErbB-Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Er spielt eine grundlegende Rolle in der Regulation der Zellproliferation, des Zellüberlebens und der Zelldifferenzierung. Der EGFR wird durch verschiedene Mechanismen aberrant aktiviert und ist assoziiert mit der Entwicklung einer Vielzahl epithelialer Tumore, wie beispielsweise der Kopf-Hals-Karzinome. In mehr als 90 % der Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes findet sich eine erhöhte Expression des EGF-Rezeptors sowie der EGFR-Liganden, wobei eine höhere EGFR-Expression mit einer schlechteren Prognose korreliert. Folglich spielt eine Inhibition des EGFR eine zentrale Rolle in der Therapie dieser Karzinome. Der monoklonale Antikörper Cetuximab ist palliativ als zielgerichtete, personalisierte molekulare Tumorthherapie des HNSCC zugelassen. Da diese kostspielige Therapie lediglich den Progress der Erkrankung aufhalten kann und in nur 15 - 20 % der Fälle zu einem verlängerten Überleben führt, sind weiterführende Erkenntnisse über die Signalwege des EGFR für die selektive Wirksamkeit im klinischen Alltag notwendig.

Aktuelle experimentelle Arbeiten weisen sogar nach, dass Cetuximab unter gewissen Bedingungen wachstumsstimulierend wirken kann. Dies ist offenbar von der Anwesenheit autokrin sezernierter, physiologischer EGFR-Liganden abhängig, da diese mit Cetuximab um die Rezeptorbindung konkurrieren. Im ersten Teil der Arbeit konnte mittels ELISA-Test gezeigt werden, dass die Gabe von Cetuximab die autokrine Produktion der drei Liganden TGF α , EREG und AREG nicht hemmte, sondern deren autokrine Produktion innerhalb der ersten 48 Stunden nach Cetuximab-Gabe sogar förderte. Einzige Ausnahme war die gering hemmende Wirkung des Cetuximab auf Epiregulin für eine der beiden Zelllinien. Übereinstimmend mit Arbeiten anderer Autoren konnte keine endogene Expression des Liganden EGF nach Cetuximab-Blockade des EGFR nachgewiesen werden. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte nicht geklärt werden. Entweder fand durch die EGFR-Blockade mit Cetuximab eine erhöhte Liganden-Produktion und -Sekretion der Zellen statt oder ein verminderter Abbau mit verminderter Internalisierung und dadurch eine Akkumulation der Liganden im Kulturmedium. Dies zeigte sich vor allem bei TGF α , der in der vorliegenden Arbeit der aussagekräftigste Ligand war. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht einerseits die Wichtigkeit des Liganden TGF α , andererseits zeigt sich die Notwendigkeit weiterer Forschung, da dessen einzelne Blockade für den Erfolg der Therapie des HNSCC bei Weitem nicht ausreichen wird. In der vorliegenden Arbeit konnten noch mindestens zwei weitere niedrig-affine Liganden als mögliche Faktoren der

Cetuximab-Resistenz angeführt werden. Für zukünftige Studien werden diese niedrig-affinen Liganden und ihre Wirkung am EGFR beim HNSCC wichtiger und sollten näher untersucht werden. Auch der Wirkung der Kombination der unterschiedlichen Liganden wird eine wichtige Rolle zukommen.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte über die Detektion der Vitalität der Tumorzellen gezeigt werden, dass die allgemein angenommene These, dass die Liganden des EGFR eine wachstumsstimulierende Wirkung auf Tumorzellen haben, für den Liganden TGF α nicht gilt. Auf eine alleinige Gabe von TGF α reagierten die Zellen in den jeweiligen Kulturmodellen heterogen. Die singuläre Zufuhr von Cetuximab bestätigte zunächst die angenommene wachstumshemmende Wirkung des Cetuximab auf Zellen des HNSCC. Allerdings kann bei der vorliegenden Arbeit keine pauschale Aussage über den Einfluss des Cetuximab in Kombination mit TGF α getroffen werden. In Abhängigkeit des Tumortyps und dessen Entität, in Abhängigkeit des einzelnen Tumors und in Abhängigkeit des jeweiligen präklinischen Kulturmodells nimmt TGF α in Kombination mit Cetuximab scheinbar funktionell unterschiedliche Rollen ein. Die Mikroumgebung innerhalb eines Tumors beeinflusst den Effekt des Cetuximab. Die Produktion von TGF α und weiterer Liganden durch Tumorzellen selbst oder durch Nachbarzellen verändert den Gesamteffekt der Cetuximab-Therapie. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum manche Patienten sehr gut, andere wiederum unmerklich auf Cetuximab und die Anti-EGFR-Medikamente ansprechen. Die Wichtigkeit der Etablierung neuer Methodiken wird beim Vergleich einer herkömmlichen Zelllinie mit einer laborintern generierten Zelllinie deutlich. Die Wirkung des Cetuximab auf Tumorzellen des HNSCC war im dreidimensionalen (3D)-Kulturmodell niedriger als in den Monolayer (2D)-Kulturen. Ebenso erscheint die weitere Etablierung des 3D-Studienmodells für die Zukunft sinnvoll, um weitere Zusammenhänge der Tumorumgebung und -kommunikation genauer betrachten zu können. Voneinander abweichende präklinische und klinische Ergebnisse könnten dadurch möglicherweise erklärt werden.

Zudem sollte die Wirkung nicht nur für TGF α , sondern auch für alle weiteren Liganden des EGFR, detektiert werden. Auch die Kombination der Wirkung mehrerer Liganden am EGFR könnte zu entscheidenden Aussagen führen. Um das Therapiespektrum des HNSCC erweitern zu können, müssten weitere Antikörper genauer untersucht werden. Des Weiteren wären Versuche über Therapiekombinationen des HNSCC notwendig. Durch die Komplexität der ErbB-Proteine und deren Liganden wird es in der Therapie des HNSCC zukünftig eine entscheidende Rolle spielen mehr als einen HER-Rezeptor und darüber hinaus weitere Rezeptoren zu blockieren.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Tobacco smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 38 (1986) 35-394
2. Adamczyk, K.A., Klein-Scory, S., Tehrani, M.M., Warnken, U., Schmiegel, W., Schnolzer, M., Schwarte-Waldhoff, I. Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. *Life Sci* 89 (2011) 304-312
3. Adams, G.P., Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23 (2005) 1147-1157
4. Adrain, C., Freeman, M. Regulation of receptor tyrosine kinase ligand processing. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 (2014)
5. Agrawal, N., Frederick, M.J., Pickering, C.R., Bettegowda, C., Chang, K., Li, R.J., Fakhry, C., Xie, T.X., Zhang, J., Wang, J., Zhang, N., El-Naggar, A.K., Jasser, S.A., Weinstein, J.N., Trevino, L., Drummond, J.A., Muzny, D.M., Wu, Y., Wood, L.D., Hruban, R.H., Westra, W.H., Koch, W.M., Califano, J.A., Gibbs, R.A., Sidransky, D., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Papadopoulos, N., Wheeler, D.A., Kinzler, K.W., Myers, J.N. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333 (2011) 1154-1157
6. Albeck, J.G., Mills, G.B., Brugge, J.S. Frequency-modulated pulses of ERK activity transmit quantitative proliferation signals. *Mol Cell* 49 (2013) 249-261
7. Alessi, D.R., Pearce, L.R., Garcia-Martinez, J.M. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal* 2 (2009) pe27
8. Alroy, I., Yarden, Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410 (1997) 83-86
9. Amornphimoltham, P., Patel, V., Sodhi, A., Nikitakis, N.G., Sauk, J.J., Sausville, E.A., Molinolo, A.A., Gutkind, J.S. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 65 (2005) 9953-9961
10. Andreu-Perez, P., Esteve-Puig, R., de Torre-Minguela, C., Lopez-Fauqued, M., Bech-Serra, J.J., Tenbaum, S., Garcia-Trevijano, E.R., Canals, F., Merlino, G., Avila, M.A., Recio, J.A. Protein arginine methyltransferase 5 regulates ERK1/2

- signal transduction amplitude and cell fate through CRAF. *Sci Signal* 4 (2011) ra58
11. Ang, K.K., Andratschke, N.H., Milas, L. Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (2004) 959-965
 12. Ang, K.K., Berkey, B.A., Tu, X., Zhang, H.Z., Katz, R., Hammond, E.H., Fu, K.K., Milas, L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62 (2002) 7350-7356
 13. Anklesaria, P., Teixido, J., Laiho, M., Pierce, J.H., Greenberger, J.S., Massague, J. Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 3289-3293
 14. Ansell, A., Jedlinski, A., Johansson, A.C., Roberg, K. Epidermal growth factor is a potential biomarker for poor cetuximab response in tongue cancer cells. *J Oral Pathol Med* 45 (2016) 9-16
 15. Argiris, A., Karamouzis, M.V., Raben, D., Ferris, R.L. Head and neck cancer. *Lancet* 371 (2008) 1695-1709
 16. Arteaga, C.L. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 284 (2003) 122-130
 17. Astsaturov, I., Cohen, R.B., Harari, P.M. EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 6 (2006) 691-710
 18. Awwad, R.A., Sergina, N., Yang, H., Ziober, B., Willson, J.K., Zborowska, E., Humphrey, L.E., Fan, R., Ko, T.C., Brattain, M.G., Howell, G.M. The role of transforming growth factor alpha in determining growth factor independence. *Cancer Res* 63 (2003) 4731-4738
 19. Baldys, A., Gooz, M., Morinelli, T.A., Lee, M.H., Raymond, J.R., Jr., Luttrell, L.M., Raymond, J.R., Sr. Essential role of c-Cbl in amphiregulin-induced recycling and signaling of the endogenous epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 48 (2009) 1462-1473
 20. Bancroft, C.C., Chen, Z., Yeh, J., Sunwoo, J.B., Yeh, N.T., Jackson, S., Jackson, C., Van Waes, C. Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer* 99 (2002) 538-548
 21. Barnard, J.A., Graves-Deal, R., Pittelkow, M.R., DuBois, R., Cook, P., Ramsey, G.W., Bishop, P.R., Damstrup, L., Coffey, R.J. Auto- and cross-induction within

- the mammalian epidermal growth factor-related peptide family. *J Biol Chem* 269 (1994) 22817-22822
22. Baselga, J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4 (2001) S16-22
 23. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W.H., Jr., Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* 85 (1993) 1327-1333
 24. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M.R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., Mendelsohn, J. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 18 (2000) 904-914
 25. Baselga, J., Rischin, D., Ranson, M., Calvert, H., Raymond, E., Kieback, D.G., Kaye, S.B., Gianni, L., Harris, A., Bjork, T., Averbuch, S.D., Feyereislova, A., Swaisland, H., Rojo, F., Albanell, J. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Oncol* 20 (2002) 4292-4302
 26. Baserga, R., Peruzzi, F., Reiss, K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 107 (2003) 873-877
 27. Batzer, A.G., Rotin, D., Urena, J.M., Skolnik, E.Y., Schlessinger, J. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 5192-5201
 28. Baumeister, P., Reiter, M., Welz, C., Becker, S., Betz, C., Harreus, U. Surgically treated oropharyngeal cancer: risk factors and tumor characteristics. *J Cancer Res Clin Oncol* 140 (2014) 1011-1019
 29. Bei, R., Budillon, A., Masuelli, L., Cereda, V., Vitolo, D., Di Gennaro, E., Ripavecchia, V., Palumbo, C., Ionna, F., Losito, S., Modesti, A., Kraus, M.H., Muraro, R. Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *J Pathol* 204 (2004) 317-325
 30. Bei, R., Pompa, G., Vitolo, D., Moriconi, E., Ciocci, L., Quaranta, M., Frati, L., Kraus, M.H., Muraro, R. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 195 (2001) 343-348
 31. Bentzen, S.M., Atasoy, B.M., Daley, F.M., Dische, S., Richman, P.I., Saunders, M.I., Trott, K.R., Wilson, G.D. Epidermal growth factor receptor expression in

- pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 23 (2005) 5560-5567
32. Berasain, C., Avila, M.A. Amphiregulin. *Semin Cell Dev Biol* 28 (2014) 31-41
 33. Bergler, W., Petroianu, G., Juncker, C., Hormann, K. Correlation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in oropharyngeal carcinomas. *Acta Otolaryngol* 116 (1996) 486-489
 34. Bernier, J., Cooper, J.S., Pajak, T.F., van Glabbeke, M., Bourhis, J., Forastiere, A., Ozsahin, E.M., Jacobs, J.R., Jassem, J., Ang, K.K., Lefebvre, J.L. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 27 (2005) 843-850
 35. Bianco, R., Shin, I., Ritter, C.A., Yakes, F.M., Basso, A., Rosen, N., Tsurutani, J., Dennis, P.A., Mills, G.B., Arteaga, C.L. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 22 (2003) 2812-2822
 36. Bier, H., Hoffmann, T., Haas, I., van Lierop, A. Anti-(epidermal growth factor) receptor monoclonal antibodies for the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* 46 (1998) 167-173
 37. Bishop, P.C., Myers, T., Robey, R., Fry, D.W., Liu, E.T., Blagosklonny, M.V., Bates, S.E. Differential sensitivity of cancer cells to inhibitors of the epidermal growth factor receptor family. *Oncogene* 21 (2002) 119-127
 38. Bissada, E., Abboud, O., Abou Chacra, Z., Guertin, L., Weng, X., Nguyen-Tan, P.F., Tabet, J.C., Thibaudeau, E., Lambert, L., Audet, M.L., Fortin, B., Soulieres, D. Prevalence of K-RAS Codons 12 and 13 Mutations in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Impact on Clinical Outcomes. *Int J Otolaryngol* 2013 (2013) 848021
 39. Blanchard, P., Baujat, B., Holostenco, V., Bourredjem, A., Baey, C., Bourhis, J., Pignon, J.P., group, M.-C.C. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiother Oncol* 100 (2011) 33-40
 40. Blanchet, S., Ramgolam, K., Baulig, A., Marano, F., Baeza-Squiban, A. Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30 (2004) 421-427
 41. Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Winn, D.M., Austin, D.F., Greenberg, R.S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J.B., Stemhagen, A., Fraumeni, J.F., Jr.

- Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48 (1988) 3282-3287
42. Blume-Jensen, P., Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411 (2001) 355-365
 43. Blumenberg, M. Differential transcriptional effects of EGFR inhibitors. *PLoS One* 9 (2014) e102466
 44. Boeckx, C., Weyn, C., Vanden Bempt, I., Deschoolmeester, V., Wouters, A., Specenier, P., Van Laer, C., Van den Weyngaert, D., Kockx, M., Vermorken, J.B., Peeters, M., Pauwels, P., Lardon, F., Baay, M. Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in Head and Neck cancer patients: implications for anti-EGFR treatment response. *BMC Res Notes* 7 (2014) 337
 45. Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D.M., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M.S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E.K., Ang, K.K. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354 (2006) 567-578
 46. Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R.K., Raben, D., Baselga, J., Spencer, S.A., Zhu, J., Youssoufian, H., Rowinsky, E.K., Ang, K.K. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11 (2010) 21-28
 47. Booth, B.W., Adler, K.B., Bonner, J.C., Tournier, F., Martin, L.D. Interleukin-13 induces proliferation of human airway epithelial cells in vitro via a mechanism mediated by transforming growth factor-alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25 (2001) 739-743
 48. Booth, B.W., Smith, G.H. Roles of transforming growth factor-alpha in mammary development and disease. *Growth Factors* 25 (2007) 227-235
 49. Bos, M., Mendelsohn, J., Kim, Y.M., Albanell, J., Fry, D.W., Baselga, J. PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. *Clin Cancer Res* 3 (1997) 2099-2106
 50. Boyle, J.O., Hakim, J., Koch, W., van der Riet, P., Hruban, R.H., Roa, R.A., Correo, R., Eby, Y.J., Ruppert, J.M., Sidransky, D. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 53 (1993) 4477-4480
 51. Bozec, A., Formento, P., Lassalle, S., Lippens, C., Hofman, P., Milano, G. Dual inhibition of EGFR and VEGFR pathways in combination with irradiation:

- antitumour supra-additive effects on human head and neck cancer xenografts. *Br J Cancer* 97 (2007) 65-72
52. Bozec, A., Peyrade, F., Fischel, J.L., Milano, G. Emerging molecular targeted therapies in the treatment of head and neck cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 14 (2009) 299-310
53. Braakhuis, B.J., Tabor, M.P., Kummer, J.A., Leemans, C.R., Brakenhoff, R.H. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 63 (2003) 1727-1730
54. Bracher, A., Cardona, A.S., Tauber, S., Fink, A.M., Steiner, A., Pehamberger, H., Niederleithner, H., Petzelbauer, P., Groger, M., Loewe, R. Epidermal growth factor facilitates melanoma lymph node metastasis by influencing tumor lymphangiogenesis. *J Invest Dermatol* 133 (2013) 230-238
55. Brand, T.M., Iida, M., Luthar, N., Starr, M.M., Huppert, E.J., Wheeler, D.L. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol* 108 (2013) 370-377
56. Brautigan, D.L., Bornstein, P., Gallis, B. Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J Biol Chem* 256 (1981) 6519-6522
57. Brown, C.L., Meise, K.S., Plowman, G.D., Coffey, R.J., Dempsey, P.J. Cell surface ectodomain cleavage of human amphiregulin precursor is sensitive to a metalloprotease inhibitor. Release of a predominant N-glycosylated 43-kDa soluble form. *J Biol Chem* 273 (1998) 17258-17268
58. Brown, P.M., Debanne, M.T., Grothe, S., Bergsma, D., Caron, M., Kay, C., O'Connor-McCourt, M.D. The extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. Studies on the affinity and stoichiometry of binding, receptor dimerization and a binding-domain mutant. *Eur J Biochem* 225 (1994) 223-233
59. Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., Yokoyama, S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12 (2003) 541-552
60. Burke, P., Schooler, K., Wiley, H.S. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell* 12 (2001) 1897-1910
61. Burris, H.A., 3rd Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 71 (2013) 829-842
62. Burtness, B., Harrington, K.J., Greil, R., Soulieres, D., Tahara, M., de Castro, G., Jr., Psyrri, A., Baste, N., Neupane, P., Bratland, A., Fuehrer, T., Hughes, B.G.M., Mesia, R., Ngamphaiboon, N., Rordorf, T., Wan Ishak, W.Z., Hong, R.L.,

- Gonzalez Mendoza, R., Roy, A., Zhang, Y., Gumuscu, B., Cheng, J.D., Jin, F., Rischin, D., Investigators, K.-. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 394 (2019) 1915-1928
63. Busser, B., Sancey, L., Brambilla, E., Coll, J.L., Hurbin, A. The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1816 (2011) 119-131
64. Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., Sidransky, D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56 (1996) 2488-2492
65. Cao, Z., Li, C., Higginbotham, J.N., Franklin, J.L., Tabb, D.L., Graves-Deal, R., Hill, S., Cheek, K., Jerome, W.G., Lapierre, L.A., Goldenring, J.R., Ham, A.J., Coffey, R.J. Use of fluorescence-activated vesicle sorting for isolation of Naked2-associated, basolaterally targeted exocytic vesicles for proteomics analysis. *Mol Cell Proteomics* 7 (2008) 1651-1667
66. Castellsague, X., Quintana, M.J., Martinez, M.C., Nieto, A., Sanchez, M.J., Juan, A., Monner, A., Carrera, M., Agudo, A., Quer, M., Munoz, N., Herrero, R., Franceschi, S., Bosch, F.X. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 108 (2004) 741-749
67. Castillo, J., Erroba, E., Perugorria, M.J., Santamaria, M., Lee, D.C., Prieto, J., Avila, M.A., Berasain, C. Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 66 (2006) 6129-6138
68. Chan, E., Lafleur, B., Rothenberg, M.L., Merchant, N., Lockhart, A.C., Trivedi, B., Chung, C.H., Coffey, R.J., Berlin, J.D. Dual blockade of the EGFR and COX-2 pathways: a phase II trial of cetuximab and celecoxib in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 34 (2011) 581-586
69. Chang, M.H., Ahn, H.K., Lee, J., Jung, C.K., Choi, Y.L., Park, Y.H., Ahn, J.S., Park, K., Ahn, M.J. Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* 117 (2011) 143-151
70. Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q., Mernaugh, R., Carpenter, G. The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem* 274 (1999) 26091-26097
71. Chau, N.G., Perez-Ordóñez, B., Zhang, K., Pham, N.A., Ho, J., Zhang, T., Ludkovski, O., Wang, L., Chen, E.X., Tsao, M.S., Kamel-Reid, S., Siu, L.L. The

- association between EGFR variant III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol* 3 (2011) 11
72. Chen, D.J., Nirodi, C.S. The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin Cancer Res* 13 (2007) 6555-6560
73. Chokki, M., Eguchi, H., Hamamura, I., Mitsunashi, H., Kamimura, T. Human airway trypsin-like protease induces amphiregulin release through a mechanism involving protease-activated receptor-2-mediated ERK activation and TNF alpha-converting enzyme activity in airway epithelial cells. *FEBS J* 272 (2005) 6387-6399
74. Christensen, M.E. The EGF receptor system in head and neck carcinomas and normal tissues. Immunohistochemical and quantitative studies. *Dan Med Bull* 45 (1998) 121-134
75. Chung, C.H., Ely, K., McGavran, L., Varella-Garcia, M., Parker, J., Parker, N., Jarrett, C., Carter, J., Murphy, B.A., Netterville, J., Burkey, B.B., Sinard, R., Cmelak, A., Levy, S., Yarbrough, W.G., Slebos, R.J., Hirsch, F.R. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 24 (2006a) 4170-4176
76. Chung, C.H., Parker, J.S., Ely, K., Carter, J., Yi, Y., Murphy, B.A., Ang, K.K., El-Naggar, A.K., Zanation, A.M., Cmelak, A.J., Levy, S., Slebos, R.J., Yarbrough, W.G. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 66 (2006b) 8210-8218
77. Chung, K.Y., Shia, J., Kemeny, N.E., Shah, M., Schwartz, G.K., Tse, A., Hamilton, A., Pan, D., Schrag, D., Schwartz, L., Klimstra, D.S., Fridman, D., Kelsen, D.P., Saltz, L.B. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 23 (2005) 1803-1810
78. Ciardiello, F., Tortora, G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 2958-2970
79. Ciardiello, F., Tortora, G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer* 39 (2003) 1348-1354
80. Ciardiello, F., Troiani, T., Bianco, R., Orditura, M., Morgillo, F., Martinelli, E., Morelli, M.P., Cascone, T., Tortora, G. Interaction between the epidermal growth

- factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy. *Ann Oncol* 17 Suppl 7 (2006) vii109-114
81. Citri, A., Yarden, Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (2006) 505-516
 82. Clayton, A.H., Walker, F., Orchard, S.G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E.C., Burgess, A.W. Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem* 280 (2005) 30392-30399
 83. Clement, P.M., Gauler, T., Machiels, J.P., Haddad, R.I., Fayette, J., Licitra, L.F., Tahara, M., Cohen, E.E., Cupissol, D., Grau, J.J., Guigay, J., Caponigro, F., de Castro, G., Jr., de Souza Viana, L., Keilholz, U., Del Campo, J.M., Cong, X.J., Ehrnrooth, E., Vermorken, J.B., Lux, H., investigators, N. Afatinib versus methotrexate in older patients with second-line recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: subgroup analysis of the LUX-Head & Neck 1 trial. *Ann Oncol* 27 (2016) 1585-1593
 84. Coffey, R.J., Jr., Derynck, R., Wilcox, J.N., Bringman, T.S., Goustin, A.S., Moses, H.L., Pittelkow, M.R. Production and auto-induction of transforming growth factor- α in human keratinocytes. *Nature* 328 (1987) 817-820
 85. Cohen, E.E., Lingen, M.W., Martin, L.E., Harris, P.L., Brannigan, B.W., Haserlat, S.M., Okimoto, R.A., Sgroi, D.C., Dahiya, S., Muir, B., Clark, J.R., Rocco, J.W., Vokes, E.E., Haber, D.A., Bell, D.W. Response of some head and neck cancers to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors may be linked to mutation of ERBB2 rather than EGFR. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 8105-8108
 86. Cohen, E.E., Rosen, F., Stadler, W.M., Recant, W., Stenson, K., Huo, D., Vokes, E.E. Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 21 (2003) 1980-1987
 87. Cohen, E.E.W., Licitra, L.F., Burtness, B., Fayette, J., Gauler, T., Clement, P.M., Grau, J.J., Del Campo, J.M., Mailliez, A., Haddad, R.I., Vermorken, J.B., Tahara, M., Guigay, J., Geoffrois, L., Merlano, M.C., Dupuis, N., Kramer, N., Cong, X.J., Gibson, N., Solca, F., Ehrnrooth, E., Machiels, J.H. Biomarkers predict enhanced clinical outcomes with afatinib versus methotrexate in patients with second-line recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol* 28 (2017) 2526-2532
 88. Cohen, R.B. Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head

- and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Cancer Treat Rev* 40 (2014) 567-577
89. Cohen, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237 (1962) 1555-1562
 90. Conti, M., Hsieh, M., Park, J.Y., Su, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20 (2006) 715-723
 91. Cummings, R.D., Soderquist, A.M., Carpenter, G. The oligosaccharide moieties of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. Presence of complex-type N-linked chains that contain terminal N-acetylgalactosamine residues. *J Biol Chem* 260 (1985) 11944-11952
 92. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., Van Cutsem, E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351 (2004) 337-345
 93. Curran, D., Giralt, J., Harari, P.M., Ang, K.K., Cohen, R.B., Kies, M.S., Jassem, J., Baselga, J., Rowinsky, E.K., Amellal, N., Comte, S., Bonner, J.A. Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab. *J Clin Oncol* 25 (2007) 2191-2197
 94. D'Souza, G., Kreimer, A.R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W.M., Westra, W.H., Gillison, M.L. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356 (2007) 1944-1956
 95. Dasonville, O., Bozec, A., Fischel, J.L., Milano, G. EGFR targeting therapies: monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors. Similarities and differences. *Crit Rev Oncol Hematol* 62 (2007) 53-61
 96. Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., Ullrich, A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379 (1996) 557-560
 97. David, M., Wong, L., Flavell, R., Thompson, S.A., Wells, A., Larner, A.C., Johnson, G.R. STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J Biol Chem* 271 (1996) 9185-9188
 98. Davis, C.G. The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol* 2 (1990) 410-419
 99. Dawson, J.P., Berger, M.B., Lin, C.C., Schlessinger, J., Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 7734-7742

100. de Larco, J.E., Todaro, G.J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1978) 4001-4005
101. Decker, S.J. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α induce differential processing of the epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 166 (1990) 615-621
102. Dempsey, P.J., Coffey, R.J. Basolateral targeting and efficient consumption of transforming growth factor- α when expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 269 (1994) 16878-16889
103. Dempsey, P.J., Meise, K.S., Yoshitake, Y., Nishikawa, K., Coffey, R.J. Apical enrichment of human EGF precursor in Madin-Darby canine kidney cells involves preferential basolateral ectodomain cleavage sensitive to a metalloprotease inhibitor. *J Cell Biol* 138 (1997) 747-758
104. Denny, W.A. Irreversible inhibitors of the erbB family of protein tyrosine kinases. *Pharmacol Ther* 93 (2002) 253-261
105. DGMKG, D.G.f.M.-., Kiefer- und Gesichtschirurgie (2012) S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMW, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. Berlin pp 1-119
106. Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D.J., Kehlbach, R., Rodemann, H.P. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280 (2005) 31182-31189
107. Djordjevic, S., Driscoll, P.C. Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *Trends Biochem Sci* 27 (2002) 426-432
108. Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R.N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G.J., Burgess, A.W., Nice, E.C. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* 18 (2000) 11-29
109. Dong, J., Opresko, L.K., Dempsey, P.J., Lauffenburger, D.A., Coffey, R.J., Wiley, H.S. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 6235-6240
110. Donnadieu, J., Lachaier, E., Peria, M., Saidak, Z., Dakpe, S., Ikoli, J.F., Chauffert, B., Page, C., Galmiche, A. Short-term culture of tumour slices reveals the heterogeneous sensitivity of human head and neck squamous cell carcinoma to targeted therapies. *BMC Cancer* 16 (2016) 273

111. Du, B., Altorki, N.K., Kopelovich, L., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A.J. Tobacco smoke stimulates the transcription of amphiregulin in human oral epithelial cells: evidence of a cyclic AMP-responsive element binding protein-dependent mechanism. *Cancer Res* 65 (2005) 5982-5988
112. Earp, H.S., 3rd, Calvo, B.F., Sartor, C.I. The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 114 (2003) 315-333; discussion 333-314
113. Ebert, M., Yokoyama, M., Kobrin, M.S., Friess, H., Lopez, M.E., Buchler, M.W., Johnson, G.R., Korc, M. Induction and expression of amphiregulin in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 54 (1994) 3959-3962
114. Ebner, R., Derynck, R. Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell Regul* 2 (1991) 599-612
115. Egloff, A.M., Grandis, J.R. Improving Response Rates to EGFR-Targeted Therapies for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Candidate Predictive Biomarkers and Combination Treatment with Src Inhibitors. *J Oncol* 2009 (2009) 896407
116. Ekblad, L., Johnsson, A. Cetuximab sensitivity associated with oxaliplatin resistance in colorectal cancer. *Anticancer Res* 32 (2012) 783-786
117. Ekblad, L., Welinder, C., Kjellen, E., Brun, E., Wennerberg, J. Anti- or pro-proliferation-conditional options for TGF-alpha and cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 51 (2015) 46-52
118. Engel, J. EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett* 251 (1989) 1-7
119. Erisen, L.M., Coskun, H., Ozuysal, S., Basut, O., Onart, S., Hizalan, I., Tezel, I. Basaloid squamous cell carcinoma of the larynx: a report of four new cases. *Laryngoscope* 114 (2004) 1179-1183
120. Erjala, K., Sundvall, M., Junttila, T.T., Zhang, N., Savisalo, M., Mali, P., Kulmala, J., Pulkkinen, J., Grenman, R., Elenius, K. Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 12 (2006) 4103-4111
121. Fakhry, C., Westra, W.H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J.A., Pinto, H., Forastiere, A., Gillison, M.L. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100 (2008) 261-269

122. Fakhry, C., Zhang, Q., Nguyen-Tan, P.F., Rosenthal, D., El-Naggar, A., Garden, A.S., Soulieres, D., Trotti, A., Avizonis, V., Ridge, J.A., Harris, J., Le, Q.T., Gillison, M. Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 32 (2014) 3365-3373
123. Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res* 53 (1993) 4637-4642
124. Fan, Z., Lu, Y., Wu, X., Mendelsohn, J. Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 269 (1994) 27595-27602
125. Fan, Z., Shang, B.Y., Lu, Y., Chou, J.L., Mendelsohn, J. Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 3 (1997) 1943-1948
126. Faria, J., de Andrade, C., Goes, A.M., Rodrigues, M.A., Gomes, D.A. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 478 (2016) 39-45
127. Faure, R., Baquiran, G., Bergeron, J.J., Posner, B.I. The dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors. Role of endosome-associated phosphotyrosine phosphatase(s). *J Biol Chem* 267 (1992) 11215-11221
128. Favellyukis, S., Till, J.H., Hubbard, S.R., Miller, W.T. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol* 8 (2001) 1058-1063
129. Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.S., Leahy, D.J., Lemmon, M.A. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11 (2003) 507-517
130. Ferguson, K.M., Darling, P.J., Mohan, M.J., Macatee, T.L., Lemmon, M.A. Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbB receptors. *EMBO J* 19 (2000) 4632-4643
131. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136 (2015) E359-386
132. Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A., Prenzel, N., Ullrich, A. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 5172-5183

133. Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59 (1977) 221-226
134. Fontanini, G., De Laurentiis, M., Vignati, S., Chine, S., Lucchi, M., Silvestri, V., Mussi, A., De Placido, S., Tortora, G., Bianco, A.R., Gullick, W., Angeletti, C.A., 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* 4 (1998) 241-249
135. Foon, K.A., Yang, X.D., Weiner, L.M., Beldegrun, A.S., Figlin, R.A., Crawford, J., Rowinsky, E.K., Dutcher, J.P., Vogelzang, N.J., Gollub, J., Thompson, J.A., Schwartz, G., Bukowski, R.M., Roskos, L.K., Schwab, G.M. Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (2004) 984-990
136. Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A., Sidransky, D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 345 (2001) 1890-1900
137. Fox, S.B., Gatter, K.C., Harris, A.L. Tumour angiogenesis. *J Pathol* 179 (1996) 232-237
138. Funatomi, H., Itakura, J., Ishiwata, T., Pastan, I., Thompson, S.A., Johnson, G.R., Korc, M. Amphiregulin antisense oligonucleotide inhibits the growth of T3M4 human pancreatic cancer cells and sensitizes the cells to EGF receptor-targeted therapy. *Int J Cancer* 72 (1997) 512-517
139. Furdui, C.M., Lew, E.D., Schlessinger, J., Anderson, K.S. Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Mol Cell* 21 (2006) 711-717
140. Gajiwala, K.S. EGFR: tale of the C-terminal tail. *Protein Sci* 22 (2013) 995-999
141. Gao, L., Wang, F.Q., Li, H.M., Yang, J.G., Ren, J.G., He, K.F., Liu, B., Zhang, W., Zhao, Y.F. CCL2/EGF positive feedback loop between cancer cells and macrophages promotes cell migration and invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7 (2016) 87037-87051
142. Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Zhu, H.J., Walker, F., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W., Ward, C.W. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110 (2002) 763-773

143. Gillison, M.L., Chaturvedi, A.K., Anderson, W.F., Fakhry, C. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 33 (2015) 3235-3242
144. Gillison, M.L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S., Viscidi, R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 100 (2008) 407-420
145. Gillison, M.L., Koch, W.M., Capone, R.B., Spafford, M., Westra, W.H., Wu, L., Zahurak, M.L., Daniel, R.W., Viglione, M., Symer, D.E., Shah, K.V., Sidransky, D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 709-720
146. Gillison, M.L., Koch, W.M., Shah, K.V. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* 11 (1999) 191-199
147. Goessel, G., Quante, M., Hahn, W.C., Harada, H., Heeg, S., Suliman, Y., Doebele, M., von Werder, A., Fulda, C., Nakagawa, H., Rustgi, A.K., Blum, H.E., Opitz, O.G. Creating oral squamous cancer cells: a cellular model of oral-esophageal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 15599-15604
148. Gold, K.A., Lee, H.Y., Kim, E.S. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 115 (2009) 922-935
149. Goldstein, N.I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., Mendelsohn, J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1 (1995) 1311-1318
150. Gollin, S.M. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck* 23 (2001) 238-253
151. Gomez, G.G., Wykosky, J., Zanca, C., Furnari, F.B., Cavenee, W.K. Therapeutic resistance in cancer: microRNA regulation of EGFR signaling networks. *Cancer Biol Med* 10 (2013) 192-205
152. Gooi, Z., Chan, J.Y., Fakhry, C. The epidemiology of the human papillomavirus related to oropharyngeal head and neck cancer. *Laryngoscope* 126 (2016) 894-900
153. Grandal, M.V., Zandi, R., Pedersen, M.W., Willumsen, B.M., van Deurs, B., Poulsen, H.S. EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. *Carcinogenesis* 28 (2007) 1408-1417
154. Grandis, J.R. Established and emerging concepts in epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69 (2007) S22-24

155. Grandis, J.R., Chakraborty, A., Zeng, Q., Melhem, M.F., Tweardy, D.J. Downmodulation of TGF- α protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem* 69 (1998a) 55-62
156. Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y., Kim, J.D. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 4227-4232
157. Grandis, J.R., Melhem, M.F., Barnes, E.L., Tweardy, D.J. 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* 78 (1996) 1284-1292
158. Grandis, J.R., Melhem, M.F., Gooding, W.E., Day, R., Holst, V.A., Wagener, M.M., Drenning, S.D., Tweardy, D.J. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 90 (1998b) 824-832
159. Grandis, J.R., Tweardy, D.J. Elevated levels of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53 (1993) 3579-3584
160. Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., Hynes, N.E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16 (1997) 1647-1655
161. Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Hynes, N.E. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 1182-1191
162. Gschwind, A., Fischer, O.M., Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 361-370
163. Gullick, W.J. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull* 47 (1991) 87-98
164. Gusenbauer, S., Zanucco, E., Knyazev, P., Ullrich, A. Erk2 but not Erk1 regulates crosstalk between Met and EGFR in squamous cell carcinoma cell lines. *Mol Cancer* 14 (2015) 54
165. Gustavsson, P., Jakobsson, R., Johansson, H., Lewin, F., Norell, S., Rutkvist, L.E. Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx, and oesophagus: a case-control study in Sweden. *Occup Environ Med* 55 (1998) 393-400

166. Hagemann, J., Jacobi, C., Hahn, M., Schmid, V., Welz, C., Schwenk-Zieger, S., Stauber, R., Baumeister, P., Becker, S. Spheroid-based 3D Cell Cultures Enable Personalized Therapy Testing and Drug Discovery in Head and Neck Cancer. *Anticancer Res* 37 (2017) 2201-2210
167. Hallberg, B., Rayter, S.I., Downward, J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem* 269 (1994) 3913-3916
168. Hama, T., Yuza, Y., Saito, Y., J, O.u., Kondo, S., Okabe, M., Yamada, H., Kato, T., Moriyama, H., Kurihara, S., Urashima, M. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncologist* 14 (2009) 900-908
169. Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (2000) 57-70
170. Hanahan, D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (2011) 646-674
171. Harari, P.M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11 (2004) 689-708
172. Harari, P.M., Allen, G.W., Bonner, J.A. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* 25 (2007) 4057-4065
173. Harding, J., Burtness, B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)* 41 (2005) 107-127
174. Harrington, K., Temam, S., Mehanna, H., D'Cruz, A., Jain, M., D'Onofrio, I., Manikhas, G., Horvath, Z., Sun, Y., Dietzsch, S., Dubinsky, P., Holeckova, P., El-Hariry, I., Franklin, N., Biswas-Baldwin, N., Legenne, P., Wissel, P., Netherway, T., Farrell, J., Ellis, C., Wang-Silvanto, J., Amonkar, M., Ahmed, N., Santillana, S., Bourhis, J. Postoperative Adjuvant Lapatinib and Concurrent Chemoradiotherapy Followed by Maintenance Lapatinib Monotherapy in High-Risk Patients With Resected Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Clin Oncol* 33 (2015) 4202-4209
175. Harris, R.C., Chung, E., Coffey, R.J. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284 (2003) 2-13
176. Harte, M.T., Gentry, L.E. Mutations within subdomain II of the extracellular region of epidermal growth factor receptor selectively alter TGF alpha binding. *Arch Biochem Biophys* 322 (1995) 378-389
177. Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S.C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M.P., Dal Maso, L., Daudt, A.W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-

- Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R.B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Lence, J.J., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., McClean, M.D., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A.F., Purdue, M., Rudnai, P., Schwartz, S.M., Smith, E., Sturgis, E.M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D.M., Shangina, O., Pilarska, A., Zhang, Z.F., Ferro, G., Berthiller, J., Boffetta, P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18 (2009) 541-550
178. Haslekas, C., Breen, K., Pedersen, K.W., Johannessen, L.E., Stang, E., Madhus, I.H. The inhibitory effect of ErbB2 on epidermal growth factor-induced formation of clathrin-coated pits correlates with retention of epidermal growth factor receptor-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 16 (2005) 5832-5842
179. Hatakeyama, H., Cheng, H., Wirth, P., Counsell, A., Marcrom, S.R., Wood, C.B., Pohlmann, P.R., Gilbert, J., Murphy, B., Yarbrough, W.G., Wheeler, D.L., Harari, P.M., Guo, Y., Shyr, Y., Slebos, R.J., Chung, C.H. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 5 (2010) e12702
180. Hay, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154 (1995) 8-20
181. Hecht, S.S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 733-744
182. Heck, J.E., Berthiller, J., Vaccarella, S., Winn, D.M., Smith, E.M., Shan'gina, O., Schwartz, S.M., Purdue, M.P., Pilarska, A., Eluf-Neto, J., Menezes, A., McClean, M.D., Matos, E., Koifman, S., Kelsey, K.T., Herrero, R., Hayes, R.B., Franceschi, S., Wunsch-Filho, V., Fernandez, L., Daudt, A.W., Curado, M.P., Chen, C., Castellsague, X., Ferro, G., Brennan, P., Boffetta, P., Hashibe, M. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol* 39 (2010) 166-181
183. Hellyer, N.J., Cheng, K., Koland, J.G. ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 333 (Pt 3) (1998) 757-763
184. Henriksen, L., Grandal, M.V., Knudsen, S.L., van Deurs, B., Grovdal, L.M. Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands. *PLoS One* 8 (2013) e58148

185. Herbst, R.S., Arquette, M., Shin, D.M., Dicke, K., Vokes, E.E., Azarnia, N., Hong, W.K., Kies, M.S. Phase II multicenter study of the epidermal growth factor receptor antibody cetuximab and cisplatin for recurrent and refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 23 (2005) 5578-5587
186. Herbst, R.S., Hong, W.K. IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer. *Semin Oncol* 29 (2002) 18-30
187. Herrero, R., Castellsague, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernandez, L., Idris, A., Sanchez, M.J., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, F.X., Reidel, U., Snijders, P.J., Meijer, C.J., Viscidi, R., Munoz, N., Franceschi, S., Group, I.M.O.C.S. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95 (2003) 1772-1783
188. Heydar, H., Mansouri, K., Norooznejhad, M., Norooznejhad, F., Mohamadnia, A., Bahrami, N. Bevacizumab Inhibits Angiogenic Cytokines in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: From Gene to the Protein. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 12 (2018) 136-141
189. Higashiyama, S., Abraham, J.A., Miller, J., Fiddes, J.C., Klagsbrun, M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251 (1991) 936-939
190. Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G.E., Abraham, J.A., Klagsbrun, M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J Biol Chem* 267 (1992) 6205-6212
191. Higginbotham, J.N., Demory Beckler, M., Gephart, J.D., Franklin, J.L., Bogatcheva, G., Kremers, G.J., Piston, D.W., Ayers, G.D., McConnell, R.E., Tyska, M.J., Coffey, R.J. Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr Biol* 21 (2011) 779-786
192. Hinkle, C.L., Sunnarborg, S.W., Loiselle, D., Parker, C.E., Stevenson, M., Russell, W.E., Lee, D.C. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem* 279 (2004) 24179-24188
193. Hitt, R., Lopez-Pousa, A., Martinez-Trufero, J., Escrig, V., Carles, J., Rizo, A., Isla, D., Vega, M.E., Marti, J.L., Lobo, F., Pastor, P., Valenti, V., Belon, J., Sanchez, M.A., Chaib, C., Pallares, C., Anton, A., Cervantes, A., Paz-Ares, L., Cortes-Funes, H. Phase III study comparing cisplatin plus fluorouracil to paclitaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy followed by

- chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 23 (2005) 8636-8645
194. Hittelman, W.N., Voravud, N., Shin, D.M., Lee, J.S., Ro, J.Y., Hong, W.K. Early genetic changes during upper aerodigestive tract tumorigenesis. *J Cell Biochem Suppl* 17F (1993) 233-236
195. Hobor, S., Van Emburgh, B.O., Crowley, E., Misale, S., Di Nicolantonio, F., Bardelli, A. TGF α and amphiregulin paracrine network promotes resistance to EGFR blockade in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 20 (2014) 6429-6438
196. Hoellein, A., Pickhard, A., von Keitz, F., Schoeffmann, S., Piontek, G., Rudelius, M., Baumgart, A., Wagenpfeil, S., Peschel, C., Dechow, T., Bier, H., Keller, U. Aurora kinase inhibition overcomes cetuximab resistance in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncotarget* 2 (2011) 599-609
197. Hofer, F., Berdeaux, R., Martin, G.S. Ras-independent activation of Ral by a Ca(2+)-dependent pathway. *Curr Biol* 8 (1998) 839-842
198. Honegger, A.M., Kris, R.M., Ullrich, A., Schlessinger, J. Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 925-929
199. Hoshino, M., Fukui, H., Ono, Y., Sekikawa, A., Ichikawa, K., Tomita, S., Imai, Y., Imura, J., Hiraishi, H., Fujimori, T. Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiology* 74 (2007) 15-21
200. Hsu, T.C., Spitz, M.R., Schantz, S.P. Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1 (1991) 83-89
201. Huang, F., Goh, L.K., Sorkin, A. EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 16904-16909
202. Huang, S., Armstrong, E.A., Benavente, S., Chinnaiyan, P., Harari, P.M. Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res* 64 (2004) 5355-5362
203. Huang, S.M., Bock, J.M., Harari, P.M. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59 (1999a) 1935-1940
204. Huang, S.M., Harari, P.M. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* 17 (1999b) 259-269

205. Huang, S.M., Harari, P.M. 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* 6 (2000) 2166-2174
206. Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 92 (2010) 1-853
207. Humblet, Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother* 5 (2004) 1621-1633
208. Hunter, K.D., Parkinson, E.K., Harrison, P.R. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 127-135
209. Hynes, N.E., Lane, H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 341-354
210. Iglesias-Bartolome, R., Martin, D., Gutkind, J.S. Exploiting the head and neck cancer oncogenome: widespread PI3K-mTOR pathway alterations and novel molecular targets. *Cancer Discov* 3 (2013) 722-725
211. Ihrler, S.W., C. Tumorentitäten und pathologische Grundlagen (2009) In: "Manual - Kopf-Hals-Malignomel", G. Mast SICM, A. Kolk, Tumorzentrum München (Hrsg.) (ed) W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 2009, vol 4. Auflage pp 1-8
212. Inui, S., Higashiyama, S., Hashimoto, K., Higashiyama, M., Yoshikawa, K., Taniguchi, N. Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *J Cell Physiol* 171 (1997) 291-298
213. Ishikawa, N., Daigo, Y., Takano, A., Taniwaki, M., Kato, T., Hayama, S., Murakami, H., Takeshima, Y., Inai, K., Nishimura, H., Tsuchiya, E., Kohno, N., Nakamura, Y. Increases of amphiregulin and transforming growth factor- α in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 65 (2005) 9176-9184
214. Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44 (1997) 1299-1305
215. Jacobs, B., De Roock, W., Piessevaux, H., Van Oirbeek, R., Biesmans, B., De Schutter, J., Fieuws, S., Vandesompele, J., Peeters, M., Van Laethem, J.L., Humblet, Y., Penault-Llorca, F., De Hertogh, G., Laurent-Puig, P., Van Cutsem, E., Tejpar, S. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors

- predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 27 (2009) 5068-5074
216. Jedlinski, A., Ansell, A., Johansson, A.C., Roberg, K. EGFR status and EGFR ligand expression influence the treatment response of head and neck cancer cell lines. *J Oral Pathol Med* 42 (2013) 26-36
 217. Jiang, X., Sorkin, A. Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Mol Biol Cell* 13 (2002) 1522-1535
 218. John, K., Lahoti, T.S., Wagner, K., Hughes, J.M., Perdew, G.H. The Ah receptor regulates growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 53 (2014) 765-776
 219. Johnson, F.M., Saigal, B., Talpaz, M., Donato, N.J. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 6924-6932
 220. Johnson, G.L., Vaillancourt, R.R. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 6 (1994) 230-238
 221. Johnson, G.R., Kannan, B., Shoyab, M., Stromberg, K. Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells. *J Biol Chem* 268 (1993) 2924-2931
 222. Johnston, D., Hall, H., DiLorenzo, T.P., Steinberg, B.M. Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res* 59 (1999) 968-974
 223. Jones, J.T., Akita, R.W., Sliwkowski, M.X. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447 (1999) 227-231
 224. Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., Hemmings, B.A. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 4171-4175
 225. Jones, S., Rappoport, J.Z. Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 51 (2014) 23-28
 226. Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W., Burgess, A.W. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284 (2003) 31-53

227. Jura, N., Endres, N.F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M.H., Wemmer, D.E., Zhang, X., Kuriyan, J. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* 137 (2009) 1293-1307
228. Kakiuchi, S., Daigo, Y., Ishikawa, N., Furukawa, C., Tsunoda, T., Yano, S., Nakagawa, K., Tsuruo, T., Kohno, N., Fukuoka, M., Sone, S., Nakamura, Y. Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum Mol Genet* 13 (2004) 3029-3043
229. Kalyankrishna, S., Grandis, J.R. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24 (2006) 2666-2672
230. Kamat, A., Carpenter, G. Phospholipase C-gamma1: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev* 8 (1997) 109-117
231. Kamata, N., Chida, K., Rikimaru, K., Horikoshi, M., Enomoto, S., Kuroki, T. Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res* 46 (1986) 1648-1653
232. Kawamoto, T., Sato, J.D., Le, A., Polikoff, J., Sato, G.H., Mendelsohn, J. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983) 1337-1341
233. Kearns, J.D., Bukhalid, R., Sevecka, M., Tan, G., Gerami-Moayed, N., Werner, S.L., Kohli, N., Burenkova, O., Sloss, C.M., King, A.M., Fitzgerald, J.B., Nielsen, U.B., Wolf, B.B. Enhanced Targeting of the EGFR Network with MM-151, an Oligoclonal Anti-EGFR Antibody Therapeutic. *Mol Cancer Ther* 14 (2015) 1625-1636
234. Keck, M.K., Zuo, Z., Khattri, A., Stricker, T.P., Brown, C.D., Imanguli, M., Rieke, D., Endhardt, K., Fang, P., Bragelmann, J., DeBoer, R., El-Dinali, M., Aktolga, S., Lei, Z., Tan, P., Rozen, S.G., Salgia, R., Weichselbaum, R.R., Lingen, M.W., Story, M.D., Ang, K.K., Cohen, E.E., White, K.P., Vokes, E.E., Seiwert, T.Y. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clin Cancer Res* 21 (2015) 870-881
235. Kelm, J.M., Timmins, N.E., Brown, C.J., Fussenegger, M., Nielsen, L.K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 83 (2003) 173-180
236. Khambata-Ford, S., Garrett, C.R., Meropol, N.J., Basik, M., Harbison, C.T., Wu, S., Wong, T.W., Huang, X., Takimoto, C.H., Godwin, A.K., Tan, B.R., Krishnamurthi, S.S., Burris, H.A., 3rd, Poplin, E.A., Hidalgo, M., Baselga, J.,

- Clark, E.A., Mauro, D.J. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 25 (2007) 3230-3237
237. Khattri, A., Zuo, Z., Bragelmann, J., Keck, M.K., El Dinali, M., Brown, C.D., Stricker, T., Munagala, A., Cohen, E.E., Lingen, M.W., White, K.P., Vokes, E.E., Seiwert, T.Y. Rare occurrence of EGFRvIII deletion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 51 (2015) 53-58
238. Kim, E.S., Khuri, F.R., Herbst, R.S. Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr Opin Oncol* 13 (2001) 506-513
239. Kim, H.H., Sierke, S.L., Koland, J.G. Epidermal growth factor-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with the erbB3 gene product. *J Biol Chem* 269 (1994) 24747-24755
240. Kim, J.H., Saito, K., Yokoyama, S. Chimeric receptor analyses of the interactions of the ectodomains of ErbB-1 with epidermal growth factor and of those of ErbB-4 with neuregulin. *Eur J Biochem* 269 (2002) 2323-2329
241. Kim, M.M., Califano, J.A. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J Cancer* 112 (2004) 545-553
242. Kim, Y., Li, Z., Apetri, M., Luo, B., Settleman, J.E., Anderson, K.S. Temporal resolution of autophosphorylation for normal and oncogenic forms of EGFR and differential effects of gefitinib. *Biochemistry* 51 (2012) 5212-5222
243. Klapper, L.N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N.E., Andrews, G.C., Sela, M., Yarden, Y. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 4995-5000
244. Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A., Herrlich, P. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J* 15 (1996) 5314-5325
245. Kong, A., Leboucher, P., Leek, R., Calleja, V., Winter, S., Harris, A., Parker, P.J., Larijani, B. Prognostic value of an activation state marker for epidermal growth factor receptor in tissue microarrays of head and neck cancer. *Cancer Res* 66 (2006) 2834-2843
246. Kong, C.S., Narasimhan, B., Cao, H., Kwok, S., Erickson, J.P., Koong, A., Pourmand, N., Le, Q.T. The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74 (2009) 553-561

247. Korc, M., Haussler, C.A., Trooman, N.S. Divergent effects of epidermal growth factor and transforming growth factors on a human endometrial carcinoma cell line. *Cancer Res* 47 (1987) 4909-4914
248. Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., Schlessinger, J. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89 (1997) 693-702
249. Kreimer, A.R., Clifford, G.M., Boyle, P., Franceschi, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14 (2005) 467-475
250. Kreimer, A.R., Randi, G., Herrero, R., Castellsague, X., La Vecchia, C., Franceschi, S., Group, I.M.O.C.S. Diet and body mass, and oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: analysis from the IARC multinational case-control study. *Int J Cancer* 118 (2006) 2293-2297
251. Krumbach, R., Schuler, J., Hofmann, M., Giesemann, T., Fiebig, H.H., Beckers, T. Primary resistance to cetuximab in a panel of patient-derived tumour xenograft models: activation of MET as one mechanism for drug resistance. *Eur J Cancer* 47 (2011) 1231-1243
252. Kuan, C.T., Wikstrand, C.J., Bigner, D.D. EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8 (2001) 83-96
253. Kunz-Schughart, L.A., Freyer, J.P., Hofstaedter, F., Ebner, R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9 (2004) 273-285
254. Kutler, D.I., Auerbach, A.D., Satagopan, J., Giampietro, P.F., Batish, S.D., Huvos, A.G., Goberdhan, A., Shah, J.P., Singh, B. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129 (2003) 106-112
255. Kwan, R.W., Wong, R.W., Chan, S.Y. Expression of full length or truncated epidermal growth factor precursor transforms NIH3T3 fibroblasts. *Int J Oncol* 15 (1999) 281-284
256. Lammering, G., Hewit, T.H., Holmes, M., Valerie, K., Hawkins, W., Lin, P.S., Mikkelsen, R.B., Schmidt-Ullrich, R.K. Inhibition of the type III epidermal growth factor receptor variant mutant receptor by dominant-negative EGFR-CD533 enhances malignant glioma cell radiosensitivity. *Clin Cancer Res* 10 (2004a) 6732-6743
257. Lammering, G., Valerie, K., Lin, P.S., Hewit, T.H., Schmidt-Ullrich, R.K. Radiation-induced activation of a common variant of EGFR confers enhanced radioresistance. *Radiother Oncol* 72 (2004b) 267-273

258. Lamont, E.B., Vokes, E.E. Chemotherapy in the management of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Lancet Oncol* 2 (2001) 261-269
259. Lax, I., Bellot, F., Howk, R., Ullrich, A., Givol, D., Schlessinger, J. Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J* 8 (1989) 421-427
260. Lee, D., Pearsall, R.S., Das, S., Dey, S.K., Godfrey, V.L., Threadgill, D.W. Epiregulin is not essential for development of intestinal tumors but is required for protection from intestinal damage. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 8907-8916
261. Lee, J., Ryu, S.H., Kang, S.M., Chung, W.C., Gold, K.A., Kim, E.S., Hittelman, W.N., Ki Hong, W., Koo, J.S. Prevention of bronchial hyperplasia by EGFR pathway inhibitors in an organotypic culture model. *Cancer Prev Res (Phila)* 4 (2011) 1306-1315
262. Leemans, C.R., Braakhuis, B.J., Brakenhoff, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11 (2011) 9-22
263. Lemmon, M.A., Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D.M., Schlessinger, J. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 16 (1997) 281-294
264. Lemmon, M.A., Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141 (2010) 1117-1134
265. Lemmon, M.A., Schlessinger, J., Ferguson, K.M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 (2014) a020768
266. Lenferink, A.E., Pinkas-Kramarski, R., van de Poll, M.L., van Vugt, M.J., Klapper, L.N., Tzahar, E., Waterman, H., Sela, M., van Zoelen, E.J., Yarden, Y. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17 (1998) 3385-3397
267. Levy, E.M., Sycz, G., Arriaga, J.M., Barrio, M.M., von Euw, E.M., Morales, S.B., Gonzalez, M., Mordoh, J., Bianchini, M. Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. *Innate Immun* 15 (2009) 91-100
268. Li, C., Iida, M., Dunn, E.F., Ghia, A.J., Wheeler, D.L. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 28 (2009) 3801-3813
269. Li, C., Iida, M., Dunn, E.F., Wheeler, D.L. Dasatinib blocks cetuximab- and radiation-induced nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol* 97 (2010) 330-337

270. Li, S., Schmitz, K.R., Jeffrey, P.D., Wiltzius, J.J., Kussie, P., Ferguson, K.M. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7 (2005) 301-311
271. Liao, H.J., Carpenter, G. Cetuximab/C225-induced intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 69 (2009) 6179-6183
272. Licitra, L., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Hitt, R., Erfan, J., Rottey, S., Kawecki, A., Zabolotnyy, D., Benasso, M., Storkel, S., Senger, S., Stroh, C., Vermorken, J.B. Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study. *Ann Oncol* 22 (2011) 1078-1087
273. Licitra, L., Perrone, F., Bossi, P., Suardi, S., Mariani, L., Artusi, R., Oggionni, M., Rossini, C., Cantu, G., Squadrelli, M., Quattrone, P., Locati, L.D., Bergamini, C., Olmi, P., Pierotti, M.A., Pilotti, S. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24 (2006) 5630-5636
274. Licitra, L., Storkel, S., Kerr, K.M., Van Cutsem, E., Pirker, R., Hirsch, F.R., Vermorken, J.B., von Heydebreck, A., Esser, R., Celik, I., Ciardiello, F. Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies. *Eur J Cancer* 49 (2013) 1161-1168
275. Lievre, A., Bachet, J.B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J.F., Cote, J.F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., Rougier, P., Penault-Llorca, F., Laurent-Puig, P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66 (2006) 3992-3995
276. Lin, C.R., Chen, W.S., Lazar, C.S., Carpenter, C.D., Gill, G.N., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G. Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms. *Cell* 44 (1986) 839-848
277. Lin, R.Z., Chang, H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 3 (2008) 1172-1184
278. Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., Hung, M.C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3 (2001) 802-808
279. Liu, B., Fang, M., Lu, Y., Mendelsohn, J., Fan, Z. Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest

- induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 20 (2001) 1913-1922
280. Lo, H.W., Hung, M.C. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* 94 (2006) 184-188
281. Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., Clarke, M.F. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23 (2007) 675-699
282. Longva, K.E., Blystad, F.D., Stang, E., Larsen, A.M., Johannessen, L.E., Madshus, I.H. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol* 156 (2002) 843-854
283. Lopez-Albaitero, A., Lee, S.C., Morgan, S., Grandis, J.R., Gooding, W.E., Ferrone, S., Ferris, R.L. Role of polymorphic Fc gamma receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent in vitro cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 58 (2009) 1853-1864
284. Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., Schlessinger, J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70 (1992) 431-442
285. Lubin, J.H., Purdue, M., Kelsey, K., Zhang, Z.F., Winn, D., Wei, Q., Talamini, R., Szeszenia-Dabrowska, N., Sturgis, E.M., Smith, E., Shangina, O., Schwartz, S.M., Rudnai, P., Neto, J.E., Muscat, J., Morgenstern, H., Menezes, A., Matos, E., Mates, I.N., Lissowska, J., Levi, F., Lazarus, P., La Vecchia, C., Koifman, S., Herrero, R., Franceschi, S., Wunsch-Filho, V., Fernandez, L., Fabianova, E., Daudt, A.W., Maso, L.D., Curado, M.P., Chen, C., Castellsague, X., Brennan, P., Boffetta, P., Hashibe, M., Hayes, R.B. Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 170 (2009) 937-947
286. Ludes-Meyers, J.H., Subler, M.A., Shivakumar, C.V., Munoz, R.M., Jiang, P., Bigger, J.E., Brown, D.R., Deb, S.P., Deb, S. Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 6009-6019
287. Lui, V.W., Hedberg, M.L., Li, H., Vangara, B.S., Pendleton, K., Zeng, Y., Lu, Y., Zhang, Q., Du, Y., Gilbert, B.R., Freilino, M., Sauerwein, S., Peyser, N.D., Xiao, D., Diergaard, B., Wang, L., Chiosea, S., Seethala, R., Johnson, J.T., Kim, S., Duvvuri, U., Ferris, R.L., Romkes, M., Nukui, T., Kwok-Shing Ng, P., Garraway,

- L.A., Hammerman, P.S., Mills, G.B., Grandis, J.R. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov* 3 (2013) 761-769
288. Lukk, M., Kapushesky, M., Nikkila, J., Parkinson, H., Goncalves, A., Huber, W., Ukkonen, E., Brazma, A. A global map of human gene expression. *Nat Biotechnol* 28 (2010) 322-324
289. Lurje, G., Lenz, H.J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 77 (2009) 400-410
290. Ma, L., de Roquancourt, A., Bertheau, P., Chevret, S., Millot, G., Sastre-Garau, X., Espie, M., Marty, M., Janin, A., Calvo, F. Expression of amphiregulin and epidermal growth factor receptor in human breast cancer: analysis of autocrine and stromal-epithelial interactions. *J Pathol* 194 (2001) 413-419
291. Macdonald-Obermann, J.L., Pike, L.J. Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation. *J Biol Chem* 289 (2014) 26178-26188
292. Macfarlane, G.J., Macfarlane, T.V., Lowenfels, A.B. The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men. *J Epidemiol Community Health* 50 (1996) 636-639
293. Mack, B., Eggert, C., Eder, K., Imrich, S., Baumeister, P., Harreus, U., Gires, O. Rapid and non-enzymatic in vitro retrieval of tumour cells from surgical specimens. *PLoS One* 8 (2013) e55540
294. Maier, H., Born, I.A., Mall, G. Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. *Klin Wochenschr* 66 Suppl 11 (1988) 140-150
295. Maier, H., Tisch, M. [Occupation and cancer of the head-neck area]. *HNO* 47 (1999) 1025-1037
296. Maier, H., Tisch, M., Enderle, G., Dietz, A., Weidauer, H. [Occupational exposure to paint, lacquer and solvents, and cancer risk in the area of the upper aerodigestive tract]. *HNO* 45 (1997) 905-908
297. Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M.F., Marshall, C.J. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 280 (1998) 109-112
298. Maramotti, S., Paci, M., Micciche, F., Ciarrocchi, A., Cavazza, A., De Bortoli, M., Vaghi, E., Formisano, D., Canovi, L., Sgarbi, G., Bongarzone, I. Soluble epidermal growth factor receptor isoforms in non-small cell lung cancer tissue and in blood. *Lung Cancer* 76 (2012) 332-338

299. Martin, G.C., Brown, J.P., Eifler, C.W., Houston, G.D. Oral leukoplakia status six weeks after cessation of smokeless tobacco use. *J Am Dent Assoc* 130 (1999) 945-954
300. Marur, S., Forastiere, A.A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 83 (2008) 489-501
301. Marur, S., Forastiere, A.A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 91 (2016) 386-396
302. Massague, J. Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* 265 (1990) 21393-21396
303. Masui, H., Castro, L., Mendelsohn, J. Consumption of EGF by A431 cells: evidence for receptor recycling. *J Cell Biol* 120 (1993) 85-93
304. Matar, P., Rojo, F., Cassia, R., Moreno-Bueno, G., Di Cosimo, S., Tabernero, J., Guzman, M., Rodriguez, S., Arribas, J., Palacios, J., Baselga, J. Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 6487-6501
305. McCole, D.F., Keely, S.J., Coffey, R.J., Barrett, K.E. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in colonic epithelial cells by carbachol requires extracellular release of transforming growth factor- α . *J Biol Chem* 277 (2002) 42603-42612
306. McKay, M.M., Morrison, D.K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26 (2007) 3113-3121
307. Mendelsohn, J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8 (2001) 3-9
308. Mendoza, M.C., Er, E.E., Blenis, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 36 (2011) 320-328
309. Milano, G. [Pharmacological skills for targeting EGFR and VEGF]. *Bull Cancer* 92 (2005) S17-20
310. Milas, L., Fan, Z., Andratschke, N.H., Ang, K.K. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (2004) 966-971
311. Minchinton, A.I., Tannock, I.F. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 583-592
312. Minjgee, M., Toulany, M., Kehlbach, R., Giehl, K., Rodemann, H.P. K-RAS(V12) induces autocrine production of EGFR ligands and mediates radioresistance

- through EGFR-dependent Akt signaling and activation of DNA-PKcs. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81 (2011) 1506-1514
313. Mitsudomi, T., Yatabe, Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 277 (2010) 301-308
314. Miyamoto, S., Fukami, T., Yagi, H., Kuroki, M., Yotsumoto, F. Potential for molecularly targeted therapy against epidermal growth factor receptor ligands. *Anticancer Res* 29 (2009) 823-830
315. Mok, T.S. Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. *Nat Rev Clin Oncol* 8 (2011) 661-668
316. Molinolo, A.A., Amornphimoltham, P., Squarize, C.H., Castilho, R.M., Patel, V., Gutkind, J.S. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 45 (2009) 324-334
317. Molinolo, A.A., Hewitt, S.M., Amornphimoltham, P., Keelawat, S., Rangaeng, S., Meneses Garcia, A., Raimondi, A.R., Jufe, R., Itoiz, M., Gao, Y., Saranath, D., Kaleebi, G.S., Yoo, G.H., Leak, L., Myers, E.M., Shintani, S., Wong, D., Massey, H.D., Yeudall, W.A., Lonardo, F., Ensley, J., Gutkind, J.S. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin Cancer Res* 13 (2007) 4964-4973
318. Molinolo, A.A., Marsh, C., El Dinali, M., Gangane, N., Jennison, K., Hewitt, S., Patel, V., Seiwert, T.Y., Gutkind, J.S. mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin Cancer Res* 18 (2012) 2558-2568
319. Moraitis, D., Du, B., De Lorenzo, M.S., Boyle, J.O., Weksler, B.B., Cohen, E.G., Carew, J.F., Altorki, N.K., Kopelovich, L., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A.J. Levels of cyclooxygenase-2 are increased in the oral mucosa of smokers: evidence for the role of epidermal growth factor receptor and its ligands. *Cancer Res* 65 (2005) 664-670
320. Mork, J., Lie, A.K., Glattre, E., Hallmans, G., Jellum, E., Koskela, P., Moller, B., Pukkala, E., Schiller, J.T., Youngman, L., Lehtinen, M., Dillner, J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 344 (2001) 1125-1131
321. Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J., Yarden, Y. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem* 278 (2003) 21323-21326

322. Mrhalova, M., Plzak, J., Betka, J., Kodet, R. Epidermal growth factor receptor--its expression and copy numbers of EGFR gene in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma* 52 (2005) 338-343
323. Mriouah, J., Boura, C., Pinel, S., Chretien, A.S., Fifre, A., Merlin, J.L., Faivre, B. Cellular response to cetuximab in PTEN-silenced head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol* 37 (2010) 1555-1563
324. Mutsaers, A.J., Francia, G., Man, S., Lee, C.R., Ebos, J.M., Wu, Y., Witte, L., Berry, S., Moore, M., Kerbel, R.S. Dose-dependent increases in circulating TGF-alpha and other EGFR ligands act as pharmacodynamic markers for optimal biological dosing of cetuximab and are tumor independent. *Clin Cancer Res* 15 (2009) 2397-2405
325. Myers, E.N. Head and neck oncology--2010, Part I. *Otolaryngol Pol* 64 (2010a) 136-146
326. Myers, E.N. Head and neck oncology--2010, part II. *Otolaryngol Pol* 64 (2010b) 204-214
327. Nagaoka, T., Kitaura, K., Miyata, Y., Kumagai, K., Kaneda, G., Kanazawa, H., Suzuki, S., Hamada, Y., Suzuki, R. Downregulation of epidermal growth factor receptor family receptors and ligands in a mutant K-ras group of patients with colorectal cancer. *Mol Med Rep* 13 (2016) 3514-3520
328. Neelam, B., Richter, A., Chamberlin, S.G., Puddicombe, S.M., Wood, L., Murray, M.B., Nandagopal, K., Niyogi, S.K., Davies, D.E. Structure-function studies of ligand-induced epidermal growth factor receptor dimerization. *Biochemistry* 37 (1998) 4884-4891
329. Negri, E., Boffetta, P., Berthiller, J., Castellsague, X., Curado, M.P., Dal Maso, L., Daudt, A.W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R.B., Herrero, R., Koifman, S., Lazarus, P., Lence, J.J., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A.F., Rudnai, P., Shangina, O., Sturgis, E.M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D.M., Zaridze, D., Lissowska, J., Zhang, Z.F., Ferro, G., Brennan, P., La Vecchia, C., Hashibe, M. Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Int J Cancer* 124 (2009) 394-401
330. Newman, J.R., Helman, E.E., Safavy, S., Zhang, W., Rosenthal, E.L. EMMPRIN expression is required for response to bevacizumab therapy in HNSCC xenografts. *Cancer Lett* 274 (2009) 313-318
331. Newton, A.C. Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res* 50 Suppl (2009) S266-271

332. Nicholson, K.M., Anderson, N.G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14 (2002) 381-395
333. Noonberg, S.B., Benz, C.C. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 59 (2000) 753-767
334. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D.S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366 (2006) 2-16
335. O. Charoenrat, P., Rhys-Evans, P., Eccles, S. Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 88 (2000a) 759-765
336. O. Charoenrat, P., Rhys-Evans, P., Modjtahedi, H., Eccles, S.A. Vascular endothelial growth factor family members are differentially regulated by c-erbB signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 18 (2000b) 155-161
337. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110 (2002) 775-787
338. Olayioye, M.A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J.M., Hynes, N.E. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274 (1999) 17209-17218
339. Olayioye, M.A., Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Rohrer, J., Gay, B., Hynes, N.E. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 5042-5051
340. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19 (2000) 3159-3167
341. Oliveras-Ferraros, C., Cufi, S., Queralt, B., Vazquez-Martin, A., Martin-Castillo, B., de Llorens, R., Bosch-Barrera, J., Brunet, J., Menendez, J.A. Cross-suppression of EGFR ligands amphiregulin and epiregulin and de-repression of FGFR3 signalling contribute to cetuximab resistance in wild-type KRAS tumour cells. *Br J Cancer* 106 (2012) 1406-1414
342. Ornskov, D., Nexø, E., Sørensen, B.S. Insulin-induced proliferation of bladder cancer cells is mediated through activation of the epidermal growth factor system. *FEBS J* 273 (2006) 5479-5489

343. Orth, J.D., Krueger, E.W., Weller, S.G., McNiven, M.A. A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization. *Cancer Res* 66 (2006) 3603-3610
344. Oshima, G., Wennerberg, J., Yamatodani, T., Kjellen, E., Mineta, H., Johnsson, A., Ekblad, L. Autocrine epidermal growth factor receptor ligand production and cetuximab response in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 138 (2012) 491-499
345. Overman, M.J., Hoff, P.M. EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 50 (2007) 1259-1270
346. Pai, S.I., Westra, W.H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol* 4 (2009) 49-70
347. Pan, M., Schinke, H., Luxenburger, E., Kranz, G., Shakhtour, J., Libl, D., Huang, Y., Gaber, A., Pavsic, M., Lenarcic, B., Kitz, J., Jakob, M., Schwenk-Zieger, S., Canis, M., Hess, J., Unger, K., Baumeister, P., Gires, O. EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers. *PLoS Biol* 16 (2018) e2006624
348. Park, J.B., Lee, C.S., Jang, J.H., Ghim, J., Kim, Y.J., You, S., Hwang, D., Suh, P.G., Ryu, S.H. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat Rev Cancer* 12 (2012) 782-792
349. Partridge, M., Emilion, G., Pateromichelakis, S., Phillips, E., Langdon, J. Field cancerisation of the oral cavity: comparison of the spectrum of molecular alterations in cases presenting with both dysplastic and malignant lesions. *Oral Oncol* 33 (1997) 332-337
350. Partridge, M., Green, M.R., Langdon, J.D., Feldmann, M. Production of TGF-alpha and TGF-beta by cultured keratinocytes, skin and oral squamous cell carcinomas--potential autocrine regulation of normal and malignant epithelial cell proliferation. *Br J Cancer* 60 (1989) 542-548
351. Patel, R.D., Kim, D.J., Peters, J.M., Perdew, G.H. The aryl hydrocarbon receptor directly regulates expression of the potent mitogen epiregulin. *Toxicol Sci* 89 (2006) 75-82
352. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373 (1995) 573-580
353. Pawson, T., Schlessingert, J. SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* 3 (1993) 434-442
354. Pedersen, M.W., Pedersen, N., Damstrup, L., Villingshoj, M., Sonder, S.U., Rieneck, K., Bovin, L.F., Spang-Thomsen, M., Poulsen, H.S. Analysis of the

- epidermal growth factor receptor specific transcriptome: effect of receptor expression level and an activating mutation. *J Cell Biochem* 96 (2005) 412-427
355. Pernas, F.G., Allen, C.T., Winters, M.E., Yan, B., Friedman, J., Dabir, B., Saigal, K., Munding, G.S., Xu, X., Morris, J.C., Calvo, K.R., Van Waes, C., Chen, Z. Proteomic signatures of epidermal growth factor receptor and survival signal pathways correspond to gefitinib sensitivity in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 15 (2009) 2361-2372
356. Perrotte, P., Matsumoto, T., Inoue, K., Kuniyasu, H., Eve, B.Y., Hicklin, D.J., Radinsky, R., Dinney, C.P. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 257-265
357. Peterson, E.A., Shabbeer, S., Kenny, P.A. Normal range of serum Amphiregulin in healthy adult human females. *Clin Biochem* 45 (2012) 460-463
358. Petit, A.M., Rak, J., Hung, M.C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B., Kerbel, R.S. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151 (1997) 1523-1530
359. Pfister, D.G., Ang, K.K., Brizel, D.M., Burtness, B.A., Busse, P.M., Caudell, J.J., Cmelak, A.J., Colevas, A.D., Dunphy, F., Eisele, D.W., Gilbert, J., Gillison, M.L., Haddad, R.I., Haughey, B.H., Hicks, W.L., Jr., Hitchcock, Y.J., Kies, M.S., Lydiatt, W.M., Maghami, E., Martins, R., McCaffrey, T., Mittal, B.B., Pinto, H.A., Ridge, J.A., Samant, S., Schuller, D.E., Shah, J.P., Spencer, S., Weber, R.S., Wolf, G.T., Worden, F., Yom, S.S., McMillian, N.R., Hughes, M., National Comprehensive Cancer, N. Head and neck cancers, version 2.2013. Featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 11 (2013) 917-923
360. Phung, Y.T., Barbone, D., Broaddus, V.C., Ho, M. Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *J Cancer* 2 (2011) 507-514
361. Pickering, C.R., Zhang, J., Yoo, S.Y., Bengtsson, L., Moorthy, S., Neskey, D.M., Zhao, M., Ortega Alves, M.V., Chang, K., Drummond, J., Cortez, E., Xie, T.X., Zhang, D., Chung, W., Issa, J.P., Zweidler-McKay, P.A., Wu, X., El-Naggar, A.K., Weinstein, J.N., Wang, J., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Wheeler, D.A., Myers, J.N., Frederick, M.J. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov* 3 (2013) 770-781

362. Piepkorn, M., Pittelkow, M.R., Cook, P.W. Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J Invest Dermatol* 111 (1998) 715-721
363. Pignon, J.P., le Maitre, A., Bourhis, J., Group, M.-N.C. Meta-Analyses of Chemotherapy in Head and Neck Cancer (MACH-NC): an update. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69 (2007) S112-114
364. Pires, F.R., Ramos, A.B., Oliveira, J.B., Tavares, A.S., Luz, P.S., Santos, T.C. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci* 21 (2013) 460-467
365. Plowman, G.D., Green, J.M., McDonald, V.L., Neubauer, M.G., Disteché, C.M., Todaro, G.J., Shoyab, M. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Mol Cell Biol* 10 (1990) 1969-1981
366. Poeta, M.L., Manola, J., Goldwasser, M.A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J.A., Ridge, J.A., Goodwin, J., Kenady, D., Saunders, J., Westra, W., Sidransky, D., Koch, W.M. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 357 (2007) 2552-2561
367. Pogorzelski, M., Ting, S., Gauler, T.C., Breitenbuecher, F., Vossebein, I., Hoffarth, S., Markowitz, J., Lang, S., Bergmann, C., Brandau, S., Jawad, J.A., Schmid, K.W., Schuler, M., Kasper, S. Impact of human papilloma virus infection on the response of head and neck cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy. *Cell Death Dis* 5 (2014) e1091
368. Prewett, M., Rockwell, P., Rockwell, R.F., Giorgio, N.A., Mendelsohn, J., Scher, H.I., Goldstein, N.I. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1996) 419-427
369. Prime, S.S., Game, S.M., Matthews, J.B., Stone, A., Donnelly, M.J., Yeudall, W.A., Patel, V., Sposto, R., Silverthorne, A., Scully, C. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha characteristics of human oral carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 69 (1994) 8-15
370. PromoCell, G. (12/2016) Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8). Instruction Manual PromoCell GmbH Heidelberg, p 4
371. Psyrris, A., Egleston, B., Weinberger, P., Yu, Z., Kowalski, D., Sasaki, C., Haffty, B., Rimm, D., Burtneß, B. Correlates and determinants of nuclear epidermal growth factor receptor content in an oropharyngeal cancer tissue microarray. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 (2008) 1486-1492

372. Psyrrri, A., Yu, Z., Weinberger, P.M., Sasaki, C., Haffty, B., Camp, R., Rimm, D., Burtness, B.A. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 5856-5862
373. Purba, E.R., Saita, E.I., Maruyama, I.N. Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model". *Cells* 6 (2017)
374. Purdue, M.P., Jarvholm, B., Bergdahl, I.A., Hayes, R.B., Baris, D. Occupational exposures and head and neck cancers among Swedish construction workers. *Scand J Work Environ Health* 32 (2006) 270-275
375. Qin, L., Partridge, N.C. Stimulation of amphiregulin expression in osteoblastic cells by parathyroid hormone requires the protein kinase A and cAMP response element-binding protein signaling pathway. *J Cell Biochem* 96 (2005a) 632-640
376. Qin, L., Qiu, P., Wang, L., Li, X., Swarthout, J.T., Soteropoulos, P., Tolias, P., Partridge, N.C. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem* 278 (2003) 19723-19731
377. Qin, L., Tamasi, J., Raggatt, L., Li, X., Feyen, J.H., Lee, D.C., Diccico-Bloom, E., Partridge, N.C. Amphiregulin is a novel growth factor involved in normal bone development and in the cellular response to parathyroid hormone stimulation. *J Biol Chem* 280 (2005b) 3974-3981
378. Quesnelle, K.M., Grandis, J.R. Dual kinase inhibition of EGFR and HER2 overcomes resistance to cetuximab in a novel in vivo model of acquired cetuximab resistance. *Clin Cancer Res* 17 (2011) 5935-5944
379. Rabiasz, G.J., Langdon, S.P., Bartlett, J.M., Crew, A.J., Miller, E.P., Scott, W.N., Smyth, J.F., Miller, W.R. Growth control by epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in human lung squamous carcinoma cells. *Br J Cancer* 66 (1992) 254-259
380. Ragin, C.C., Modugno, F., Gollin, S.M. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 86 (2007a) 104-114
381. Ragin, C.C., Taioli, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 121 (2007b) 1813-1820
382. Raju, U., Molkenline, D.P., Valdecanas, D.R., Deorukhkar, A., Mason, K.A., Buchholz, T.A., Meyn, R.E., Ang, K.K., Skinner, H. Inhibition of EGFR or IGF-1R signaling enhances radiation response in head and neck cancer models but concurrent inhibition has no added benefit. *Cancer Med* 4 (2015) 65-74

383. Ramos, J.W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (2008) 2707-2719
384. Rangan, S.R. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 29 (1972) 117-121
385. Rebucci, M., Peixoto, P., Dewitte, A., Wattez, N., De Nuncques, M.A., Rezvoy, N., Vautravers-Dewas, C., Buisine, M.P., Guerin, E., Peyrat, J.P., Lartigau, E., Lansiaux, A. Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: role of AKT inhibition in bypassing this resistance. *Int J Oncol* 38 (2011) 189-200
386. Red Brewer, M., Choi, S.H., Alvarado, D., Moravcevic, K., Pozzi, A., Lemmon, M.A., Carpenter, G. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell* 34 (2009) 641-651
387. Reich, N.C., Liu, L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 602-612
388. Reuter, C.W., Morgan, M.A., Eckardt, A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 96 (2007) 408-416
389. Riese, D.J., 2nd, Cullum, R.L. Epiregulin: roles in normal physiology and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 28 (2014) 49-56
390. Riese, D.J., 2nd, Stern, D.F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20 (1998) 41-48
391. Roberts, A.B., Frolik, C.A., Anzano, M.A., Sporn, M.B. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Fed Proc* 42 (1983) 2621-2626
392. Rodrigo, J.P., Ramos, S., Lazo, P.S., Alvarez, I., Suarez, C. Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur J Cancer* 32A (1996) 2004-2010
393. Rodrigues, G.A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S.H., Schlessinger, J. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 1448-1459
394. Rodriguez, T., Altieri, A., Chatenoud, L., Gallus, S., Bosetti, C., Negri, E., Franceschi, S., Levi, F., Talamini, R., La Vecchia, C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol* 40 (2004) 207-213
395. Roepstorff, K., Grandal, M.V., Henriksen, L., Knudsen, S.L., Lerdrup, M., Grovdal, L., Willumsen, B.M., van Deurs, B. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic* 10 (2009) 1115-1127

396. Rogers, S.J., Harrington, K.J., Rhys-Evans, P., P, O.C., Eccles, S.A. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 24 (2005) 47-69
397. Rosenthal, A., Lindquist, P.B., Bringman, T.S., Goeddel, D.V., Derynck, R. Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor-alpha cDNA results in transformation. *Cell* 46 (1986) 301-309
398. Rozengurt, E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 213 (2007) 589-602
399. Sacco, A.G., Cohen, E.E. Current Treatment Options for Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 33 (2015) 3305-3313
400. Saeki, T., Salomon, D.S., Johnson, G.R., Gullick, W.J., Mandai, K., Yamagami, K., Moriwaki, S., Tanada, M., Takashima, S., Tahara, E. Association of epidermal growth factor-related peptides and type I receptor tyrosine kinase receptors with prognosis of human colorectal carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 25 (1995) 240-249
401. Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C.P. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164 (2004) 769-779
402. Saki, M., Toulany, M., Rodemann, H.P. Acquired resistance to cetuximab is associated with the overexpression of Ras family members and the loss of radiosensitization in head and neck cancer cells. *Radiother Oncol* 108 (2013) 473-478
403. Sako, Y., Minoghchi, S., Yanagida, T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 168-172
404. Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19 (1995) 183-232
405. Saltz, L.B., Meropol, N.J., Loehrer, P.J., Sr., Needle, M.N., Kopit, J., Mayer, R.J. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22 (2004) 1201-1208
406. 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* 13 (1991) 132-139
407. Santini, M.T., Rainaldi, G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67 (1999) 148-157

408. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307 (2005) 1098-1101
409. Sasaki, T., Hiroki, K., Yamashita, Y. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *Biomed Res Int* 2013 (2013) 546318
410. Sasaki, T., Nakamura, T., Rebhun, R.B., Cheng, H., Hale, K.S., Tsan, R.Z., Fidler, I.J., Langley, R.R. Modification of the primary tumor microenvironment by transforming growth factor alpha-epidermal growth factor receptor signaling promotes metastasis in an orthotopic colon cancer model. *Am J Pathol* 173 (2008) 205-216
411. Sasaoka, T., Langlois, W.J., Leitner, J.W., Draznin, B., Olefsky, J.M. The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J Biol Chem* 269 (1994) 32621-32625
412. Sato, J.D., Kawamoto, T., Le, A.D., Mendelsohn, J., Polikoff, J., Sato, G.H. Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1 (1983) 511-529
413. Schlessinger, J. SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* 4 (1994) 25-30
414. Schlessinger, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110 (2002) 669-672
415. Schlessinger, J., Lemmon, M.A. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* 2003 (2003) RE12
416. Schmidt, M., Scholz, C.J., Polednik, C., Roller, J. Spheroid-based 3-dimensional culture models: Gene expression and functionality in head and neck cancer. *Oncol Rep* 35 (2016) 2431-2440
417. Schmitz, S., Ang, K.K., Vermorken, J., Haddad, R., Suarez, C., Wolf, G.T., Hamoir, M., Machiels, J.P. Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: current knowledge and future directions. *Cancer Treat Rev* 40 (2014) 390-404
418. Schneider, M.R., Wolf, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* 218 (2009) 460-466
419. Schreiber, A.B., Winkler, M.E., Derynck, R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232 (1986) 1250-1253
420. Schwartz, G.J., Mehta, R.H., Wenig, B.L., Shaligram, C., Portugal, L.G. Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 22 (2000) 34-41

421. Schwartz, S.R., Yueh, B., McDougall, J.K., Daling, J.R., Schwartz, S.M. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125 (2001) 1-9
422. Seitz, H.K., Cho, C.H. Contribution of alcohol and tobacco use in gastrointestinal cancer development. *Methods Mol Biol* 472 (2009) 217-241
423. Seitz, H.K., Stickel, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr* 5 (2010) 121-128
424. Seiwert, T.Y., Cohen, E.E. State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer* 92 (2005) 1341-1348
425. Seiwert, T.Y., Zuo, Z., Keck, M.K., Khattri, A., Pedomallu, C.S., Stricker, T., Brown, C., Pugh, T.J., Stojanov, P., Cho, J., Lawrence, M.S., Getz, G., Bragelmann, J., DeBoer, R., Weichselbaum, R.R., Langerman, A., Portugal, L., Blair, E., Stenson, K., Lingen, M.W., Cohen, E.E., Vokes, E.E., White, K.P., Hammerman, P.S. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 21 (2015) 632-641
426. Shao, J., Lee, S.B., Guo, H., Evers, B.M., Sheng, H. Prostaglandin E2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin. *Cancer Res* 63 (2003) 5218-5223
427. She, Q.B., Solit, D., Basso, A., Moasser, M.M. Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 4340-4346
428. Sheikh, M.S., Carrier, F., Johnson, A.C., Ogdon, S.E., Fornace, A.J., Jr. Identification of an additional p53-responsive site in the human epidermal growth factor receptor gene promoter. *Oncogene* 15 (1997) 1095-1101
429. Shi, F., Telesco, S.E., Liu, Y., Radhakrishnan, R., Lemmon, M.A. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 7692-7697
430. Shigeishi, H., Higashikawa, K., Hiraoka, M., Fujimoto, S., Mitani, Y., Ohta, K., Takechi, M., Kamata, N. Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep* 19 (2008) 1557-1564
431. Shin, D.M., Ro, J.Y., Hong, W.K., Hittelman, W.N. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 54 (1994) 3153-3159

432. Shirakata, Y., Komurasaki, T., Toyoda, H., Hanakawa, Y., Yamasaki, K., Tokumaru, S., Sayama, K., Hashimoto, K. Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 275 (2000) 5748-5753
433. Shoyab, M., McDonald, V.L., Bradley, J.G., Todaro, G.J. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 6528-6532
434. Shoyab, M., Plowman, G.D., McDonald, V.L., Bradley, J.G., Todaro, G.J. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 243 (1989) 1074-1076
435. Sibilica, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B.M., Natarajan, A., Hecking, M., Holcman, M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 75 (2007) 770-787
436. Sibilica, M., Wagner, E.F. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269 (1995) 234-238
437. Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., Di Fiore, P.P. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* 15 (2008) 209-219
438. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P., Polo, S. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 2760-2765
439. Silverman, S., Jr., Gorsky, M., Kaugars, G.E. Leukoplakia, dysplasia, and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82 (1996) 117
440. Singh, A.B., Harris, R.C. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 17 (2005) 1183-1193
441. Singh, A.B., Tsukada, T., Zent, R., Harris, R.C. Membrane-associated HB-EGF modulates HGF-induced cellular responses in MDCK cells. *J Cell Sci* 117 (2004) 1365-1379
442. Singh, B., Coffey, R.J. From wavy hair to naked proteins: the role of transforming growth factor alpha in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* 28 (2014a) 12-21
443. Singh, B., Coffey, R.J. Trafficking of epidermal growth factor receptor ligands in polarized epithelial cells. *Annu Rev Physiol* 76 (2014b) 275-300
444. Singh, B., Schneider, M., Knyazev, P., Ullrich, A. UV-induced EGFR signal transactivation is dependent on proligand shedding by activated metalloproteases in skin cancer cell lines. *Int J Cancer* 124 (2009) 531-539

445. Slaughter, D.P., Southwick, H.W., Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6 (1953) 963-968
446. Smilek, P., Neuwirthova, J., Jarkovsky, J., Dusek, L., Rottenberg, J., Kostrica, R., Srovnal, J., Hajduch, M., Drabek, J., Klozar, J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma* 59 (2012) 508-515
447. Sok, J.C., Coppelli, F.M., Thomas, S.M., Lango, M.N., Xi, S., Hunt, J.L., Freilino, M.L., Graner, M.W., Wikstrand, C.J., Bigner, D.D., Gooding, W.E., Furnari, F.B., Grandis, J.R. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 12 (2006) 5064-5073
448. Solmi, R., Lauriola, M., Francesconi, M., Martini, D., Voltattorni, M., Ceccarelli, C., Ugolini, G., Rosati, G., Zanotti, S., Montroni, I., Mattei, G., Taffurelli, M., Santini, D., Pezzetti, F., Ruggeri, A., Castellani, G., Guidotti, L., Coppola, D., Strippoli, P. Displayed correlation between gene expression profiles and submicroscopic alterations in response to cetuximab, gefitinib and EGF in human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 8 (2008) 227
449. Song, J.I., Grandis, J.R. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 19 (2000) 2489-2495
450. Song, J.I., Lango, M.N., Hwang, J.D., Drenning, S.D., Zeng, Q., Lamph, W.W., Grandis, J.R. Abrogation of transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor autocrine signaling by an RXR-selective retinoid (LGD1069, Targretin) in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 61 (2001) 5919-5925
451. Sorkin, A., Goh, L.K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* 315 (2009) 683-696
452. Spitz, M.R., Fueger, J.J., Goepfert, H., Hong, W.K., Newell, G.R. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer* 61 (1988) 203-208
453. Stern, K.A., Place, T.L., Lill, N.L. EGF and amphiregulin differentially regulate Cbl recruitment to endosomes and EGF receptor fate. *Biochem J* 410 (2008) 585-594
454. Strachan, L., Murison, J.G., Prestidge, R.L., Sleeman, M.A., Watson, J.D., Kumble, K.D. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem* 276 (2001) 18265-18271
455. Stransky, N., Egloff, A.M., Tward, A.D., Kostic, A.D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Kryukov, G.V., Lawrence, M.S., Sougnez, C., McKenna, A., Shefler, E.,

- Ramos, A.H., Stojanov, P., Carter, S.L., Voet, D., Cortes, M.L., Auclair, D., Berger, M.F., Saksena, G., Guiducci, C., Onofrio, R.C., Parkin, M., Romkes, M., Weissfeld, J.L., Seethala, R.R., Wang, L., Rangel-Escareno, C., Fernandez-Lopez, J.C., Hidalgo-Miranda, A., Melendez-Zajgla, J., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S.B., Meyerson, M., Lander, E.S., Getz, G., Golub, T.R., Garraway, L.A., Grandis, J.R. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333 (2011) 1157-1160
456. Sturgis, E.M., Pytynia, K.B. After the smoke clears: environmental and occupational risks for carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Cancer J* 11 (2005) 96-103
457. Sun, L., Carpenter, G. Epidermal growth factor activation of NF-kappaB is mediated through IkappaBalpha degradation and intracellular free calcium. *Oncogene* 16 (1998) 2095-2102
458. Sun, X.J., Crimmins, D.L., Myers, M.G., Jr., Miralpeix, M., White, M.F. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13 (1993) 7418-7428
459. Sunada, H., Magun, B.E., Mendelsohn, J., MacLeod, C.L. Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 3825-3829
460. Sundvall, M., Ijini, K., Kilpinen, S., Sara, H., Kallioniemi, O.P., Elenius, K. Role of ErbB4 in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13 (2008) 259-268
461. Suo, Z., Risberg, B., Karlsson, M.G., Villman, K., Skovlund, E., Nesland, J.M. The expression of EGFR family ligands in breast carcinomas. *Int J Surg Pathol* 10 (2002) 91-99
462. Taberero, J., Cervantes, A., Rivera, F., Martinelli, E., Rojo, F., von Heydebreck, A., Macarulla, T., Rodriguez-Braun, E., Eugenia Vega-Villegas, M., Senger, S., Ramos, F.J., Rosello, S., Celik, I., Stroh, C., Baselga, J., Ciardiello, F. Pharmacogenomic and pharmacoproteomic studies of cetuximab in metastatic colorectal cancer: biomarker analysis of a phase I dose-escalation study. *J Clin Oncol* 28 (2010) 1181-1189
463. Takahashi, N., Yamada, Y., Furuta, K., Nagashima, K., Kubo, A., Sasaki, Y., Shoji, H., Honma, Y., Iwasa, S., Okita, N., Takashima, A., Kato, K., Hamaguchi, T., Shimada, Y. Association between serum ligands and the skin toxicity of anti-epidermal growth factor receptor antibody in metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci* 106 (2015) 604-610
464. Takes, R.P., Baatenburg de Jong, R.J., Schuurin, E., Litvinov, S.V., Hermans, J., Van Krieken, J.H. Differences in expression of oncogenes and tumor

- suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res* 18 (1998) 4793-4800
465. Tan, A.R., Yang, X., Hewitt, S.M., Berman, A., Lepper, E.R., Sparreboom, A., Parr, A.L., Figg, W.D., Chow, C., Steinberg, S.M., Bacharach, S.L., Whatley, M., Carrasquillo, J.A., Brahimi, J.S., Ettenberg, S.A., Lipkowitz, S., Swain, S.M. Evaluation of biologic end points and pharmacokinetics in patients with metastatic breast cancer after treatment with erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *J Clin Oncol* 22 (2004) 3080-3090
466. Tang, C., Chan, C., Jiang, W., Murphy, J.D., von Eyben, R., Colevas, A.D., Pinto, H., Lee-Enriquez, N., Kong, C., Le, Q.T. Concurrent cetuximab versus platinum-based chemoradiation for the definitive treatment of locoregionally advanced head and neck cancer. *Head Neck* 37 (2015) 386-392
467. Temam, S., Kawaguchi, H., El-Naggar, A.K., Jelinek, J., Tang, H., Liu, D.D., Lang, W., Issa, J.P., Lee, J.J., Mao, L. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol* 25 (2007) 2164-2170
468. Theroux, S.J., Latour, D.A., Stanley, K., Raden, D.L., Davis, R.J. Signal transduction by the epidermal growth factor receptor is attenuated by a COOH-terminal domain serine phosphorylation site. *J Biol Chem* 267 (1992) 16620-16626
469. Thomas, G.R., Nadiminti, H., Regalado, J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* 86 (2005) 347-363
470. Thompson, S.A., Harris, A., Hoang, D., Ferrer, M., Johnson, G.R. COOH-terminal extended recombinant amphiregulin with bioactivity comparable with naturally derived growth factor. *J Biol Chem* 271 (1996) 17927-17931
471. Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C., et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269 (1995) 230-234
472. Tinhofer, I., Klinghammer, K., Weichert, W., Knodler, M., Stenzinger, A., Gauler, T., Budach, V., Keilholz, U. Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res* 17 (2011) 5197-5204
473. Todd, R., Donoff, B.R., Gertz, R., Chang, A.L., Chow, P., Matossian, K., McBride, J., Chiang, T., Gallagher, G.T., Wong, D.T. TGF- α and EGF-receptor mRNAs in human oral cancers. *Carcinogenesis* 10 (1989) 1553-1556

474. Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65 (2015) 87-108
475. Toulany, M., Baumann, M., Rodemann, H.P. Stimulated PI3K-AKT signaling mediated through ligand or radiation-induced EGFR depends indirectly, but not directly, on constitutive K-Ras activity. *Mol Cancer Res* 5 (2007) 863-872
476. Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Morimoto, S. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 326 (Pt 1) (1997) 69-75
477. Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Takayama, Y., Isobe, T., Okuyama, T., Hanada, K. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 270 (1995) 7495-7500
478. Trafalis, D., Alifieris, C. Bevacizumab, temsirolimus plus or without cetuximab: combinational treatment against patients with advanced HNSCC. *J BUON* 23 (2018) 1928-1929
479. Troiani, T., Martinelli, E., Napolitano, S., Vitagliano, D., Ciuffreda, L.P., Costantino, S., Morgillo, F., Capasso, A., Sforza, V., Nappi, A., De Palma, R., D'Aiuto, E., Berrino, L., Bianco, R., Ciardiello, F. Increased TGF- α as a mechanism of acquired resistance to the anti-EGFR inhibitor cetuximab through EGFR-MET interaction and activation of MET signaling in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 19 (2013) 6751-6765
480. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309 (1984) 418-425
481. Umekita, Y., Ohi, Y., Sagara, Y., Yoshida, H. Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- α predicts worse prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer* 89 (2000) 484-487
482. Val, S., Belade, E., George, I., Boczkowski, J., Baeza-Squiban, A. Fine PM induce airway MUC5AC expression through the autocrine effect of amphiregulin. *Arch Toxicol* 86 (2012) 1851-1859
483. Van Cutsem, E., Tejpar, S., Vanbeckevoort, D., Peeters, M., Humblet, Y., Gelderblom, H., Vermorken, J.B., Viret, F., Glimelius, B., Gallerani, E., Hendlisz, A., Cats, A., Moehler, M., Sagaert, X., Vlassak, S., Schlichting, M., Ciardiello, F. Inpatient cetuximab dose escalation in metastatic colorectal cancer according to the grade of early skin reactions: the randomized EVEREST study. *J Clin Oncol* 30 (2012) 2861-2868

484. Van Cutsem, E., Verslype, C., Beale, P., Clarke, S., Bugat, R., Rakhit, A., Fettner, S.H., Brennscheidt, U., Feyereislova, A., Delord, J.P. A phase Ib dose-escalation study of erlotinib, capecitabine and oxaliplatin in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 19 (2008) 332-339
485. Vermeer, P.D., Panko, L., Karp, P., Lee, J.H., Zabner, J. Differentiation of human airway epithelia is dependent on erbB2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291 (2006) L175-180
486. Vermorken, J.B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., Hitt, R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359 (2008) 1116-1127
487. Vermorken, J.B., Trigo, J., Hitt, R., Koralewski, P., Diaz-Rubio, E., Rolland, F., Knecht, R., Amellal, N., Schueler, A., Baselga, J. Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *J Clin Oncol* 25 (2007) 2171-2177
488. Vigneron, A., Gamelin, E., Coqueret, O. The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Eme1 endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res* 68 (2008) 815-825
489. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, M., Santini, D., Tonini, G. The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol* 68 (2008) 93-106
490. Vincenzi, B., Zoccoli, A., Pantano, F., Venditti, O., Galluzzo, S. Cetuximab: from bench to bedside. *Curr Cancer Drug Targets* 10 (2010) 80-95
491. Voldborg, B.R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., Poulsen, H.S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 8 (1997) 1197-1206
492. Wagner, M.J., Stacey, M.M., Liu, B.A., Pawson, T. Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain-containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (2013) a008987
493. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Munoz, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189 (1999) 12-19
494. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L.M., Li, H., Yu, J.P., Ren, X.B., Wang, C.L. Combined Erlotinib and Cetuximab overcome the acquired resistance to

- epidermal growth factor receptors tyrosine kinase inhibitor in non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 138 (2012) 2069-2077
495. Wang, Z., Martin, D., Molinolo, A.A., Patel, V., Iglesias-Bartolome, R., Degese, M.S., Vitale-Cross, L., Chen, Q., Gutkind, J.S. mTOR co-targeting in cetuximab resistance in head and neck cancers harboring PIK3CA and RAS mutations. *J Natl Cancer Inst* 106 (2014)
496. Wang, Z., Zhang, L., Yeung, T.K., Chen, X. Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation. *Mol Biol Cell* 10 (1999) 1621-1636
497. Ward, C.W., Hoyne, P.A., Flegg, R.H. Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. *Proteins* 22 (1995) 141-153
498. Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., Yarden, Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem* 273 (1998) 13819-13827
499. Weber, A., Langhanki, L., Sommerer, F., Markwarth, A., Wittekind, C., Tannapfel, A. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene* 22 (2003) 4757-4759
500. Wei, W.I., Sham, J.S. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 365 (2005) 2041-2054
501. Weinberger, P.M., Yu, Z., Haffty, B.G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., Sasaki, C., Joe, J., Camp, R.L., Rimm, D.L., Psyrri, A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 24 (2006) 736-747
502. Weinberger, P.M., Yu, Z., Haffty, B.G., Kowalski, D., Harigopal, M., Sasaki, C., Rimm, D.L., Psyrri, A. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 5684-5691
503. Weiss, J.M., Grilley-Olson, J.E., Deal, A.M., Zevallos, J.P., Chera, B.S., Paul, J., Knowles, M.F., Usenko, D., Weissler, M.C., Patel, S., Hayes, D.N., Hackman, T. Phase 2 trial of neoadjuvant chemotherapy and transoral endoscopic surgery with risk-adapted adjuvant therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* (2018)
504. Weiswald, L.B., Bellet, D., Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17 (2015) 1-15
505. Wells, A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31 (1999) 637-643
506. Wen, Y., Li, H., Zeng, Y., Wen, W., Pendleton, K.P., Lui, V.W., Egloff, A.M., Grandis, J.R. MAPK1E322K mutation increases head and neck squamous cell

- carcinoma sensitivity to erlotinib through enhanced secretion of amphiregulin. *Oncotarget* (2016)
507. Westra, W.H., Lewis, J.S., Jr. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head Neck Pathol* 11 (2017) 41-47
508. Wheeler, D.L., Huang, S., Kruser, T.J., Nechrebecki, M.M., Armstrong, E.A., Benavente, S., Gondi, V., Hsu, K.T., Harari, P.M. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 27 (2008) 3944-3956
509. Wheeler, S., Siwak, D.R., Chai, R., LaValle, C., Seethala, R.R., Wang, L., Cieply, K., Sherer, C., Joy, C., Mills, G.B., Argiris, A., Siegfried, J.M., Grandis, J.R., Egloff, A.M. Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 18 (2012) 2278-2289
510. White, J.S., Weissfeld, J.L., Ragin, C.C., Rossie, K.M., Martin, C.L., Shuster, M., Ishwad, C.S., Law, J.C., Myers, E.N., Johnson, J.T., Gollin, S.M. The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 43 (2007) 701-712
511. Wierzbicki, R., Jonker, D.J., Moore, M.J., Berry, S.R., Loehrer, P.J., Youssoufian, H., Rowinsky, E.K. A phase II, multicenter study of cetuximab monotherapy in patients with refractory, metastatic colorectal carcinoma with absent epidermal growth factor receptor immunostaining. *Invest New Drugs* 29 (2011) 167-174
512. Wilken, J.A., Perez-Torres, M., Nieves-Alicea, R., Cora, E.M., Christensen, T.A., Baron, A.T., Maihle, N.J. Shedding of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) is mediated by a metalloprotease/fibronectin/integrin axis and inhibited by cetuximab. *Biochemistry* 52 (2013) 4531-4540
513. Willmarth, N.E., Baillo, A., Dziubinski, M.L., Wilson, K., Riese, D.J., 2nd, Ethier, S.P. Altered EGFR localization and degradation in human breast cancer cells with an amphiregulin/EGFR autocrine loop. *Cell Signal* 21 (2009) 212-219
514. Willmarth, N.E., Ethier, S.P. Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 281 (2006) 37728-37737
515. Wilson, K.J., Gilmore, J.L., Foley, J., Lemmon, M.A., Riese, D.J., 2nd. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther* 122 (2009) 1-8
516. Wilson, K.J., Mill, C., Lambert, S., Buchman, J., Wilson, T.R., Hernandez-Gordillo, V., Gallo, R.M., Ades, L.M., Settleman, J., Riese, D.J., 2nd. EGFR

- ligands exhibit functional differences in models of paracrine and autocrine signaling. *Growth Factors* 30 (2012) 107-116
517. Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 2965-2969
518. Wong, S.F. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clin Ther* 27 (2005) 684-694
519. Woodburn, J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 82 (1999) 241-250
520. Worthylake, R., Opresko, L.K., Wiley, H.S. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 274 (1999) 8865-8874
521. Xi, S., Grandis, J.R. Gene therapy for the treatment of oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res* 82 (2003) 11-16
522. Xia, L., Wang, L., Chung, A.S., Ivanov, S.S., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Platt, A., Gilmer, T.M., Fu, X.Y., Chin, Y.E. Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation. *J Biol Chem* 277 (2002) 30716-30723
523. Xia, W., Lau, Y.K., Zhang, H.Z., Xiao, F.Y., Johnston, D.A., Liu, A.R., Li, L., Katz, R.L., Hung, M.C. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 4164-4174
524. Yano, S., Yamada, T., Takeuchi, S., Tachibana, K., Minami, Y., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Tanaka, H., Kimura, T., Kudoh, S., Nokihara, H., Ohe, Y., Yokota, J., Uramoto, H., Yasumoto, K., Kiura, K., Higashiyama, M., Oda, M., Saito, H., Yoshida, J., Kondoh, K., Noguchi, M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol* 6 (2011) 2011-2017
525. Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4 (2001) S3-8
526. Yarden, Y., Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 127-137
527. Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S., Misra, A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials* 34 (2013) 8690-8707

528. Yokota, T. Is biomarker research advancing in the era of personalized medicine for head and neck cancer? *Int J Clin Oncol* 19 (2014) 211-219
529. Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Lindeman, N., Homes, A.J., Jackman, D.M., Zhao, F., Rogers, A.M., Johnson, B.E., Janne, P.A. Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin Cancer Res* 14 (2008) 6963-6973
530. Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., Fujisaka, Y., Philips, J., Shimizu, T., Maenishi, O., Cho, Y., Sun, J., Destro, A., Taira, K., Takeda, K., Okabe, T., Swanson, J., Itoh, H., Takada, M., Lifshits, E., Okuno, K., Engelman, J.A., Shivdasani, R.A., Nishio, K., Fukuoka, M., Varella-Garcia, M., Nakagawa, K., Janne, P.A. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med* 3 (2011) 99ra86
531. Yoshida, K., Kyo, E., Tsuda, T., Tsujino, T., Ito, M., Niimoto, M., Tahara, E. EGF and TGF- α , the ligands of hyperproduced EGFR in human esophageal carcinoma cells, act as autocrine growth factors. *Int J Cancer* 45 (1990) 131-135
532. Yotsumoto, F., Fukami, T., Yagi, H., Funakoshi, A., Yoshizato, T., Kuroki, M., Miyamoto, S. Amphiregulin regulates the activation of ERK and Akt through epidermal growth factor receptor and HER3 signals involved in the progression of pancreatic cancer. *Cancer Sci* 101 (2010) 2351-2360
533. Zandi, R., Larsen, A.B., Andersen, P., Stockhausen, M.T., Poulsen, H.S. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 19 (2007) 2013-2023
534. Zeng, F., Harris, R.C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol* 28 (2014) 2-11
535. Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., Greene, M.I. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117 (2007) 2051-2058
536. Zhang, L., Castanaro, C., Luan, B., Yang, K., Fan, L., Fairhurst, J.L., Rafique, A., Potocky, T.B., Shan, J., Delfino, F.J., Shi, E., Huang, T., Martin, J.H., Chen, G., Macdonald, D., Rudge, J.S., Thurston, G., Daly, C. ERBB3/HER2 signaling promotes resistance to EGFR blockade in head and neck and colorectal cancer models. *Mol Cancer Ther* 13 (2014) 1345-1355
537. Zhang, Q., Thomas, S.M., Xi, S., Smithgall, T.E., Siegfried, J.M., Kamens, J., Gooding, W.E., Grandis, J.R. SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. *Cancer Res* 64 (2004) 6166-6173

538. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125 (2006) 1137-1149
539. Zhu, H., Cao, X., Ali-Osman, F., Keir, S., Lo, H.W. EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocation of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. *Cancer Lett* 294 (2010) 101-110
540. Zhu, J., Siclari, V.A., Liu, F., Spatz, J.M., Chandra, A., Divieti Pajevic, P., Qin, L. Amphiregulin-EGFR signaling mediates the migration of bone marrow mesenchymal progenitors toward PTH-stimulated osteoblasts and osteocytes. *PLoS One* 7 (2012) e50099

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kultivierungsmedien, Liganden, Enzyme und Chemikalien	54
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien und Test-Kits.....	55
Tabelle 3:	Geräte und Zubehör.....	56
Tabelle 4:	Inhalt des modifizierten DMEM-Nährmediums	58
Tabelle 5:	Sensitivität der ELISA-Kits für die vier EGFR-Liganden.....	61
Tabelle 6:	Stamm- und Gebrauchslösung von Cetuximab, Erbitux™	62
Tabelle 7:	Konzentration des Liganden TGF α	65
Tabelle 8:	Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4).....	72
Tabelle 9:	Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4).....	75
Tabelle 10:	Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie PiCa (n = 4).....	78
Tabelle 11:	Konzentration der Liganden TGF α , EREG und AREG und deren Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie FaDu (n = 4).....	81
Tabelle 12:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im 2D-Kulturmodell (n = 21).....	85
Tabelle 13:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zu den mit Cetuximab behandelten Zellen im 2D-Kulturmodell (n = 21)	85

Anhang

Tabelle 14:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Liganden-Gabe im 2D-Kulturmodell (n = 21).....	85
Tabelle 15:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im 2D-Kulturmodell (n = 21)	86
Tabelle 16:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zu den mit Cetuximab behandelten Zellen im 2D-Kulturmodell (n = 21)	87
Tabelle 17:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Liganden-Gabe im 2D-Kulturmodell (n = 21).....	87
Tabelle 18:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und des Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 2D-Kulturmodell (n = 21)	89
Tabelle 19:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im 3D-Kulturmodell (n = 20)	90
Tabelle 20:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zu den mit Cetuximab behandelten Zellen im 3D-Kulturmodell (n = 20)	91
Tabelle 21:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Liganden-Gabe im 3D-Kulturmodell (n = 20).....	91
Tabelle 22:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im 3D-Kulturmodell (n = 20)	92
Tabelle 23:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zu den mit Cetuximab behandelten Zellen im 3D-Kulturmodell (n = 20)	93
Tabelle 24:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Liganden-Gabe im 3D-Kulturmodell (n = 20).....	93
Tabelle 25:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und des Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 3D-Kulturmodell (n = 20)	95
Tabelle 26:	Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell	97

Tabelle 27: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell.....	99
---	----

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des EGFR nach [Burgess <i>et al.</i> 2003, Lemmon <i>et al.</i> 2014]	19
Abbildung 2: Mechanismus der Liganden-induzierten Dimerisierung der extrazellulären Domäne des EGFR nach [Li <i>et al.</i> 2005].....	21
Abbildung 3: Mechanismus der allosterischen Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne nach [Jura <i>et al.</i> 2009].....	23
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Liganden-induzierten Signaltransduktionswege eines aktivierten EGFR-Homodimers nach [Jones <i>et al.</i> 2014, Reuter <i>et al.</i> 2007, Singh <i>et al.</i> 2005].....	26
Abbildung 5: Struktureller Aufbau der EGFR- Liganden nach [Adrain <i>et al.</i> 2014, Schneider <i>et al.</i> 2009].....	37
Abbildung 6: Hemmung der Liganden-induzierten Dimerisierung des EGFR durch Cetuximab nach [Li <i>et al.</i> 2005]	48
Abbildung 7: Studienübersicht.....	57
Abbildung 8: Übersicht 2D-Studiendesign	64
Abbildung 9: Schema des 2D-Versuches mit Ligand TGF α und Cetuximab für eine Passage einer Zelllinie.....	66
Abbildung 10: Übersicht 3D-Studiendesign	68
Abbildung 11: Schema des 3D-Versuches mit Ligand TGF α und Cetuximab für eine Passage einer Zelllinie.....	69
Abbildung 12: Konzentration des Liganden TGF α und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4).....	73
Abbildung 13: Konzentration des Liganden Epiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4).....	73
Abbildung 14: Konzentration des Liganden Amphiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 2D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4).....	74
Abbildung 15: Konzentration des Liganden TGF α und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4).....	76

Anhang

Abbildung 16: Konzentration des Liganden Epiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4)	76
Abbildung 17: Konzentration des Liganden Amphiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen im 3D-Kulturmodell für die Zelllinien PiCa und FaDu (n = 4)	77
Abbildung 18: Konzentration des Liganden TGF α und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie PiCa (n = 4)	79
Abbildung 19: Konzentration des Liganden Epiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie PiCa (n = 4)	79
Abbildung 20: Konzentration des Liganden Amphiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie PiCa (n = 4)	80
Abbildung 21: Konzentration des Liganden TGF α und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie FaDu (n = 4)	82
Abbildung 22: Konzentration des Liganden Epiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie FaDu (n = 4)	82
Abbildung 23: Konzentration des Liganden Amphiregulin und dessen Kombination mit Cetuximab in den Kulturüberständen des 2D- und 3D-Kulturmodells für die Zelllinie FaDu (n = 4)	83
Abbildung 24: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und die Kombination beider auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D-Kulturmodell (n = 21)	84
Abbildung 25: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und die Kombination beider auf die Vitalität der Zellen von FaDu im 2D-Kulturmodell (n = 21)	86
Abbildung 26: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 2D-Kulturmodell (n = 21)	88
Abbildung 27: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 2D-Kulturmodell (n = 21)	89
Abbildung 28: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und die Kombination beider auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 3D-Kulturmodell (n = 20)	90

Abbildung 29: Einfluss des EGFR Liganden TGF α , Cetuximab und die Kombination beider auf die Vitalität der Zellen von FaDu im 3D-Kulturmodell (n = 20) ..	92
Abbildung 30: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 3D-Kulturmodell (n = 20)	94
Abbildung 31: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa und FaDu im 3D-Kulturmodell (n = 20)	95
Abbildung 32: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell	96
Abbildung 33: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von PiCa im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell	97
Abbildung 34: Einfluss des EGFR Liganden TGF α auf die Vitalität der Zellen von FaDu im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell	98
Abbildung 35: Einfluss des EGFR Liganden TGF α in Kombination mit Cetuximab auf die Vitalität der Zellen von FaDu im 2D (n = 21)- und 3D (n = 20)-Kulturmodell	99

Danksagung

Ich bedanke mich bei der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München und ihrem ärztlichen Direktor, *Professor Dr. med. Martin Canis*, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, Materialien und finanziellen Mittel, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Vielen Dank an *Prof. Dr. med. Philipp Baumeister*, der es mir ermöglichte, im Labor für klinisch-experimentelle Onkologie zu promovieren. Er war stets am Fortgang dieser Arbeit interessiert und stand mir mit seiner Fachkenntnis zur Seite. Ich bedanke mich für das entgegengebrachte Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Bei *Dr. med. Christian Jacobi* möchte ich mich für die Betreuung während der Dissertation bedanken. Ich danke ihm für alle Anregungen und die Durchsicht des Textes. Seine motivierenden Worte haben mir geholfen den roten Faden zu spinnen.

Mein spezieller Dank gilt *Sabina Schwenk-Zieger*. Sie führte mich in die Methodiken im Labor ein, unterstützte mich unentwegt in der Durchführung der Dissertation und hatte zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich. Ohne ihres unermüdlichen Einsatzes wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich mich bei *Gabriele Hollweck* bedanken für eine angenehme Zeit im Labor in familiärer Atmosphäre.

Meinen Eltern, meiner Familie und besonders meinem Freund gilt mein Dank für die immerwährende Unterstützung und Motivation. Vielen Dank fürs Zuhören, Anspornen und Korrektur lesen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Vergleich der Stimulation und therapeutischen Inhibition des Epidermal Growth Faktor-Rezeptors (EGFR) im 2D- und 3D-Kulturmodell bei Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 30.03.2021

Barbara Holzinger