
Aus dem Max-Planck-Institut für Neurologische Forschung mit
Klaus-Joachim Zülch Laboratorien der Max-Planck-Gesellschaft und
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Leiter Translationale Genomik:
Universitätsprofessor Dr. med. R. Thomas

**Mutationsabhängige Aktivität von niedermolekularen
reversiblen und irreversiblen Inhibitoren der EGFR
Signalkaskade in NSCLC**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Cécile Reuter
aus St.Wendel

Promoviert am 15.08.2012

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Unviversitätsprofessor Dr. med. R. Thomas
2. Berichterstatter: Dr. med. B. Wollnik

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl der Auswertung des Materials so wie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form an anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



München, 22.12.2011

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch **Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Roman Thomas** von mir selbst ausgeführt worden.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
---------------------------	----------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
------------------------------	-----------

1 EINLEITUNG	1
---------------------	----------

1.1 Das Bronchialkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Histologische Subtypen	2
1.1.4 Staging und Therapieoptionen des NSCLC	2
1.2 Membranständige Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen	4
1.2.1 Struktur und Liganden der EGF- Rezeptor Familie	4
1.2.1.1 Der humane Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor	4
1.2.2 Tyrosinkinase abhängige Signalkaskaden: EGFR-Signaling	5
1.2.2.1 Die RAS-RAF-MEK Signalkaskade	7
1.2.2.2 Die PI3K-AKT-mTOR Signalkaskade	8
1.3 Krebs - Genetik und Tumorgenese	8
1.3.1 Das NSCLC (Subtyp Adenokarzinom): Molekulare Pathogenese	9
1.3.2 Aktivierende EGFR Mutationen in Lungentumoren	11
1.4 Targeted Cancer Therapie - Gezielte Krebstherapie	13
1.4.1 Reversible Tyrosinkinaseinhibitoren und aktivierende EGFR Mutationen	14
1.4.1.1 Resistenz gegenüber EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren: primär und erworben	17
1.4.2 Irreversible Tyrosinkinaseinhibitoren und die Sekundärmutation-T790M	18
1.4.3 Zielsetzung	19

2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	20
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	20
2.2	Geräte und Programme	21
2.3	Zellen	22
2.3.1	Adhärent wachsende NSCLC Zelllinien	22
2.3.2	Ba/F3 Suspensionszellen	22
2.3.3	Kultivieren und Passagieren der adhärent wachsenden Zellen	23
2.3.4	Kultivieren und Passagieren der Ba/F3 Zellen	25
2.3.5	Kryokonservierung der adhärenten und Suspensions-Zellen	25
2.4	Mycoplasmen	26
2.4.1	Mycoplasmen Test	27
2.4.2	Behandlung der Zellen bei Kontamination mit Mycoplasmen	27
2.5	Zelluläre Vitalitätsassays	27
2.5.1	Inhibitoren	27
2.5.2	Aliquotieren und Verdünnen der Inhibitoren	31
2.5.3	Adhärente Zellen: Ausplattieren der Zellen und Behandlung mit Inhibitoren	32
2.5.4	Ba/F3 Zellen: Ausplattieren der Zellen und Behandlung mit Inhibitoren	33
2.5.5	Bestimmung der Zellproliferation	35
2.5.6	Statistische Auswertung mittels der Programmiersprache „R“	36
2.6	Western Blot	37
2.6.1	Proteingewinnung	38
2.6.2	Proteinbestimmung	38
2.6.3	Immunodetektion	39
3	<u>ERGEBNISSE</u>	41
3.1	Genetisch charakterisierte NSCLC Zelllinien und ihre Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren	41
3.1.1	Aktivität von Gefitinib in EGFR-mutierten Zelllinien	41
3.1.2	Resistenz gegenüber Gefitinib in NSCLC Zelllinien	43

3.1.3	Genetisch charakterisierte NSCLC Zelllinien und ihre Sensitivität gegenüber dem irreversiblen Inhibitoren PD168393	44
3.1.4	Sensitivität von Zelllinien ohne EGFR Mutation und Zelllinien mit Sekundärmutation gegenüber RL1	46
3.1.5	Dosis versus zeitlicher Effekt	48
3.2	Ba/F3 Zellen und ihre Validität als Zelllinienmodell	49
3.3	Interexperimentelle Vergleichbarkeit der Ergebnisse	52
3.4	Aktivität einer fokussierten EGFR-Inhibitor Bibliothek in Zellulären Modellen	54
3.4.1	Zellinienscreen mit den Inhibitoren der neuen Kollektion	56
3.4.1.1	Ergebnisse der Zelltoxizitätsassays	56
3.5	Western Blot Analysen	68
4	DISKUSSION	72
4.1	Gezielte Therapie von NSCLC Tumoren	72
4.2	Zelltoxizitätsscreen mit Zelllinien aus Primärtumoren und Ba/F3 Zelle	73
4.2.1	Wirkung von Gefitinib in Zelllinien mit EGFR Mutationen und mit der Resistenzmutation T790M	73
4.2.2	Konzept des Zelltoxizitätsscreen	73
4.2.3	Differentielle Aktivität von EGFR-Inhibitoren in Ba/F3 EGFR Modellen	74
4.2.4	Untersuchung neuer ATP kompetitiver Inhibitoren mit elektrophilen Substituenten	75
4.2.5	<i>Off-Target</i> Effekte	85
4.2.6	Uneinheitliches Ansprechen aller untersuchten Inhibitoren	86
4.2.7	Ausblick	88
4.3	Schlussfolgerung	90
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	LITERATURVERZEICHNIS	96
7	CURRICULUM VITAE	105

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahre Überlebensrate
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid)
BRAF	Isoform B der Raf Proteinfamilie (engl.: rapidly growing fibrosarcoma)
Cl	Chlor
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CREB	engl.: cAMP response element-binding protein
CT	Computer Tomographie
CTG	Cell Titer Glow
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: Epidermal Growth Factor Receptor)
ErbB	Name angelehnt an ein zum Rezeptor homologes virales Onkogen (engl.: Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene)
ERK	engl.: extracellular signal-regulated kinase
F	Fluor
GNEF	Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (engl.: guanine nucleotide exchange factor)
Grb2	engl.: growth factor receptor-binding protein
Her2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (engl.: human epidermal growth factor receptor 2)
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
JAK	Janus Kinase
kDa	Kilo Dalton
MAPK	engl.: mitogen-activated protein kinase
MEK	auch MAPKK: engl.: mitogen-activated protein kinase
kinase	
mTOR	engl.: mammalian target of rapamycin
N	Stickstoff
NSCLC	Nicht Kleinzelliges Bronchialkarzinom (engl.: Non Small Cell Lung Carcinoma)
O	Sauerstoff
p90RSK	90kDa-ribosomale S6-Kinase
PBS	(engl.: phosphate buffered saline)
PFÜ	progressionsfreie Überleben
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5,-bisphosphate
PKC	Proteinkinase C
PLC-y	Phospholipase C- y
PTK	Protein Tyrosin Kinase
RAF	engl.: rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma

Ras	engl.: Rat sarcoma
RB	Retinoblastom-Protein
RCF	relative Zentrifugalbeschleunigung (engl.: relative centrifugal force)
RKI	Robert Koch Institut
RPM	Umdrehung pro Minute (engl.: rounds per minute)
RPTK	Rezeptorproteintyrosinkinase
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (engl.: Small Cell Lung Carcinoma)
Ser	Serin
SH	engl.: src-homolog
Shc	collagen domain protein
Sos	engl.: Son of Sevenless homolog protein
Src	Akronym aus cellular und sarcoma
STAT	engl.: Signal Transducers and Activator of Transcription
Thr	Threonin
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
Tyr	Thyrosin
WHO	Welt Gesundheits Organisation (engl.: World Health Organization)

1 Einleitung

1.1 Das Bronchialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Trotz aller Bemühungen in Prävention, Diagnostik und Therapie ist das primäre Bronchialkarzinom mit 1.226.100 Millionen Toten pro Jahr (18% aller Krebstodesursachen) bei beiden Geschlechtern die häufigste Krebstodesursache weltweit [42]. Die 5-Jahre Überlebensrate (5-JÜR) wird in Deutschland im Durchschnitt auf circa 15% bei Männern und circa 18% bei Frauen beziffert, wobei diese in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Diagnose und dem Stadium der Tumorerkrankung (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland) differiert. Bei Diagnosestellung befinden sich bereits zwei Drittel der Patienten wegen spät einsetzender Symptomatik in einem metastasierten Stadium. Das Bronchialkarzinom ist in Deutschland mit 40.641 Todesfällen im Jahr 2005 die vierthäufigste Todesursache insgesamt, bei Männern gar die dritthäufigste (www.destatis.de).

1.1.2 Ätiologie

Haupttrisikofaktor des Bronchialkarzinoms sind inhalative Kanzerogene durch Zigarettenrauch, diese bedingen 95% aller Bronchialkarzinome [10]. Tabakrauch enthält mindestens 100 nachweislich karzinogene Substanzen (Teer, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen, Benzpyren). Das relative Risiko an einem Bronchialkarzinom zu erkranken ist bei chronischem Konsum von 10 Zigaretten pro Tag etwa 15-fach, 30 bis 40 Jahre nach Beginn des Rauchens 60fach und auch bei langjähriger passiver Zigarettenrauchexposition um das 1,5 Fache erhöht. Weitere ursächlich kanzerogene Substanzen treten in Zusammenhang mit Berufskrankheiten in Erscheinung (Asbest, Metall- und Holzstäube, Chrom), spielen jedoch im Vergleich mit Tabakkonsum eine untergeordnete Rolle.

1.1.3 Histologische Subtypen

Die Bronchialkarzinome werden entsprechend der WHO-Klassifikation im Wesentlichen in zwei Gruppen eingeteilt: in die der kleinzelligen, undifferenzierten Lungenkarzinome (engl.: SCLC; Small Cell Lung Carcinoma) und die der nicht-kleinzelligen (engl.: NSCLC; Non Small Cell Lung Carcinoma) mit den dazugehörigen Subtypen Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und großzellige Karzinome. Diese histologische Typisierung und das Ausmaß der Tumorausbreitung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Stadium) sind wesentliche Prognoseparameter. In den letzten Jahren erlangte die histologische Einteilung zunehmende Bedeutung, da das Auftreten von therapierelevanten genetischen Veränderungen mit der Histologie assoziiert sein kann. So sind beispielsweise Mutationen im *epidermal growth factor receptor* (EGFR) in Adenokarzinomen angereichert.

1.1.4 Staging und Therapieoptionen des NSCLC

Das Staging beurteilt die Ausbreitung des Tumors im Organismus. Bei der Einteilung des NSCLC wird die internationale TNM Klassifikation angewendet:

Tabelle 1.1 TNM Klassifikation des NSCLC der UICC 7. Auflage [23]

Primärtumor (T)	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchiallavage, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor < 3 cm oder kleiner, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus bronchoskopisch frei
T2	Tumor > 3 cm und/oder Tumor mit Befall des Hauptbronchus \geq 2cm distal der Karina und/oder Tumor infiltrierte viszerale Pleura und/oder assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der gesamten Lunge
T3	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Brustwand oder Diaphragma oder

mediastinale Pleura oder Perikard oder Tumor mit Befall des Hauptbronchus weniger als $\leq 2\text{cm}$ distal der Karina (aber selbst nicht befallen) und/oder assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung der gesamten Lunge

T4 Tumor jeder Größe mit Infiltration von Mediastinum oder Herz oder großen Gefäße oder Trachea oder Ösophagus oder Wirbelkörpern oder Karina oder maligner Pleura- oder Perikarderguss oder Satellitenherde im gleichen Lungenlappen

Regionäre Lymphknoten (N)

NX Keine Aussage über Befall möglich

N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1 Metastasen in ipsilateralen peribronchialen Lymphknoten u/o in ipsilateralen Hilumlymphknoten

N2 Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten

N3 Metastasen in kontralateralen mediastinalen Lymphknoten, kontralateralen Hilumlymphknoten, ipsi- oder kontralateralen Skalenus-Lymphknoten oder supraklavikulären Lymphknoten

Fernmetastasen (M)

MX Keine Aussage über Fernmetastasen möglich

M0 Kein Nachweis von Fernmetastasen

Tumorherde in einem anderen Lungenlappen ipsilateral

M1 Tumorherde in einem anderen Lungenlappen kontralateral
Fernmetastasen

Die aus der TNM Klassifikation resultierende Stadieneinteilung ist insbesondere bei der Vorbereitung des Patienten auf Operation oder Strahlentherapie mit kurativem Ansatz entscheidend, da Therapie und Prognose streng Stadien abhängig sind. Bei primär nicht kurativ behandelbaren Patienten kommen Chemotherapeutika, Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) sowie humanisierte Antikörper zum Einsatz.

1.2 Membranständige Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen

1.2.1 Struktur und Liganden der EGF- Rezeptor Familie

1.2.1.1 Der humane Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Rund 2% aller Gene kodieren für Kinasen, welche alle eine einheitliche Reaktion katalysieren, den Transfer von gamma-Phosphatgruppen - meist des Donors ATP - auf die Hydroxyl-(OH)-gruppe der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin [40]. Eine Untergruppe der Tyrosinkinase bildet die ErbB Familie mit ihren vier verschiedenen Rezeptoren: EGFR (HER1/ErbB1), HER2 (Neu, ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) [78]. EGFR ist aus der ErbB Familie der am besten untersuchte Rezeptor und ein Prototyp klassischer RTKs [62],[25, 30] [14],[8].

Das *EGFR* Gen befindet sich auf Chromosom 7p12. Insgesamt kodieren 28 Exons für EGFR, es umfasst circa 190.000 Basen [66]. Es kommt in epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben vor [41, 87].

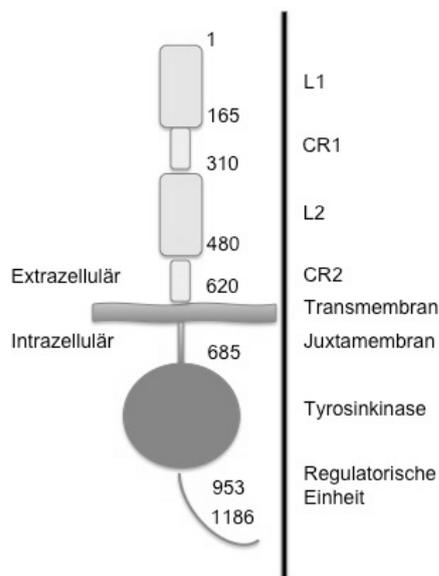


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau des EGF Rezeptors

In der schematischen Darstellung des Rezeptors erkennt man vier extrazelluläre Bereiche (L1, CR1, L2, CR2), eine Transmembran- und Juxtamembranregion sowie die intrazellulär liegende Tyrosinkinaseeinheit [verändert nach Burgess et al., 2003].

EGFR besitzt eine extrazelluläre Region bestehend aus 621 Aminosäuren, mehreren Oligosaccharidketten und zwei cysteinreichen Sequenzen, zwischen denen sich die Ligandenbindungsstelle befindet (Abbildung 1.1). Die transmembrane Domäne ist aus 23 kurzkettigen, hydrophoben Aminosäuren aufgebaut. Die cytoplasmatische Domäne mit 542 Aminosäuren wird unterteilt in

juxtamembrane Region (zwischen transmembran und Tyrosinkinase Region) und Tyrosinkinase-Domäne, an die ein carboxyterminales Ende gebunden ist [46]. Die Tyrosinkinasedomäne umspannt etwa 300 Reste und besteht aus einem N terminalen „Lobe“ mit 5 Beta Faltblättern und einer alpha Helix, während die C terminale Domäne hauptsächlich alpha helikale Bestandteile hat. ATP sowie Tyrosinkinaseinhibitoren werden zwischen diesen beiden „Lobes“ gebunden [37].

Aktiviert werden die Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen bis auf Her2 durch die temporäre Bindung ihrer für sie spezifischen, sie aktivierenden und regulierenden Liganden. Diese Bindung leitet den Übergang zweier Monomere hin zu Homo- oder Heterodimerisierung. Die Dimerisierung erfolgt durch Rezeptor-Rezeptor Interaktionen. Somit sind Liganden nicht direkt an dieser Interaktion beteiligt. Diese hervorgerufene Konformationsänderung bewirkt die Aktivierung der intrinsischen Kinasedomäne unter Verwendung von ATP. Bis auf ErbB3, welcher nur durch andere EGF Rezeptoren phosphoryliert wird, findet eine Autophosphorylierung der intrazellulär im carboxyterminalen Bereich gelegenen Phosphorylierungsstellen, die Tyrosinreste, statt, von denen bisher sechs (Tyr 992, Tyr 1045, Tyr 1068, Tyr 1086, Tyr1148, Tyr1173) identifiziert sind [15, 36].

1.2.2 Tyrosinkinasen-abhängige Signalkaskaden: EGFR-Signaling

Tyrosinkinasen sind für die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen verantwortlich, woraus folgt, dass ihre genaue Regulierung entscheidend für die physiologische Steuerung eukaryotischer Zellen ist.

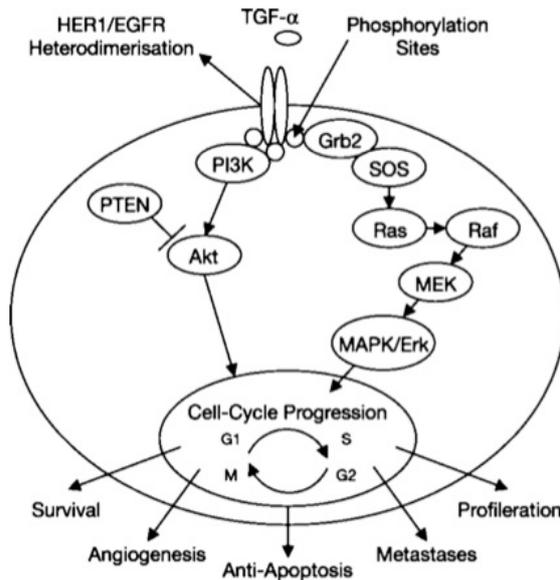


Abbildung 1.2

Schematische Darstellung der EGFR-Signalkaskade [32]

Das Binden von entsprechenden Wachstumsfaktoren an EGFR hier TGF- α bewirkt die Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren der EGFR Familie und über die anschließende Phosphorylierung von Signalmolekülen eine Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Die zwei wichtigsten Kaskaden PI3K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK sind vereinfacht schematisch dargestellt. Sie fördern Zellzyklus Progression und begünstigen im Falle einer unphysiologischen Steigerung fünf der sechs „Hallmarks of Cancer“.

Wie bereits erläutert, wird über die Bindung der Wachstumsfaktoren eine Dimerisierung mit Aktivierung der Tyrosinkinase durch Autophosphorylierung der Tyrosinreste eingeleitet. Diese Phosphotyrosine dienen intrazellulären, SH₂ tragenden Signalproteinen (SH = src-homolog; Src ist eine lösliche, im Zytoplasma lokalisierte Tyrosinkinase) als Andockstelle [18, 74]. Durch die Phosphorylierung werden verschiedene Adapter Moleküle (Src, Shc, Grb2, Crk, Sos) aktiviert, die mit Hilfe biochemischer Reaktionen das Phosphorylierungssignal durch eine Kette von Molekülen zwischen Plasmamembran und Zellkern übermitteln. Wichtige Signalmoleküle sind die PLC- γ (Phospholipase C-gamma), das G-Protein RAS und die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) (siehe Abbildung 1.3) [12]. Eine Gegenregulation im physiologischen EGFR Signalweg wird über negatives Feedback geregelt. Rezeptoraktivität bewirkt verminderte zelluläre Produktion von Liganden (z.B. EGF), Dephosphorylierung durch Phosphatasen, erhöhte Rezeptor Internalisierung/Endozytose und negative Rückkopplung durch aktiviertes ERK und AKT [33]. Unter bestimmten Voraussetzungen, wie sie in maligne veränderten Zellen zu finden sind, bilden sich Dimere auch ohne zuvor durch die entsprechenden Liganden aktiviert worden zu sein [95].

Für den Prozess der intrazellulären Signalweiterleitung steht eine

Vielzahl an intrazellulären Kaskaden bereit. EGFR aktiviert zwei Hauptsignalkaskaden (siehe Abbildung 1.3): Die RAS-RAF-MEK Kaskade und die PI3K-AKT-mTOR (*mammalian target of rapamycin*) Kaskade. Diese verschiedenen Signaltransduktionswege beeinflussen sich gegenseitig [80]. Dieser sogenannte „Crosstalk“ ist wichtig, um die Information von verschiedenen extrazellulären Signalen zu einer Zellantwort zu verarbeiten. Sie sollten auf Grund ihrer Vielzahl an Interaktionen nicht streng unabhängig voneinander betrachtet werden.

1.2.2.1 Die RAS-RAF-MEK Signalkaskade

Diese Signalkaskade ist ein nächster Schritt in der Signaltransduktion ausgehend von EGFR (Abbildung 1.3). Sie moduliert zelluläre Prozesse wie Gentranskription, G1/S Zellzyklusprogression und Zellproliferation. Die RAS Familie besteht aus drei Onkogenen (*H-ras*, *K-ras* und *N-ras*) und gehört zu den am häufigsten vertretenen aktivierten Onkogenen (häufig Punktmutationen). Sie kodieren für ein an der Innenseite der Plasmamembran gelegenes Protein mit GTPase Aktivität, welches in der inaktiven GDP- und der aktiven GTP-gebundenen Form existiert. Physiologisch entsteht durch die Bindung von RAS an SOS (engl.: *Son of sevenless*) oder einen anderen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GNEF.: *guanine nucleotide exchange factor*) die Bildung des aktiven, GTP-gebundenen RAS. Durch diese Bindung erfolgt eine Konformationsänderung mit anschließender Dissoziation von GDP und Bildung von GTP. Physiologischerweise werden RAS Proteine auch über die EGFR-Signalkaskade aktiviert. In beiden Fällen stimuliert aktiviertes, GTP-gebundenes RAS die RAF-MEK-MAPK Kaskade über die Serin/Threonin-Kinase (Ser/Thr-Kinase) RAF (auch MAPKKK; engl.: *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), die dann über weitere Ser/Thr-Kinasen wie MEK (auch MAPKK; engl.: *mitogen-activated protein kinase kinase*) und MAPK (engl.: *mitogen-activated protein kinase*; auch ERK; engl.: *extracellular signal-regulated kinase*) das Phosphorylierungssignal in den Zellkern leitet und Transkriptionsfaktoren aktiviert [39]. Die Aktivierung der RAF-MEK-MAPK Signalkaskade begünstigt folglich Transkription und Translation mit sich anschließender Proliferation, Differenzierung und Wachstum der Zellen.

1.2.2.2 Die PI3K-AKT-mTOR Signalkaskade

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol ($\text{PIP}_2 \rightarrow \text{PIP}_3$) sowie weitere verwandte Substrate. Das Enzym besteht als Heterodimer aus einer regulatorischen und katalytischen Einheit. Wie oben bereits erläutert, erfolgt die Phosphorylierung der an der zytoplasmatischen Domäne von EGFR lokalisierten Phosphotyrosin durch die Bindung durch eine SH2-haltige Domäne in der regulatorischen Untereinheit von PI3K. Das am besten erforschte Substrat von PI3K ist eine zelluläre Ser/Thr-Kinase AKT (Abbildung 1.3). AKT ist ein wichtiger Knotenpunkt zweier elementarer Signalkaskaden, einen Apoptose-inhibierenden und Proliferations-aktivierenden Signalweg. Somit ist AKT entscheidend für die Kontrolle des Gleichgewichts von Proliferation und Apoptose [39]. Der AKT Downstream-Effektor mTOR (engl.: *mammalian target of rapamycin*), eine weitere Ser/Thr-Kinase, spielt als wichtiger Aktivator des Zellzyklus eine entscheidende Rolle im Gleichgewicht von Nährstoffangebot und Zellwachstum. Die PI3K/AKT-Signalkaskade ist über mTOR somit an der Kontrolle der Translation während der Proteinbiosynthese beteiligt. Eine weitere Signalweiterleitung erfolgt über den MAPK- und Proteinkinase C-Weg, welche die Kinase p90RSK (90kDa-ribosomale S6-Kinase) aktivieren, die im folgenden den Transkriptionsfaktor CREB (engl.: *cAMP response element-binding protein*) bindet und über diesen Weg zur Steigerung der Expression antiapoptotischer Proteine der BCL-2 Familie führt. So wird deutlich, dass mehrere Wege an Anti-Apoptose oder Pro-Survival Vorgängen beteiligt sind und eine genaue Regulierung entscheidend für das zelluläre Gleichgewicht ist.

1.3 Krebs - Genetik und Tumorgenese

Tumorgenese beruht auf Veränderungen in der Kontrolle und Aktivität von Genen, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren. Diese Alterationen führen zu unkontrollierter Proliferation maligner Zellen. Eingeteilt werden diese Krebs-assoziierten Gene in zwei Gruppen: Die Tumorsuppressorgene, die in physiologischem Zustand das Zellwachstum unterdrücken bzw. kontrollieren und folglich in Krebszellen supprimiert werden

können. Die andere Gruppe sind die Onkogene, die in gesunden Körperzellen das Wachstum stimulieren und in Krebszellen stärker aktiviert sind [88]. Unter allen Veränderungen scheinen somatische Alterationen des Genoms der Hauptfaktor für die Entstehung von Krebs zu sein. Bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts postulierte Boveri, dass somatische Veränderungen von Chromosomen zu Krebs führen können [9]. Dieses Konzept wurde erstmals 1960 von Nowell and Hungerford anhand des Philadelphia-Chromosoms, einer Translokation zwischen Chromosom 9 und 22, bei der CML bewiesen [61]. Bahnbrechend war die Erkenntnis, dass durch diese Translokation, eine Fusion zwischen dem *Bcr* und dem *Abl* Gen, eine Tyrosin Kinase entsteht die in diesen mutierten Zellen als Onkogen fungiert.

1.3.1 Das NSCLC (Subtyp Adenokarzinom): Molekulare Pathogenese

Die erfolgreiche Behandlung und Prävention des Bronchialkarzinoms sind nach wie vor große unerreichte Ziele. Sie wird vor allem gefördert durch ein verbessertes Verstehen des molekularen Ursprungs und der Pathogenese dieser häufigen Erkrankung. Beim NSCLC, beziehungsweise eines seiner Subtypen dem Adenokarzinom (vgl. Abschnitt 1.1.3), werden *EGFR* Mutationen bei circa 10% in den USA und der westlichen Welt sowie bei über 30% der Patienten in Asien nachgewiesen [67]. Zudem zeigt diese Untergruppe 50% Alterationen im Gen *p16* und 30% *KRAS* Mutationen. Diese aktivierten *KRAS* Mutationen kommen ausschließlich beim NSCLC vor und werden nicht gemeinsam mit *EGFR* Mutationen beobachtet [72, 85]. *KRAS* Mutationen finden sich bereits in einem frühen Stadium der Krebsentstehung vornehmlich bei Patienten mit Tabakrauch assoziierten Adenokarzinomen und noch bevor invasives Wachstum entsteht [86, 89, 90]. Sie gehen mit einer schlechten Prognose einher und sind assoziiert mit Resistenz gegenüber *EGFR*-Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und Therapieresistenz gegenüber Chemotherapeutika [22, 68]. Mutationen im *BRAF* (Isoform B der Raf Proteinfamilie; engl.: rapidly growing fibrosarcoma) Gen treten ebenfalls in einem frühen Stadium des NSCLC auf [16].

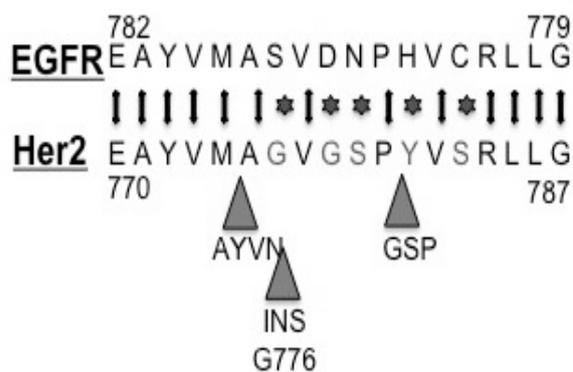


Abbildung 1.3 Sequenz des *EGFR* und *HER2* Gens mit *HER2* Mutationen [77]

Dargestellt ist eine Sequenz des *EGFR* (Aminosäure 782 bis 779) und des *HER2* (Aminosäure 770 bis 787) Gens. Der Aufbau beider Gene ist annähernd kongruent. Die wichtigsten Amplifikationen im *HER2* Gen sind durch Dreiecke gekennzeichnet.

HER2 spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese verschiedener Tumoren und wurde klinisch relevant in Zusammenhang mit durch *HER2* charakterisierte Mammakarzinome, die mit schlechter Prognose einhergehen [79]. Mutationen und Amplifikationen im *HER2* Gen sind ebenfalls bei Patienten mit NSCLC vornehmlich mit Adenokarzinomen identifiziert worden. Die Frequenz von *HER2* Mutationen beträgt 2%, die der Amplifikationen liegt ebenfalls im Bereich von ca. 2% [77]. Wie bereits beschrieben ist *Her2* ohne notwendige Ligandenaktivierung der bevorzugte Dimerisierungspartner für *EGFR*, welches durch Amplifikation im *HER2* Gen potenziert wird. *HER2* Mutationen (in-frame Insertionen in Exon 20: z.B. Insertion AYVN am Codon 776-779; Insertion G an der Position 776; Insertion GSP an 781-783) (siehe Abbildung 1.4) und *EGFR* Mutationen der Kinasedomäne (fast kongruenter Aufbau beider Tyrosinkinasedomänen, siehe Abbildung 1.4) sind gleichermaßen assoziiert mit dem weiblichem Geschlecht, Nichtraucherstatus, asiatischer Herkunft und vorliegen eines Adenokarzinoms [77]. Tumoren mit Mutationen im *HER2* Gen zeigen ein gutes Ansprechen auf eine gezielte *HER2* Therapie mit monoklonalen Antikörpern [11]. Mutationen in der Kinasedomäne des *HER3* Rezeptors konnten bei Patienten mit NSCLC nicht nachgewiesen werden [43].

1.3.2 Aktivierende EGFR Mutationen in Lungentumoren

Wie bereits erläutert reguliert die ERBB Familie unter physiologischen Bedingungen in Körperzellen eine Fülle von metabolischen Abläufen und Wachstumsprozessen. Genetische Veränderungen des *EGFR* sind folglich mit einer Vielzahl an Krebserkrankungen assoziiert. Tyrosinkinase nehmen zwei Zustandsformen an, für gewöhnlich befinden sie sich in einem „off“ Status mit minimaler Aktivität und einem durch Liganden getriggerten „on“ Status mit maximaler Aktivierung. ERBB Rezeptoren, ausgenommen ERBB3, besitzen ebenfalls diese induzierbare Kinaseaktivität, welche die Signalkaskade zu Zellproliferation und Überleben der betroffenen Zelle einleitet [4]. In Tumorzellen kann eine erhöhte intrazelluläre EGFR-Kinaseaktivität verursacht werden durch sogenannte **aktivierende Mutationen**. Sie führen zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung der Kinase. Durch dieses Ungleichgewicht im Aktivitätsstatus der Tyrosinkinase zu Gunsten des „on“-Status resultiert die Konsequenz, dass in Bezug auf mutiertes EGFR eine Onkogenabhängigkeit mit gezieltem Wachstum und Überlebensvorteil der Tumorzelle entsteht [76]. Kristallstrukturanalysen lassen vermuten, dass dieses Ungleichgewicht durch Mutationen in der *EGFR* Gensequenz entsteht, die strukturelle Veränderungen im Protein bei gleichzeitigem Funktionserhalt hervorrufen und somit fördernden Einfluss auf die Aktivität des EGFR Proteins nehmen [51]. Als weitere Erklärung wird postuliert, dass aktivierende Mutationen diese konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase durch Destabilisierung der autoinhibitorischen Konformation erreichen, die physiologisch nur bei Fehlen von Liganden vorliegt [92]. Zu den aktivierenden Mutationen zählen Deletionen im extrazellulären Bereich der EGFR Liganden Bindungsstelle, zum Beispiel die EGFRvIII-Mutation (Deletion des Exons 2 bis 7). Intrazellulär gruppieren sie sich vorwiegend in den ersten vier Exons der Kinasedomäne - Exon 18 bis 21 (siehe Abbildung 1.5) [54, 77]. Zu den häufigsten Mutationen gehören mit circa 45% *in frame* Deletionen in Exon 19. Betroffen sind häufig die Aminosäuren Leucin bis Glutamin (L747-G749). Des Weiteren finden sich häufig Punktmutationen in Exon 21 (ca. 40%), welche im Codon an Stelle 858 zu einem Austausch von Arginin gegen Leucin (L858R) führt. Diese Mutation ist mit einer Prävalenz von circa 41% die am

häufigsten vorkommende Punktmutation im *EGFR* Gen. Weitere aktivierende Punktmutationen liegen im Codon 719 und führen zu einem Austausch der Aminosäure Glycin gegen Serin, Alanin oder Cystein (G719; mit einer Prävalenz von circa 4%).

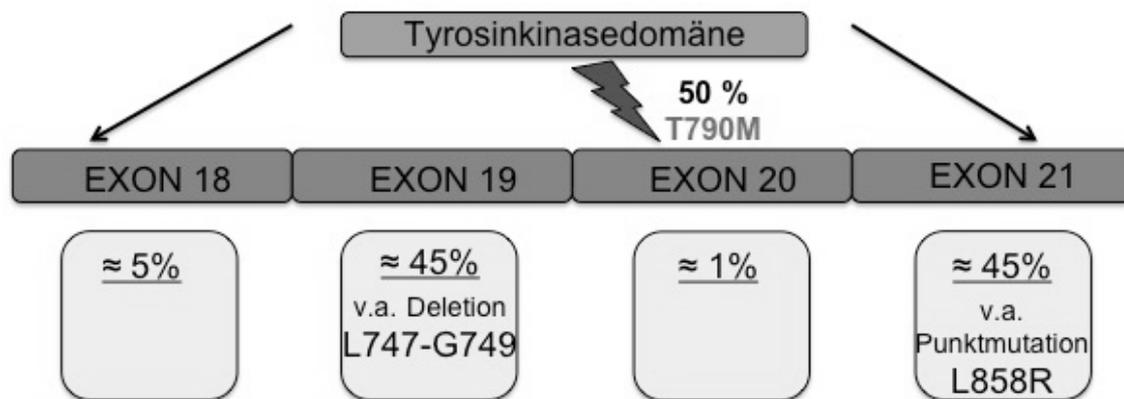


Abbildung 1.4 Überblick über die am häufigsten vorkommenden Mutationen und Deletionen in der Gensequenz von EGFR

Dargestellt sind die am häufigsten vorkommenden EGFR-Mutationen sowie solche Mutationen (T790M) die mit einer Resistenz gegenüber EGFR abhängigen Tumoren einhergehen. Die T790M Mutation wird bei über 50% der Patienten mit Nichtansprechen nach anfänglichem Therapieerfolg nachgewiesen. Von den EGFR aktivierenden Mutationen ist die Mutation L858R in Exon 21 quantitativ die häufigste [76]. Ebenfalls häufig mit 45% sind Deletionen im Bereich L747-G749 in Exon 19.

Zusammengefasst machen die Deletionen in Exon 19 inklusive der Punktmutation L858R 90% aller Veränderungen am *EGFR* Locus aus. Obwohl noch nicht alle Konsequenzen dieser aktivierenden Mutationen für die Signalkaskade verstanden sind geht man davon aus, dass durch konstitutive Aktivierung des Rezeptors vornehmlich die antiapoptotisch wirkende AKT- und STAT Kaskade angeregt wird. Eine Überexpression von *EGFR* aufgrund von Amplifizierung führt zu einer erhöhten Fähigkeit auf Liganden zu antworten mit konstant erhöhter Kinaseaktivität. Dies fördert ein unphysiologisches Überleben der betroffenen Tumorzellen [63]. EGFR Überexpression wird in 60 % aller Patienten mit metastasiertem NSCLC beobachtet und ist korreliert mit einer schlechten Prognose [31].

1.4 Targeted Cancer Therapie - Gezielte Krebstherapie

Krebs ist ein Oberbegriff für mehr als 100 verschiedene Krankheiten, die durch dysreguliertes, enthemmtes und autonomes Wachstum bestimmter Körperzellen verursacht werden. So folgt ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation kontrolliert durch zelluläre Signaltransduktion und dem programmierten Zelltod (Apoptose). Die **gezielte Krebstherapie** richtet sich gegen ein bestimmtes *target*, das aufgrund genetischer Veränderungen (Mutation, Amplifikation, Deletion) entartet ist. Eine in der Medizinalchemie häufig angewendete Möglichkeit in der gezielten Krebstherapie ist der Einsatz von Enzyminhibitoren. Entweder verhindern sie die Bindung eines Substrats am Aktiven Zentrum des mutierten Enzyms oder sie blockieren die katalytische Einheit direkt.

Diese Ausrichtung der Krebstherapie folgt im Gegensatz zu bisherigen therapeutischen Ansätzen entlang des genetischen Profils. Deutlich wird dies am Beispiel der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) und Imatinib. In vielen Fällen wird eine Translokation zwischen den Chromosom 9 (*ABL* Gen) und 22 (*BCR* Gen) nachgewiesen die zur Entstehung des Fusionsgens *BCR-ABL* führt („Philadelphia Chromosom“) [19]. Die Entwicklung von Imatinib (STI571, Gleevec®; Novartis; Basel, CH), einem niedermolekularen Tyrosinkinaseinhibitor (TKI), der spezifisch diese *BCR-ABL* Tyrosinkinase inhibiert, ist das Paradebeispiel für das neue Konzept der *Targeted Cancer* Therapie. Durch das gezielte Inhibition des deregulierten Onkogens können über 90% der Patienten in Remission gebracht werden [20]. Durch die Vielzahl nachgewiesener *EGFR* Mutationen in genetisch analysiertem Gewebe von verschiedenen Tumoren wurde auch dieser Rezeptor zum Ziel einer expandierenden Klasse von antineoplastischen Therapien im Rahmen der gezielten Krebstherapie [95]. Für die gezielte Inhibition des EGFR existieren zwei Klassen von Therapeutika: monoklonale Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs). Die monoklonalen Antikörper (mAbs) **Cetuximab** [Erbix, ImClone Systems, New York, NY] und **Panitumumab** [Vectibix, Amgen, Thousand Oaks, CA]) binden extrazellulär und blockieren die Ligandenbindung an EGFR. Bei den Tyrosinkinaseinhibitoren werden reversible

und irreversible TKIs unterschieden. Zurzeit stehen 2 reversible EGFR Tyrosinkinase Inhibitoren als Therapie zur Verfügung: **Erlotinib** [Tarceva®, Genentech, South San Francisco, CA/OSI Pharmaceuticals, Melville, NY] und **Gefitinib** [Iressa®, AstraZeneca, Wilmington, DE].

1.4.1 Reversible Tyrosinkinaseinhibitoren und aktivierende EGFR Mutationen

Der EGFR-Inhibitor **Gefitinib** neben **Erlotinib** ist ein in der palliativen Therapie des NSCLC zugelassener Wirkstoff aus der Gruppe der reversiblen Tyrosinkinaseinhibitoren.

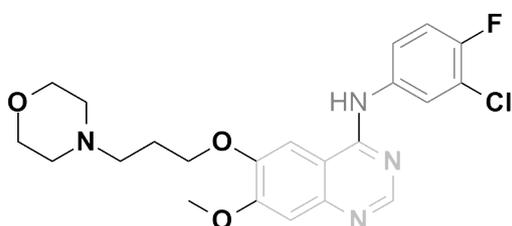


Abbildung 1.5. Gefitinib

Gefitinib besteht aus einem Chinazolin Grundgerüst (hell grau) sowie einem Anilin Ring (dunkel grau).

Reversible Inhibitoren wie Gefitinib binden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, ionischen Bindungen oder van der Waals-Kräfte an das entsprechende Enzym, im Falle von Gefitinib bevorzugt an das veränderte EGFR Protein. Die Wasserstoffbrückenbindung ist die stärkste und häufigste intermolekulare Bindung der **reversiblen** Inhibitoren, bei der ein Wasserstoffatom mit einem freien Elektronenpaar eines Nichtmetallatoms hoher Elektronegativität (N, O, F, Cl) wechselwirkt. Eine Vielzahl dieser Bindungen zwischen Inhibitor und dem aktivem Zentrum des Substrates produzieren eine starke spezifische Bindung. Gefitinib konkurriert als Chinazolin Derivat mit ATP um die Bindung der Kinasedomäne. Bei der Bindung von Gefitinib wird die aktive Form von EGFR erhalten [84], allerdings ist die Bindungsstelle für ATP damit blockiert und der Rezeptor verliert die Fähigkeit zur Autophosphorylierung und somit zur Signalweiterleitung [58]. So erreicht Gefitinib über die Inaktivierung der Kinasedomäne des EGFR Proteins einen Bruch in der unphysiologisch hoch regulierten Aktivierung der Signalkaskade im Sinne einer Unterbindung der Tumorzellproliferation.

Gefitinib zeigt eine bis zu 50-fach höhere Affinität zu mutiertem EGFR im Vergleich zu Wildtyp-EGFR was die Selektivität des Inhibitors entscheidend beeinflusst [29]. Ursächlich ist, dass mutiertes EGFR in der ständig aktivierten Form (siehe auch 1.3.2. *aktivierende Mutationen*) im Vergleich zum Wildtyp Rezeptor mit bestehender Fähigkeit zur Inaktivität bevorzugt inhibiert wird. Aktivierende Mutationen wie die meist vertretene L858R bewirken, dass die Kinase keine inaktive Konformation mehr einnehmen kann, sie ist inkompatibel mit dieser inaktiven Konformation und unabhängig von Liganden konstitutiv aktiviert.

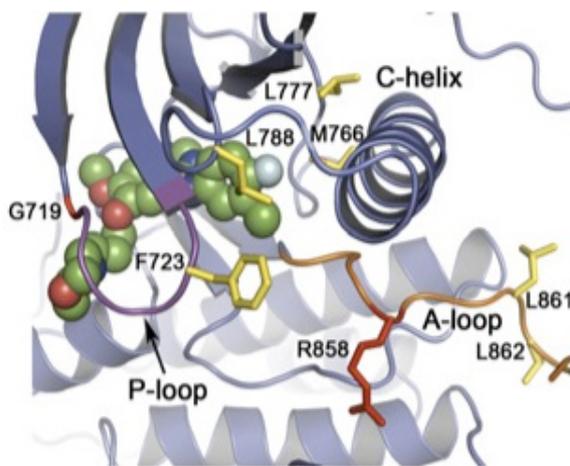


Abbildung 1.6 Kristallstruktur der mutierten permanent aktivierten EGFR-Kinase (L858R) im Komplex mit Gefitinib [92]

Die Substitution von Leucin durch Arginin destabilisiert die inaktive Konformation. Die A-Loop (orange) organisiert sich so, dass die C-Helix (blau) in die aktive Position rotiert und die hydrophoben Reste (gelbe Enden) nach außen demontiert sind. Gefitinib (grün) kann somit perfekt binden.

Abbildung 1.7 zeigt die Kristallstruktur der L858R-mutierten Form von EGFR in der Zelllinie H3255 im Komplex mit Gefitinib. Im veränderten EGFR-Protein wird die C-Helix (blaue Spirale) der „Active Site“ disloziert und nach außen gedreht. Der N-terminale Anteil des „Activation Loops“ (A-Loop) nimmt eine spiralförmige Drehung ebenfalls nach außen und fixiert somit die C-Helix in der inaktiven Position. Physiologisch befindet sich Leucin an Position 858 inmitten dieser spiralförmigen Drehung und bildet in der inaktiven Form entscheidende hydrophobe Interaktionen mit anderen Resten des N-terminalen Anteils, um diese zu stabilisieren. Durch die Substitution von Arginin (R) im mutiertem EGFR Gen mit einer deutlich größeren Seitenkette kann die durch Leucin stabilisierte inaktive Form durch den Verlust der hydrophoben Interaktionen nicht mehr realisiert werden [92]. Diese mutierten Rezeptoren sind 50fach aktiver als der Wildtyprezeptor, zudem konnte gezeigt werden, dass Gefitinib 20-fach fester an die mutierte Form bindet [92] und diese Zelllinien 10

bis 100fach sensitiver gegenüber einer Therapie mit TKIs sind als Zellen mit Wildtyp EGFR [34, 59, 65]. Somit liegt der ursächliche Grund für die bevorzugte Bindung von Gefitinib an genetisch veränderte EGF Rezeptoren darin, dass diese Mutationen den Rezeptor in einer permanent aktiven Konformation halten (Abbildung 1.7).

Da auch der Wildtyp Rezeptor die aktive Konformation einnehmen kann, ist die Bindung von Inhibitoren insbesondere in höheren Dosierungen nicht ausgeschlossen (siehe Abbildung 1.8). Im Vergleich zu mutierten Rezeptoren die permanent aktiviert sind ist die Bindung jedoch stark vermindert.

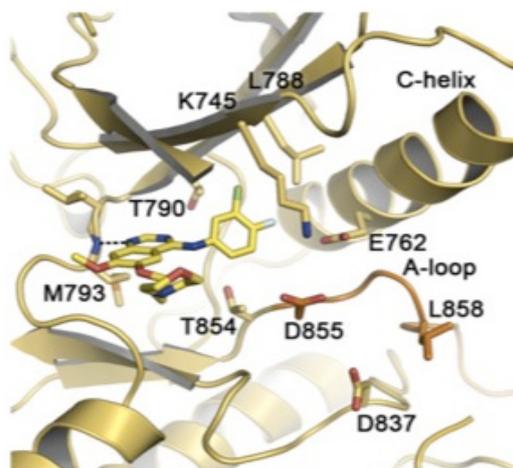


Abbildung 1.7 Kristallstruktur des EGFR Wildtypproteins im Komplex mit Gefitinib [92]

Die Abbildung zeigt, dass Gefitinib nicht ausschließlich an einen mutierten Rezeptor bindet, sondern auch an die aktive Form des Wildtypproteins. Die wichtigsten Seitengruppen (rote und blaue Markierungen) von Gefitinib sind ausgezeichnet, Kohlenstoffringe sind gelb, die Bindung verursachende Wasserstoffbrückenbindung ist durch eine gestrichelte Linie angedeutet.

Da das EGFR Wildtypgen in zahlreichen Körperzellen exprimiert ist und zudem die Bindung des Inhibitors an die aktivierte Wildtyp-Rezeptorform zwar abgeschwächt aber möglich ist (siehe Abbildung 1.8) sind so die in der Klinik für Gefitinib am häufigsten beschriebenen Nebenwirkungen (Hautausschlag, Diarrhö) zu erklären. Allerdings lassen sich diese Nebenwirkungen im Vergleich zu den konservativen Therapien als verträglicher einstufen.

Entsprechend korreliert das Ansprechen der Therapie (Responder) unter anderem mit dem Vorhandensein von EGFR Mutationen [64]. In der Klinik zeigt sich der Therapieerfolg mit EGFR TKIs demzufolge bei Patienten mit EGFR mutierten Tumoren [55, 57, 73].

1.4.1.1 Resistenz gegenüber reversiblen EGFR Tyrosinkinaseinhibitoren: primär und erworben

Als **primär resistent** bezeichnet man Patienten, die bereits initial nicht auf eine Therapie mit TKIs ansprechen, beispielsweise bei Patienten mit negativem EGFR Mutationsstatus. Die meisten NSCLC Patienten die initial vielversprechend auf eine Behandlung mit Erlotinib oder Gefitinib reagierten, zeigen im weiteren Verlauf einen Rückfall [48]. Dies bezeichnet man als **erworbene Resistenz**.

Aktivierende Mutationen können häufig einen Therapieerfolg vorhersagen, andere Sekundärmutationen, wie die T790M oder KRAS Mutationen sind mit Resistenzen gegenüber EGFR TKIs assoziiert [48, 50, 67, 68]. Daneben wurden außerdem in einem Patientenkollektiv mit erworbener Resistenz genetische und histologische Untersuchungen angestellt und als Resistenzmechanismen neben Amplifikationen im MET Onkogen und Mutation im PI3K Gen in 14% der Fälle die Transformation von NSCLC zu SCLC Tumoren beschrieben [75].

Die T790M Mutation, welche in dieser Arbeit im Fokus steht ist bei mindestens 50% aller Patienten im Rezidiv nachgewiesen worden [3, 50, 75]. Die Bindung der reversiblen Tyrosinkinaseinhibitoren wird in Zelllinien mit einer T790M Mutation dadurch erschwert, dass der Austausch durch die deutlich größere Aminosäure Methionin eine sterische Behinderung darstellt [7]. Zudem bedingt die Mutation eine Verschiebung der ATP-Affinität [93]. Bei der T790M Mutation ist die Affinität des Substrats ATP zum Rezeptor erhalten, die in Konkurrenz zu ATP bindende Affinität von Gefitinib aber gleichzeitig gesunken.

Gefitinib bildet nur eine einzige Wasserstoffbrückenbindung zu Met793 (siehe Abbildung 1.8) aus. Dadurch rückt der Anilin Substituent in die hydrophobe Tasche der ATP Bindungsstelle. Das Chlorid am Anilin Ring ist nun umgeben von Seitenketten der Aminosäuren auf Position Lys745, Leu788 und Thr790. Die Methylgruppe bildet van der Waals Kräfte zu Gly796 aus (vgl. Abbildung 1.8, gestrichelte blaue Linie). Die Dichte freier Elektronen der für die Bindung entscheidenden elektrophilen Seitenkette von Gefitinib, ist gering. Im Falle der Sekundärmutation T790M kommt es durch den Austausch von

Threonin durch das größere Methionin zu einer sterischen Behinderung der Anilin und Phenylethylamin Substituenten von Gefitinib [92]. Die Elektrophilie der Seitenkette von Gefitinib ist nicht ausreichend, um die Bindung einzugehen. Es ist keine suffiziente Therapie mehr möglich, was sich durch **erworbene Resistenz** äußert. Der Effekt für Patienten ist dramatisch. Nach ursprünglichem Ansprechen bleibt der Therapieerfolg aus.

1.4.2 Irreversible Tyrosinkinaseinhibitoren und die Sekundärmutation-T790M

Das Vorhandensein der EGFR-T790M Mutation korreliert mit einem Effektivitätsverlust unter Therapie mit reversiblen Inhibitoren. Die Bindung von reversiblen Inhibitoren ist erschwert (siehe 1.4.1.1). Das führte zu der Annahme, dass irreversible Inhibitoren, die eine einmalige kovalente Bindung eingehen können, diesen Effekt möglicherweise durchbrechen und das Wachstum dieser Zellen blockieren können. Demzufolge ist eine Strategie diese Resistenzentwicklung zu umgehen oder zu verhindern, die Entwicklung von irreversiblen Inhibitoren (z.B. BIBW2992 oder HKI-272, irreversible duale Inhibitoren der Tyrosinkinasen EGFR und HER2). Irreversible Inhibitoren reagieren aufgrund veränderter elektrophiler Seitengruppen zusätzlich zu Ionenbindungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindung) wie bei den reversiblen Inhibitoren über kovalente Bindungen (Elektronenpaarbindung, Atombindung) mit dem aktiven Zentrum des Enzyms, der Kinasedomäne.

Im Falle von EGFR wird die Konformationsänderung und somit Inaktivierung von EGFR durch reaktive elektrophile funktionelle Seitengruppen (zum Beispiel Alkene, Michael Akzeptoren und Aldehyde) der irreversiblen Inhibitoren eingeleitet, die Aminosäurenreste (Hydroxyl (R-OH)- oder Sulfhydrylgruppen (R-SH)) der Aminosäuren Cystein, Threonin oder Tyrosin) in Schlüsselpositionen von EGFR modifizieren. Die elektrophilen Seitengruppen der irreversiblen Inhibitoren können durch die Ausbildung einer kovalente Bindung am Cystein 773 (einmaliges Alkylieren eines einzigen Cystein Rests (Cys773)–innerhalb der ATP Bindungsstelle) des EGFR permanent an die Kinase binden und somit trotz der sterischen Behinderung die Kinase hemmen [28] [95].

So ist zwar das Target, die ATP Bindungsstelle des mutierten EGFR, beider Inhibitorclassen (reversibel und irreversibel) gleich, die Angriffsorte an den Aminosäuren - einmalig kovalent durch elektrophile funktionelle Gruppen bei den irreversiblen Inhibitoren oder nicht kovalent durch beispielsweise Wasserstoffbrückenbindung bei den reversiblen Inhibitoren – bei gleichem Grundgerüst allein aufgrund unterschiedlicher elektrophiler Gruppen unterschiedlich und gestattet am identischen onkogenen Target EGFR mehrere Ansatzpunkte.

Diese elektrophilen Seitengruppen, welche die Bindungsmodalitäten (reversibel versus irreversibel) entscheiden sollten demzufolge In Kooperation mit dem Chemical Genomics Center der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund für diese Arbeit in den Fokus gerückt werden um das Problem der erworbenen Resistenz verursacht durch die T790M Mutation zu adressieren.

1.4.3 Zielsetzung

Die gezielte Behandlung von Bronchialkarzinompatienten mit niedermolekularen Inhibitoren zielt darauf ab, tumorspezifische Zielmoleküle auszuschalten und somit das Überleben der Patienten zu verlängern. Die unter der Therapie zu erwartenden Resistenzen führen früher oder später zu einem Therapieversagen. Somit ist für eine erfolgreiche Therapie solcher Patienten die Entwicklung von Substanzen, die diese Resistenzen überwinden essentiell. Irreversible EGFR Inhibitoren stellen eine Weiterentwicklung von reversiblen EGFR-Inhibitoren dar und könnten dazu beitragen die erworbenen Resistenzen zu umgehen [13, 91]. In dieser Arbeit wird die Wirkungsweise von irreversiblen Inhibitoren in unterschiedlichen zellulären Modellen, insbesondere im Vergleich zu den korrespondierenden reversiblen Inhibitoren untersucht. Dadurch soll ein besseres Verständnis über die Aktivität dieser Inhibitoren gewonnen werden, und eine biologische Grundlage für die klinische Anwendung solcher Inhibitoren geschaffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Aceton	
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aqua dest (RNase/DNase frei)	Invitrogen, Karlsruhe
Beta-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BSA	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
Cell Lysis Buffer	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DMEM Flüssigmedium	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Entwickler G153	Agfa HealthCare, München
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Fixierer G354	Agfa HealthCare, München
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher, Karlsruhe
RPMI 1640 Flüssigmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Dodecylsulphat Pellets (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tris Base	Roth, Karlsruhe
0,05% Trypsin EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München

Blotting Papier	Whatman, Dassel
Falcon-Reaktionsgefäß (15/50ml)	Corning, Wiesbaden
Parafilm	VWR, Langenfeld
Pipetten (5/10/25ml)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
PVDF Transfer-Membran	GE Healthcare, München
Reaktionsgefäße 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Tris Glycin Gele 4-12%	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturdishes (6/10cm)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25/75cm ²)	Greiner, Frickenhausen
Zellscraper	BD Biosciences, Heidelberg
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher, Karlsruhe
Cell Titer GloCell Viability Assay	Promega, Heidelberg
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit“	CAMBREX

2.2 Geräte und Programme

Avanti J-26 XP Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Beckman Coulter Z2	Beckman Coulter, Krefeld
Blot Modul X-Cell II	Invitrogen, Karlsruhe
Curix 60 Entwickler	Agfa Health Care, München
Eppendorf Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Filmkassette	Kodak, Stuttgart
Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
Invertmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen
Laborabzug Mithras LB94	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Multidrop Combi	Thermo Fisher, Karlsruhe
Novex Mini-Cell Gelkammer	Invitrogen, Karlsruhe
Orbital Shaker	Forma Scientific, San Bruno, USA
Vortexer Genius 3	Ika, Staufen

2.3 Zellen

Für die Experimente wurden Suspensions- sowie adhären wachsende Zelllinien verwendet.

2.3.1 Adhären wachsende NSCLC Zelllinien

Die verwendeten adhären wachsenden Zelllinien (siehe Tabelle 2.1) sind aus Tumormaterial von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom isoliert worden.

Tabelle 2.1 Überblick über die wichtigsten Charakteristika der verwendeten NSCLC Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Histologie	TNM Stage ₁	Alter	Geschlecht ₂	Raucher ₃
A549	ATCC	CA, nicht spezifiziert	N.A.	58	M	N.A.
H1650	ATCC	Adenokarzinom, Bronchioalveoläres CA	IIIB	27	M	10py
H1781	ATCC	Adenokarzinom, Bronchioalveoläres CA	IIIB	66	F	60py
H1819	ATCC	Adenokarzinom	N.A.	55	F	80py
H1975	ATCC	Adenokarzinom	N.A.	N.A.	F	N.A.
H3255	N.A.	Adenokarzinom	IIIB	47	N.A.	N.A.
H820	ATCC	Papilläres Adenokarzinom	N.A.	53	M	N.A.
HCC293	ATCC	Adenokarzinom	N.A.	39	M	N.A.
HCC400	ATCC	Adenokarzinom	N.A.	<50	M	N.A.
HCC827	ATCC	Adenokarzinom	N.A.	39	F	N.A.
PC9	N.A.	Adenokarzinom	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

(1) N.A. = Nicht bekannt

(2) M = Maskulin; F = Feminin

(3) py = Packungen/Jahr

2.3.2 Ba/F3 Suspensionszellen

Die verwendeten Ba/F3 Zellen (siehe Tabelle 2.3) sind ursprünglich Interleukin (IL)-3 abhängig wachsende murine Pro-B-Zelllinien, die aus peripherem Blut entnommen wurden. Durch das Überexprimieren eines

Onkogens wie beispielsweise mutiertem EGFR, wird eine IL-3 Unabhängigkeit erreicht und das Überleben der Zellen hängt nunmehr von der Aktivität des genetisch eingebrachten Onkogens ab. Morphologisch handelt es sich um runde Suspensionszellen, die meist vereinzelt und in hoher Zelldichte wachsen, aber auch in Zellgruppen vorkommen.

Tabelle 2.2 Übersicht über Ba/F3 Zelllinien mit Mutationsstatus und der am häufigsten nachgewiesenen Tumorentität [64]

Zelllinie	Tumor-gewebe	Lokalisation	Mutation	Sek. mutation ^{1,2}
EGFR R108K	Glioblastom	Extrazellulär	R108	-
EGFR A289V	Glioblastom	Extrazellulär	A289V	-
EGFR VIII	Glioblastom	Extrazellulär	Deletion Exons 2-7	-
EGFR Y764D	Glioblastom	KD	Y764D	-
EGFR del1	NSCLC	KD	Deletion 745-749	-
EGFR del2	NSCLC	KD	Deletion 752-759	-
EGFR del3	NSCLC	KD	Deletion 746-748	-
EGFR del5	NSCLC	KD	E745V+Deletion 746-752	-
EGFR del1 + T790M	NSCLC	KD	Deletion 745-749	+
EGFR del2 + T790M	NSCLC	KD	Deletion 752-759	+
EGFR del3 + T790M	NSCLC	KD	Deletion 746-748	+
EGFR del4 + T790M	NSCLC	KD	Deletion 745-751	+
EGFR del5 + T790M	NSCLC	KD	E745V+Deletion 746-752	+
EGFR L858R + Her2 WT	NSCLC	KD	L858R	+
	NSCLC	-	-	-

(1) - = Nicht bekannt; (2) + = Mutation oder Amplifikation; KD = Kinasedomäne

2.3.3 Kultivieren und Passagieren der adhärent wachsenden Zellen

Alle Arbeitsschritte, die nachfolgend beschrieben werden, wurden in einer vor Beginn desinfizierten Sicherheitswerkbank der Stufe 2 mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde ausschließlich mit nur einer Zelllinie unter der Werkbank gearbeitet und nach Abschluss der Arbeiten erneut desinfiziert. Alle Zelllinien wurden in einer Kulturflasche mit einer Oberfläche von 75cm² in einem Gesamtvolumen von 12ml RPMI 1640 Flüssigmedium kultiviert. Diesem Medium wurde zur Inaktivierung des Komplementsystems standardmäßig 10 Vol-% fetales

Kälberserum und ein Vol-% Penicillin/Streptomycin (10.000Units/ml Penicillin G, 10.000µg/ml Streptomycin Sulfat) zugesetzt. Des weitern enthielt dieses Zellkulturmedium ein Hydrogencarbonat-Puffersystem basierend auf einer Lösung aus Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen. Zur Kontrolle der Zellproliferation diente neben der Begutachtung unter einem Invertmikroskop das im Medium enthaltene Phenolrot als Farbindikator für den PH-Wert. Je höher die Stoffwechselleistung der kultivierten Zellen und somit das ansäuern des Mediums, desto stärker ist der Farbumschlag von rot nach gelb. Um für alle Experimente standardisierte Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Zelllinien entsprechend ihrer spezifischen Proliferationsrate alle 3-5 Tage passagiert. Nach Erreichen einer 70-90 % Konfluenz wurden die 12 ml Medium der adhärent wachsenden Zellen mit einer Pipette abgenommen, um die Zellen direkt im Anschluss mit 3 ml kaltem 1 x PBS (Phosphate-Buffered-Saline) - Puffer (10X PBS-Buffer, PSA, Pasching) zu waschen. Durch diesen Vorgang wurde das im Serum enthaltene α 1-Antitrypsin inhibiert. Nach dem unmittelbaren Entfernen des Puffers wurden die Zellen mit 2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA Lösung für wenige Minuten inkubiert. Zur Antagonisierung des Trypsins wurde das Medium auf ein Gesamtvolumen von 12 ml mit Medium aufgefüllt.

Mit dem Ziel, zu Beginn eines Experimentes für jede zu testenden Zelllinien eine möglichst einheitliche Zelldichte und vergleichbare Proliferationsbedingungen zu erreichen, wurde während der Kultivierung der Zellen entsprechend deren Proliferationsrate und Dauer zum nächsten Experiment eine entsprechende Menge an Zellen entnommen, in eine neue Kulturflasche überführt und separat in Kultur gebracht. Dieser Teil wurde übereinstimmend mit dem Maximalvolumen der Kulturflasche mit Medium aufgefüllt und im Inkubator gelagert, so dass für diese Zelllinie am Tag des geplanten Experimentes erneut die gewünschte Konfluenz gewährleistet werden konnte.

Um das Ansprechen einer Zelllinie gegenüber bestimmter Inhibitoren zu testen, wurde ein kleiner Teil der eigens in Kultur gebrachten Zellsuspension in Falcons überführt. Aus diesen Falcons (Sarstedt, Nümbrecht) wurden 200µl in

4,8 ml isotone Flüssigkeit überführt und die Zellzahl am Zellzähler bestimmt. Nach Erhalt der gemessenen Zellzahl wurde berechnet, welches Volumen der Zellsuspension benötigt wird, um ausreichend Zellen ausplattieren zu können. Die für das Experiment nicht benötigte Zellsuspension wurde erneut passagiert und in Kultur genommen.

2.3.4 Kultivieren und Passagieren der Ba/F3 Zellen

Die 12 ml Suspensionszellen wurden nach Kontrolle auf Vitalität und Konfluenz unter dem Invertmikroskop und unter Berücksichtigung des Indikatorfarbumschlages in ein Falcon überführt und bei 400 RCF für 5-6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 12ml frisches Medium aufgenommen, erneut der Zellkultur zugeführt und entsprechend der jeweiligen Proliferationsrate von 2-3 Tagen nach Erfahrungswerten gesplittet oder für ein vorgesehenes Experiment wie oben unter 2.3.3 beschrieben vorbereitet.

2.3.5 Kryokonservierung der adhärennten und Suspensionszellen

Um den Zellkulturerhalt insbesondere noch während des Zustandes einer niedrigen Passagenzahl zu sichern, wurden permanent Zellen konserviert. Nach mikroskopischer Kontrolle auf Vitalität und Erreichen einer 80-100% Konfluenz, wurden die adhärennten Zellen erst mit PBS gewaschen, anschließend mit Hilfe von Trypsin vom Flaschenboden gelöst, erneut in neues Medium aufgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Die Suspensionszellen wurden direkt aus der Kulturflasche in ein Falcon überführt. Diese wurden dann bei 24°C (definierte Raumtemperatur) bei 400 RCF für 5 min zentrifugiert.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese in ein Medium überführt, das sich aus 9 Teilen Medium und einem Teil FCS/Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) zusammensetzt. Sowohl für Suspensions- und adhärennt wachsende Zellen wurde nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes das entstandene Zellpellet in 1-2 ml Medium, bestehend aus Standardmedium mit 10Vol-% DMSO, resuspendiert und auf 2 ml Kryotubes (Nunc, Wiesbaden) verteilt. Zum kontinuierlichen und langsamen Einfrieren der Zellen wurde eine Einfrierhilfe

verwendet, die über Nacht bei -80°C gelagert wurde, um sie am Folgetag in den Flüssigstickstofftank (-196°C) zu überführen.

Für eine Versuchsreihe wurden die benötigten Aliquots aus dem Stickstofftank entnommen, in einem 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und im Anschluss umgehend in ein Falcon überführt. Auf die 2 ml Zellsuspension wurde dann mindestens 15 ml warmes Medium zugetropft. Da DMSO zum Einfrieren der Zellen erforderlich war, unter Normalbedingungen in dieser Konzentration aber zytotoxisch ist, mussten alle Arbeitsschritte zügig geschehen, sodass das DMSO noch vor der endgültigen Entfernung zumindest verdünnt wurde. Um das Medium endgültig frei von DMSO zu halten, wurden die Zellen bei RT (Raumtemperatur) und 200 RCF für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das DMSO angereicherte Medium über dem entstandenen Pellet abgenommen und die Zellen in frisches Medium zu überführt.

2.4 Mycoplasmen

Mycoplasmen können als chronische Infektion den Metabolismus der Zellen beeinflussen und die Ergebnisse der Experimente verfälschen. Da sie lichtmikroskopisch oder visuell - wie beispielsweise über einen augenfälligen pH-Umschlag - nicht zu erkennen sind, wurden alle Zellen regelmäßig getestet. Der verwendete Mycoplasmen-Test *MycoAlert* (siehe Abschnitt 2.4.1) macht sich die Fähigkeit bestimmter mycoplasmatischer Enzyme zu Nutze, mit dem *MycoAlert* Substrateagenz unter Bildung von ATP zu reagieren. Diese Reaktion kann luminometrisch nachgewiesen werden. Dabei verhält sich die Intensität des emittierten Lichts proportional zur ATP-Konzentration. Das Verhältnis der ATP-Konzentration vor und nach Zugabe des *MycoAlert* Substrateagenzes ist ein Indikator für das Vorhandensein bzw. das Fehlen von Mycoplasmen. Wurde während der zweiten Messung ein stärkeres Signal gemessen, spricht ein höherer ATP Gehalt nachgewiesen, wurde eine positive Korrelation zu einer Kontamination mit Mycoplasmen hergestellt.

2.4.1 Mycoplasmen Test

Die Zellen wurden drei Tage lang ohne Antibiotika Zugabe kultiviert. Die Zellsuspension wurde dann für fünf Minuten bei 20°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein Falcon überführt. *MycoAlert* Reagenz (A) und Substrat (B) wurden gemäß der Anleitung des Herstellers mit *MycoAlert* Puffer verdünnt und bei Raumtemperatur äquilibriert. 100µL Probe des zu testenden Zellüberstandes wurden in eine 96-Loch-Platte gegeben, mit 100µL *MycoAlert* Reagenz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun erfolgte die erste Lumineszenzmessung. Im Anschluss wurden 100µL *MycoAlert* Substrat zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gemessen. War die Intensität der zweiten Messung kleiner, als die der ersten, konnten die Zellen als frei von Mycoplasmen bewertet werden. Im umgekehrten Fall lag eine Kontamination vor. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung.

2.4.2 Behandlung der Zellen bei Kontamination mit Mycoplasmen

Bei Kontamination einer Zellkultur mit Mycoplasmen, wurde die Kultur entsorgt oder alternativ mit Minocyclin (BM-Cyclin I und II; Antibiotika-Kombination für die Eliminierung von Mycoplasmen) und ohne Zusatz von Penicillin/Streptomycin mindestens drei Wochen behandelt. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Zellen erneut getestet und bei einem negativen Testergebnis wieder in Kultur genommen.

2.5 Zelluläre Vitalitätsassays

Die genetisch charakterisierten Tumorzelllinien wurden mit Hilfe eines Pertubierungsscreens auf ihr individuelles Ansprechen gegenüber spezifischen Inhibitoren getestet.

2.5.1 Inhibitoren

Die verwendete Inhibitorenkollektion besteht aus sechs reversiblen (RL6, RL7, RL45, RL49, RL50, Gefitinib) und sieben irreversiblen (RL1 (PD168393),

RL2, RL3, RL10, RL11, RL13, RL14) Inhibitoren mit mutiertem EGFR als Zielstruktur [82]. Sie wurden als Chinolin oder in Anlehnung an Gefitinib als 4-Amino-Chinazolin Derivate in Zusammenarbeit mit dem Chemical Genomics Center des Max Planck Instituts in Dortmund synthetisiert [83].

In Tabelle 3.4 sind die Inhibitoren und deren Eigenschaften aufgeführt. Das Grundgerüst der Inhibitoren ist stets kongruent und wurde entweder mit einem Chinolin (siehe Abbildung 2.2) oder einem 4-Amino-Chinazolin (siehe Abbildung 2.1) Derivat in Anlehnung an Gefitinib synthetisiert (Abbildung 1.6). Ziel der Entwicklung dieser Kollektion war es, Inhibitoren zu erhalten, denen ausschließlich über ihre verschiedenen elektrophilen Substituenten unterschiedliche Bindungseigenschaften zukommen. Auf diese Weise war es möglich, den Einfluss jeder einzelnen Modifikation isoliert bewerten zu können. Dies ermöglicht Interpretationen zu Spezifität (keine bzw. Fähigkeit der Bindung des Moleküls an andere Proteine) und Potenz (hohe Dissoziationskonstante) der verschiedenen elektrophilen Substituenten bezogen auf spezifische EGFR Mutationen. In Abbildung 2.1 und 2.2 sind die verwendeten Grundgerüste dargestellt.

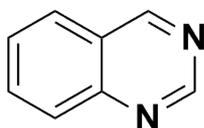


Abbildung 2.1
Chinazolinring

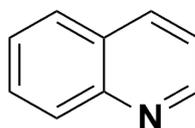


Abbildung 2.2
Chinolinring

Innerhalb der Kollektion gibt es korrespondierende reversible und irreversible Inhibitorpärchen, die sich nur anhand einer veränderten Doppelbindung innerhalb der elektrophilen Seitengruppe unterscheiden: RL1 (irreversibel) und RL6 (reversibel) (siehe Abbildung 2.3 und 2.4).

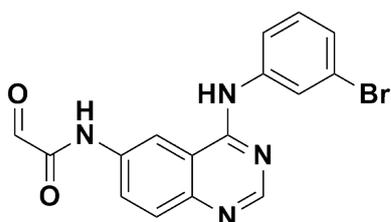
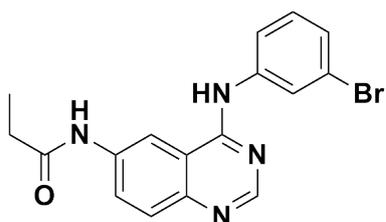


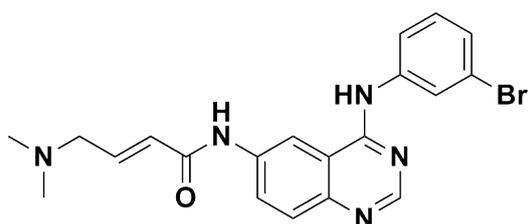
Abbildung 2.3 **RL1**

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des irreversiblen Inhibitors RL1 (PD168393). Der Inhibitor RL1 besteht aus einem Chinazolin Grundgerüst sowie einem Anillin Ring. Die reaktive elektrophile Seitengruppe ist different zu der von Gefitinib, nicht starr und fähig zu rotieren. Sie reagiert mit einem Cystein in Position 797 der ATP Bindestelle. Durch diese Bindung wird RL1 im Vergleich zu Gefitinib zu einem irreversiblen Inhibitor.

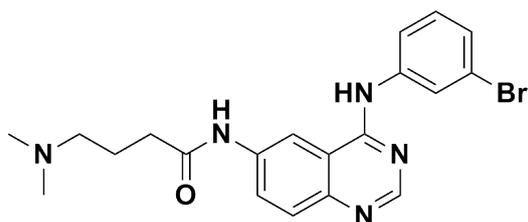
**Abbildung 2.4 RL6**

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des reversiblen Inhibitors RL6, der sich nur an Hand einer Doppelbindung innerhalb der elektrophilen Seitenruppe von RL1 unterscheidet.

Ein weiteres Inhibitorpärchen bilden die Inhibitoren RL3 (irreversibel) und RL7 (reversibel), die sich ebenfalls nur anhand einer Doppelbindung innerhalb der elektrophilen Seitengruppe unterscheiden (vergleiche Abbildung 2.5 und 2.6).

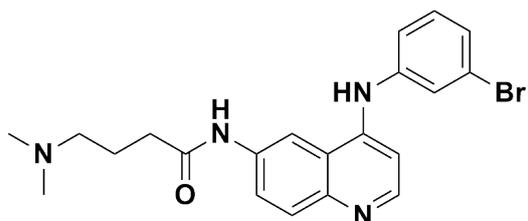
**Abbildung 2.5 RL3**

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des irreversiblen Inhibitors RL3.

**Abbildung 2.6 RL7**

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des reversiblen Inhibitors RL7, der sich bis auf eine Doppelbindung innerhalb der elektrophilen Seitengruppe nicht von RL3 unterscheidet.

Das nächste Inhibitorpaar bilden erneut RL7 (siehe Abbildung 2.6) und RL50 (siehe Abbildung 2.7), beide reversibel. Sie differieren aufgrund des verwendeten Grundgerüst, bei RL7 wurde in Übereinstimmung zu Gefitinib ein Chinazolin Grundgerüst verwendet (siehe Abbildung 1.6 und 2.1), bei RL50 hingegen ein Chinolin Grundgerüst (siehe Abbildung 2.2).

**Abbildung 2.7 RL50**

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des reversiblen Inhibitors RL50.

Zusätzlich wurden weitere TKIs in die Kollektion aufgenommen, die reversiblen Inhibitoren RL45, RL49 und RL51 (Abbildung 2.8, 2.9 und 2.10). RL45 besitzt kongruent zu Gefitinib ein Chinazolin Grundgerüst, RL49 und RL51 ein Chinolin Grundgerüst wie es bereits bei RL50 Verwendung fand.

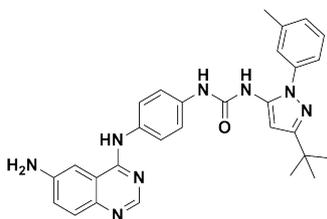


Abbildung 2.8 RL45

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des reversiblen Inhibitors RL45 mit Chinazolin Grundgerüst.

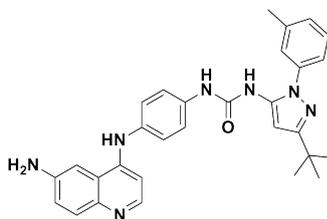


Abbildung 2.9 RL49

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des reversiblen Inhibitors RL49 mit Chinolin Grundgerüst.

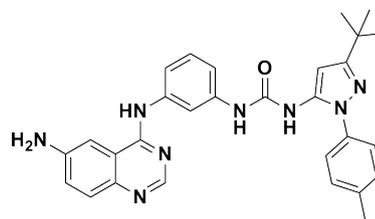


Abbildung 2.10 RL51

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des reversiblen Inhibitors RL51 mit Chinolin Grundgerüst.

Als Ergänzung zu RL1 und RL3 wurden die irreversiblen Inhibitoren RL2, RL10, RL11, RL13 sowie RL14 synthetisiert und in die Experimente mit aufgenommen.

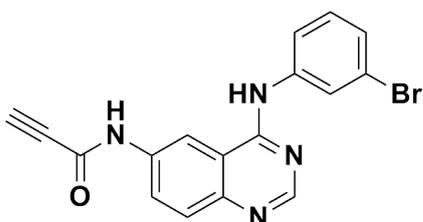


Abbildung 2.11 RL2

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des irreversiblen Inhibitors RL2 mit Chinazolin Grundgerüst.

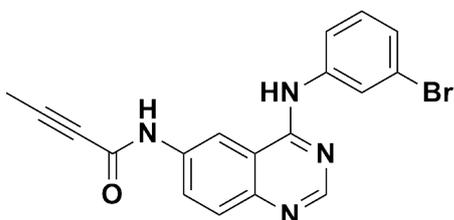
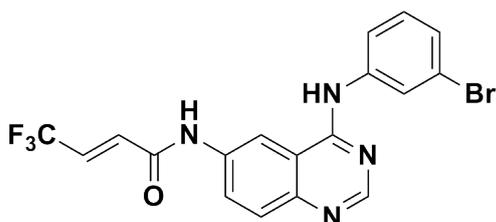
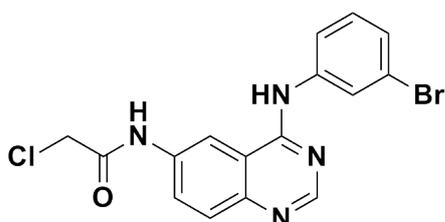


Abbildung 2.12 RL10

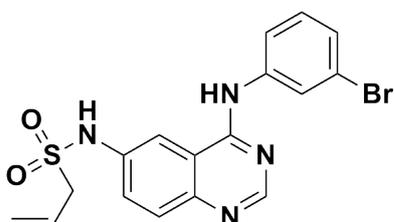
Die Abbildung zeigt die Strukturformel des irreversiblen Inhibitors RL10 mit Chinazolin Grundgerüst.

**Abbildung 2.13** RL11

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des irreversiblen Inhibitors RL11 mit Chinazolin Grundgerüst.

**Abbildung 2.14** RL13

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des irreversiblen Inhibitors RL13 mit Chinazolin Grundgerüst.

**Abbildung 2.15** RL14

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des irreversiblen Inhibitors RL14 mit Chinazolin Grundgerüst.

2.5.2 Aliquotieren und Verdünnungen der Inhibitoren

Alle verwendeten Inhibitoren, die nicht in einer Stocklösung gelöst waren, lagen in Pulverform vor und wurden entsprechend ihres Molekulargewichtes in dem jeweiligen Lösungsmitteln aufgenommen, mit der Maßgabe für alle Inhibitoren eine einheitliche 20mM Stocklösungen herzustellen. In aliquotierter Form wurden die gelösten Inhibitoren bei -80°C gelagert. Für alle Experimente waren serielle Verdünnungen in folgender Konzentration erforderlich: 100µM, 30µM, 10µM, 3µM, 1µM, 0,3µM, 0,1µM, 0,03µM, 0,01µM. Diese Verdünnungen wurden mit Standardmedium angefertigt, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten. Mit dem Ziel standardisierte Bedingungen zu gewährleisten, musste der DMSO Gehalt von maximal 1Vol-% in allen Konzentrationen und dem Kontrollansatz (Nullwert; keine Zugabe von Inhibitoren) angepasst werden.

2.5.3 Adhärenente Zellen: Ausplattieren der Zellen und Behandlung mit Inhibitoren

Ziel dieses Experimentes war es, die Vitalität der Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen zu erfassen. Als Methode wurde ein Screening-Verfahren für adhärenente und Suspensionszellen etabliert, Zu Beginn des Experiments wurden die Zelllinien in 96 Loch Mikrotiterplatten (Costar, white bottom) ausgesät (siehe Abbildung 2.16). Die Fläche pro Well betrug $0,32 - 0,6 \text{ cm}^2$. Um einheitlich die gleiche Zellzahl pro Well zu erhalten, wurde wie oben beschrieben die Zellzahl vorab mit einem Zellzähler (Coulter Counter) gemessen. Entsprechend der Berechnung wurde eine Zellsuspension hergestellt und pro Well 1500 der adhärenenten Zellen ausgesät. Das Aussäen erfolgte in Einzelfällen mit einer 12-Kanal Pipette und standardmäßig mit einer 8 Kanal Peristaltikpumpe mit einem Variationskoeffizienten von $< 10\%$ bei $0,5\mu\text{l}$. Pro Well wurden $90\mu\text{l}$ überführt ($16,7 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$), um nach Zugabe der Inhibitoren ($10\mu\text{l}$) ein Gesamtvolumen von $100\mu\text{l}/\text{well}$ zu erhalten. Zwischen jedem Vorgang wurde zum Zweck einer einheitlichen Zellpopulation pro Platte das verwendete Schlauchsystem der Peristaltikpumpe mit EtOH und destilliertem Wasser gespült.

Die adhärenenten Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert, um am Plattenboden anzuwachsen. Je $10\mu\text{l}$ der gelösten und verdünnten Inhibitoren wurden aus einer Masterpatte mit einer 12-Kanal Pipette zu den $90\mu\text{l}$ Zellsuspension zugegeben. Da die Inhibitoren durch diesen Arbeitsschritt im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden, lag die Konzentration der Verdünnungsreihe zunächst um eine 10er Potenz höher als die gewünschten Endkonzentrationen von $0,001\mu\text{M}$ bis $10\mu\text{M}$. Die Zellen wurden danach drei Tage bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Pro Zelllinie und Konzentration wurden drei Replikate angefertigt.

100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100 µl M
90µl ZS	0 µM	0,001 µM	0,003 µM	0,01 µM	0,03 µM	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM	10 µM	90µl ZS	
90µl ZS	0 µM	0,001 µM	0,003 µM	0,01 µM	0,03 µM	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM	10 µM	90µl ZS	
90µl ZS	0 µM	0,001 µM	0,003 µM	0,01 µM	0,03 µM	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM	10 µM	90µl ZS	
90µl ZS	0 µM	0,001 µM	0,003 µM	0,01 µM	0,03 µM	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM	10 µM	90µl ZS	
90µl ZS	0 µM	0,001 µM	0,003 µM	0,01 µM	0,03 µM	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM	10 µM	90µl ZS	
90µl ZS	0 µM	0,001 µM	0,003 µM	0,01 µM	0,03 µM	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM	10 µM	90µl ZS	
100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100µl M	100 µl M

Abbildung 2.16 Plattenlayout des Pertubierungsscreens im 96 Well Format

- 1) hell grau = 90 µl Zellsuspension plus 10µl des Inhibitor 1 mit jeweils 3 Replikate
 - (2) dunkel grau = 90 µl Zellsuspension plus 10µl des Inhibitor 2 mit jeweils 3 Replikate
 - (3) ZS = Zellsuspension ohne Inhibitor Zugabe
 - (4) M = Standardmedium ohne Zellen
- Alle Wells wurden zusätzlich im Zuge der Auswertung mit 100µl *Cell Titer Glow* versetzt.

2.5.4 Ba/F3 Zellen: Ausplattieren der Zellen und Behandlung mit Inhibitoren

Um Angaben aus der Literatur zu validieren [94], die für Experimente in 96er Mikrotiterplatten eine Anzahl von 10.000 Ba/F3 Zellen/Well vorgeben, wurde in der Etablierungsphase mit Ba/F3 Zellen die optimale Zellzahl für die Zelllinien ermittelt. Dazu wurde eine serielle Verdünnung im Spektrum 2000 – 20000 Zellen pro Well angefertigt. Die Zellzahlverdünnungsreihe wurde in Falcons angesetzt und in die entsprechenden Wells der 96er Mikrotiterplatte überführt. Die unbehandelten Zellen wurden inkubiert, nach 72 Stunden mit 100µl CTG pro Well versetzt und die Zellviabilität bestimmt. Beispielhaft ist in Abbildung 2.2 ein repräsentatives Experiment mit der Zelllinie BA/F3 Her2 Wildtyp gezeigt.

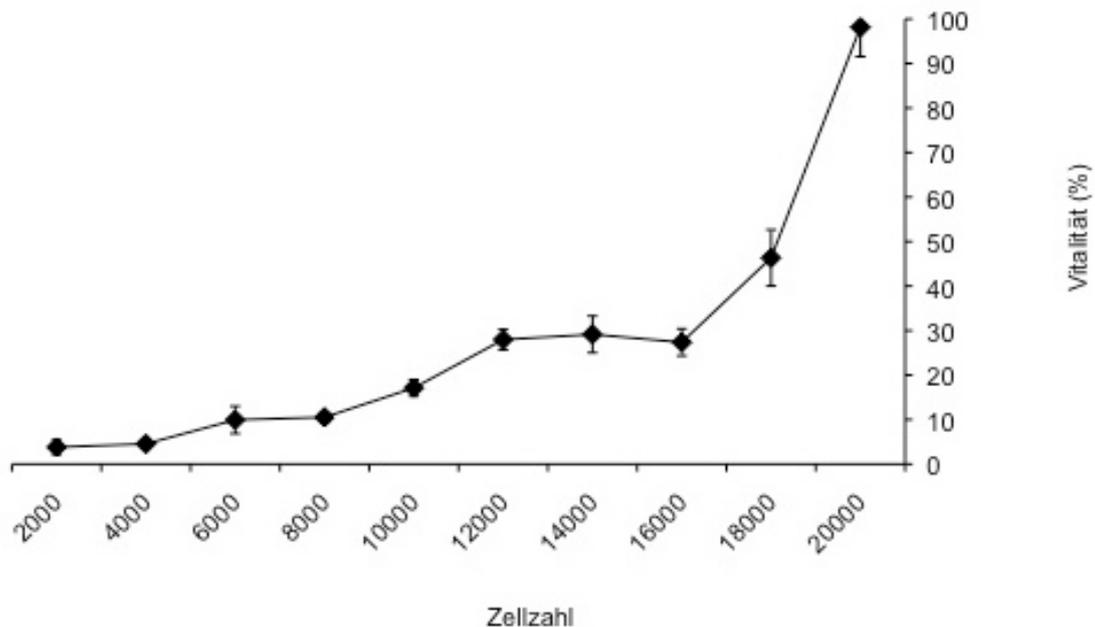


Abbildung 2.17 Zellzahloptimierungsexperiment für die Ba/F3 Zelllinien

Repräsentativ für alle weiteren Ba/F3 Zelllinien wird für die Zelllinie Ba/F3 Zelllinie Her2 Wildtyp die Zellzahl für nachfolgende Inhibitorscreens optimiert. Dargestellt sind auf der Abszisse die Konzentrationsschritte von 2000 bis 20000 Zellen und auf der Ordinate die Vitalität in %. Die mittels CTG maximal gemessene ATP Gehalt wurde mit 100% Viabilität definiert. Die optimale Zellzahl wurde im Beginn des aufsteigenden Kurvenverlaufs gefunden.

Abbildung 2.17 zeigt, dass eine Zellzahl vor Erreichen des Konvexbogens (Kurvenverlauf nach oben offen), im Falle der Ba/F3 Zelllinie mit 8000 Zellen, eine für die nachfolgenden Experimente sinnvolle Zelldichte ist, da in diesem Bereich die ungehemmte Zellproliferation noch nachweislich gewährleistet ist und ein potentieller Vitalitätsverlust nach Behandlung auf die Potenz des Inhibitors zurück geführt werden kann.

Die Zellen wurden mikroskopisch kontrolliert, in ein Falcon überführt und bei 400 RCF bei RT 5 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 12 ml Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und entsprechend der Ergebnisse aus dem Zellzahletablierungsexperiment in einer Dimension von 8000 bis 12000 Zellen in 90µl pro Well ausgesät. Direkt nach dem Ausplattieren wurde mit der Zugabe der Inhibitoren begonnen, die wie für die adhärenen Zellen ebenfalls aus der

Masterplatte in den Endkonzentrationen von 0,001 μ M bis 10 μ M in die Wells zugegeben wurden.

In der Planung musste berücksichtigt werden, dass die benötigte Zellzahl im Vergleich zu den adhärenen Zelllinien um bis zu einem Faktor 10 höher lag und man pro Platte annähernd eine Million Zellen für ein Vitalitätsassay benötigte.

Die Zellen wurden drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und dann ausgelesen.

2.5.5 Bestimmung der Zellproliferation

Nach 96 Stunden Inkubation für die adhärenen und 72 Stunden für die Suspensionszellen erfolgte die Zugabe von 100 μ l *Cell Titer Glo* (1:5 PBS) pro Well und das anschließende Auslesen der Lumineszenz (Berthold Reader, Mithras LB940). Der *Cell Titer Glo* Assay bestimmt die Zahl lebender Zellen in einer Kultur anhand der Quantifizierung des vorhandenen ATP, welches als universelle Form verfügbarer Energie ein Indikator für metabolisch aktive Zellen ist. Die Stärke des dabei emittierten Lumineszenz Signals korreliert direkt mit der Viabilität der Zellen. In jedes Well wurden 100 μ l *Cell Titer Glo* Reagenz (1:5 mit 1 x PBS verdünnt) zugegeben. Die Platten wurden anschließend bei Raumtemperatur für mindestens 15 Minuten und höchstens 4 Stunden lichtgeschützt inkubiert.

Die Inhibitorkonzentration bei dem die Zellproliferation um 50% gehemmt wird entspricht dem GI₅₀ Wert (halb-maximale inhibitorische Konzentrationen), der wie folgt berechnet wird:

- Subtraktion des „Background-Wertes“. Dieser Wert entspricht den Wells, die nur Medium und *Cell Titer Glo* Reagenz ohne Zellen enthalten.
- Bestimmung der prozentualen Inhibierung der Zellproliferation: Dabei wurde das Signal der Wells, die nur Zellen und DMSO enthielten gemessen. Diese Informationen liefern dann eine Kurve mit der Inhibitorkonzentration auf der Abszisse und der prozentualen Vitalität der Zellen auf der Ordinate.

Um den genauen GI₅₀ Wert zu bestimmen wurde eine nicht-lineare

Regressionsanalyse durchgeführt, die mittels der Programmiersprache „R“ automatisiert wurde [27].

2.5.6 Statistische Auswertung mittels der Programmiersprache „R“

Um die Daten aus dem Zellscreen exakt analysieren und mit statistischen Tests validieren zu können, wurde die frei verfügbare Software der Programmiersprache „R“ verwendet sowie ein Programm („*ic50*“), verfügbar im zentralen Archiv „CRAN“, welches eigens für die Auswertung konzipiert wurde [27], um damit eine lineare Regressionsanalyse mit den erhaltenen Rohdaten der Vitalitätsassays durchzuführen.

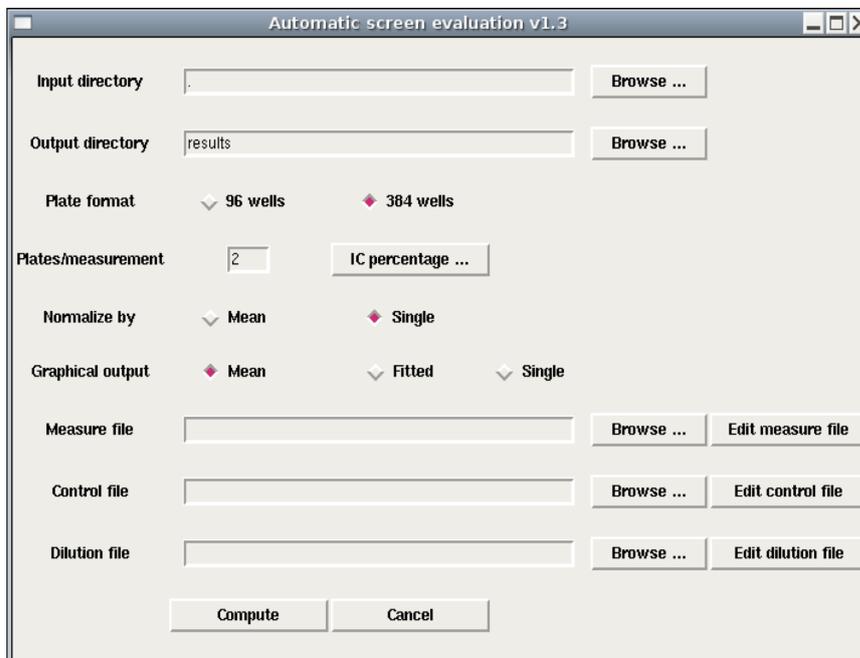


Abbildung 2.18
Hauptfenster des
Programms
„*ic50*“

Im Hauptfenster des Programms *ic50* lassen sich alle benötigten Einstellungen zur Auswertung der Rohdateien treffen.

Nachdem die benötigten Einstellungen getroffen wurden, konnte mit der Evaluierung der Daten begonnen werden. Die erhaltenen Kurven zeigen im PDF Format neben einem 95% Konfidenzintervall für die ermittelten GI_{50} 's die Standardabweichung der einzelnen Datenpunkte sowie den Variationskoeffizienten für die Replikate an. Da der GI_{50} Wert im Regelfall zwischen zwei Konzentrationsschritten liegt, handelt es sich im Allgemeinen nicht um einen ermittelten sondern einen mittels nicht linearer Regressionsanalyse geschätzten Wert. Um Aussagen über die Präzision der Schätzung der IC_{50} Werte treffen zu können, wurde zuvor ein Konfidenzniveau

(Wahrscheinlichkeit) von 5% festgelegt, in der sich die wahre Lage des geschätzten Parameters befindet. Im Gegensatz zur ebenfalls angewendeten Punktschätzung (als Beispiel: Mittelwert, Varianz, Standardabweichung) kann man im Konfidenzintervall durch das zuvor festgelegte Vertrauensniveau, hier 5%, eine Signifikanz ablesen, was für die Ergebnisse unbedingt erwünscht war. Alle GI_{50} Werte sollten innerhalb eines schmalen Konfidenzintervalls liegen und der tatsächliche Wert sich mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 5 % innerhalb dieses Vertrauensintervalls befinden.

2.6 Western Blot

Um die Ergebnisse der Vitalitätsassays zu validieren wurden Western Blots angefertigt. Für die Proteingewinnung aus den Zellen wurde zunächst die Zellkultur um die für das Experiment vorgesehenen Zelllinien erweitert. Am Tag 1 wurden die adhärennten Zelllinien trypsinisiert, resuspendiert und ein Gesamtvolumen von 8ml in 10cm Zellkulturschalen überführt. Das Verhältnis aus Medium und Zellsuspension setzte sich nach Erfahrungswerten der jeweiligen Proliferationsraten der einzelnen Zelllinien zusammen mit dem Ziel nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ eine Konfluenz der adhärennten Zellen von ca. 70% zu erreichen. Am zweiten Tag wurde das Medium ausgetauscht und gegen Medium ohne FCS, Penicillin und Streptomycin ersetzt. Durch den Wachstumsfaktorentzug wurde nach isolierter Zugabe von EGF zu einem späteren Zeitpunkt ein für die Western Blots vorteilhaftes stärkeres Signal erwartet. Am dritten Tag wurde der entsprechende Inhibitor in den zu den Vitalitätsassays kongruenten Konzentrationsschritten zugegeben bzw. der entsprechende Prozentsatz an DMSO ohne Inhibitor als Negativkontrolle. Nach 2,5 Stunden wurden die Zellen mit 50ng/ml EGF erneut eine halbe Stunde weiter inkubiert. Anschließend wurden die Proben aufgearbeitet und daraus Lysate hergestellt.

2.6.1 Proteingewinnung

Nach Entfernung des Mediums wurden die adhärennten Zellen zunächst zweimal mit etwa 3-4ml eiskaltem 1xPBS gewaschen und nach Zugabe von 200µl Lysepuffer pro Petrischale mit Zellschabern abgesammelt. Während der 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Eppendorftubes in regelmäßigen Abständen gevortext. Im Anschluss wurden die Lösungen bei 14.000 RCF und 2°C 20-30Min abzentrifugiert, bis der Überstand klar war. Dieser Überstand mit den nun aufgereinigten Proteinen wurde nach Durchführung der Proteinbestimmung bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das gebildete Pellet aus zellulären Trümmern wurde verworfen.

2.6.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der gewonnenen Lösungen wurde zunächst eine Protein-Standardreihe mit BSA (bovine serum albumine) und gegebenem Proteingehalt als Referenz angelegt. In Lysepuffer verdünnt wurden die folgenden Konzentrationen vorgelegt:

2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0mg/ml (reiner Lysepuffer).

Um den Proteingehalt der Proben zu quantifizieren, wurde das *BCA Protein Assay Kit* verwendet. Dieses nutzt die in alkalischem Medium stattfindende Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen durch vorhandene Proteine und geht mit der Entwicklung einer blauen Farbe einher (Biuret-Reaktion). Im zweiten Reaktionsschritt führt dann die Chelatbildung des Kupfer-Ions mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid; BCA) zur Entwicklung einer violetten Färbung deren Intensität von der vorhandenen Proteinmenge linear abhängig ist. Entsprechend der Händlerangaben wurden zur Herstellung der reaktionsbereiten Arbeitslösung zwei Reagenzien, Substanz A und B, im Verhältnis 50(A):1(B) gründlich gemischt. Für jede Probe der Standardreihe und für jede zu ermittelnde Proteinprobe wurde in eine 96well Platte (clear bottom) 250µl BCA Reagenz vorgelegt und mit 5µl der Lysate oder BSA Lösung vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Proben bei 570nm gemessen. Die Messwerte der BSA-Standardreihe wurden dann gegen die

Proteinkonzentration aufgetragen und die Proteinmenge der Proben daran abgelesen.

2.6.3 Immunodetektion

Um die Proteine detektieren zu können, wurde eine für alle Proben konstante Proteinmenge von ca. 60-80µg in einem Volumenverhältnis von 1:5 mit Laemmli-Puffer gemischt, 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und Tris-Glycin Gele (Novex 4-12%, 1,5mm, 10well) mit den Lösungen beladen. Entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte dann eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bei 120 Volt. Als Molekulargewichtsmarker wurden Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards (12µl) verwendet. Im Anschluss erfolgte der Proteintransfer von den Gelen auf die PVDF-Membranen.

Die PVDF-Membranen wurden zunächst mit Methanol befeuchtet und fünf Minuten in 1x Blotting Puffer äquilibriert und im Anschluss der Proteintransfer von den Gelen auf die Membran bei 200mA für mindestens zwei Stunden mit der X-Cell II Blot Modul angefertigt. Anschließend wurden freien Bindungsstellen auf der Membran durch einstündiges Inkubieren (in Blocking Puffer) bei Raumtemperatur geblockt, um sie im Anschluss mit dem in Blocking Puffer verdünnten primären Antikörper bei 4°C über Nacht zu inkubieren.

Folgende Antikörper wurden für die Westernblots in 4%TBST-Milch gelöst und in Verdünnungen von 1:250 bis 1:3000 verwendet:

Antikörper	Hersteller
anti-mouse (HRP konj.)	Millipore, Schwalbach
anti-rabbit (HRP konj.)	Millipore, Schwalbach
AKT	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
phospho-AKT (Ser473)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
EGFR	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
phospho-EGFR (Tyr1068)	Biosource, Solingen

Am Folgetag wurden die Membranen für je 15 Minuten 3 mal in 1xTBST gewaschen und im Anschluss mit dem in Blocking Puffer verdünnten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Abschluss wurden die 3 Waschschrirte wiederholt und die Detektion des Signals unter Verwendung des ECL Western Blotting Detection Reagents durchgeführt.

Zusammensetzung der Puffer:

Lysepuffer:

- 1ml 10x Cell Lysis Buffer
- 9ml Aqua dest
- 200µl Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III
- 5µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 200mM in Ethanol
- 1 Tablette Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail

5x Laemmlipuffer:

- 6,8ml Aqua dest
- 2ml 0,5M Tris pH 6,8
- 3,2ml Glycerol
- 1,6ml 20% SDS
- 0,8ml β-Mercaptoethanol
- 1,6ml 1% Bromphenolblau

1x SDS Laufpuffer: 192mM Glycin, 25mM Tris, 0,1% SDS in Aqua dest

10x Blotting Puffer: 192mM Glycin, 25mM Tris in Aqua dest

1x Blotting Puffer: 10x Puffer verdünnt und Zusatz von 20% Methanol

10x TBS: 175,2g NaCl, 24,2g Tris auf 2l Aqua dest, pH 7,9

1x TBST: 1x TBS mit Zusatz von 0,05% Tween 20

Blocking Puffer: 1x TBST mit 4% Milchpulver

3 Ergebnisse

3.1 Genetisch charakterisierte NSCLC Zelllinien und ihre Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren

3.1.1 Aktivität von Gefitinib in EGFR-mutierten Zelllinien

Die Aktivität von EGFR Inhibitoren ist abhängig vom Mutationsstatus der Tumorzellen und entscheidet somit über den klinischen Erfolg der Therapie mit reversiblen Inhibitoren wie Gefitinib [64]. Diese Beziehung sollte am Zelllinienmodell mit NSCLC Zelllinien mit bekanntem Mutationsstatus an denen am häufigsten nachgewiesenen Mutationen verifiziert werden [82]. Hierzu wurde der niedermolekulare reversible Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib mit einem 4-aminochinazolin Grundgerüst verwendet.

Zunächst wurden sechs Zelllinien mit aktivierenden EGFR Mutationen (H3255, H1650, HCC2935, HCC4006, HCC827, PC9), zwei Zelllinien mit der Sekundärmutation T790M (H1975 und H820) sowie eine Zelllinie mit einer KRAS Mutation und Wildtyp-EGFR (A549), untersucht (siehe Tabelle 3.1). Dazu wurden die Zellen entsprechend des zellulären Vitalitätsassays (siehe Methoden Teil) in aufsteigenden Konzentrationsschritten mit Gefitinib behandelt.

Tabelle 3.1 Mutationsstatus der verwendeten NSCLC Zelllinien^{1,2}

Zelllinie	EGFR Mutation	EGFR Sekundärmutation	KRAS Mutation
A549	–	–	G12S
H1650	E746-750	–	–
H1975	L858R	T790M	–
H3255	L858R	–	–
H820	E746-750	T790M	–
HCC2935	E746-750	–	–
HCC4006	E747-749	–	–
HCC827	E746-750	–	–
PC9	E746-750	–	–

(1) - = Nicht bekannt;

(2) + = Mutation

Das Ansprechen der Zelllinien auf eine Behandlung mit Inhibitoren wurde mittels des Zellviabilität-Assays (siehe Abschnitt 2.4.4) gemessen und die GI_{50} -Werte berechnet (siehe Abschnitt 2.4.6). Der GI_{50} Wert entspricht der mittleren inhibitorischen Konzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50% erreicht wurde (FDA, www.fda.gov).

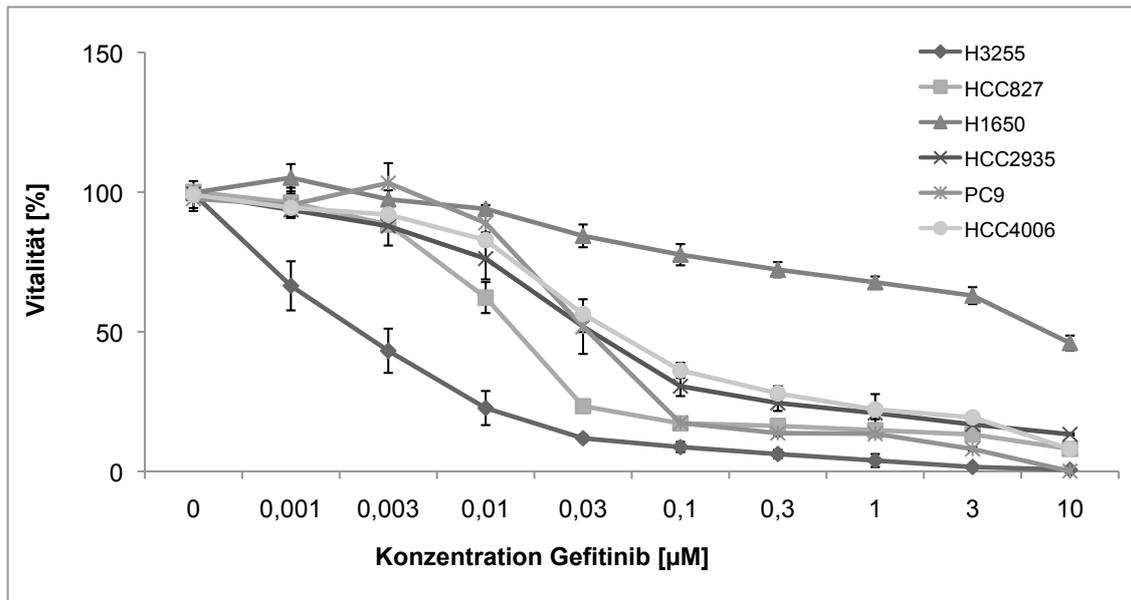


Abbildung 3.1 Behandlung der EGFR mutierten NSCLC Zelllinien mit Gefitinib

Dargestellt sind die aus den Viabilitätsassays generierten Ergebnisse von sechs NSCLC Zelllinien mit EGFR Mutationen und ihre Behandlung mit Gefitinib. 100% Viabilität entspricht der gemessenen Werte ohne Zugabe von Gefitinib. Fortlaufend folgt auf der Abszisse eine konzentrationsabhängige Darstellung. Die Ordinate zeigt die Viabilität in Prozent.

Wie erwartet zeigen alle EGFR-mutierten Zelllinien eine dosisabhängige Wachstumsinhibition mit GI_{50} Werten im nanomolaren Bereich (HCC2935: 0,033µM; HCC827: 0,026µM; PC9:0,033µM) bis auf die Zelllinie H1650, die ungeachtet der EGFR Deletionsmutation in Exon19 (del 746-750) einen resistenten Verlauf nimmt (GI_{50} -Wert >10µM) [6, 83]. Die Zelllinie H3255 reagiert am sensitivsten von allen getesteten Zelllinien mit einem GI_{50} -Wert von 0,0024µM (Abbildung 3.1). Diese Ergebnisse rekapitulieren die bisherigen präklinischen und klinischen Erfahrungen [83].

3.1.2 Resistenz gegenüber Gefitinib in NSCLC Zelllinien

Die T790M Mutation verändert die Topologie der ATP Bindungsstelle und führt zur Resistenz gegenüber reversiblen EGFR-Inhibitoren [51].

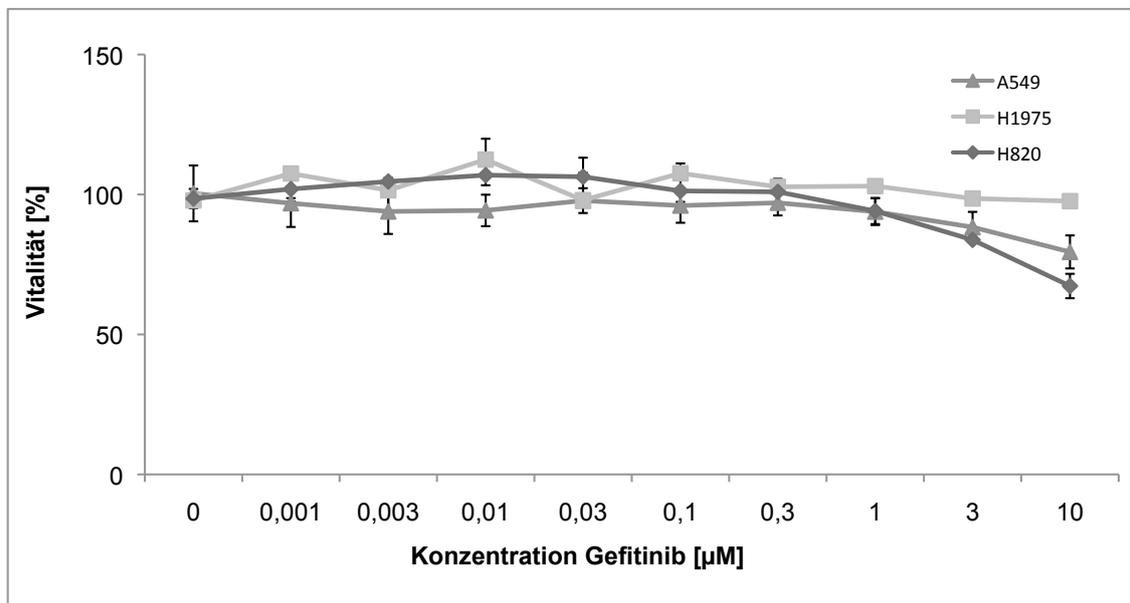


Abbildung 3.2 Sensitivität von Zellen ohne EGFR Mutation oder mit der Sekundärmutation T790M gegenüber Gefitinib

Dargestellt sind die Ergebnisse der Zelllinien A549 ohne EGFR Mutation sowie die Zelllinien H1975 und H820, die beide eine Sekundärmutation tragen, nach Behandlung mit Gefitinib. 100% Viabilität entspricht der gemessenen Werte ohne Zugabe von Gefitinib. Fortlaufend folgt auf der Abszisse eine konzentrationsabhängige Darstellung. Die Ordinate zeigt die Viabilität in Prozent.

Die Zelllinie A549 weist eine G12S KRAS Punktmutation, sowie Wildtyp-EGFR auf. KRAS Mutationen sind mit Nichtansprechen gegenüber einer Therapie mit EGFR Tyrosinkinaseinhibitoren assoziiert [68]. Sie weist erwartungsgemäß keine Sensitivität gegenüber Gefitinib auf und wird fortan als Negativkontrolle mitgeführt, um im Weiteren die zielgerichtete Wirkungsweise der synthetisierten Inhibitoren bewerten und Nebeneffekte besser ausschließen zu können. Die Viabilität der Zelllinien H1975 und H820, die beide die Resistenzmutation EGFR-T790M tragen, wird selbst bei Konzentrationen von bis zu 10µM Gefitinib nicht signifikant gesenkt.

Vergleicht man nun die GI_{50} Werte einer Zelllinie H3255 (EGFR-L858R; $GI_{50}=0,0241\mu\text{M}$) und der Zelllinie H1975 (EGFR-L858R + T790M; $GI_{50}>10\mu\text{M}$), erkennt man einen deutlichen Aktivitätsverlust von Gefitinib (Abbildung 3.3).

Somit scheint die Sekundärmutation T790M als entscheidende Differenz der beiden Zelllinien für ein Nichtansprechen der Zelllinie H1975 gegenüber Gefitinib verantwortlich zu sein.

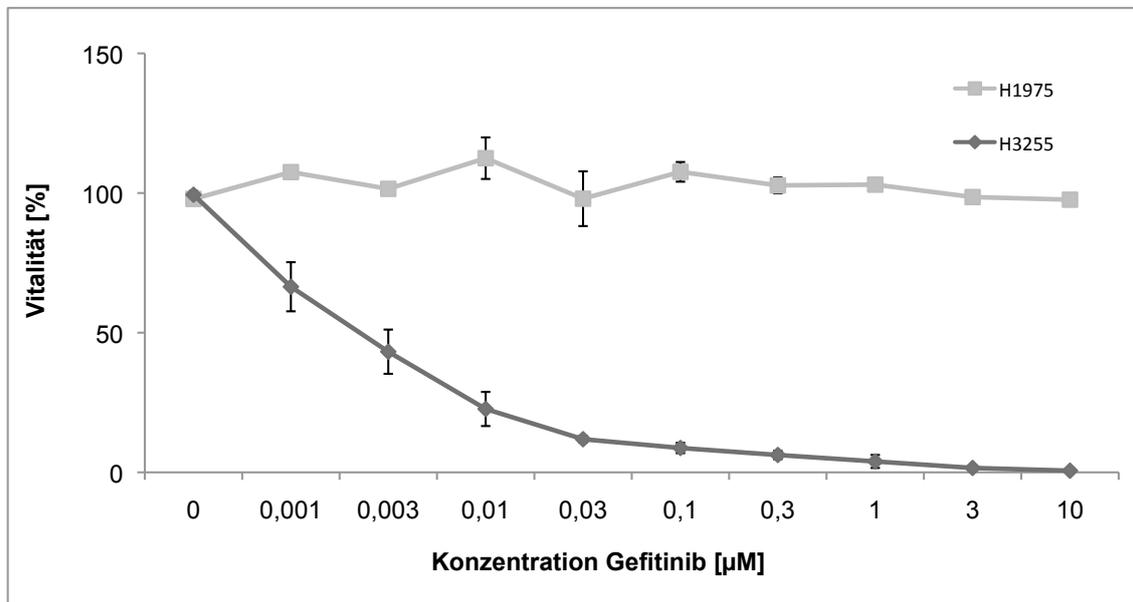


Abbildung 3.3 Sensitivität der Zelllinie mit EGFR Mutation L858R und der Zelllinie mit der EGFR Mutation L858R und der Sekundärmutation T790M gegenüber Gefitinib

Dargestellt sind die Ergebnisse der Zelllinien H3255 mit EGFR Mutation sowie die Zelllinie H1975, die zu der L858R Mutation die Sekundärmutation trägt nach Behandlung mit Gefitinib. Die T790M Mutation bewirkt einen totalen Aktivitätsverlust. 100% Viabilität entspricht der gemessenen Werte ohne Zugabe von Gefitinib. Fortlaufend folgt auf der Abszisse eine konzentrationsabhängige Darstellung. Die Ordinate zeigt die Viabilität in Prozent.

Da Gefitinib die T790M Mutation nicht zu inhibieren vermag soll nun im Weiteren geprüft werden, ob durch den Einsatz von irreversiblen Inhibitoren, die mit unterschiedlichen elektrophilen und epoxiden ausgestattet sind dieser Mechanismus durchbrochen werden kann.

3.1.3 Genetisch charakterisierte NSCLC Zelllinien und ihre Sensitivität gegenüber dem irreversiblen Inhibitoren PD168393

Wie oben dargestellt führt die Sekundärmutation EGFR-T790M in Zelllinien zu einem Aktivitätsverlust des reversiblen Inhibitors Gefitinib. Diese

Ergebnisse rekapitulieren die bisherigen präklinischen und klinischen Ergebnisse mit reversiblen Inhibitoren [48, 50, 67].

Um die Aktivität des bereits bekannten irreversiblen Inhibitors PD168393 (siehe Abbildung 2.3) zu untersuchen, wurden sieben unterschiedliche EGFR mutierte NSCLC Zelllinien ohne EGFR-T790M Resistenzmutation mit dem Inhibitor in steigenden Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde die Viabilität der Zelllinien mittels CTG-Assay analysiert.

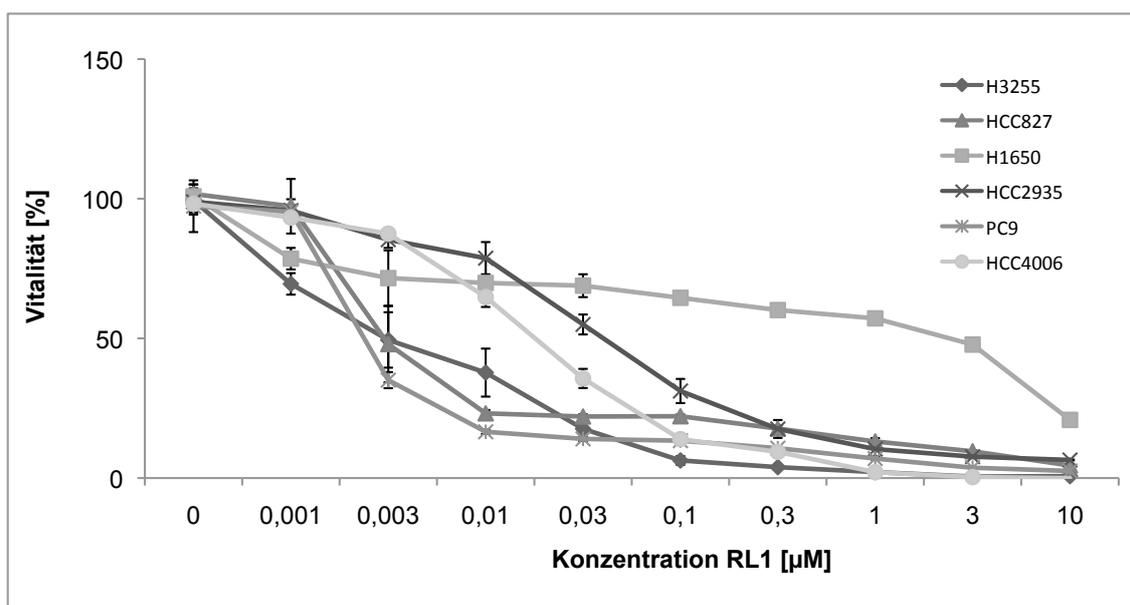


Abbildung 3.4 Sensitivität von NSCLC Zellen mit EGFR Mutation gegenüber dem irreversiblen Inhibitor RL1

Dargestellt sind die aus Viabilitätsassays generierten Ergebnisse von sechs NSCLC Zelllinien mit EGFR Mutationen nach Behandlung mit dem Inhibitor RL1. Auf der Abszisse sind 10 aufsteigende Konzentrationsschritte (0 bis 10 μM) dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Vitalität in %.

Wie erwartet ist die Behandlung der EGFR mutierten Zelllinien (6 von 7) mit dem irreversiblen Inhibition PD168393 bereits in Konzentrationen unter 0,01μM zytotoxisch. Manche getesteten Linien zeigen ein im Vergleich zu Gefitinib stärkeres Ansprechen auf eine Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor auf (PC9: GI₅₀-Gefitinib: 0,033μM und GI₅₀-PD168393: 0,0023μM; HCC4006: GI₅₀-Gefitinib: 0,0439μM und GI₅₀-PD168393: 0,0179μM; HCC827: GI₅₀-Gefitinib: 0,014μM und GI₅₀-PD168393: 0,0028μM). Dieser Effekt lässt sich

allerdings nicht für alle gescreenten Zelllinien mit EGFR Mutationen zeigen (H3255: GI_{50} -Gefitinib: $0,024\mu\text{M}$ und GI_{50} -PD168393: $0,07\mu\text{M}$).

Ausschließlich die Zelllinie H1650 weist eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit dem irreversiblen EGFR-Inhibitor auf (GI_{50} : $6,38\mu\text{M}$). Im Falle der Zelllinie H1650 wurde in der Arbeitsgruppe zeitgleich zu den Etablierungsexperimenten ein homozygoter Verlust eines Teils des *PTEN* Gens in der Zelllinie H1650 nachgewiesen werden, was zu einer von EGFR unabhängigen Aktivierung des EGFR nachgeschalteten AKT-Signalweges führt. Dies setzt die Effektivität der EGFR-Hemmung herab und führt zu einer erhöhten Zellteilung unabhängig von einer EGFR-Hemmung [67, 81]. Die verminderte Effektivität der EGFR-Hemmung lässt sich somit auch nicht mit einem irreversiblen Inhibitor überwinden (Abbildung 3.6).

3.1.4 Sensitivität von Zelllinien ohne EGFR Mutation und Zelllinien mit Sekundärmutation gegenüber RL1

Um die Aktivität des irreversiblen EGFR-Inhibitors PD168393 zu untersuchen, wurden die beiden Zelllinien H820 und H1975 (beide mit T790M) mit dem irreversiblen Inhibitor PD168393 in aufsteigenden Konzentrationen behandelt (Abbildung 3.7). Wie bereits beschrieben dient in diesem Experiment die KRAS mutierte Linie A549 als Negativkontrolle.

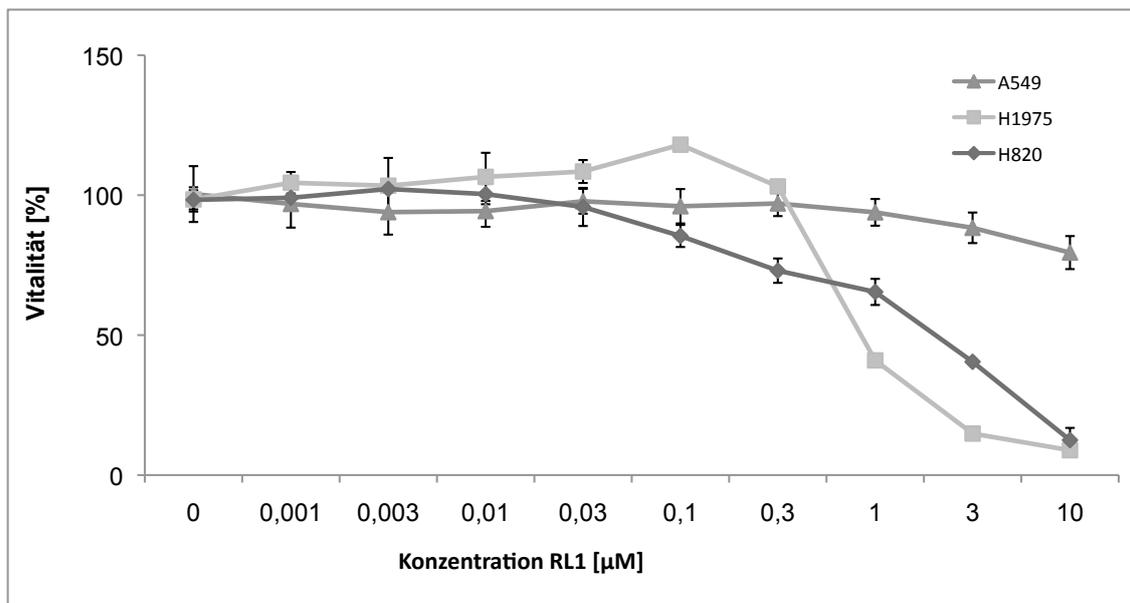


Abbildung 3.5 Sensitivität von Zellen ohne EGFR Mutation oder mit Sekundärmutation T790M gegenüber dem irreversiblen Inhibitor RL1

Dargestellt sind die Ergebnisse der Viabilitätsassays der Zelllinien A549 ohne EGFR Mutation sowie die Zelllinien H1975 und H820 mit Sekundärmutation nach Behandlung mit dem Inhibitor RL1. Auf der Abszisse sind die Konzentrationsschritte aufgetragen. Die Ordinate zeigt das prozentuale Überleben der Zellen. Keine der Zelllinien zeigt ein sensibles Ansprechen auf die Behandlung mit RL1.

Die Zelllinien H1975 und H820 mit Sekundärmutation zeigen im Gegensatz zur Behandlung mit dem reversiblen Inhibitor Gefitinib eine Auffälligkeit in dem Sinne, dass beide Zelllinien unter der Behandlung mit dem Inhibitor RL1 einen zumindest intermediär sensitiven Verlauf aufweisen (H1975: GI_{50} -Gefitinib: 10µM versus GI_{50} -PD168393: 0,8128µM; H820: GI_{50} -Gefitinib: 10µM versus GI_{50} -PD168393: 2,014µM (Abbildung 3.6). Dies stellt eine Verbesserung der Wirksamkeit da. Allerdings liegen die gemessenen GI_{50} -Werte dieser Zelllinien nach der Behandlung mit RL1 im Allgemeinen um mindestens eine 10er-Potenz höher als im Vergleich zu den Zelllinien ohne T790M,

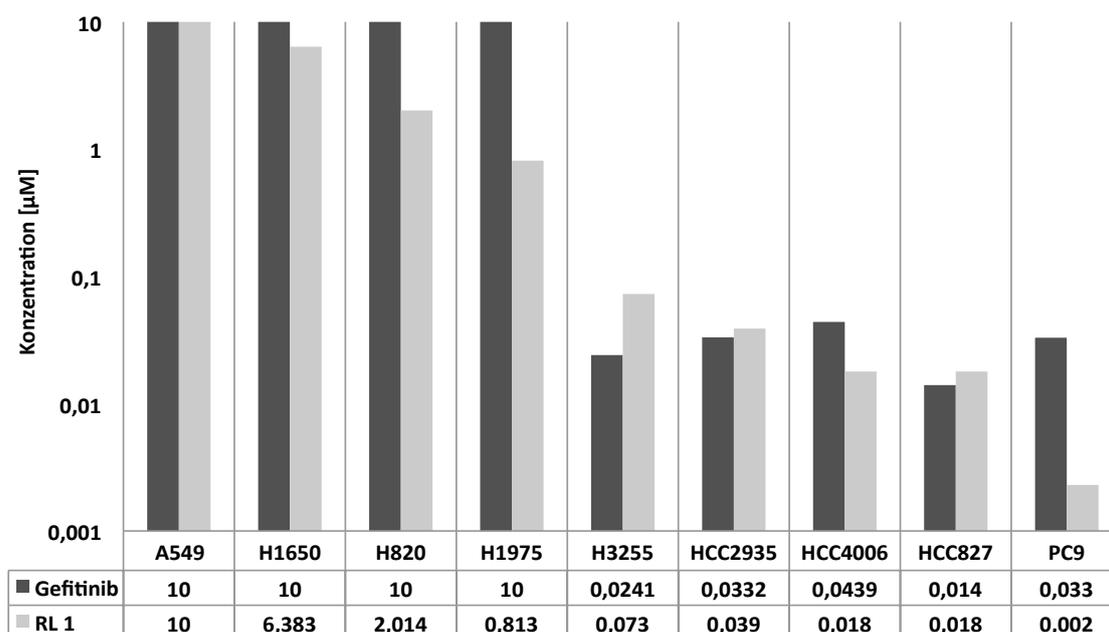


Abbildung 3.6 GI₅₀ Werte des irreversiblen Inhibitors RL1 im direkten Vergleich mit dem reversiblen Inhibitor Gefitinib

Dargestellt sind zusammenfassend die GI₅₀ Werte der Viabilitätsassays aller sechs Zelllinien mit EGFR Mutation, der Zelllinie A549 ohne EGFR Mutation sowie die Zelllinien H1975 und H820 mit Sekundärmutation nach Behandlung mit Gefitinib (dunkel grau) und RL1 (hellgrau). Die Konzentrationsschritte sind auf der Ordinate logarithmisch aufgetragen.

3.1.5 Dosis versus zeitlicher Effekt

Um nachzuweisen, dass es sich bei der Aktivität der getesteten Inhibitoren um einen dosisabhängigen und nicht um einen zeitlichen Effekt im Sinne einer allgemeinen Zelltoxizität der Inhibitoren handelt, wurden die Zelllinien unterschiedlich lange (72h oder 96h) mit den Inhibitoren inkubiert und anschließend die Viabilität gemessen. Als repräsentatives Beispiel seien die Zelllinien H1975 und PC9 unter Behandlung mit RL1 angeführt (Abbildung 3.7).

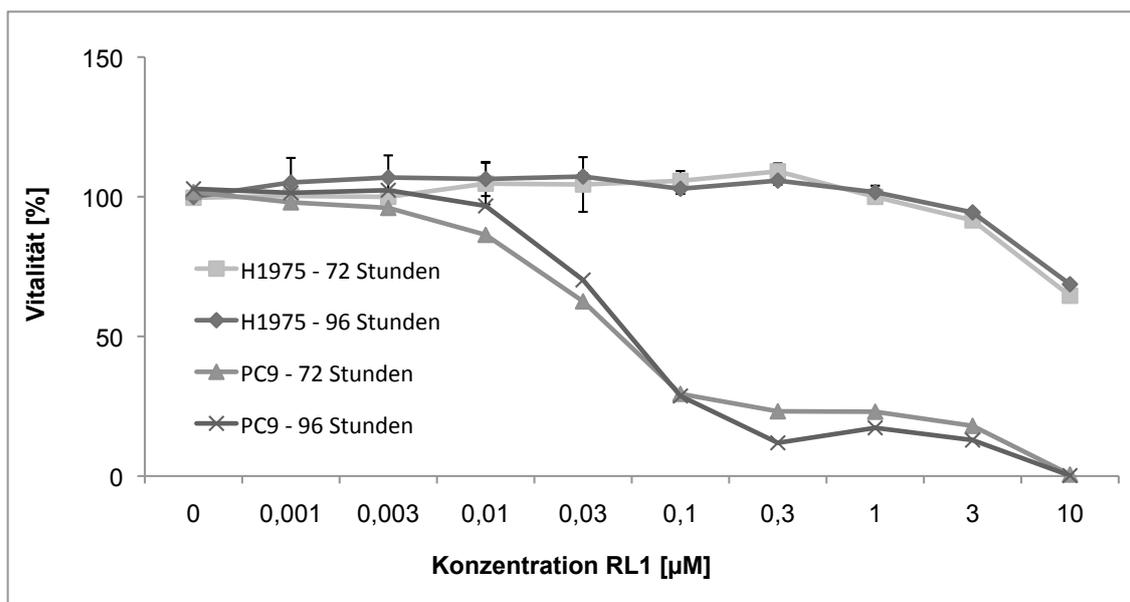


Abbildung 3.7 Vergleich der Sensitivität von Zelllinien nach einer Behandlung mit dem Inhibitor RL1 nach 72 und 96 Stunden Inkubationszeit

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Viabilitätsassays der Zelllinien H1975 und PC9 nach Behandlung mit RL1 und einer Inkubationszeit von 72 oder 96 Stunden.

Die Verwendung statistischer Methoden (T-Test: Alpha < 5 %) und Berechnung der Konfidenzintervalle unter zu Hilfenahme der Statistik Software R (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.4.6) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den GI_{50} Werte nach 72 bzw. 96 Stunden. Die GI_{50} Werte sind unabhängig von einer längeren Inkubationszeit konstant, woraus resultiert, dass keine allgemeine Zelltoxizität vorliegt sondern von einer dosisspezifischen Inhibition ausgegangen werden kann.

3.2 Ba/F3 Zellen und ihre Validität als Zelllinienmodell

Um den Einfluss von unterschiedliche EGFR- und HER2-Mutationen, die im Patienten häufig vorgefunden werden, auf die Aktivität von EGFR Inhibitoren zu untersuchen wurden Ba/F3 Linien hinzugezogen die ektop verschiedene EGFR und HER2 Mutanten exprimieren. Der große Vorteil der genetisch hergestellten Ba/F3 Zelllinien ist die Möglichkeit, die Aktivität eines EGFR-Inhibitors sehr spezifisch zu untersuchen, da das Zelllinienüberleben ausschließlich von der Aktivität des eingeführten EGFR- oder HER2 Onkogens

abhängt (siehe Methoden). Mit diesem Zelllinienkollektiv lässt sich die Potenz verschiedener Inhibitoren und deren Effekt auf Mutationen im Gen des EGF-Rezeptors direkt vergleichen. Somit besteht beispielsweise die Möglichkeit, den tatsächlichen Effekt der Sekundärmutation T790M auf einen Inhibitor isoliert zu betrachten und die Effekte verschiedener Inhibitoren und deren Bindemodalitäten zu analysieren.

Tabelle 3.2 Überblick über die verwendeten Ba/F3 Zelllinien und deren genetische Veränderung [64]

Zelllinie	Genetische Veränderung	Lokalisation	T790M
EGFR R108K	Mutation (R108)	Extrazellulär	-
EGFR A289V	Mutation (A289V)	Extrazellulär	-
EGFR vIII	In frame Deletion Exon 2-7	Extrazellulär	-
EGFR Y764D	Mutation (Y764D)	Kinasedomäne	-
EGFR del1	Deletion 745-749	Kinasedomäne	-
EGFR del2	Deletion 752-759	Kinasedomäne	-
EGFR del3	Deletion 746-748	Kinasedomäne	-
EGFR del5	E745V + Deletion 746-752	Kinasedomäne	-
EGFR del1 + T790M	Deletion 745-749	Kinasedomäne	+
EGFR del2 + T790M	Deletion 752-759	Kinasedomäne	+
EGFR del3 + T790M	Deletion 746-748	Kinasedomäne	+
EGFR del4 + T790M	Deletion 745-751	Kinasedomäne	+
EGFR del5 + T790M	E745V + Deletion 746-752	Kinasedomäne	+
EGFR L858R + T790M	Mutation (L858R)	Kinasedomäne	+
Her2 WT	-	-	-
Her2 INS3	-	Kinasedomäne	-
Her2 GSP INS4	Insertion GSP 781-783	Kinasedomäne	-
Her2 G776 VC INS7	Insertion G776	Kinasedomäne	-
Her2 AYVN INS8	Insertion AYVN 776-779	Kinasedomäne	-

Um die Validität der genetisch hergestellten Ba/F3-Zelllinien gegenüber der Zelllinien die aus Tumormaterial gewonnen wurden zu überprüfen, wurden Ba/F3 Zelllinien mit Gefitinib und PD168393 behandelt und die GI₅₀ Werte mit den Zelltoxizitätskurven der bereits getesteten NSCLC Zelllinien mit korrespondierendem EGFR Mutationsstatus verglichen. In Abbildung 3.8 ist die Sensitivität der Linien Ba/F3 L858R+T790M und H1975 gegenüber Gefitinib

und RL1 dargestellt.

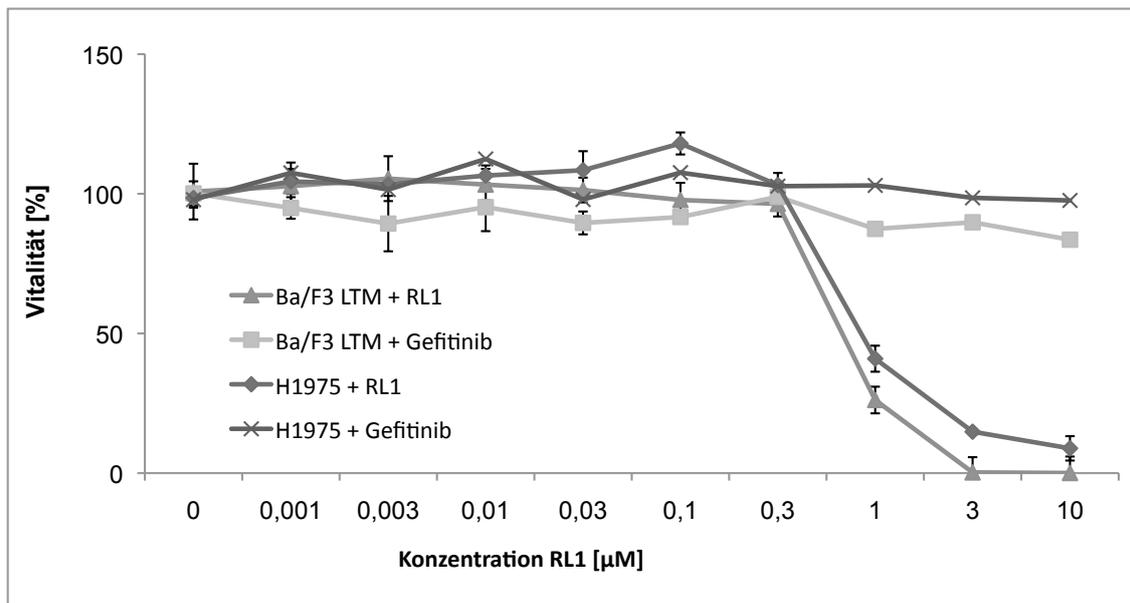


Abbildung 3.8 Sensitivität von Ba/F3 Zelllinien gegenüber den Inhibitoren Gefitinib und RL1

Dargestellt sind die Ergebnisse der Viabilitätsassays mit der NSCLC Zelllinie H1975 (L858R + T790M) und der Zelllinie Ba/F3 LTM (L858R + T790M) nach Behandlung mit den Inhibitoren RL1 oder Gefitinib.

Beide Zelllinien zeigen einen resistenten Kurvenverlauf, wobei alle Zellen nach einer Behandlung mit RL1 bei einer Konzentration von 1µM (siehe Tabelle) abgestorben sind und die Zellen, die mit Gefitinib behandelt wurden, noch weiterleben (Abbildung 3.8).

Tabelle 3.3 Vergleich der GI₅₀ Werte zwischen einer Zelllinien aus Primärtumoren und einer Ba/F3 Zelllinie mit identischem Mutationsstaus

Zelllinie	GI ₅₀	
	Gefitinib	RL1
H1975	10	0,8128
Ba/F3 L858R + T790M	10	0,6902

Die Tabelle 3.3 zeigt die mittels Viabilitätsassays erhaltenen GI₅₀ Werte der Zelllinien H1975 und Ba/F3 L858R + T790M. Bei identischem Mutationsstatus unterscheidet sich die Sensitivität der Ba/F3 Zellen nicht signifikant von der Sensitivität der Zelllinien, die aus Primärtumoren gewonnen

wurden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Ba/F3 Zellen als valides Modell für die Untersuchung von Mutationen aus Primärtumoren und deren Effekte auf den Wirkmechanismus von Inhibitoren herangezogen werden können.

Um zu belegen, dass sich die Mittelwerte der Einzelmessungen und die daraus resultierenden GI_{50} Werte zwischen den getesteten Linien (Ba/F3 und Zelllinien aus Primärtumoren) statistisch nicht signifikant voneinander unterscheiden, wurden mit Hilfe der Statistiksoftware „R“ die Konfidenzintervalle um die GI_{50} Werte bestimmt, die in Abhängigkeit von der Streuung und der Anzahl der Einzelmessungen den Bereich angeben, der jeweils den wahren Wert mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einschließt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.4.6). Gewählt wurde ein 95%-iges Konfidenzintervall. Überschneiden sich die Balken der Mittelwerte im oberen oder unteren Konfidenzintervall, kann man die erhaltenen Werte als statistisch nicht signifikant unterschiedlich bewerten, was für die Zelllinien H1975 und Ba/F3 L858R + T790M zutrif:

Konfidenzintervall H1975: $0,762\mu\text{M} - 0,8671\mu\text{M}$ (GI_{50} : $0,8128\mu\text{M}$)

Konfidenzintervall Ba/F3 LTM: $0,6501\mu\text{M} - 0,7328\mu\text{M}$ (GI_{50} : $0,6902\mu\text{M}$)

3.3. Interexperimentelle Vergleichbarkeit der Ergebnisse

Um die interexperimentelle Vergleichbarkeit bezüglich der Sensitivität der neu synthetisierten Inhibitoren (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.5.1) in den humanen Primärtumorzelllinien und den Ba/F3 Zelllinien gewährleisten zu können, wurden alle Zelllinien repetitiv in Einzelexperimenten bis zu 6 mal mit einem maximalen Stichprobenumfang (n) von $n=18$ zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils mit allen Inhibitoren behandelt und die spezifischen GI_{50} Werte ermittelt. Die im Folgenden gezeigten GI_{50} Werte und Kurvenverläufe stellen folglich Mittelwerte dieser repetitiv durchgeführten Zelltoxizitätsscreens dar. Um zu zeigen, dass die verwendeten Daten interexperimentell keine signifikanten Unterschiede zeigen, wurden ebenfalls Konfidenzintervalle gebildet. Im Folgenden wird repräsentativ die statistische Validierung der ermittelten GI_{50} -Werte am Beispiel der Zelllinie HCC4006

(Deletion E747-749, siehe auch Tabelle 3.1) nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL2 vorgestellt (Abbildung 2.11).

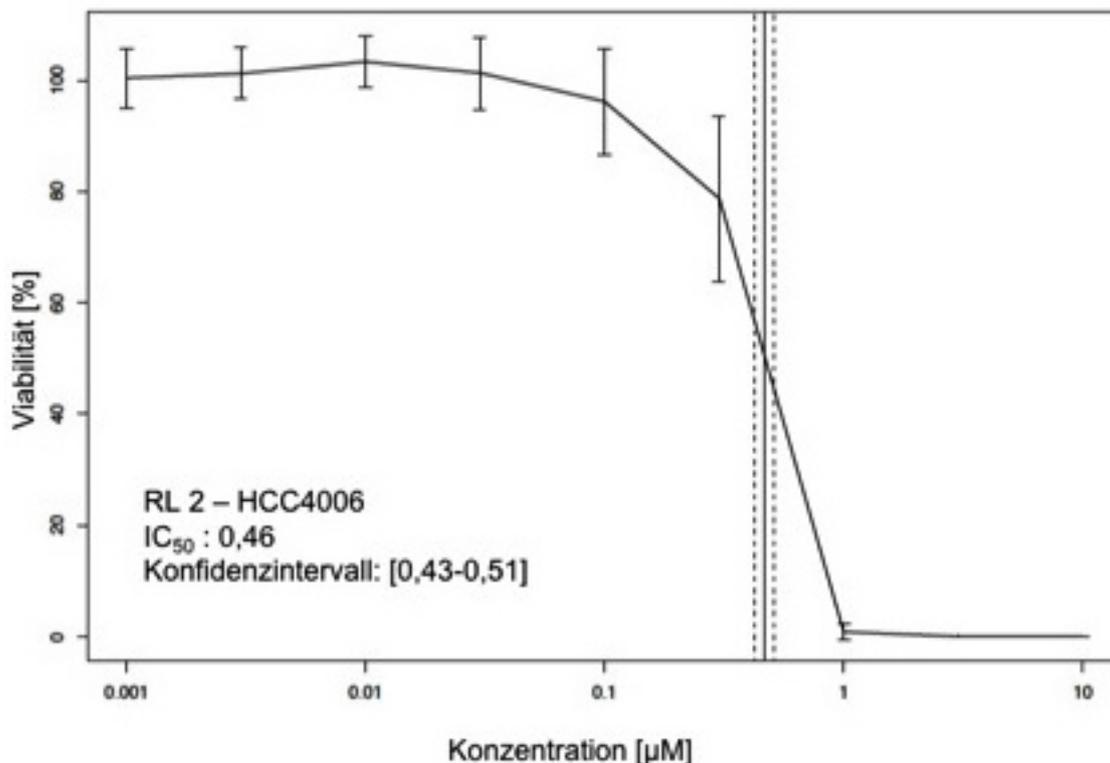


Abbildung 3.9 Zelltoxizitätskurve und Konfidenzintervall der Zelllinie HCC4006 nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL2

Dargestellt sind zusammengefasst die Einzelergebnisse aus sechs Zelltoxizitätsscreens. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % in Abhängigkeit von der auf der Abszisse aufgetragenen Konzentration in µM. Das Konfidenzintervall wurde mit 95% festgelegt.

Abbildung 3.9 zeigt, dass der wahre GI₅₀ Wert (0,4677µM), angegeben durch das Konfidenzintervall, mit einer 95%-igen Wahrscheinlichkeit für die Zelllinie HCC4006 und RL2 zwischen 0,43µM und 0,51µM liegt. Das Vertrauensintervall wurde wie hier exemplarisch gezeigt fortlaufend für alle Experimente mit 95% gewählt. Ein für ein vorgegebenes Vertrauensintervall zu breites Konfidenzintervall würde auf einen zu geringen Stichprobenumfang (n) hinweisen. Entweder wäre die Stichprobe tatsächlich „klein“ oder das untersuchte Phänomen, mit den multiplen Arbeitsschritten in den Vitalitätsassays und der individuellen Biologie der Zelllinien so variabel, dass nur durch eine unrealistisch große Stichprobe ein Konfidenzintervall von

akzeptabler Breite erreicht werden könnte. Dies ist hier jedoch nicht der Fall. Die einzelnen Zelltoxizitätsassays wurden für die Zelllinie HCC4006 an sechs verschiedenen Tagen wiederholt mit einer gesamt Probenanzahl von $n=18$. Da es bei den durchgeführten Experimenten vorrangig um die Einschätzung der Sensitivität, intermediären Sensitivität oder Resistenz der Zelllinien gegenüber den verwendeten Inhibitoren geht als um den absoluten Zahlenwert, bewegt sich das Konfidenzintervall von $0,43\mu\text{M}$ und $0,51\mu\text{M}$ somit in einem wünschenswerten Bereich ($\text{GI}_{50} < 1\ \mu\text{M}$). Mit der Statistiksoftware „R“ (siehe Material und Methoden 2.5.6) wurde für alle anderen durchgeführten Zelltoxizitätsassays und die ermittelten GI_{50} Werte die Konfidenzintervalle gebildet (Daten nicht gezeigt).

3.4 Aktivität einer fokussierten EGFR-Inhibitor Bibliothek in Zellulären Modellen

Die Zelllinien H1975 (L858R + T790M), H820 (E746-750 + T790M) und Ba/F3 L858R+T790M zeigen gegenüber dem Inhibitor RL1 intermediärer Sensitivität (Abbildungen 3.5 und 3.8). Somit weist der irreversible Inhibitor RL1 bei den Zelllinien mit Sekundärmutation größere Potenz auf als Gefitinib (Vergleiche Abbildung 3.6).

So stellte sich nach diesen ersten erfolgversprechenden Ergebnissen die Frage, ob durch weitere Modifikationen der Bindungsmodalitäten, z.B. durch Hinzufügen unterschiedlicher elektrophiler Substituenten bei identischem Grundgerüst der Inhibitoren, eine potentere Aktivität der Inhibitoren in EGFR mutierten Tumorzellen erreicht werden kann, als es bei Gefitinib und dem irreversiblen Inhibitor RL1 der Fall ist.

Als nächster Schritt wurde demgemäß erneut in Zusammenarbeit mit dem Chemical Genomics Center der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund die Inhibitor Kollektion um insgesamt fünf reversible (RL6, RL7, RL45, RL49 und RL50) und sechs irreversible Inhibitoren (RL2, RL3, RL10, RL11, RL13, RL14) erweitert (siehe Material und Methoden Abbildung 2.4 bis 2.15). Darauf hinzuweisen ist, dass RL1 (irreversibel) und RL6 (reversibel) ebenso wie RL3

(irreversibel) und RL7 (reversibel) sich entsprechende Pärchen bilden, die von der Strukturformel identisch sind und sich nur anhand einer Doppelbindung innerhalb der elektrophilen Seitengruppe unterscheiden, die RL1 und RL3 im Vergleich zu RL6 und RL7 das irreversible Binden ermöglicht. Ebenso verhält es sich mit RL3 (irreversibel) und RL50 (reversibel) mit nahezu identischer Strukturformel. Hier ergibt sich die einzige Differenz am Ringgerüst, da der Chinazolinring durch ein Chinolinring ersetzt wurde (siehe Abbildung 2.1 und 2.2, Substitution eines Kohlenstoffatoms).

Tabelle 3.4 Übersicht über die synthetisierten Inhibitoren und ihrer Charakteristika

Inhibitor	Bindungsmechanismus	Grundgerüst	Inhibition
RL1	irreversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL2	irreversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL3	irreversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL10	irreversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL11	irreversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL13	irreversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL14	irreversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL6	reversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL7	reversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL45	reversibel	Chinazolin	kompetitiv
RL49	reversibel	Chinolin	kompetitiv
RL51	reversibel	Chinolin	kompetitiv
RL50	reversibel	Chinolin	kompetitiv

In Tabelle 3.4 sind die Inhibitoren und deren Eigenschaften aufgeführt. Das Grundgerüst der Inhibitoren ist stets kongruent und wurde mit einem 4-Amino-Chinazolin (siehe Abbildung 3.11) Derivat in Anlehnung an Gefitinib oder einem Chinolin Grundgerüst (siehe Abbildung 3.12) synthetisiert. Für alle neu synthetisierten reversiblen Inhibitoren gilt, dass ihre Seitengruppe eine höhere Elektrophilie aufweist als Gefitinib. Ziel der Entwicklung dieser Kollektion war es, Inhibitoren zu erhalten, denen ausschließlich über ihre verschiedenen elektrophilen Substituenten unterschiedliche Bindungseigenschaften zukommen (vgl. Strukturformel in Material und Methoden Abschnitt 2.5.1). Auf diese Weise war es möglich, den Einfluss jeder einzelnen Modifikation isoliert bewerten zu können.

Die Differenz zwischen den Inhibitoren ergibt sich ausschließlich aus den elektrophilen Seitengruppen, welche wiederum für den Mechanismus der Inhibition ausschlaggebend sind. Dies ermöglicht Interpretationen zu Spezifität (keine bzw. Fähigkeit der Bindung des Moleküls an andere Proteine) und Potenz (hohe Dissoziationskonstante) der verschiedenen elektrophilen Substituenten bezogen auf spezifische EGFR Mutationen.

3.4.1 Zellinienscreen mit den Inhibitoren der neuen Kollektion

Um die Aktivität der neu synthetisierten Inhibitoren zu testen, wurden ihre Aktivität in den genetisch charakterisierten NSCLC Zelllinien (siehe Tabelle 2.1) [82] sowie allen ERBB-abhängigen Ba/F3 Zelllinien (siehe Tabelle 2.2) analysiert.

3.4.1.1 Ergebnisse der Zelltoxizitätsassays

Wegen der vielversprechenden Ergebnisse mit dem irreversiblen Inhibitor RL1 sollte zunächst auch der Inhibitor RL3 getestet werden (vergleiche Tabelle 3.4 und Abbildung 2.5). Abbildung 3.10 zeigt, dass ein Grossteil der Zelllinien eine hohe Sensitivität gegenüber den irreversiblen Inhibitoren RL1 und RL3 aufweist.

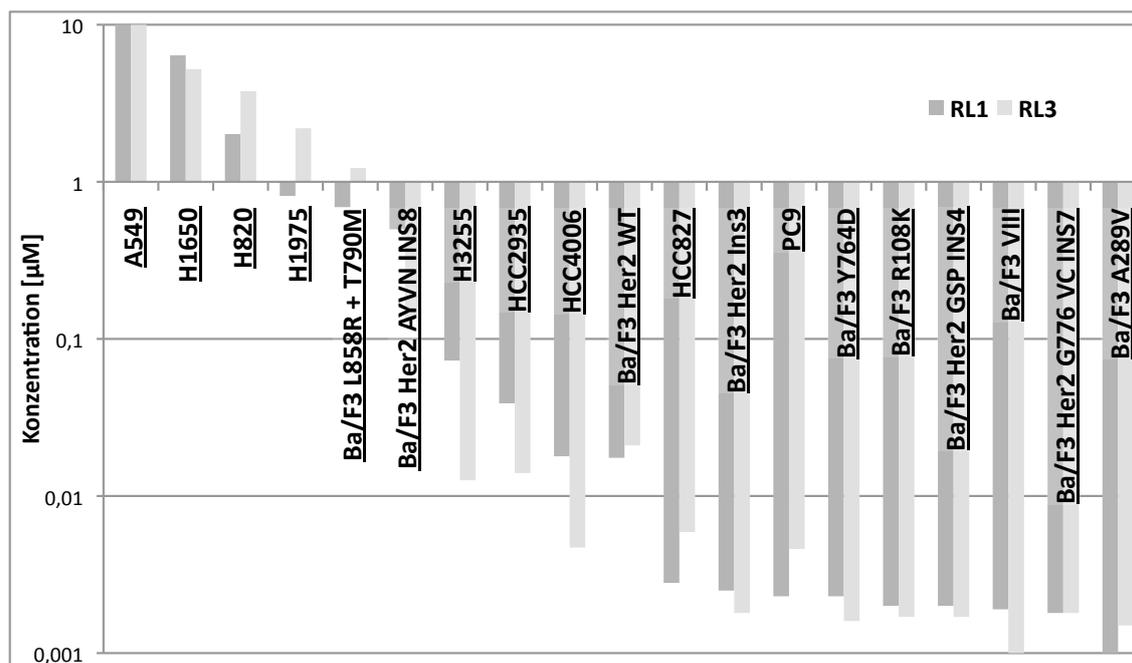


Abbildung 3.10 GI_{50} Werte der NSCLC und Ba/F3 Zelllinien nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL1 bzw. RL3

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Zelltoxizitätsscreens. Auf der Ordinate sind logarithmisch die Konzentrationen der Inhibitoren RL1 (dunkel grau) und RL3 (hell grau) aufgetragen. NSCLC und Ba/F3 Zelllinien sind auf der Abszisse aufgetragen.

Für die Zelllinien H1975, H820 und Ba/F3 L858R + T790M, die aufgrund ihrer Sekundärmutation im Fokus einer Behandlung mit irreversiblen Inhibitoren stehen kann intermediäre Sensitivität für beide Inhibitoren nachgewiesen werden. RL1 bleibt für diese Zelllinien der wirksamere Inhibitor (H1975: GI_{50} -PD168393: 0,013µM versus GI_{50} -RL3: 2,1928µM; H820: GI_{50} -PD168393: 2,014µM versus GI_{50} -RL3: 3,7757µM; Ba/F3 L858R + T790M: GI_{50} -PD168393 0,6902µM versus GI_{50} -RL3: 1,2246µM). Alle Zelllinien ohne Sekundärmutation zeigen einheitlich einen sensitiven Verlauf gegenüber beiden Inhibitoren. Allerdings konnte kein einheitliches Ansprechen nachgewiesen werden in dem Sinne, dass einer der beiden Inhibitoren für das gesamte Zelllinienkollektiv eine höhere Aktivität aufweist. Zum Beispiel inhibiert RL1 die Zelllinie HCC827 potenter als der Inhibitor RL3 (HCC827: GI_{50} -PD168393: 0,0028µM versus GI_{50} -RL3: 0,0059µM). Bei der Zelllinie H3255 verhält es sich umgekehrt (H3255: GI_{50} -PD168393: 0,0728µM versus GI_{50} -RL3: 0,0126µM). Eine Ausnahme der Zelllinien ohne Sekundärmutation stellt erneut die Zelllinie H1650 (Deletion

E746-750) dar, die in Übereinstimmung mit den bisher gezeigten Ergebnissen auch nach einer Behandlung mit dem Inhibitor RL3 keinen sensitiven Verlauf aufweist (vgl. Abbildung 3.1). Die Zelllinie A549 ist erwartungsgemäß aufgrund der nicht vorhandenen EGFR Mutation mit GI_{50} -Werten $>10\mu\text{M}$ am resistantesten in Bezug auf eine Behandlung mit dem Inhibitor RL1 und RL3. Die Ergebnisse der Experimente der Zelllinien H1650 und A549 deuten auf target Spezifität beider Inhibitoren hin.

Obwohl RL2 (Abbildung 2.11), wie RL1 und RL3, ebenfalls ein irreversibler Inhibitor ist (vgl. Tabelle 3.4), ergaben sich in den Ergebnissen Unterschiede im Bezug auf das Ansprechen der verschiedenen Zelllinien. Im Folgenden sollen nun einige ausgewählte Zelllinien und die dazugehörigen GI_{50} Werte für den irreversiblen Inhibitor RL2 gezeigt werden (Abbildung 3.11).

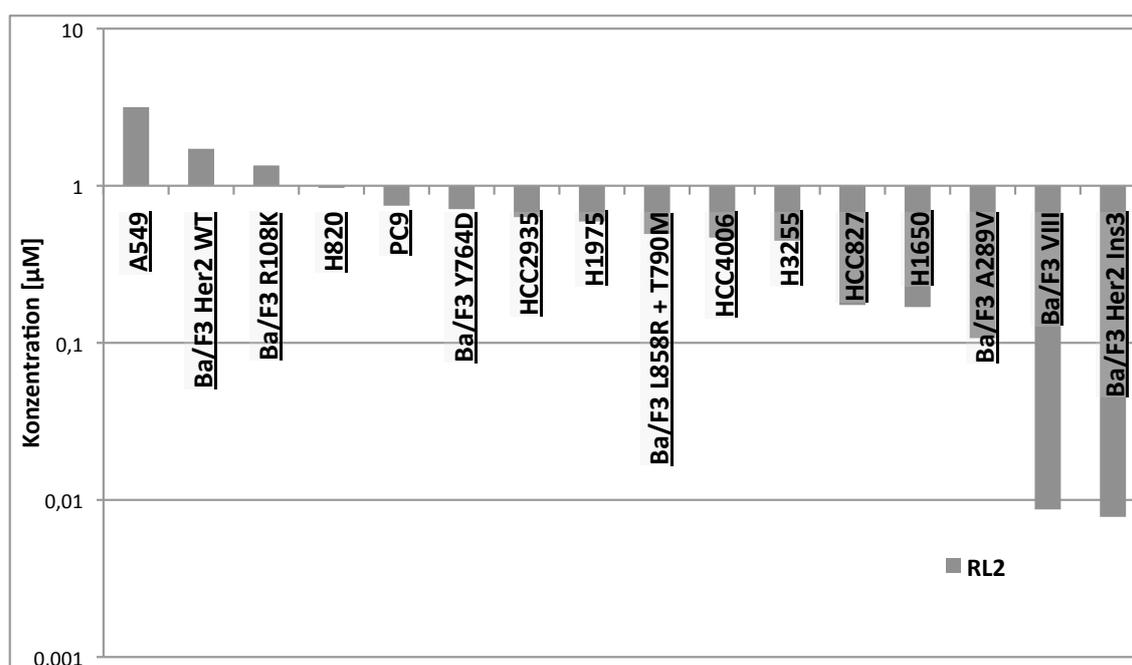


Abbildung 3.11 GI_{50} Werte der NSCLC und Ba/F3 Zelllinien nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL2

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Zelltoxizitätsscreens. Auf der Ordinate sind logarithmisch die Konzentrationen der Inhibitoren RL2 aufgetragen. NSCLC und Ba/F3 Zelllinien sind auf der Abszisse aufgetragen.

Alle Zelllinien zeigen zumindest intermediäre Sensitivität gegenüber dem Inhibitor RL2. Allerdings lässt sich kein einheitliches Muster bezüglich des

Ansprechverhaltens ableiten. RL2 zeigt bei allen getesteten Zelllinien Wirkung in dem Sinne, dass keine der Zelllinien entsprechend der Definition (resistent = $GI_{50} > 5\mu\text{M}$) als resistent einzustufen ist. Überraschenderweise zeigen die Zelllinien H1975 (GI_{50} : $0,5916\mu\text{M}$) und H820 (GI_{50} : $0,9977\mu\text{M}$) mit Sekundärmutationen eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu der Zelllinie Ba/F3 R108K (GI_{50} : $1,3459\mu\text{M}$) ohne Sekundärmutation. Insbesondere Zelllinien mit Mutationen der Ektodomäne, wie sie in den Ba/F3-Linien R108K oder Y764D vorkommen, verhalten sich anderes als bei RL2 (vgl. Abbildung 3.11) bei den bisher getesteten irreversiblen und reversiblen Inhibitoren (RL1, RL3, Gefitinib) ähnlich und zeigen hier eine besonders hohe Empfindlichkeit (vgl. Abbildung 3.10, Daten für Gefitinib nicht gezeigt).

Die Zelllinie H1650, die unter einer Behandlung mit Gefitinib (vgl. Abbildung 3.1), RL1 und RL3 (vgl. Abbildung 3.10) resistente Verläufe zeigt, reagiert auf eine Behandlung mit RL2 sensitiv (GI_{50} : $0,169\mu\text{M}$). Auch die Zelllinie A549 weist im Vergleich zu den beiden anderen irreversiblen Inhibitoren RL1 und RL3 nach einer Behandlung mit dem Inhibitor RL2 eine zumindest intermediäre Sensitivität (GI_{50} : $3,1623\mu\text{M}$) auf. Dieser Effekt war aufgrund einer fehlenden EGFR Mutation aber einer KRAS Mutation nicht zu erwarten. Anhand dieser Ergebnisse kann von einer allgemeinen Zelltoxizität des Inhibitors RL2 ausgegangen werden.

Wie bereits eingangs erwähnt liegt ein besonderes Augenmerk auf dem Inhibitorpärchen RL1 und RL6, da sie sich nur anhand einer Doppelbrücke innerhalb der elektrophilen Seitengruppe unterscheiden, welche die Bindungsmodalität irreversibel (RL1) und reversibel (RL6) ergibt. Es gilt festzustellen, ob ein irreversibler Inhibitor wirksamer die Resistenzmutation zu durchbrechen vermag im Vergleich zu einem identischen reversiblen Gegenpart.

Die Abbildung 3.12 zeigt, dass Zellen mit Sekundärmutation (Ba/F3 LTM, H1975, H820) durch den reversiblen Inhibitor RL6 nicht inhibiert werden (alle GI_{50} Werte $> 10\mu\text{M}$), sein irreversibler Gegenpart RL1 hingegen inhibiert Zellen mit T790M Mutation: GI_{50} -PD168393: $0,013\mu\text{M}$; H820: GI_{50} -PD168393: $2,014\mu\text{M}$; Ba/F3 L858R + T790M: GI_{50} -PD168393 $0,6902\mu\text{M}$). Zelllinien die

Mutationen innerhalb der Kinasedomäne tragen werden durch RL1 potenter inhibiert, insbesondere auch solche mit Mutationen der Ektodomäne (Ba/F3 VIII: GI_{50} -PD168393: 0,0019 μ M versus GI_{50} -RL6: 1,6331 μ M; Ba/F3 R108K: GI_{50} -PD168393: 0,002 μ M versus GI_{50} -RL6: 0,9204 μ M; Ba/F3 Y764D: GI_{50} -PD168393 0,0023 μ M versus GI_{50} -RL6: 1,5241 μ M). Die Zelllinie A549 wird weder durch RL1 noch durch RL6 in ihrem Wachstum gehemmt. Dieses Ergebnis liefert Hinweise auf eine Targetspezifität.

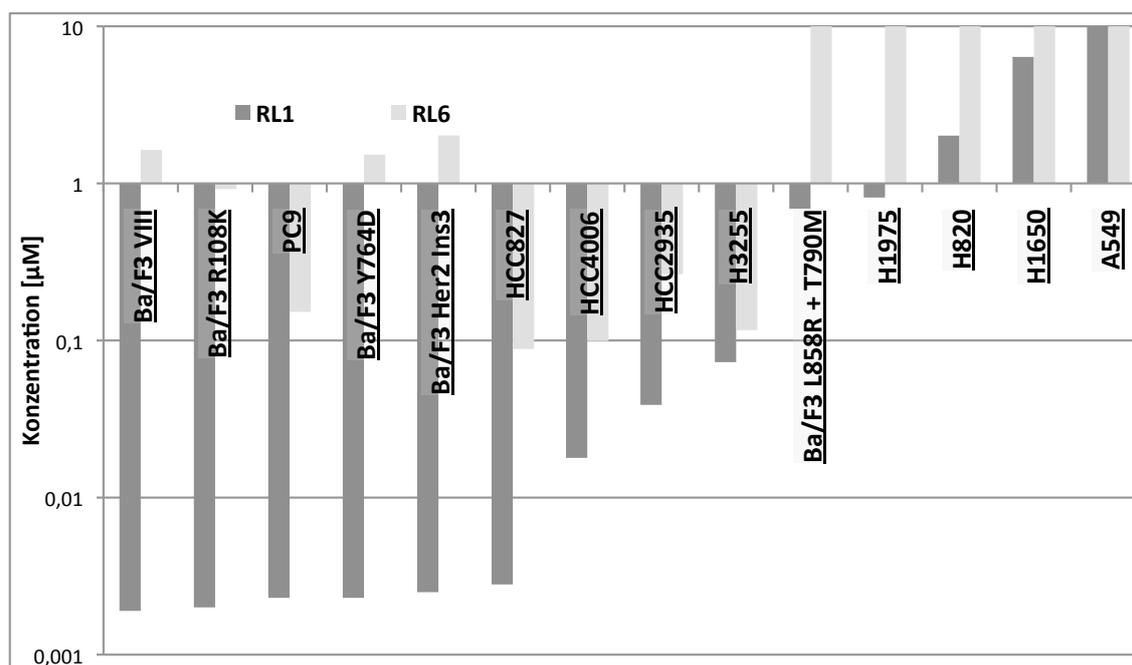


Abbildung 3.12 GI_{50} Werte der NSCLC und Ba/F3 Zelllinien nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL1 und dem reversiblen Inhibitor RL6

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Zelltoxizitätsscreens. Auf der Ordinate sind logarithmisch die Konzentrationen der Inhibitoren RL1 (hell grau) und RL6 (dunkel grau) aufgetragen. NSCLC und Ba/F3 Zelllinien sind auf der Abszisse aufgetragen. Man erkennt, dass Zellen mit der Sekundärmutation, anders als durch den Inhibitor RL1, durch den reversiblen Inhibitor RL6 keinen Vitalitätsverlust erleiden.

Zwar inhibiert RL3 Zelllinien mit T790M Mutation nicht gleichermaßen potent wie der Inhibitor RL1 (siehe Abbildung 3.10), dennoch sollte auch für RL3 überprüft werden, ob es einen Vorteil im Bezug auf die Sekundärmutation gegenüber dem reversiblen Gegenstück RL7 (veränderte Doppelbindung

innerhalb der elektrophilen Seitengruppe) oder dem reversiblen Inhibitor RL50 (Chinolin statt Chinazolingrundgerüst bei RL3) gibt.

Bei den Zelllinien aus Primärtumoren zeichnet sich auch in diesem Fall eine Überlegenheit des irreversiblen Inhibitors RL3 ab. Dies bezieht sich sowohl auf solche Zelllinien mit Sekundärmutation (H1975: GI_{50} -RL3: 2,1928 μ M versus GI_{50} -RL7: 10 μ M und H820: GI_{50} -RL3: 3,7757 μ M versus GI_{50} -RL7: 10 μ M) als auch auf alle getesteten Zelllinien ohne T790M Mutation (PC9: GI_{50} -RL3: 0,0046 μ M versus GI_{50} -RL7: 0,0358 μ M; HCC4006: GI_{50} -RL3: 0,0047 μ M GI_{50} -RL7: 0,02581 μ M); siehe auch Abbildung 3.13). Die Zelllinie A549 wird weder durch RL3 noch durch RL7 inhibiert, was erneut als Hinweis auf Targetspezifität herangezogen werden kann.

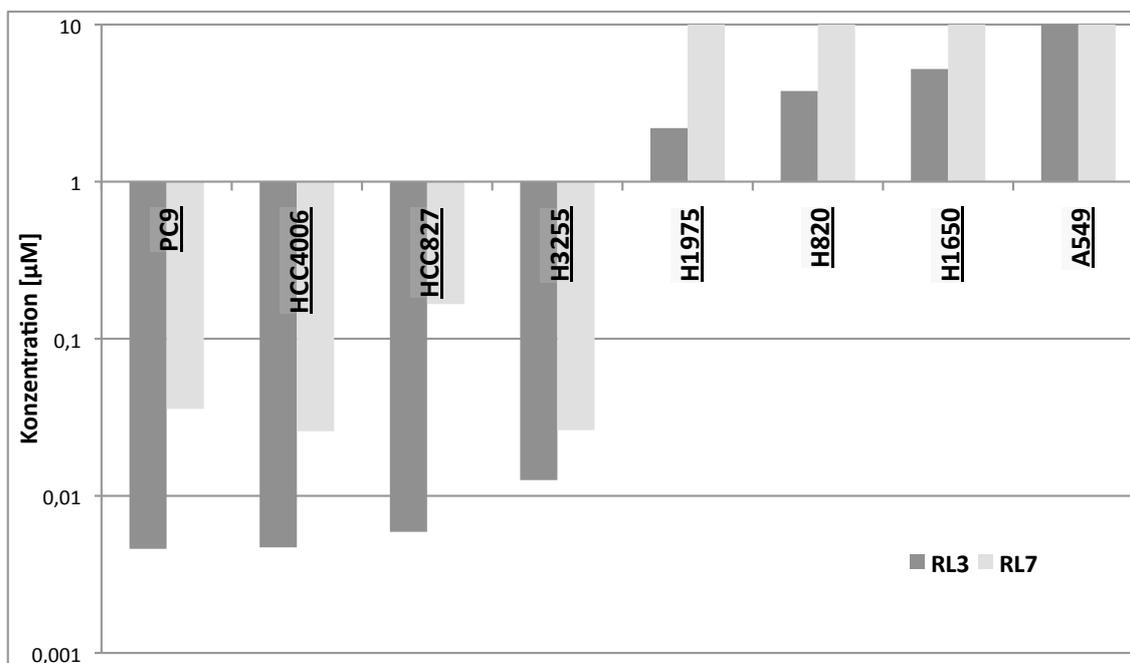


Abbildung 3.13 GI_{50} Werte der NSCLC nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL3 und dem reversibeln Inhibitor RL7

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Zelltoxizitätsscreens. Auf der Ordinate sind logarithmisch die Konzentrationen der Inhibitoren RL3 (dunkel grau) und RL7 (hell grau) aufgetragen. NSCLC und Ba/F3 Zelllinien sind auf der Abszisse aufgetragen. Man erkennt, dass alle Zellelinien potenter durch RL3 inhibiert werden.

Statt eines Chinazolin Grundgerüst trägt RL50 im Vergleich zu RL7 ein Chinolin Grundgerüst. Die elektrophilen Seitengruppen der beiden Inhibitoren sind identisch. Für Mutationen der Ektodomäne ist der Inhibitor RL50 auch im Vergleich zu RL7 der Inhibitor mit der geringsten Potenz (zum Beispiel Ba/F3 A289V GI_{50} -RL3: 0,0015 μ M versus GI_{50} -RL7: 0,0708 μ M versus GI_{50} -RL50: 1,8113 μ M; Ba/F3 R108K: GI_{50} -RL3: 0,0017 μ M versus GI_{50} -RL7: 0,1702 μ M versus GI_{50} -RL50: 1,7579 μ M). Ein besonderer Fokus sollte auf Zelllinien mit identischer, somatischer Mutation in Kombination mit oder ohne T790M-Sekundärmutation gelegt werden. Solche Zelllinien ohne T790M Mutation und identischer Mutation innerhalb der Kinasedomäne zeigen für alle Inhibitoren GI_{50} -Werte im sensitiven Bereich. Allerdings sind solche mit T790M mit einer Ausnahme Ba/F3 Del1 + T790M nur durch den RL3 zu inhibieren, wobei RL50 mit dem Chinolin Gerüst die Sekundärmutation für alle gezeigten Zelllinien besser inhibiert als RL7 mit dem gleichen Grundgerüst wie Gefitinib. Beispielsweise zeigt die Zelllinie Ba/F3 L858R + T790M einen GI_{50} Wert für RL50 von 2,851 μ M, RL7 einen GI_{50} Wert >10 μ M. Auffallend ist auch, dass die Zelllinie mit der Mutation Ba/F3 Del1 + T790M für alle Inhibitoren GI_{50} Werte <1 μ M zeigt, die Zelllinien Ba/F3 Del4 + T790M hingegen selbst für RL3 wie für alle anderen einen resistenten Verlauf nimmt mit GI_{50} Werten >10 μ M (vergleiche Abbildung 3.14).

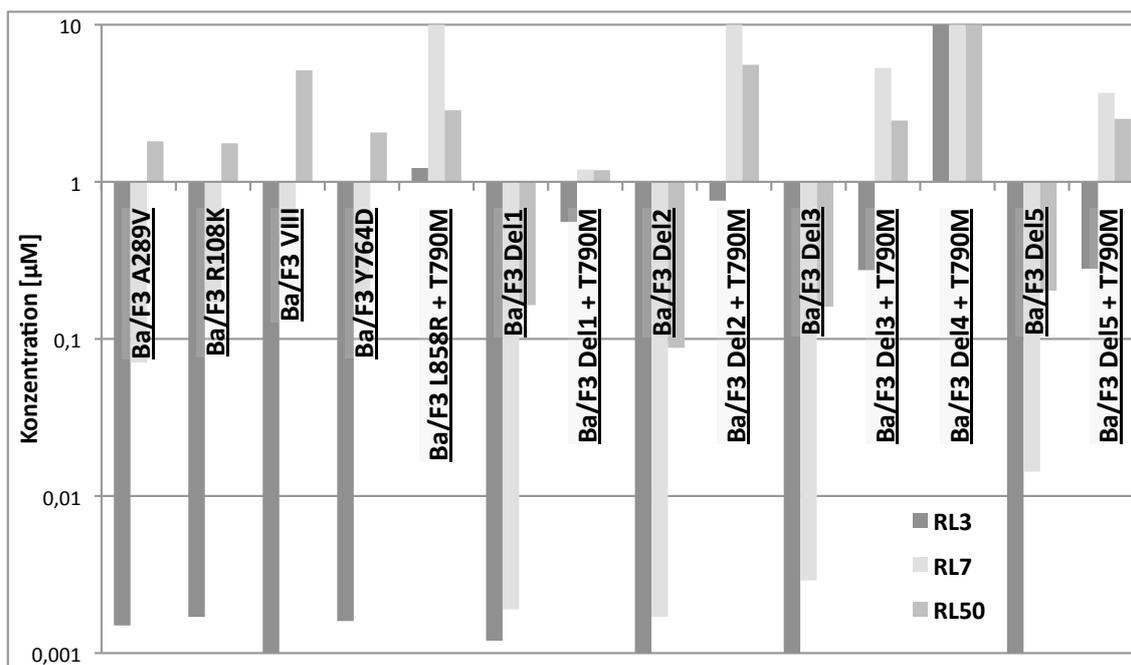


Abbildung 3.14 GI₅₀ Werte der Ba/F3 Zelllinien nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL3, dem reversiblen Inhibitor RL7 und RL50

Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Zelltoxizitätsscreens. Auf der Ordinate sind logarithmisch die Konzentrationen der Inhibitoren RL3 (dunkel grau), RL7 (hell grau) und RL50 (grau) aufgetragen. Ba/F3 Zelllinien sind auf der Abszisse aufgetragen. Man erkennt, dass alle Zelllinien potenter durch RL3 inhibiert werden.

Nach den Ergebnissen mit den irreversiblen Inhibitoren RL3 und RL1 sollten ebenfalls die irreversiblen Inhibitoren RL10, RL11, RL13 und RL14 mit ihren unterschiedlichen elektrophilen Substituenten (siehe Tabelle 3.4 und Abbildung 2.12. bis 2.15) getestet werden. Zunächst wird ein Auszug der getesteten Ba/F3 Zellen ohne T790M Mutation gezeigt (Abbildung 3.15).

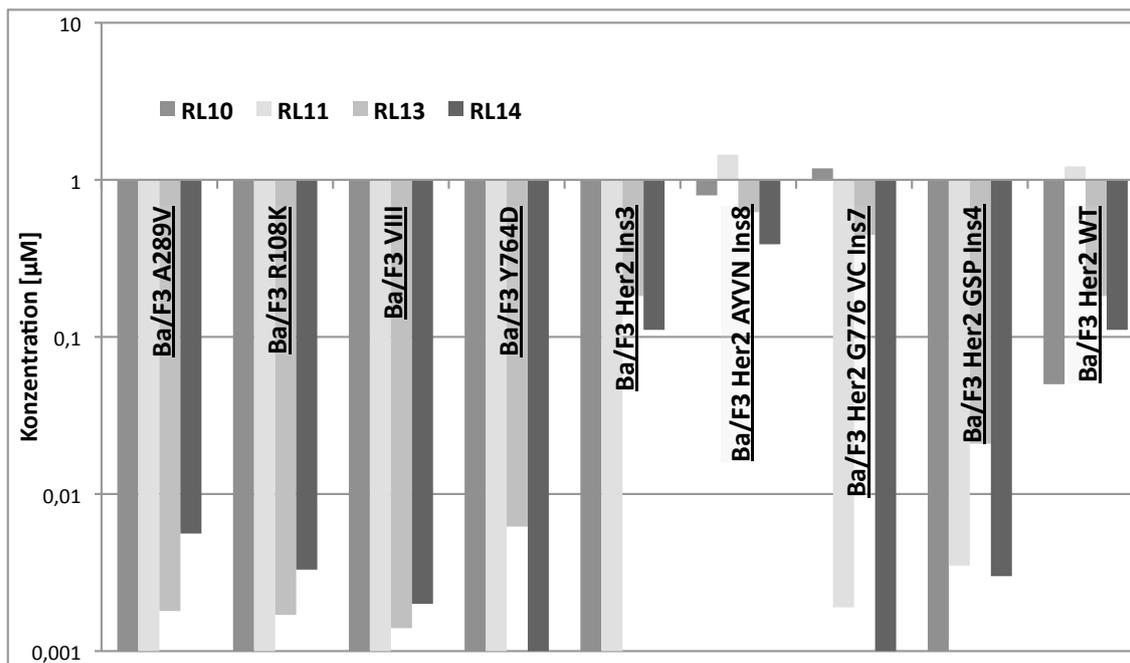


Abbildung 3.15 G_{i50} Werte der Ba/F3 Zelllinien nach Behandlung mit den irreversiblen Inhibitoren RL10, RL11, RL 13 und RL14

Dargestellt sind Ergebnisse der Zelltoxizitätsscreens. Auf der Ordinate sind logarithmisch die Konzentrationen der Inhibitoren RL10 (hell grau), RL11 (dunkel grau), RL13 (weiß), RL14 (schwarz) aufgetragen. Auf der Abszisse sind die Ba/F3 Zelllinien aufgeführt.

Abgesehen von drei Ausnahmen (Ba/F3 Her2 G776 VC Ins7 und RL10: G_{i50} - RL10: 1,183 μM ; Ba/F3 Her2 AYVN Ins8 und RL11: G_{i50} -RL11: 1,4454 μM sowie Ba/F3 Her2 WT und RL11: G_{i50} - RL11: 1,2162 μM) zeigen alle Zelllinien nach einer Behandlung mit den Inhibitoren RL10, RL11, RL13, RL14 G_{i50} Werte im nanomolaren Bereich. Die Her2 mutierten Zelllinien (Ba/F3 Her2 INS3, Ba/F3 Her2 GSP INS4, Ba/F3 Her2 G776 VC INS7, Ba/F3 Her2 AYVN INS8) reagieren abgesehen von den drei oben genannten Ausnahmen alle sensitiv gegenüber den getesteten Inhibitoren. Am sensitivsten (alle G_{i50} -Werte < 0,005 μM) reagieren Zelllinien mit Mutationen der Ektodomäne (Ba/F3 A289V, Ba/F3 R108K, Ba/F3 VIII und Ba/F3 Y764D). Dabei ist der Unterschied in der Potenz der Inhibitoren nur marginal (Abbildung 3.15).

Abbildung 3.16 zeigt die Ergebnisse des Zelltoxizitätsscreens der Zelllinien mit oder ohne Sekundärmutation bei gleichzeitig vorhandener, identischer Mutation innerhalb der Kinasedomäne.

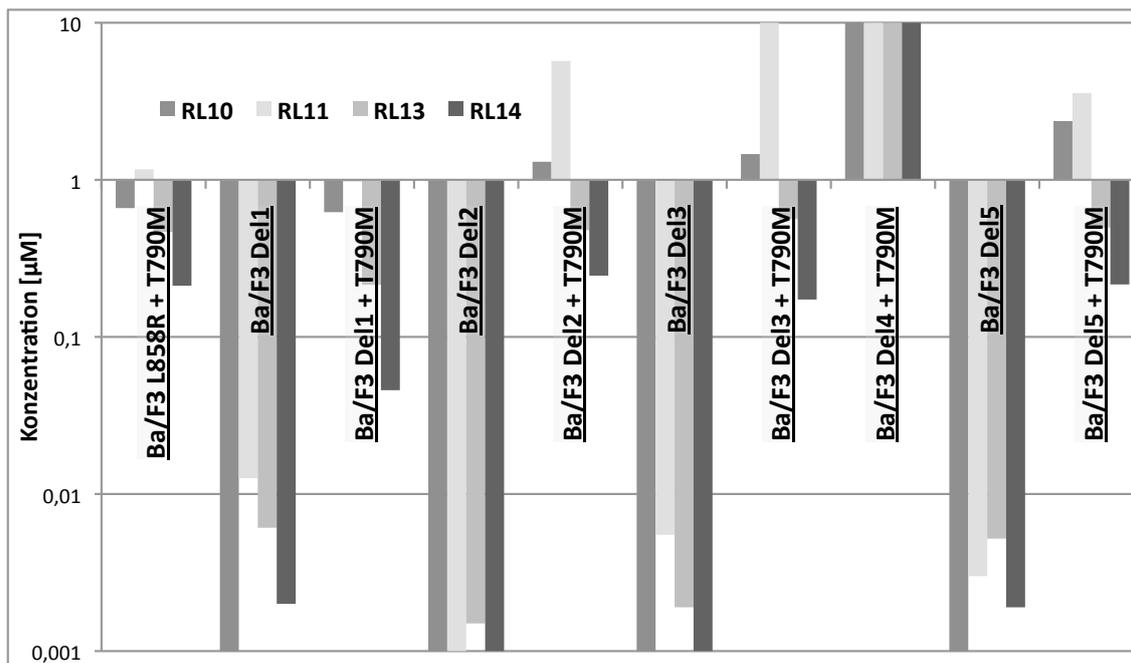


Abbildung 3.16 GI₅₀ Werte der Ba/F3 Zelllinien mit Sekundärmutation nach Behandlung mit den irreversiblen Inhibitoren RL11, RL10, RL 13 und RL14

Dargestellt sind Ergebnisse der Zelltoxizitätsscreens. Auf der Ordinate sind logarithmisch die Konzentrationen der Inhibitoren RL10 (hell grau), RL11 (dunkel grau), RL13 (weiß), RL14 (schwarz) aufgetragen. Auf der Abszisse sind die Ba/F3 Zelllinien aufgeführt.

Die Abbildung 3.16 belegt, dass unter den sekundär mutierten Zelllinien die Linien Del4 + T790M die einzige Zelllinie ist, die für alle vier getesteten irreversiblen Inhibitoren einen resistenten Verlauf aufweist (GI₅₀-Werte für alle Inhibitoren >10µM). Die untersuchten Ba/F3 Zelllinien sind insgesamt wenig sensitiv gegenüber dem Inhibitor RL11 (GI₅₀- RL11: Ba/F3 Del2 + T790M: 5,7069µM; Ba/F3 Del3 + T790M: >10µM). Die Inhibitoren RL13 und RL14 erweisen sich (bis auf die erwähnte Ausnahme Ba/F3 Del4 + T790M) als potente Inhibitoren in Zelllinien mit Sekundärmutation, so dass sich erneut eine Überlegenheit im Vergleich zu den reversiblen Inhibitoren abzeichnet. Dennoch stellt offensichtlich die T790M Mutation auch für die irreversiblen Inhibitoren eine sterische Behinderung dar, da solche Zelllinien mit identischer somatischer Mutation aber ohne T790M signifikant niedrigere GI₅₀- Werte aufweisen, als solche mit T790M, vergleiche:

Ba/F3 Del1: GI₅₀-RL13: 0,0061µM; GI₅₀-RL14: 0,002µM

Ba/F3 Del1+T790M: GI₅₀-RL13: 0,2148µM; GI₅₀-RL14: 0,0458µM

Ba/F3 Del5: GI₅₀-RL13: 0,0052µM; GI₅₀-RL14: 0,0019µM

Ba/F3 Del5+T790M: GI₅₀-RL13: 0,4966µM; GI₅₀-RL14: 0,2158µM

RL13 und vor allem RL14 inhibieren mit einer Ausnahme (vergleiche auch Abbildung 3.16), der Zelllinie Ba/F3 EGFR Del4 + T790M, das Wachstum von Zellen mit Sekundärmutation im nanomolaren Bereich (GI₅₀<1µM). Allerdings zeigen diese Ergebnisse erneut, dass keiner dieser irreversiblen Inhibitoren für alle Mutationen der potenteste Inhibitor ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass vielmehr jede einzelne Mutation für sich genommen individuell betrachtet und der Wirkmechanismus in Bezug auf einen bestimmten Inhibitor stets isoliert bezogen auf spezifische Mutationen bewertet werden muss.

Im Falle der reversiblen Inhibitoren RL45, RL49, und RL51 mit Substituenten höhere Elektrophilie als Gefitinib wurden ebenfalls Zelltoxizitätsexperimente durchgeführt (siehe Abbildung 3.17).

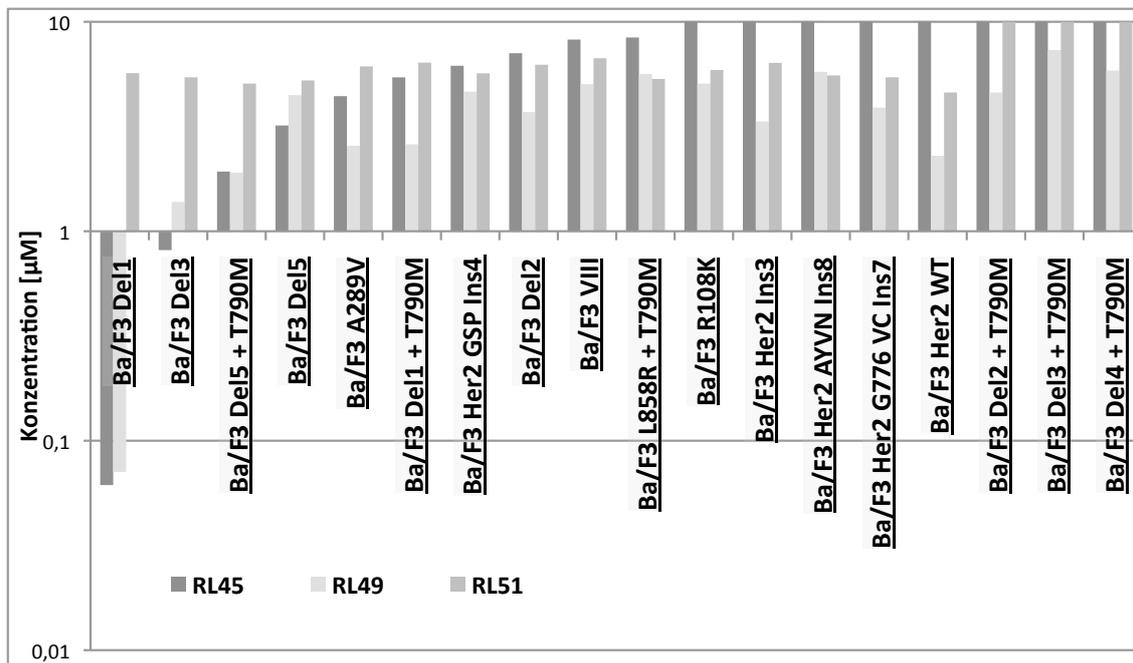


Abbildung 3.17 GI₅₀ Werte von Ba/F3 Zelllinien nach einer Behandlung mit den Inhibitoren RL45, RL49 und RL51

Dargestellt sind Ergebnisse der Zelltoxizitätsscreens. Auf der Ordinate sind logarithmisch die Konzentrationen der Inhibitoren RL45 (dunkel grau), RL51 (dunkel grau) und RL49 (hell grau) aufgetragen. Auf der Abszisse sind ausgewählte NSCLC und Ba/F3 Zelllinien aufgeführt.

Trotz Integration elektrophiler Substituenten an das Gefitinib Grundgerüst (RL45) oder die Verwendung eines Chinolin Grundgerüst bei erhaltenem reversiblen Inhibitionsmechanismus, vermögen diese Inhibitoren einheitlich Zellen mit einer T790M Sekundärmutation nicht zu inhibieren (GI_{50} -Werte $>5\mu\text{M}$). Eine Ausnahme für reversible Inhibitoren stellt allerdings erneut auch nach diesen Ergebnissen nur die Ba/F3 Zelllinie Del1 + T790M dar, die nach einer Behandlung mit den Inhibitoren RL7 und RL50 intermediäre Sensitivität aufweisen (vergleiche Abbildung 3.17). Grundsätzlich bleibt unter den reversiblen Inhibitoren RL50 bei den Zelllinien mit T790M der potenteste, auch in Zusammenschau mit Gefitinib (Daten nicht gezeigt). Insbesondere Zelllinien mit Mutationen der Ektodomäne (Ba/F3 A289V, Ba/F3 R108K und Ba/F3 VIII), die gleichermaßen unter der Behandlung mit reversiblen und irreversiblen Inhibitoren durchgängig ein Ansprechen im nanomolaren Bereich zeigten (vgl. Abbildung 3.14, Abbildung 3.16), liegen die GI_{50} Werte bei diesen Inhibitoren über $1\mu\text{M}$. Man erkennt in der logarithmischen Darstellung der GI_{50} Werte, dass ausschließlich eine der gezeigten Zelllinien (Ba/F3 Del1) und dabei ausschließlich für die reversiblen Inhibitoren RL45 und RL49 einen sensitiven Verlauf mit einem GI_{50} Wert von unter $1\mu\text{M}$ aufweist (vgl. Abbildung 3.17). Bei den *EGFR* mutierten Linien ohne T790M Mutation nimmt der Inhibitor RL7 zusammenfassend vielfach die potenteste Stellung ein (Abbildung 3.17). Zudem unterscheiden sich im Falle des Inhibitors RL49 die Zelllinie H1975 in ihrem Ansprechen signifikant ($GI_{50}=3,48\mu\text{M}$) von der vom Mutationsstaus identischen Zelllinie Ba/F3 L858R + T790M ($GI_{50}=5,64\mu\text{M}$). Diese unterschiedliche Empfindlichkeit zweier Zelllinien mit identischem *EGFR*-Status wurden in den Etablierungsexperimenten für Gefitinib und RL1 (vgl. Abbildung 3.8) nicht nachgewiesen, was deshalb hier im Falle dieser reversiblen Inhibitoren mit Seitengruppen höherer Elektrophilie auf geringe Targetspezifität schließen lässt.

Zusammenfassend weisen die Inhibitoren RL45, RL49 und RL51 im Vergleich zu den bisher gezeigten reversiblen und irreversiblen Inhibitoren die geringste Hemmwirkung in dem getesteten Zelllinienkollektiv auf.

3.5 Western Blot Analysen

Um genetische Veränderungen im *EGFR* Gen als Ziel für eine Hemmung der Aktivität des entsprechenden Proteins durch die neu synthetisierten Inhibitoren zu validieren, wurden Western Blots angefertigt und somit verschiedene Proteine der Signalkaskade und deren Veränderung, z.B. durch Phosphorylierung, nachgewiesen. Dargestellt werden exemplarisch ausgewählte Western Blot Analysen mit den neu synthetisierten Inhibitoren.

Der irreversible Inhibitor RL1 geht aus den Zelltoxizitätsscreens als einer der potentesten Inhibitoren hervor. Insbesondere Zellen mit Mutationen innerhalb der Kinasedomäne wie beispielsweise die Zelllinie PC9 werden bereits bei niedrigen Konzentrationen mit einem GI_{50} -Wert für die PC9 von $0,0023\mu\text{m}$ inhibiert. Dies lässt sich in den Western Blot Analysen belegen, da bereits bei dem Konzentrationsschritt $0,01\mu\text{m}$ keine Phosphorylierung des EGFR bzw. AKT Proteins nachweisbar ist (Vergleiche Abbildung 3.18)

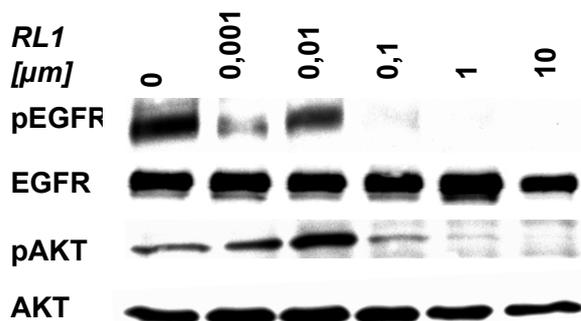


Abbildung 3.18 Western Blot Analysen der Zelllinie PC9 nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL1

Die Zellen wurden kongruent zu den entsprechenden Konzentrationsschritten der Viabilitätsassays mit dem reversiblen Inhibitor RL1 behandelt und anschließend die Proteinlevels von EGFR, phosphoryliertem EGFR, AKT und phosphoryliertem AKT mit Hilfe von Antikörpern im Western Blot bestimmt.

Einen besonderen Stellenwert haben die Irreversiblen Inhibitoren und hier insbesondere RL1 bezüglich der Zelllinien mit Sekundärmutation. RL1 vermag in den Zelltoxizitätsassays im Vergleich zu seinem reversiblen Gegenpart RL6 Zelllinien mit der Sekundärmutationen T790M (z.B. die Zelllinie

H1975) im sensitiven Bereich zu inhibieren. Dies lässt sich ebenfalls in den Westernblots anhand der Proteinlevels bestätigen.

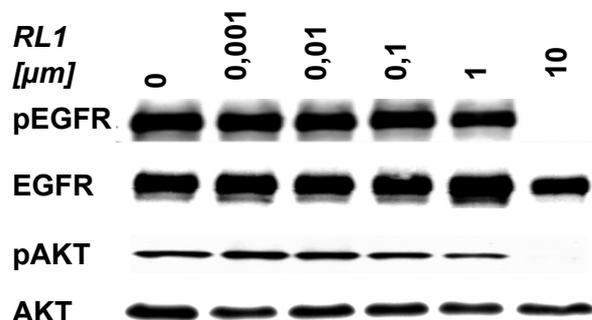


Abbildung 3.19 Western Blot Analysen der Zelllinie H1975 mit der Sekundärmutation T790M nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL1

Die Zellen wurden kongruent zu den entsprechenden Konzentrationsschritten der Viabilitätsassays mit dem reversiblen Inhibitor RL1 behandelt und anschließend die Proteinlevels von EGFR, phosphoryliertem EGFR, AKT und phosphoryliertem AKT mit Hilfe von Antikörpern im Western Blot bestimmt .

RL1 inhibiert das Wachstum der Zelllinie H1975 (Mutation L858R und T790M) in den Zelltoxizitätsscreens mit einem GI₅₀-Wert von 0,8128µm, übereinstimmend ist in der Western Blot Analyse keine Phosphorylierung der Proteine EGFR und AKT nachweisbar bei einer Konzentration von 10µm (Abbildung 3.19).

Auch für den irreversiblen Inhibitor RL3 können die Ergebnisse aus dem Zelltoxizitätsassay (HCC4006: GI₅₀: 0,0047µm) bestätigt werden.

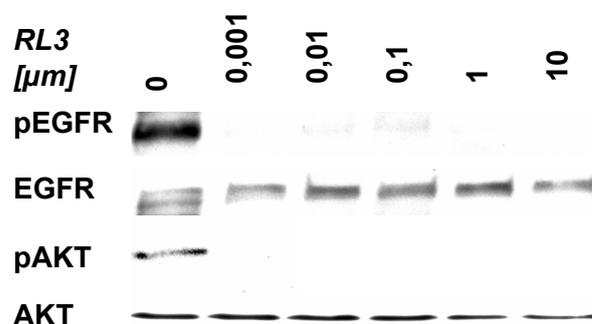


Abbildung 3.20 Western Blot Analysen der Zelllinie HCC4006 nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL3

Die Zellen wurden kongruent zu den entsprechenden Konzentrationsschritten der Viabilitätsassays mit dem reversiblen Inhibitor RL1 behandelt und anschließend die Proteinlevels von EGFR, phosphoryliertem EGFR, AKT und phosphoryliertem AKT mit Hilfe von Antikörpern im Western Blot bestimmt .

Bereits bei einer Konzentration von 0,001 μ m ist kein phosphoryliertes EGFR und AKT mehr nachweisbar. Somit wird auch für den Inhibitor RL3 mutiertes EGFR als Target validiert.

Der irreversible Inhibitor RL2 stellte in den Zelllinien Screens eine Besonderheit dar, da RL2 auch solche Zelllinien inhibiert, die auf eine Behandlung mit ERBB Inhibitoren nicht ansprechen dürften (A549, H1650). Die Zelllinie H1650 wird durch keinen der verwendeten Inhibitoren im sensitiven Bereich inhibiert. Dies ist wie bereits erwähnt durch einen homozygoten Verlust eines Teils des *PTEN* Gens begründet. Dies setzt die Effektivität der EGFR-Hemmung herab und führt zu einer erhöhten Zellteilung unabhängig von einer EGFR-Hemmung [67, 81]. RL2 bildet die einzige Ausnahme mit einem GI₅₀-Wert von 0,169 μ m.

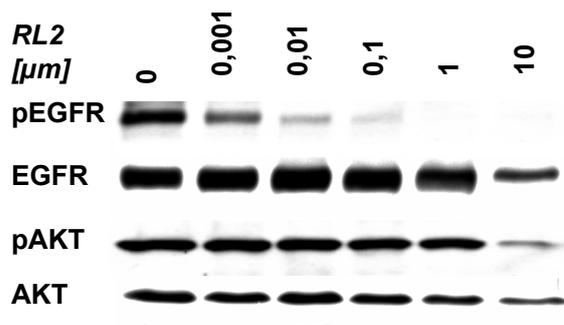


Abbildung 3.21 Western Blot Analysen der Zelllinie H1650 nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL2

Die Zellen wurden kongruent zu den entsprechenden Konzentrationsschritten der Viabilitätsassays mit dem irreversiblen Inhibitor RL3 behandelt und anschließend die Proteinlevels von EGFR, phosphoryliertem EGFR, AKT und phosphoryliertem AKT als Kontrolle mit Hilfe von Antikörpern im Western Blot bestimmt

In der Western Blot Analyse zeigt sich, dass die Protein-Level für phosphoryliertes EGFR ab einer Konzentration von 0,001 μ m kontinuierlich abnehmen und ab einem Wert von 1 μ m nicht mehr nachweisbar sind. Somit kann man davon ausgehen, dass RL2 mutiertes EGFR inhibiert. Die Protein Level für phosphoryliertes AKT hingegen bleiben über alle Konzentrationsschritte konstant. Dies ist dadurch erklärt, dass der Verlust von PTEN zu einer von EGFR unabhängigen Aktivierung des EGFR nachgeschalteten AKT-Signalweges führt und lässt sich somit im Western Blot

bestätigen. Dennoch muss bei dem Inhibitor RL2 von einer allgemeinen Zelltoxizität ausgegangen werden. Er inhibiert zwar nachweislich EGFR, allerdings sind die Ergebnisse der Zelltoxizitätsscreens am ehesten durch Off Target Effekte zu erklären.

Zusammenfassend werden die Ergebnisse aus den Viabilitätsassays in den Western Blot Analysen bestätigt.

4 Diskussion

4.1 Gezielte Therapie von NSCLC Tumoren

Die im Laufe der Tumorgenese erworbenen genetischen Veränderungen wie Mutationen, Deletionen oder Amplifikationen von Genen, die physiologisch an der Regulation von Wachstum und Apoptose der Zellen beteiligt sind, führen zur Deregulierung von Signalkaskaden, die das Wachstum, die Teilung und Differenzierung von Zellen kontrollieren. EGFR Mutationen oder Amplifikationen führen zu gesteigerter Kinaseaktivität bei NSCLC Patienten. Das Überleben der Tumorzelle wird von dem Onkogen direkt abhängig. Somit rückte die Inhibition von mutiertem EGFR in den Mittelpunkt der Wirkstoffforschung bei NSCLC Patienten. In der gezielten oder personalisierten Krebstherapie wird versucht, die erhöhte Teilungsaktivität der Zielzelle direkt oder indirekt am genetisch veränderten Protein mit niedermolekularen Inhibitoren zu unterdrücken. In der Behandlung von NSCLC wurde 2003 zunächst der reversible ATP-kompetitive EGFR-Inhibitor Gefitinib (Iressa®) und 2005 ein weiterer, Erlotinib (Tarceva®) eingeführt, die spezifisch die Aktivität von mutierten EGFR hemmen. Es konnte gezeigt werden, dass die gezielte Behandlung von EGFR mutierten Lungenkarzinomen mit EGFR-Inhibitoren das progressionsfreie Überleben der Patienten signifikant verlängern kann [55, 57, 73]. Allerdings verlieren diese Medikamente ähnlich wie bei anderen Therapeutika im Laufe der Behandlung ihre Wirkung. In etwa der Hälfte der Patienten liegt im Falle eines Rezidivs die Sekundärmutationen T790M vor [48, 76]. Nun stellt sich die Frage, ob niedrige Ansprechraten auf Grund der T790M Mutation mit EGFR Inhibitoren der 2. Generation, irreversiblen Inhibitoren, durchbrochen werden können. Das Beleuchten dieser Frage ist Ausgangspunkt dieser Arbeit.

4.2 Zelltoxizitätsscreen mit Zelllinien aus Primärtumoren und Ba/F3 Zellen

4.2.1 Wirkung von Gefitinib in Zelllinien mit EGFR Mutationen und mit der Resistenzmutation T790M

Zunächst wurden NSCLC Zelllinien mit unterschiedlichen EGFR Mutationen untersucht, um die differentielle Aktivität von reversiblen EGFR-Inhibitoren zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass alle Zelllinien, die ausschließlich einer Primärmutation im EGFR Gen tragen auf die dosisabhängige reversible Inhibition von mutiertem EGFR mit Gefitinib ansprechen ($GI_{50} < 0,05 \mu M$; siehe Abbildung 3.1). Die Ergebnisse sind deckungsgleich mit denen weiterer Arbeitsgruppen und korrelieren ebenfalls mit klinischen Ansprechraten bei positivem, spezifischem Mutationsstatus [57]. Ausgenommen für positive Ansprechraten gegenüber Gefitinib sind erwartungsgemäß aufgrund der T790M die Zelllinien H1975 und H820 ($GI_{50} > 10 \mu M$) (Abbildung 3.2). Die Ergebnisse belegen, dass weder die Primärtumorzelllinien mit der Sekundärmutation noch im Verlauf der Experimente die getesteten Ba/F3 Zelllinien mit der T790M Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Gefitinib aufweisen (alle GI_{50} -Werte $> 10 \mu M$; siehe auch Abbildung 3.2). Der Aktivitätsverlust ist wie bereits erläutert ursächlich mit der Mutation zu begründen, da sie durch den Austausch der beiden Aminosäuren eine sterische Behinderung für die Bindung von Gefitinib mit sich bringt, das Anbinden wird durch die Seitenketten von Gefitinib erschwert, zudem ist deren Elektrophilie nicht ausreichend die Bindung einzugehen [92]. Aus diesem Grund wurde diese elektrophile Seitengruppe bei der Synthese neuer Inhibitoren in den Fokus gerückt und damit deren Elektrophilie verändert beziehungsweise verstärkt (Siehe Material und Methoden; Abbildung 2.1 bis 2.15).

4.2.2 Konzept des Zelltoxizitätsscreens

Die Zelllinie A549, die keine EGFR Mutation aber eine KRAS Mutation aufweist, wurde in allen Experimenten als Kontrolle mitgeführt und zeigte entsprechend den Erwartungen bezüglich ihres Mutationsstaus in den

zellulären Vitalitätsassays keine Sensitivität ($GI_{50} > 10 \mu\text{M}$), weder nach Behandlung mit einem reversiblen EGFR Inhibitor noch nach Behandlung mit irreversiblen EGFR-Inhibitoren. Die Ausnahme bildet der Inhibitor RL2 ($GI_{50} > 3,1623 \mu\text{M}$) (siehe Diskussion 4.2.6 und Abbildung 3.11). Neben dem Argument der Integration eines Wildtyprezeptors in das Zelllinienkollektiv wurde die Linie A549 als Kontrolle ausgewählt, da sie eine Mutation im KRAS Gen aufweist. KRAS kodiert für ein Protein welches für die Zellteilung mitverantwortlich ist. Mutationen werden bei circa 20–30% der Patienten mit NSCLC nachgewiesen, schließen das gleichzeitige Vorhandensein von EGFR Mutationen aus und gehen mit Resistenzen gegenüber EGFR-Inhibitoren einher [68].

Demzufolge war das Mitführen der Zelllinie A549 für die Beurteilung der Ergebnisse aus den Zelltoxizitätsscreens wichtig, um toxische Nebeneffekte der neu synthetisierten Inhibitoren ausschließen und die Spezifität dieser Inhibitoren besser einschätzen zu können (siehe Diskussion 4.2.6; Off Target Effekte).

4.2.3 Differentielle Aktivität von EGFR-Inhibitoren in Ba/F3 EGFR Modellen

Für die Integration von Ba/F3 Zellen in den Zelltoxizitätsscreen waren unter anderem die Ergebnisse aus den Experimenten mit der Zelllinie H1650 ausschlaggebend. Trotz positivem EGFR Mutationsstatus und ohne vorhandene Sekundärmutation konnte mit dem reversiblen Inhibitor Gefitinib keine ($GI_{50} > 10 \mu\text{M}$) bzw. nach Behandlung mit dem irreversiblen Inhibitor RL1 nur ein GI_{50} -Wert von $6,38 \mu\text{M}$ erzielt werden (Abbildung 3.1 und 3.4). Somit ist nicht ausschließlich das Vorhandensein und isolierte Betrachten von EGFR Mutationen in Primärtumorzelllinien ausschlaggebend, da die Wachstumsinhibierung dieser Zellen mit TKIs auch unabhängig von mutiertem EGFR durch weitere potentielle Veränderungen im nachgeschalteten Signalweg abgeschwächt bzw. verändert werden kann. In den Ba/F3 Zellen hingegen ist das Überleben der Zellen nachgewiesenermaßen ausschließlich von EGFR abhängig. Durch die Integration der Ba/F3 Zellen, die jeweils definierte genetische Veränderungen im EGFR Gen tragen, können Einflüsse von

veränderten Proteinen in EGFR-nachgeschalteten Signalwegen ausgeschlossen werden. Für diese Arbeit war dieser Ansatz entscheidend, da genau der isolierte Effekt von Veränderungen im EGFR Gen in Bezug auf eine Kollektion neu synthetisierter Inhibitoren untersucht werden sollte. Zudem bieten die Ba/F3 Zellen ein Modell, mit denen man alle und zudem in ausreichender Anzahl beliebig viele Mutationen abbilden kann.

Um die Ba/F3 Zelllinien als valides Modell zu etablieren wurden solche mit identischem EGFR Mutationsstaus mit solchen aus Primärtumorzelllinien in den Zelltoxizitätsscreen integriert. Es zeigte sich, dass die Ba/F3 Zelllinien mit L858R und T790M Mutationen ähnlich wie die Primärzelllinie H1975 mit gleichem Mutationsprofil resistent sind nach einer Behandlung mit Gefitinib (GI_{50} Werte $>10\mu\text{M}$) und nach der Behandlung mit RL1 keine signifikant unterschiedlichen GI_{50} Werte liefern (H1975: GI_{50} : $0,8128\mu\text{M}$ und Ba/F3 LTM: GI_{50} : $0,6902\mu\text{M}$) (vergleiche Konfidenzintervalle Abschnitt 3.3 und Abbildung 3.8). Nach diesen Ergebnissen der Validierungsexperimente wurden die Ba/F3 Zelllinien in den Zelltoxizitätsscreen integriert.

4.2.4 Untersuchung neuer ATP kompetitiver Inhibitoren mit elektrophilen Substituenten

Um die Problematik der sterischen Behinderung durch Sekundärmutationen und potentielle Möglichkeiten diese zu durchbrechen zu untersuchen, sollten zunächst neben RL1 weitere sechs irreversible Inhibitoren: RL2, RL3, RL10, RL11, RL13, RL14, sowie die reversiblen EGFR-Inhibitoren RL6, RL7 und RL50, die mit unterschiedlichen Elektrophilen substituiert waren in die Kollektion aufgenommen werden. Alle neu synthetisierten Inhibitoren sind vom Grundgerüst ähnlich strukturiert, mit einem Anilin und Chinazolin oder Chinolin Ring (siehe Abbildung 2.1 und 2.2), variieren aber in ihrem Bindemechanismus durch unterschiedliche elektrophile Substituenten (siehe Abbildungen 2.3 bis 2.15). Hervorzuheben ist, dass RL1 bis auf eine Doppelbindung innerhalb der Seitengruppe, die RL1 dadurch irreversibel binden lässt identisch ist mit RL6 (reversibel). Ebenso verhält es sich mit RL3 (irreversibel) und RL7 (reversibel). RL50 besitzt im Vergleich zu RL3 ein

Kohlenstoff im Grundgerüst (Chinolin Grundgerüst), RL3 an gleicher Stelle ein Stickstoff (Chinazolin Grundgerüst). So lassen sich für diese Inhibitorenpaare direkte Vergleiche zwischen irreversiblen und reversiblen Inhibitoren anstellen.

Für die irreversiblen Inhibitoren wird durch die an Gefitinib angelehnte Grundstruktur und dadurch ähnlicher Bindemodalitäten die reaktive Gruppe in eine optimale Position zum Cystein an Position 797 gebracht mit dem Ziel die Thiol-Gruppe (R-SH) wie eingangs bereits beschrieben zu alkylieren. Diese Bindung ist dadurch irreversibel und stört das katalytische Gleichgewicht zwischen ATP und Kinase dauerhaft. Sie entsteht durch einen elektrophilen Angriff der reaktiven Gruppe (Michael Akzeptor = Acrylamid) des Chinazolinrings. Dadurch kommt es über eine kovalente Bindung zur Alkylierung des Cystein797 in der ATP Bindetasche. Eine Dissoziation des Enzym-Inhibitor Komplexes ist anders als bei den reversiblen Inhibitoren nicht mehr möglich mit dem Ziel das Onkogen dauerhaft zu inaktivieren. Die Bindung der irreversiblen Inhibitoren an den Rezeptor mit T790M Mutation könnte durch die gleiche Grundstruktur wie Gefitinib ebenfalls erschwert sein, da die sterische Behinderung aber durch irreversible Bindung nur einmalig überwunden werden muss, ergibt sich ein Vorteil gegenüber Gefitinib. Je elektrophiler ein Substituent ist, also umso reaktiver bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Inhibitor eine schnellere nicht aber zwangsläufig eine festere Bindung eingeht, da die Alkylierung der schwefelhaltigen Seitengruppe in jedem Fall irreversibel ist. Je elektrophiler die Gruppen, desto schneller erfolgt also die Bindung. Zunächst wurden dann Primärtumor Zelllinien mit RL1 und Gefitinib behandelt. Hier zeigte sich für manche Mutationen eine Überlegenheit des Inhibitors RL1. Insbesondere solche Zelllinien mit Sekundärmutation reagieren im Gegensatz zu Gefitinib unter einer Behandlung mit RL1 mit GI_{50} -Werten im mindestens intermediär sensitiven Bereich (H1975: GI_{50} -Gefitinib: 10 μ M versus GI_{50} -PD168393: 0,8128 μ M; H820: GI_{50} -Gefitinib: 10 μ M versus GI_{50} -PD168393: 2,014 μ M (siehe auch Abbildung 3.7)). Auch für manche Zelllinien mit Mutationen innerhalb der Kinasedomäne (PC9: GI_{50} -Gefitinib: 0,033 μ M versus GI_{50} -PD168393: 0,002 μ M) ist der irreversible Inhibitor überlegen, jedoch zeichnen sich ebenso nahezu identische Verläufe ab, wie

beispielsweise bei den Zelllinien HCC2935: GI_{50} -Gefitinib: $0,0332\mu\text{M}$ versus GI_{50} -PD168393: $0,039\mu\text{M}$ oder HCC827: GI_{50} -Gefitinib: $0,014\mu\text{M}$ versus GI_{50} -PD168393: $0,018\mu\text{M}$. In nur einem Fall liefert Gefitinib hingegen niedrigere GI_{50} Werte als RL1 (H2355: GI_{50} -Gefitinib: $0,0241\mu\text{M}$ versus GI_{50} -PD168393: $0,073\mu\text{M}$). Obwohl also RL1 in vielen Beispielen wirksamer ist als Gefitinib, kann folglich dennoch nicht davon ausgegangen werden, dass RL1 grundsätzlich der potentere Inhibitor ist. Dennoch ist die Wirksamkeit deutlich höher in T790M Zelllinien. Nach diesen ersten vergleichenden Ergebnissen und den darauf folgenden Etablierungsexperimenten (siehe Punkt 3.3 Ba/F3 Zellen und ihre Validität als Zelllinienmodell und 3.4. Interexperimentelle Vergleichbarkeit der Ergebnisse) wurden neben den Primärtumorzelllinien nun Ba/F3 Zelllinien und zudem weitere reversible und irreversible Inhibitoren in die Experimente mit einbezogen.

Besonderheit des Inhibitors RL6 ist wie bereits erwähnt die hohe strukturelle Ähnlichkeit zu RL1, da sich ausschließlich die Seitengruppe durch eine Doppelbindung unterscheidet. Dies ist bewusst gewählt, da man so den unterschiedlichen Effekt der beiden Bindungsmodalitäten – reversibel versus irreversibel - direkt vergleichen kann. Der reversible Inhibitor RL6 weist wie Gefitinib insgesamt eine gute Aktivität in Zelllinien mit aktivierenden EGFR Mutationen auf. Ausnahmen bilden insbesondere auch im Vergleich zu RL1 Zelllinien mit Mutationen der Ektodomäne (zum Beispiel Ba/F3 EGFR VIII: GI_{50} -RL6: $1,6331\mu\text{M}$ versus GI_{50} -PD168393: $0,0019\mu\text{M}$ und Ba/F3 EGFR Y764D: GI_{50} -RL6: $1,5241\mu\text{M}$ versus GI_{50} -PD168393: $0,0023\mu\text{M}$) und Zelllinien mit Her2 Mutation (zum Beispiel: Ba/F3 Her2 Ins3: GI_{50} -RL6: $2,0184\mu\text{M}$ versus GI_{50} -PD168393: $0,00125\mu\text{M}$), in diesen Fällen ist der Inhibitor RL1 deutlich überlegen. Bei Zelllinien mit Sekundärmutation, die im Fokus der Betrachtung zwischen reversiblen und irreversiblen Inhibitoren stehen zeigt RL6 im Vergleich zu seinem irreversiblen Gegenstück RL1 keine Aktivität. Keine der Zelllinien mit T790M Mutation wird durch eine Behandlung mit RL6 inhibiert (alle GI_{50} -Werte $>10\mu\text{M}$). Als ein Beispiel sei die Zelllinie H3255 (L858R) genannt mit einem GI_{50} -Wert für RL6 von $0,1164\mu\text{M}$. Sobald die gleiche Mutation in Kombination mit der Sekundärmutation T790M auftritt wie bei der Zelllinie

H1975 (L858R und T790M) oder Ba/F3 L858R + T790M wird das Onkogen nicht mehr inhibiert, der GI_{50} Wert liegt bei $>10\mu\text{m}$. Folglich führt das Vorhandensein der T790M trotz der Integration eines elektrophileren Substituenten an den reversibeln Inhibitor RL6 ebenso wie unter Gefitinib zu einem absoluten Aktivitätsverlust. Anders bei RL1, welcher auch eben genannte Zelllinien mit Sekundärmutation zu inhibieren vermag. Die irreversible Bindung von RL1 ist dem strukturell identischen Inhibitor RL6 mit reversiblen Mechanismus überlegen, insbesondere bei Zelllinien mit Mutationen der Ektodomäne und T790M-Mutation.

Im Anschluss an die vielversprechenden Ergebnisse mit RL1 vor allem in Bezug auf sekundär-mutierte Zelllinien wurde im Verlauf der Experimente der ebenfalls irreversible Inhibitor RL3 eingeführt. Im direkten Vergleich zwischen RL1 und RL3 bleibt RL1 der potentere Inhibitor, insbesondere erneut mit Blick auf Zelllinien mit T790M Mutation (H1975: GI_{50} -PD168393: $0,013\mu\text{M}$ versus GI_{50} -RL3: $2,1928\mu\text{M}$; H820: GI_{50} -PD168393: $2,014\mu\text{M}$ versus GI_{50} -RL3: $3,7757\mu\text{M}$; Ba/F3 L858R + T790M: GI_{50} -PD168393 $0,6902\mu\text{M}$ versus GI_{50} -RL3: $1,2246\mu\text{M}$) (siehe Abbildung 3.10). RL3 konnte im Vergleich zu RL1 keine GI_{50} -Werte $<1\mu\text{m}$ erzielen. Im Vergleich zu dem Aktivitätsniveau von Gefitinib und RL6 (alle GI_{50} -Werte für sekundär-mutierte Zelllinien $>10\mu\text{m}$) ist allerdings auch RL3 als Irreversibler Inhibitor unübertroffen. Aus diesem Grund sollte zudem entlang des Beispiels RL1 versus RL6 nun auch für RL3 ein Inhibitor mit identischer Strukturformel aber reversiblen Bindemechanismus synthetisiert werden (RL7) um auch in diesem Fall erneut direkte Vergleiche zwischen beiden Bindemechanismen anstellen zu können. Auch hier differieren die beiden Inhibitoren nur durch eine zusätzliche Doppelbindung innerhalb der elektrophilen Seitengruppe, die wiederum den Bindemechanismus ergeben. Für alle getesteten Zelllinien erreicht RL3 niedrigere GI_{50} -Werte als RL7, sowohl innerhalb der Gruppe mit somatischen Mutationen (zum Beispiel HCC4006: GI_{50} -RL3: $0,0047\mu\text{M}$ GI_{50} -RL7: $0,02581\mu\text{M}$) und insbesondere bei T790M – Zelllinien, die alle ausnahmslos resistente Verläufe unter RL7 nehmen (GI_{50} -Werte $>10\mu\text{m}$). Somit kann auch innerhalb dieses Inhibitor-Pärchens Überlegenheit des irreversiblen Inhibitionsmechanismus bestätigt werden.

Wenn man davon ausgeht, dass für die neuen Inhibitoren durch die an Gefitinib angelehnte Grundstruktur – das Chinazolin – Grundgerüst – auch die Problematik der Resistenzentstehung mit übernommen wird oder bestehen bleibt, schien es sinnvoll neben veränderten elektrophilen Seitengruppen auch ein weiteres Grundgerüst zu verwenden. Dieses ist zunächst für den ersten Schritt der Bindung an die Kinasedomäne verantwortlich, indem es die Seitengruppen in die optimale Position bringt damit diese eine Bindung an den Rezeptor eingehen können. Vor diesem Hintergrund wurden die Inhibitoren RL49, RL50 und RL51 synthetisiert. Der Inhibitor RL50 zeigt eine Besonderheit, da er bis auf das veränderte Grundgerüst – ein Chinolin Ring – die identische Struktur besitzt wie RL7. Die Seitengruppen der Inhibitoren sind identisch, der Inhibitionsmechanismus für beide ebenfalls gleich. Die Ergebnisse zeigen, dass der Inhibitor bei allen getesteten Zelllinien mit Mutationen der Ektodomäne eine deutlich geringere Potenz aufweist (zum Beispiel Ba/F3 A289V: GI_{50} -RL7: $0,0708\mu\text{M}$ versus GI_{50} -RL50: $1,8113\mu\text{M}$; Ba/F3 R108K: GI_{50} -RL7: $0,1702\mu\text{M}$ versus GI_{50} -RL50: $1,7579\mu\text{M}$), die GI_{50} -Werte für RL50 sind $>1\mu\text{M}$ (vergleiche Abbildung 3.14). Auch in diesem Kontext wurde nun besonderes Augenmerk auf die Sekundärmutation gelegt mit der Frage ob ein verändertes Grundgerüst potentiellen Spielraum für die Umgehung der T790M bringt. Grundsätzlich erreicht der Inhibitor ebenso wie RL7 keine GI_{50} -Werte für diese Zelllinien im sensitiven Bereich, allerdings sind alle Werte niedriger als die für den Inhibitor RL7. Als markantes Beispiel sei die Zelllinie Ba/F3 L858R + T790M genannt mit folgenden Ergebnissen: GI_{50} Wert für RL50 von $2,851\mu\text{M}$, GI_{50} Wert für RL7 $>10\mu\text{M}$. Ein weiteres interessantes Zelllinienpaar bilden die Zelllinie

Ba/F3 Del3:

GI_{50} -RL7: $0,0029\mu\text{M}$ versus GI_{50} -RL50: $0,1603\mu\text{M}$ und

Ba/F3 Del3 + T790M:

GI_{50} -RL7: $5,3088\mu\text{M}$ versus GI_{50} -RL50: $2,4547\mu\text{M}$.

Bei der Zelllinie mit nur einer somatischen Mutation ist der Inhibitor RL7 mit Gefitinib Grundgerüst potenter als sein Gegenpart RL50. Sobald zu dieser Mutation die Sekundärmutation T790M hinzu kommt ist der Inhibitor RL50 mit

dem Chinolin Grundgerüst überlegen. Weitere Beispiele sind die Zelllinienpärchen

Ba/F3 Del1: GI_{50} -RL7: 0,0019 μ M versus GI_{50} -RL50: 0,1641 μ M und

Ba/F3 Del1 + T790M: GI_{50} -RL7: 1,1967 μ M versus GI_{50} -RL50: 1,1858 μ M

Sowie die Zelllinien:

Ba/F3 Del2: GI_{50} -RL7: 0,0017 μ M versus GI_{50} -RL50: 0,0877 μ M und

Ba/F3 Del2 + T790M: GI_{50} -RL7 >10 μ M versus GI_{50} -RL50: 5,559 μ M

Oder:

Ba/F3 Del5: GI_{50} -RL7: 0,0143 μ M versus GI_{50} -RL50: 0,2028 μ M und

Ba/F3 Del5 + T790M: GI_{50} -RL7: 3,6813 μ M versus GI_{50} -RL50: 2,5177 μ M

Für die getesteten Linien mit Mutationen der Kinasedomäne ist jeweils der Inhibitor RL7 mit Gefitinib-Grundgerüst eindeutig wirksamer als RL50. Kommt es aber zusätzlich zu einer Sekundärmutation ist RL50 für alle gezeigten Linien mit Sekundärmutation RL7 überlegen. Es scheint so, als wäre offensichtlich nicht ausschließlich die elektrophile Seitengruppe für die Überwindung der Sekundärmutation ausschlaggebend – denn diese ist bei diesen Inhibitorpärchen identisch - sondern auch das verwendete Grundgerüst. Dieses scheint maßgeblich für die Positionierung des Inhibitors innerhalb der ATP Bindestelle beteiligt. Die optimale Positionierung der Seitengruppe hingegen ist wichtig für die endgültige Bindung des Inhibitors innerhalb der Kinasedomäne. Wenn man also anhand der erhobenen Ergebnisse das von Gefitinib übernommene Chinazolin Grundgerüst mit einem Chinolin Grundgerüst bei gleicher elektrophiler Seitengruppe vergleicht, stellt sich die Frage, ob man nicht auch durch das Grundgerüst die sterische Behinderung, die durch die Methionin Substitution entsteht aufrecht erhält. Grundsätzlich bleibt allerdings festzuhalten, dass RL50 zwar Zelllinien mit T790M potenter inhibiert als RL7 oder Gefitinib, allerdings werden GI_{50} -Werte wie sie unter irreversiblen Inhibitoren wie RL3 (vergleiche Abbildung 3.14) und insbesondere RL1 erzielt werden nicht erreicht. In einem weiteren Setting wurden nun drei weitere ebenfalls reversiblen Inhibitoren, RL45, RL49 und RL51 in die Experimente mit einbezogen. RL45 besitzt das identische Grundgerüst wie Gefitinib, aber einen Substituenten höherer Elektrophilie, bindet allerdings trotzdem reversibel an die

Kinase. Die Inhibitoren RL49 und RL51 haben wie RL50 ein Chinolin Grundgerüst. Für die beiden Inhibitoren war interessant zu beobachten, ob die für RL50 positiv zu bewertenden Ergebnisse bezüglich der Zelllinien mit T790M Mutation mit weiteren Inhibitoren mit Chinolin Grundgerüst fortgesetzt werden können. Allerdings zeigte sowohl RL45 als auch RL49 und RL51 keine wirksame Enzyminhibition. Für keine der Zelllinien mit Sekundärmutation wurden GI_{50} -Werte $<5\mu\text{M}$ erreicht. Des Weiteren werden mit folgenden Ausnahmen, den Zelllinie Ba/F3 Del1 und den Inhibitoren RL45 und RL49 sowie der Zelllinie Ba/F3 Del3 und dem Inhibitor RL45, keine GI_{50} -Werte $<1\mu\text{M}$ erzielt. Dies betrifft sowohl Zelllinien mit Mutationen der Ektodomäne, Her2 mutierte Zelllinien als auch Zelllinien mit Mutationen innerhalb der Kinasedomäne (vergleiche Abbildung 3.17). Insofern scheint dieses Konzept nicht grundsätzlich auf zu gehen, da diese Inhibitoren deutlich hinter den Erwartungen liegen.

Nachdem im direkten Vergleich zwischen reversiblen und Irreversiblen Inhibitoren (RL1 und RL6 sowie RL3 und RL7) letztere insbesondere im Falle der T790M Mutation wirksamer waren, sollten weitere irreversible Inhibitoren (RL10, RL11, RL13, RL14) mit veränderten elektrophilen Seitengruppen im Zelltoxizitätsscreen getestet werden. Hier bestätigt sich erneut, dass solche Zelllinien mit Mutationen der Ektodomäne eine Gruppierung bilden, die von allen hier gezeigten Inhibitoren im nanomolaren Bereich inhibiert werden. Für die Inhibitoren RL10, RL11, RL13 und RL14 werden für die Zelllinien Ba/F3 A289V, Ba/F3 R108K, Ba/F3 VIII und Ba/F3 Y764D GI_{50} -Werte $<0,005\mu\text{M}$ erreicht. An dieser Stelle kann also festgehalten werden, dass die Lokalisation der Mutation, insbesondere intra- oder extrazellulär lokalisiert, offensichtlich entscheidend das Ansprechen auf eine Behandlung beeinflusst, auch unabhängig von einer Resistenzmutation. Eine Lücke zeigt sich bei dem Inhibitor RL11 und folgenden Her2-mutierten Zelllinien; Ba/F3 Her2 AYVN Ins8: GI_{50} :-RL11: $1,4454\mu\text{M}$ sowie Ba/F3 Her2 WT: GI_{50} : RL11: $1,2162\mu\text{M}$, wobei sich diese Lücke nicht einheitlich auf alle Her2 mutierten Zelllinien bezieht, da beispielsweise die Ba/F3 Her2 G776 VC INS7 einen GI_{50} : Wert: $0,0019\mu\text{M}$ und die Ba/F3 Her2 GSP Ins4 einen GI_{50} -Wert: $0,0035\mu\text{M}$ aufweist (siehe Abbildung

3.15). Erneut kann festgestellt werden, dass auch die Primärmutationen selbst ganz eigene Ansprechraten zeigen und nicht ein Inhibitor der wirksamste ist. Bei Betrachtung der Zelllinien mit T790M Mutation nimmt RL11 die schwächste Position ein. Während beispielsweise die Inhibitoren RL10, RL13 und RL14 für die Zelllinie Ba/F3 L858R + T790M GI_{50} : Werte $<1\mu\text{M}$ zeigen, beträgt er für RL11: $1,1668\mu\text{M}$. Auch RL10 scheint weniger potent zu sein, zu sehen zum Beispiel an der Zelllinie Ba/F3 Del5 + T790M mit einem GI_{50} -Wert: $2,3659\mu\text{M}$ sowie auch RL11 mit $3,5645\mu\text{M}$ bei allerdings Werten für die gleichen Zelllinien im nanomolaren Bereich für die Inhibitoren RL13 (GI_{50} : $0,4966\mu\text{M}$) und RL14 (GI_{50} : $0,2158\mu\text{M}$). Ein ähnliches Bild zeichnet sich auch bei der Zelllinie Ba/F3 Del3 + T790M ab. RL13 und RL14 sind somit am potentesten, sowohl im Bereich der Primärmutationen, als auch im Bereich der Sekundärmutation. Eine einzige Ausnahme bildet die Linie Ba/F3 Del4 + T790M, die nicht inhibiert wird und für alle Inhibitoren GI_{50} -Werte $>10\mu\text{M}$ aufweist.

Grundsätzlich kann man festhalten, dass Zelllinien mit einer T790M Mutationen im Vergleich zu den reversiblen Inhibitoren welche in solchen Zelllinien - mit einer Ausnahme - überwiegend GI_{50} -Werte $>10\mu\text{M}$ zeigen, durch die irreversiblen Inhibitoren potenter in ihrem Wachstum gehemmt werden (Abbildung 3.14 und 3.16). Diese Ausnahme für reversible Inhibitoren bildet die Zelllinie Ba/F3 EGFR Del1 + T790M. Sie zeigt zwar in den Zelltoxizitätsscreens nach Behandlung mit irreversiblen Inhibitoren GI_{50} -Werte $<1\mu\text{M}$ (GI_{50} -RL10: $0,6223\mu\text{M}$, GI_{50} -RL13: $0,2148\mu\text{M}$, GI_{50} -RL14: $0,0458\mu\text{M}$) (siehe Abbildung 3.16). Allerdings wurden für diese Ba/F3 Zelllinie Del1 + T790M auch nach Behandlung mit den reversiblen Inhibitoren RL7 und RL50 in den Zelltoxizitätsscreens zumindest intermediäre Sensitivität (GI_{50} -RL7: $1,1967\mu\text{M}$ und GI_{50} -RL50: $1,1858\mu\text{M}$) (siehe Abbildungen 3.14) ermittelt, somit stellt sie eine Ausnahme innerhalb der sekundärmutierten Zelllinien da. Auf der anderen Seite wiederum befindet sich eine Zelllinie in diesem Zelllinienkollektiv, Ba/F3 Del4 + T790M, welche weder bei reversiblen, noch bei irreversiblen Inhibitoren (RL1, RL3, RL10, RL11, RL13, RL14) sensitive GI_{50} -Werte zeigt (alle GI_{50} -Werte $>10\mu\text{M}$). Die einzige Ausnahme bildet für die Zelllinie Ba/F3 Del4 + T790M der Inhibitor RL2 mit einem GI_{50} -Wert von $5,1286\mu\text{M}$. Dies ist allerdings

am ehesten durch Off-Target Effekte zu erklären (siehe Abschnitt 4.2.6). Dies ist in Zusammenschau ein entscheidender Hinweis darauf, dass die Sekundärmutation nicht isoliert betrachtet werden sollte, sondern offensichtlich das Zusammenspiel von Primärmutationen und T790M fokussiert werden muss. Im Endeffekt würde diese Anschauungsweise im Allgemeinen eine noch detaillierte Betrachtung des Mutationsstaus und des zu wählenden Inhibitors bei Patienten erfordern. Um nähere Informationen über das Nichtansprechen aller Inhibitoren innerhalb der Ba/F3 Del4 + T790M zu erhalten und Aufschlüsse über das Zusammenwirken der somatischen und T790M Mutationen und die sich daraus ergebende Konformationsänderungen der Proteinkinase zu erhalten, sind die Zelltoxizitätsassays nicht das geeignete Mittel. Um detailliertere Erkenntnisse über das gute Ansprechen der Zelllinie Ba/F3 Del1 + T790M selbst bei reversiblen Inhibitoren zu erhalten und gleichzeitig den absoluten Aktivitätsverlust aller Inhibitoren für die Zelllinie Ba/F3 Del4 +T790M zu erklären, wären am ehesten Kristallstrukturanalysen in Komplex mit den verschiedenen Inhibitoren aussagekräftig. Mutmaßen kann man anhand der Ergebnisse nur, dass neben der Sekundärmutation vor allem auch die somatische Mutation großen Einfluss auf den potentiellen Raum für Inhibition hat.

Zusammenfassend werden Zelllinien ohne T790M Mutation in den Vitalitätsassays vor allem auch durch irreversible Inhibitoren stark in ihrem Wachstum gehemmt, insbesondere dann, wenn die Mutationen in der Ektodomäne lokalisiert sind (Abbildung 3.12, 3.14 und 3.15). Die Fähigkeit der irreversiblen Inhibitoren Zelllinien mit Sekundärmutation zu inhibieren lag trotz des Vergleichs zu reversiblen Inhibitoren dennoch hinter den Erwartungen (Abbildung 3.14 und 3.16), da es mit dem Auftreten einer T790M Mutation auch für die irreversiblen Inhibitoren zu einem relativen Aktivitätsverlust kommt. Dies wird deutlich, wenn man Zelllinien mit somatischer Mutation und identische Zelllinien mit zusätzlicher Sekundärmutation vergleicht. Hier sei noch einmal eine Gegenüberstellung zweier Zelllinien angebracht:

Ba/F3 Del1: GI₅₀:-RL13: 0,0061µM versus
Ba/F3 Del1+T790M: GI₅₀:-RL13: 0,2148µM

Ba/F3 Del1: GI_{50} :-RL14: 0,002 μ M versus
Ba/F3 Del1+T790M: GI_{50} :-RL14: 0,0458 μ M

Ba/F3 Del5: GI_{50} :-RL13: 0,0052 μ M versus
Ba/F3 Del5+T790M: GI_{50} :-RL13: 0,4966 μ M

Ba/F3 Del5: GI_{50} :-RL14: 0,0019 μ M versus
Ba/F3 Del5+T790M: GI_{50} :-RL14: 0,2158 μ M

Man erkennt an dieser Gegenüberstellung beispielhaft, dass zwar die sekundärmutierten Zelllinien im sensitiven Bereich inhibiert werden, allerdings liegen die gemessenen GI_{50} -Werte zum Beispiel für die Zelllinien Ba/F3 Del5+T790M um ein 100faches höher als bei der Zelllinie Ba/F3 Del5 ohne T790M, sowohl für den Inhibitor RL13 als auch RL14. Dies würde auch eine nicht erreichbare Dosissteigerung in der Klinik nach sich ziehen. Dieser Sachverhalt setzt sich fort bei allen getesteten Linien die bezüglich mit oder ohne T790M im Vergleich standen. Somit kann festgehalten werden, dass die T790M durch irreversible Inhibitoren zwar wirksamer inhibiert wird als durch reversible, insbesondere auch ihre direkten Gegenpaare (RL1 versus RL6 und RL3 versus RL7), allerdings bleibt ein nicht unwesentlicher Aktivitätsverlust auch für die irreversiblen Inhibitoren bestehen.

Eine Begründung könnte sein, dass die Irreversiblen Inhibitoren neben den Vorteilen der kongruenten Grundstruktur dem Chinazolin Grundgerüst - wie Gefitinib - scheinbar zunächst auch die Problematik der sterischen Behinderung durch die im Vergleich größere Aminosäure Methionin nicht zu überwinden vermögen. Dass das Grundgerüst offensichtlich entscheidenden Einfluss auf die Bindung nimmt wurde bereits an dem Beispiel der Inhibitoren RL7 (Chinazolin Grundgerüst) und RL50 (Chinolin Grundgerüst) deutlich (siehe oben). Zusätzlich zu der scheinbar auch für Irreversible Inhibitoren beständigen sterischen Behinderung und den potentiellen Nebeneffekten (siehe Abschnitt 4.2.6) ist die Affinität von ATP zu der Kinasedomäne mit T790M Mutation drastisch erhöht. Daraus resultiert, dass die gesteigerte Affinität von ATP den Rezeptor mit T790M Mutation zu binden, eine reduzierte Potenz der kompetitiven Inhibitoren bei gleicher Rezeptor-Affinität zur Folge hat. Dies gilt für alle ATP-kompetitiven Inhibitoren - unabhängig davon ob es sich um einen reversiblen oder irreversiblen Inhibitor handelt. Aus früheren präklinischen

Studien ging bisher eine große Befürwortung für irreversible Inhibitoren bei T790M assoziierten Resistenzen gegenüber Gefitinib hervor [53]. Allerdings zeigen die erhobenen Ergebnisse, insbesondere der direkte Vergleich zwischen den Ba/F3 Zellen mit und ohne T790M Mutation, dass diese Rationale zwar durch die Substitution verschiedener elektrophiler Substituenten an Inhibitoren adressiert werden kann, die Resistenzüberwindung aber wahrscheinlich nur durch klinisch unerreichbare Konzentrationen oder aber einer Kombinationstherapie erfüllt werden würde.

Weiterhin muss erwähnt werden, dass die intrazelluläre Konzentration von Kinaseinhibitoren und die zelluläre Aktivität von vielen Faktoren, wie dem Überbrücken von Zellpermeabilitätsbarrieren, Drug Efflux, Zellstoffwechsel, Konkurrenz mit ATP oder Vorhandensein von Phosphaten als endogener Antagonist der Kinaseaktivität beeinflusst werden. Die aktuelle Technik liefert keine Erkenntnisse darüber, wie groß die Kinaseaktivität tatsächlich mit der zellulären Aktivität insgesamt zusammenhängt, da zelluläre Kompensationen einer blockierten Signalkaskade durch adaptierte Signalwege nicht völlig quantifiziert werden können.

4.2.5 Off-Target Effekte

Wenngleich die zweidimensionalen Zellkulturexperimente nicht die gesamten Nebenwirkungen der niedermolekularen Therapeutika einfangen können, so können doch „Off Target“ Effekte, also Effekte die über die Inhibition des anvisierten Zielmoleküls hinausgehen gemessen werden. Nur wenige ATP kompetitive Kinase Inhibitoren sind tatsächlich spezifisch für eine einzige Kinase, da die für alle Tyrosinkinase Rezeptoren ähnliche Kinasedomäne angegriffen wird [47].

Obwohl die Zelllinie A549 keine EGFR Mutation aufweist und zudem eine KRAS Mutation, die mit TKI-Resistenz assoziiert ist, ist sie sensitiv (GI_{50} = 3,1623 μ M) gegenüber einer Behandlung mit dem irreversiblen EGFR-Inhibitor RL2, ebenso die Zelllinie H1650 (GI_{50} = 0,169 μ M) (siehe Abbildung 3.11). Diese Ergebnisse könnten als Hinweis für Off target Effekte des Inhibitors RL2 herangezogen werden. Obwohl RL2 zwar einen der elektrophilsten

Substituenten trägt, wurde dennoch zunächst erwartet, dass RL2 weniger aktiv sei, da die elektrophile Seitengruppe in der Bindung starr ist und somit die Flexibilität in der Bindung eingeschränkt ist. Dies hat sich nicht bestätigt, da RL2 unspezifisch in nahezu allen Zelllinien Aktivität aufweist (siehe Abbildung 3.11). Hinzu kommt, dass die irreversiblen Inhibitoren ganz allgemein durch die kovalente Bindung über die Alkylierung einer Thiol-Gruppe die Potenz haben mit allen Proteinen, die ein freies Schwefelatom besitzen, also einen freien Cysteinrest haben, zu reagieren. „Off Target“ Effekte waren aus diesem Grund in zwar sehr abgeschwächter Form bei nahezu allen irreversiblen Inhibitoren nachweisbar. Der Inhibitor RL2 hingegen hat von allen getesteten Inhibitoren die Seitengruppe mit der höchsten Elektrophilie, weshalb ein Anbinden an eine Tyrosinkinase besonders schnell erfolgt. Dies könnte eine Erklärung für die besonders starken beobachteten Nebeneffekte sein.

4.2.6 Uneinheitliches Ansprechen aller untersuchten Inhibitoren

Mutationen verändern die Kinase Domäne in einem solchen Ausmaß, dass die Inhibitorbindung stark beeinträchtigt sein kann [92]. Wie stark und vor allem unterschiedlich diese Konformationsänderung sein kann, zeigt sich an dem völlig uneinheitlichen Ansprechen aller behandelten Zelllinien im Bezug auf die verwendeten Inhibitoren. Es lassen sich allenfalls Tendenzen im Sinne von Inhibitor Klassen erkennen. Eine Gruppierung bilden die reversiblen Inhibitoren, darunter RL6 und RL7, die wirksam Zelllinien mit somatischen Mutationen in ihrem Wachstum hemmen, hier insbesondere auch solche mit Mutationen außerhalb der Kinasedomäne. Bei der T790M Mutation zeigt sie hingegen keine Wirkung ($GI_{50} > 10 \mu M$). Eine weitere Gruppe innerhalb der reversiblen Inhibitoren stellen RL45, RL49 und RL51 da, obwohl sie kein einheitliches Grundgerüst besitzen. Sie erreichen aber einheitlich wie bereits dargestellt bis auf die zwei oben erwähnten Ausnahmen in keiner der getesteten Zelllinien GI_{50} Werte $< 1 \mu M$, selbst nicht in Zelllinien mit Mutationen außerhalb der Kinasedomäne. RL50 nimmt durch sein Chinolin Grundgerüst innerhalb der Gruppe von reversiblen Inhibitoren eine Sonderposition ein. Die Wirkung in Zellen mit

somatischen Mutationen liegt deutlich hinter Gefitinib, RL6 oder RL7, sein direkter Gegenpart mit Chinazolingrundgerüst. Allerdings zeigt sich eine verbesserte Wirkung in solchen Zelllinien mit T790M Mutation. Hier ist RL50 eindeutig potenter als die oben genannten, erreicht die niedrigen GI_{50} -Werte der irreversibeln Inhibitoren allerdings nicht. Eine weitere große Gruppe bilden auf Grund der T790M Mutation deshalb die irreversiblen Inhibitoren. Diese Gruppierung zeichnet sich aus durch die Fähigkeit auch solche Zelllinien mit T790M Mutation mit deutlich niedrigeren Konzentrationen zu inhibieren. RL11 bezieht in diesem Bezug eine Sonderrolle, da dieser Inhibitor schwächer als die anderen Getesteten inhibiert, sowohl Zelllinien mit somatischen als auch mit T790M Mutation. Eine weitere Sonderstellung wird durch RL2 vertreten. Wie bereits erwähnt inhibiert RL2 zwar sehr wirksam Zelllinien mit T790M Mutation, allerdings auch die Zelllinien H1650 und A549 mit EGFR Wildtyp Protein und KRAS Mutation. Aufgrund der an RL2 angebrachten, äußerst elektrophilen Seitengruppe kann man von Off Target Effekten ausgehen. Diese Nebeneffekte sind aufgrund des Aufbaus der Inhibitoren – ATP kompetitiv – und der sehr homologen Kinasedomäne von Proteinkinasen nichts Unerwartetes. Neben den Inhibitoren bilden auch die Mutationen selbst eigene Fraktionen. Beispielsweise gruppieren die Mutationen der Ektodomäne, solche mit Her2 Mutationen und die Zelllinien mit T790M Mutation für die jeweils getesteten Inhibitoren.

Zusammenfassend bestehen bestenfalls die oben beschriebenen Gruppierungen von Inhibitoren oder Mutationen die ein ähnliches Ansprechverhalten zeigen. Allerdings kann grundsätzlich kein einheitliches Ansprechen eines spezifischen Inhibitors bezogen auf die verschiedenen in den Zelllinien enthaltenen EGFR Mutationen belegt werden. Es konnte nicht gezeigt werden, dass eine der eingebrachten elektrophilen Substitutionen am potentesten für alle Mutationen ist. Zudem zeigt sich auch, dass das verwendete Grundgerüst scheinbar entscheidenden Einfluss auf die Hemmung des Zellwachstums hat und für manche Zellgruppierungen im Vergleich zu anderen Inhibitoren Vor- oder aber Nachteile bringt (siehe Ergebnisse zu RL50). Die Ergebnisse zeigen somit vielmehr in welchem Ausmaß die Mutationen oder gar die Kombination von Mutationen im gleichen Gen die

Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren verändern können bis hin zu völligem Wirkungsverlust. Folglich muss also scheinbar das Augenmerk nicht auf dem Gen als Target sondern noch spezifischer auf den einzelnen Mutationen innerhalb des Gens liegen und damit dem Genprodukt, dem veränderten Enzym selbst. Die Ergebnisse deuten an, dass die verschiedenen Mutationen im EGFR Gen ganz individuelle Wirkmechanismen von Inhibitoren erfordern.

4.2.7 Ausblick

Es gibt beeinflussende Faktoren die unabhängig aber ergänzend zu den hier erhobenen Ergebnissen zur Diskussion stehen, da sie durch eine Therapie mit einem EGFR TK Inhibitor nicht adressiert werden können und somit möglicherweise zusätzlich zu dem limitierten Effekt der irreversiblen Inhibitoren beitragen. Wenn man die Komplexität der beschriebenen Signalwege ausgehend von EGFR betrachtet, kann man sich viele Interaktionen vorstellen, z.B. Veränderungen der Signalweiterleitung durch genetische Veränderungen andere Mitglieder der Erbb Familie oder von Faktoren in überlappendem Signalwegen (IGF-1R; Fibroblast Growth Receptor, PDGFR platelet-derived growth factor receptor; VEGFRs) [2, 49, 52]. Ein wichtiges Beispiel wurde im Zusammenhang mit der Resistenzentstehung im Falle der Zelllinie H1650 durch den Verlust von PTEN bereits angeführt. Trotz EGFR Mutation ist eine Hemmung des Zellwachstums abgesehen von dem Inhibitor RL2 mit keinem der verwendeten TKIs möglich. Ein weiteres Beispiel wäre die Amplifikation von MET. Ein Rezeptor der durch eine beständige Phosphorylierung von ErbB3 die Tumorzellproliferation begünstigt und in Zelllinien mit Gefitinib Resistenz überexprimiert ist. Studien belegen einen erneuten Sensitivitätsanstieg gegenüber Gefitinib, sobald die MET Kaskade spezifisch inhibiert wird [24]. Insofern wäre eine Inhibition mit Gefitinib oder allgemein gesprochen mit reversiblen ATP-kompetitiven Inhibitoren in diesen Fällen nicht ausgereizt. In etwa 20% der analysierten Tumorgewebeproben mit erworbener Gefitinib Resistenz fand sich eine MET Amplifikation mit verstärkter Aktivität des MET Proteins, in 10% der Fälle existieren MET Amplifikation und T790M Mutationen sogar nebeneinander [5]. Nachgewiesenermaßen besteht demzufolge beim

NSCLC ein enger Zusammenhang zwischen den verschiedenen Signalkaskaden. Auch eine alleinige Therapie mit einem 2. Generationsinhibitor wie sie hier angewendet wurde, der zwar an den Rezeptor mit T790M Mutation binden kann, ist unabhängig von den hier gezeigten Ergebnissen isoliert verwendet nicht zwingend sinnvoll. Die erworbene Resistenz ausgehend von der T790M Mutation könnte zwar theoretisch überwunden werden, eine gleichzeitig vorhandene Veränderung des nachgeschalteten Signalweges die Wirkung der EGFR Inhibitor aber wiederum aufheben. Eine alleinige Therapie mit zum Beispiel irreversiblen Inhibitoren wäre in diesem Fall nicht Ziel führend. Aus diesem Grund scheint bei betroffenen Patienten zunächst und im Therapie Verlauf eine genaue Analyse des Tumorgewebes mit sich einer gegebenenfalls anschließenden Kombinationstherapie sinnvoll, beispielsweise in Form einer Inhibitor eines gemeinsamen Faktors *downstream* der EGFR Signalkaskade. Weitere Mediatoren der EGFR Signalkaskade stellen bereits mögliche Ansatzpunkte einer zielgerichteten NSCLC Therapie darstellen, wie z.B. Faktoren in den Ras-Raf-MEK-MAPK oder PI3K-Akt-mTOR Signalkaskaden [56]. Phase II Studien evaluieren AZD6244, einen MEK1/2 Inhibitor. Der Inhibitor wird bei Patienten mit spezifischen Mutationen im B-Raf Gen getestet, von denen aus präklinischen Test bekannt ist, dass Zelllinien mit diesen Mutationen sensitiv gegenüber MEK Inhibitoren reagieren [26]. Keine der hier getesteten Zelllinien weist allerdings gleichzeitig eine Mutation im EGFR und im B-Raf Gen auf. Inhibitoren der PI3K-Akt-mTOR Signalkaskade werden alleine und bereits in Kombination mit EGFR Inhibitoren evaluiert. Ein mTOR und PI3K Inhibitor „XL765“ wird gemeinsam mit Erlotinib in einer Ib/II Studie erprobt und verschiedene mTOR Inhibitoren zeigen ein initiales Ansprechen in der NSCLC Therapie [35]. Es wird zudem postuliert, dass eine simultane Inhibition mehrerer genetisch veränderter Signalkaskaden, die Neoangiogenese und Zellproliferation bedingen, bereits einen großen klinischen Effekt zeigt und zudem dem Risiko der Entstehung von Resistenzen durch Sekundärmutationen vorbeugen kann, da potentielle Selektionsvorteile reduziert werden. Als Beispiel sei hier Vandetanib zu nennen, da es die Aktivität des EGFR und VEGFR Rezeptors inhibiert (drei Phase III Studien) [60]. Somit existieren neben der Entwicklung

neuer EGFR-Inhibitoren viele Strategien weitere Effektoren und Abläufe, die in Verbindung mit der EGFR Signalkaskade stehen spezifisch zu inhibieren und dadurch auch die Therapie mit EGFR-Inhibitoren gezielt zu verbessern.

Diese vielfältigen Ansätze belegen, dass für den Einsatz von TKIs zunächst auch das Verständnis über die Interaktionen der verschiedenen Kinasen untereinander nachgedacht werden muss. Dabei wurden in der Systembiologie in den letzten Jahren bereits große Schritte zur Aufklärung der verschiedenen pathophysiologischen Zusammenhänge geleistet [17]. Zwar ist die Medikamentenentwicklung mit mittlerweile über 10.000 Patenten für Kinaseinhibitoren, 60 in den USA in klinischen Studien und 11 in der Krebstherapie zugelassenen Kinaseinhibitoren ein wichtiger Ansatzpunkt, dennoch bleibt der Wunsch mit einzelnen Molekülen eine solch komplexe Signalweiterleitung in Tumorzellen zuverlässig zu steuern noch Zukunftsmusik [45]. Ziel führend wird folglich sein, weiteres Verständnis innerhalb dieses komplexen Themengebietes zu generieren und die Erkrankung individuell für Patienten zu verstehen um eine noch spezifischere gezielte Kombinationstherapie zu entwickeln.

4.3 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass irreversible Inhibitoren allgemein größere Potenz haben Zelllinien mit mutiertem EGFR zu inhibieren als reversiblen Inhibitoren. Insbesondere Zelllinien mit EGFR-T790M Resistenzmutationen wurden durch irreversible Inhibitoren sehr viel wirksamer in Ihrem Wachstum gehemmt, als durch reversible Inhibitoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen allerdings gleichermaßen, dass auch die verschiedenen irreversiblen Inhibitoren letztlich in Ihrer Wirkung begrenzt sind, insbesondere Zelllinien mit Sekundärmutationen im *EGFR* Gen zu inhibieren. Dies zeigt sich vor allem an der Gegenüberstellung von Zelllinien mit und ohne T790M Mutation. Sobald zu der gleichen Zelllinie eine T790M Mutation hin zu kommt, sind zwar Irreversible Inhibitoren wirksamer, insbesondere auch im direkten Vergleich zu den reversiblen Inhibitoren, dennoch kann man einen deutlichen

Aktivitätsverlust ausmachen, in dem die benötigte Inhibitor Konzentration für die gleiche Zellhemmung um ein 100faches und mehr ansteigt. Zudem haben die nachgeschalteten Signalkaskade einen komplexen Einfluss auf die Tumorgenese (siehe Abschnitt 4.2.8), zum Anderen sind die genetischen Veränderungen bei NSCLC selbst innerhalb des *EGFR* Gens nicht homogen. Es existieren vielmehr multiple genetische Subtypen. Nach den Ergebnissen aus den Zelltoxizitätsscreens scheint es nicht möglich alle NSCLC Patienten, selbst solche mit nachweislich positivem EGFR Mutationsstatus mit einem einzigen Inhibitor zu therapieren. Mit der Untersuchung der Ba/F3 Zelllinien konnte absolut unabhängig von weiteren potentiellen Veränderungen innerhalb der Signalkaskade gezeigt werden, dass selbst die Lokalisation einer genetischen Veränderung innerhalb des EGFR Gens ein uneinheitliches Ansprechen der Zelllinien auf den gleichen Inhibitor bewirkt was eine noch spezifischere Therapie erfordert. Alle Mutationen der verwendeten Zelllinien haben ein ganz eigenes Ansprechverhalten gezeigt, obgleich einige Mutationen Gruppierungen bilden. Somit rückt die Genetik nicht nur im Bereich Krebsgenese sondern insbesondere im Bezug auf die Therapie noch stärker in den Vordergrund.

Im Falle einer Therapie mit Cetuximab (EGFR Antikörper, Bristol-Myers) wird beispielsweise zu Beginn der Therapie ein KRAS Mutationsstatus erhoben. Bei Mutation des KRAS Gens wäre eine Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor sinnlos. Diese Beispiele zeigen, dass es sinnvoll ist vor der Therapie mit niedermolekularen Inhibitoren eine genaue Kenntnis von genetischen Veränderungen des zu behandelnden Tumors zu haben. Da gleichwohl nur circa 10% Prozent aller europäischen und US amerikanische Patienten (in selektierten Populationen wie Asiaten, Frauen und Nicht Raucher bis zu 40%) Mutationen oder Amplifikationen im *EGFR* Gen aufweisen wäre es zudem sinnvoll, ausschließlich Patienten mit positivem Mutationsstaus mit einem EGFR-Inhibitor zu behandeln. Vor einem eventuellen Therapiebeginn sollten im Sinne der Effektivitätssteigerung, der Vermeidung ineffektiver Behandlungen und negativem Kosten-Nutzen Profil Tests etabliert werden, um therapieresistente Tumore bereits im Vorfeld zu entdecken.

Es existieren mehrere Ansätze, um den Mutationsstatus eines Gens im Vorfeld einer Therapie zu bestimmen. Beispielsweise kann die Menge des EGFR Protein quantitativ erfasst werden, z.B. durch Radioactive-labeled ligand Binding, competitive Immunoassay, Western Blot und Immunohistochemie (IHC; Proteine werden mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht). Mit der Ausnahme von IHC ist die Durchführung jedoch sehr aufwendig und es ist nur schwer denkbar diese Tests flächendeckend in der Klinik zu etablieren [44]. Darüber hinaus werden die Analysen zu EGFR Levels mit der IHC durch viele Variablen beeinflusst und verringern die Reproduzierbarkeit quantitativer Aussagen [21]. Die Verwendung dieser Methode ist zudem zu wenig konsistent, um den Erfolg einer TKI Therapie vorhersagen zu können [38, 69, 70]. Zurzeit ist IHC noch nicht optimiert genug, um die Eignung eines Patienten für eine EGFR TKI Therapie vorhersagen zu können. Durch Standardisierung der Methode könnte sie allerdings in der Zukunft eventuell Einzug in die Klinik halten. Zudem könnte es größere klinische Relevanz haben phosphoryliertes EGFR Protein zu messen, da dies die aktive Form des Proteins darstellt. Allerdings zeigen Studien, dass aufgrund der kurzen Halbwertszeit von phosphoryliertem EGFR bei nicht optimaler Probegewinnung und Prozessierung falsch negative Ergebnisse erzielt werden können [71].

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit an, dass die Behandlung eines NSCLC Patienten mit einem einzigen Inhibitor, der sich gegen ein einzelnes Target wie dem EGFR Rezeptor (*targeted therapy*) richtet, der individualisierten Kombinationstherapie weichen muss, die auf den spezifischen Mutationsstatus eines jeden Patienten unter Berücksichtigung von Veränderungen in anderen Signalkaskaden abgestimmt ist. Zudem sollte die Etablierung von nicht invasiven klinischen Tests zur Erfassung und Verlauf des Mutationsstatus gefördert werden, um die Therapie für Patienten im Sinne einer gesteigerten Lebenszeitverlängerung bei erhaltener Lebensqualität weiter zu individualisieren.

5 Zusammenfassung

Trotz Intensivierung bestehender Chemotherapien bleibt das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) mit mehr als einer Million Toten pro Jahr an der Spitze der häufigsten Krebstodesursachen. Umso wichtiger ist es neue Therapieprinzipien zu entwickeln und bestehende auszubauen, mit dem Ziel betroffenen Patienten einen Überlebensvorteil zu sichern. Gleichzeitig ist es ebenso erstrebenswert, unerwünschte Nebenwirkungen auf ein mögliches Minimum zu reduzieren, um die Lebensqualität der Patienten auch unter Therapie weitestgehend erhalten zu können.

Durch die genetische Charakterisierung von Tumorgewebe, Identifizierung mutierter, amplifizierter oder deletierter Gene mit der Folge einer Onkogenabhängigkeit der betroffenen Tumorzelle, kommt die Idee der gezielten Krebstherapie zum tragen, welche die eingangs angesprochenen Ansprüche an eine erfolgreiche Therapie erfüllen soll. Niedermolekulare Substanzen sollen spezifisch den Effekt des unkontrollierten Wachstums, hervorgerufen durch genetisch veränderten Strukturen inhibieren.

Beim NSCLC konnte dieses Therapieprinzip bereits umgesetzt und zunächst erfolgreich mit reversiblen Tyrosinkinaseinhibitoren wie Gefitinib in die Klinik eingeführt werden. Indes profitieren trotz einheitlicher Diagnosestellung nicht alle Patienten von diesem Therapieansatz. Patienten mit negativem EGFR Mutationsstaus profitieren nicht (primäre Resistenz). Ursächlich ist, dass im Falle des NSCLC keine homogene Tumorgenetik vorliegt. Dieser Umstand spiegelt sich auch an den verwendeten, genetisch analysierten NSCLC Zelllinien wieder, die trotz identischer Tumorentität keinen einheitlichen tumorursächlichen Mutationsstatus aufweisen. Neben dieser primären Resistenz gegenüber reversiblen EGFR TKIs ist der Überlebensvorteil der behandelten Patienten selbst nach ursprünglichem Ansprechen limitiert. Im Therapieverlauf werden Resistenzentstehungen beobachtet. In über 50% der Fälle findet sich die Sekundärmutation T790M, die eine Bindung bisheriger reversibler Inhibitoren an den Rezeptor erschwert

und zum Therapieversagen führt (**erworbene Resistenz**). Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich die Frage, wie man diesen, für Patienten dramatischen Effekt überwinden kann, um den ursprünglichen Therapieerfolg zu sichern.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit eine Veränderung des Bindemechanismus der EGFR Tyrosinkinaseinhibitoren - von reversiblen hinzu irreversiblen Anbinden an den Rezeptor - die Fähigkeit hat die sterische Behinderung verursacht durch die T790M Mutation zu überwinden. Es wurde eine neue Kollektion von Inhibitoren mit einem Chinolin oder angelehnt an Gefitinib mit einem Chinazolin Grundgerüst synthetisiert. Substituiert wurden verschiedene Elektrophile. Die verwendeten, einander korrespondierenden Inhibitoren (reversibel versus irreversibel) zeichnen sich durch die Stärke der Elektrophilie der Substituenten und somit ihren individuellen Bindemechanismus aus. Mit dieser Inhibitorenkollektion wurden eine Reihe Primärtumorzelllinien mit positivem EGFR Mutationsstatus sowie stabil exprimierende murine Stammzellen (Ba/F3 Zellen) jeweils mit und ohne Sekundärmutation behandelt. Letztere sollten den Effekt einer isoliert betrachteten genetischen Veränderung im *EGFR* Gen in Bezug auf einen bestimmten Inhibitor und dessen Bindemodalität aufzeigen.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die reversiblen Inhibitoren trotz stark elektrophiler Substituenten zwar gute Ergebnisse in Zelllinien mit Mutationen der Kinase- und Ektodomäne liefern, allerdings keine Aktivität in Zelllinien mit Sekundärmutation aufweisen. Die getesteten irreversiblen Inhibitoren sind potent in Zellen mit Primärmutationen und zeigen im Vergleich zu ihren reversiblen Gegenpartnern zumindest intermediäre Sensitivität in Zelllinien mit Sekundärmutation. Dennoch wird auch hier der Aktivitätsverlust im direkten Vergleich zwischen Zelllinien mit und ohne T790M deutlich. Die Untersuchungen an Ba/F3 Zelllinien deuten zudem an, dass die Lokalisation einer Veränderung innerhalb des EGFR Gens die Aktivität eines Inhibitors maßgeblich bestimmt. In NSCLC Zellen existiert somit nicht ein EGF Rezeptor als einheitliches Target, sondern verschiedene mutationsbedingte Varianten, die sich in ihrer Konformation unterscheiden und einer individuellen Betrachtung bedürfen. Durch die Vielzahl an genetischen Veränderungen im

EGFR Gen entstehen verschiedene Konformationsvarianten die gerade im Falle des NSCLC eine individualisierte Therapie erforderlich machen. Eine vereinheitlichte Therapie für NSCLC scheint aktuell nicht Ziel führend und sollte vielmehr einer an dem genetischen Profil des Tumors ausgerichteten Therapie folgen. Weiterhin konnte durch die Erarbeitung weiterer Ergebnissen innerhalb der Forschungsgruppe belegt werden, dass EGFR als Onkogen in ein komplexes Geflecht von Signalkaskaden eingebunden ist, welche auch nach erfolgreicher Inhibition von EGFR durch Selektionsdruck aktiviert werden können, so dass EGFR mutierte Zellen auch unabhängig von Sekundärmutationen nicht auf eine Behandlung mit den hier verwendeten TKIs ansprechen. Demzufolge scheint eine individualisierte Kombinationstherapie, die an verschiedenen Zielstrukturen spezifisch ansetzt, sinnvoll. Dieser noch individualisiertere Blick erfordert weiterhin intensives Forschungsinteresse nach neuen Inhibitoren und dem Verstehen der zellbiologischen Interaktionen mit dem Ziel eine individualisierte personenbezogene Therapie zu fördern.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams, M.D., M. Dubnick, A.R. Kerlavage, R. Moreno, J.M. Kelley, T.R. Utterback, J.W. Nagle, C. Fields, and J.C. Venter, *Sequence identification of 2,375 human brain genes*. Nature, 1992. **355**(6361): p. 632-4.
2. Aita, M., G. Fasola, C. Defferrari, A. Brianti, M.G. Bello, A. Follador, G. Sinaccio, P. Pronzato, and F. Grossi, *Targeting the VEGF pathway: antiangiogenic strategies in the treatment of non-small cell lung cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **68**(3): p. 183-96.
3. Balak, M.N., Y. Gong, G.J. Riely, R. Somwar, A.R. Li, M.F. Zakowski, A. Chiang, G. Yang, O. Ouerfelli, M.G. Kris, M. Ladanyi, V.A. Miller, and W. Pao, *Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6494-501.
4. Baserga, R., *Oncogenes and the strategy of growth factors*. Cell, 1994. **79**(6): p. 927-30.
5. Bean, J., G.J. Riely, M. Balak, J.L. Marks, M. Ladanyi, V.A. Miller, and W. Pao, *Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(22): p. 7519-25.
6. Bivona, T.G., H. Hieronymus, J. Parker, K. Chang, M. Taron, R. Rosell, P. Moonsamy, K. Dahlman, V.A. Miller, C. Costa, G. Hannon, and C.L. Sawyers, *FAS and NF-kappaB signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR*. Nature. **471**(7339): p. 523-6.
7. Blair, J.A., D. Rauh, C. Kung, C.H. Yun, Q.W. Fan, H. Rode, C. Zhang, M.J. Eck, W.A. Weiss, and K.M. Shokat, *Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(4): p. 229-38.
8. Bouyain, S., P.A. Longo, S. Li, K.M. Ferguson, and D.J. Leahy, *The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(42): p. 15024-9.
9. Boveri, T., *Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris*. J Cell Sci, 2008. **121** **Suppl 1**: p. 1-84.
10. Burstein, H.J. and R.S. Schwartz, *Molecular origins of cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(5): p. 527.
11. Cappuzzo, F., L. Bemis, and M. Varella-Garcia, *HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(24): p. 2619-21.

12. Carpenter G, C.S., *Epidermal Growth factor*. J Biol Chem., 1990. **265(14):7709-12**.
13. Carter, T.A., L.M. Wodicka, N.P. Shah, A.M. Velasco, M.A. Fabian, D.K. Treiber, Z.V. Milanov, C.E. Atteridge, W.H. Biggs, 3rd, P.T. Edeen, M. Floyd, J.M. Ford, R.M. Grotzfeld, S. Herrgard, D.E. Insko, S.A. Mehta, H.K. Patel, W. Pao, C.L. Sawyers, H. Varmus, P.P. Zarrinkar, and D.J. Lockhart, *Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102(31):** p. 11011-6.
14. Cho, H.S. and D.J. Leahy, *Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether*. Science, 2002. **297(5585):** p. 1330-3.
15. Cohen, R.B., *Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2003. **2:246-51**.
16. Dankort, D., E. Filenova, M. Collado, M. Serrano, K. Jones, and M. McMahon, *A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors*. Genes Dev, 2007. **21(4):** p. 379-84.
17. Davidov, E., J. Holland, E. Marple, and S. Naylor, *Advancing drug discovery through systems biology*. Drug Discov Today, 2003. **8(4):** p. 175-83.
18. Downward, J., P. Parker, and M.D. Waterfield, *Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor*. Nature, 1984. **311(5985):** p. 483-5.
19. Druker, B.J., *Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML*. Oncogene, 2002. **21(56):** p. 8541-6.
20. Druker, B.J., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G.M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, and N.B. Lydon, *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells*. Nat Med, 1996. **2(5):** p. 561-6.
21. Eberhard, D.A., G. Giaccone, and B.E. Johnson, *Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting*. J Clin Oncol, 2008. **26(6):** p. 983-94.
22. Eberhard DA, J.B., Amler LC, *Mutations in the EGFR and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with NSCLC treated with chemotherapy alone and combination with erlotinib*. J Clin Oncol J Clin Oncol 2005. **23:5900-9**.
23. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol. **17(6):** p. 1471-4.
24. Engelman, J.A., K. Zejnullahu, T. Mitsudomi, Y. Song, C. Hyland, J.O. Park, N. Lindeman, C.M. Gale, X. Zhao, J. Christensen, T. Kosaka, A.J. Holmes, A.M. Rogers, F. Cappuzzo, T. Mok, C. Lee, B.E. Johnson, L.C. Cantley, and P.A. Janne, *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316(5827):** p. 1039-43.

25. Ferguson, K.M., *Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 5): p. 742-5.
26. Friday, B.B., C. Yu, G.K. Dy, P.D. Smith, L. Wang, S.N. Thibodeau, and A.A. Adjei, *BRAF V600E disrupts AZD6244-induced abrogation of negative feedback pathways between extracellular signal-regulated kinase and Raf proteins*. *Cancer Res*, 2008. **68**(15): p. 6145-53.
27. Frommolt, P. and R.K. Thomas, *Standardized high-throughput evaluation of cell-based compound screens*. *BMC Bioinformatics*, 2008. **9**: p. 475.
28. Fry, D.W., A.J. Bridges, W.A. Denny, A. Doherty, K.D. Greis, J.L. Hicks, K.E. Hook, P.R. Keller, W.R. Leopold, J.A. Loo, D.J. McNamara, J.M. Nelson, V. Sherwood, J.B. Smail, S. Trumpp-Kallmeyer, and E.M. Dobrusin, *Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(20): p. 12022-7.
29. Fry, D.W., A.J. Kraker, A. McMichael, L.A. Ambroso, J.M. Nelson, W.R. Leopold, R.W. Connors, and A.J. Bridges, *A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase*. *Science*, 1994. **265**(5175): p. 1093-5.
30. Garrett, T.P., N.M. McKern, M. Lou, T.C. Elleman, T.E. Adams, G.O. Lovrecz, H.J. Zhu, F. Walker, M.J. Frenkel, P.A. Hoyne, R.N. Jorissen, E.C. Nice, A.W. Burgess, and C.W. Ward, *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 763-73.
31. Gazdar, A.F. and J.D. Minna, *Deregulated EGFR signaling during lung cancer progression: mutations, amplicons, and autocrine loops*. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2008. **1**(3): p. 156-60.
32. Giaccone, G., *HER1/EGFR-targeted agents: predicting the future for patients with unpredictable outcomes to therapy*. *Ann Oncol*, 2005. **16**(4): p. 538-48.
33. Grandal, M.V. and I.H. Madshus, *Epidermal growth factor receptor and cancer: control of oncogenic signalling by endocytosis*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(5A): p. 1527-34.
34. Greulich, H., T.H. Chen, W. Feng, P.A. Janne, J.V. Alvarez, M. Zappaterra, S.E. Bulmer, D.A. Frank, W.C. Hahn, W.R. Sellers, and M. Meyerson, *Oncogenic Transformation by Inhibitor-Sensitive and -Resistant EGFR Mutants*. *PLoS Med*, 2005. **2**(11): p. e313.
35. Gridelli, C., P. Maione, and A. Rossi, *The potential role of mTOR inhibitors in non-small cell lung cancer*. *Oncologist*, 2008. **13**(2): p. 139-47.
36. Guy, P.M., J.V. Platko, L.C. Cantley, R.A. Cerione, and K.L. Carraway, 3rd, *Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(17): p. 8132-6.
37. Heldin, C.H., *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 213-23.
38. Hirsch, F.R., M. Varella-Garcia, P.A. Bunn, Jr., W.A. Franklin, R. Dziadziuszko, N. Thatcher, A. Chang, P. Parikh, J.R. Pereira, T.

- Ciuleanu, J. von Pawel, C. Watkins, A. Flannery, G. Ellison, E. Donald, L. Knight, D. Parums, N. Botwood, and B. Holloway, *Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(31): p. 5034-42.
39. Ho, C. and J. Laskin, *EGFR-directed therapies to treat non-small-cell lung cancer*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009. **18**(8): p. 1133-45.
40. Huse, M. and J. Kuriyan, *The conformational plasticity of protein kinases*. *Cell*, 2002. **109**(3): p. 275-82.
41. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(5): p. 341-54.
42. Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
43. Jeong, E.G., Y.H. Soung, J.W. Lee, S.H. Lee, S.W. Nam, J.Y. Lee, and N.J. Yoo, *ERBB3 kinase domain mutations are rare in lung, breast and colon carcinomas*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(12): p. 2986-7.
44. John, T., G. Liu, and M.S. Tsao, *Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors*. *Oncogene*, 2009. **28 Suppl 1**: p. S14-23.
45. Johnson, L.N., *Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds*. *Q Rev Biophys*, 2009. **42**(1): p. 1-40.
46. Jorissen, R.N., F. Walker, N. Pouliot, T.P. Garrett, C.W. Ward, and A.W. Burgess, *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 31-53.
47. Karaman, M.W., S. Herrgard, D.K. Treiber, P. Gallant, C.E. Atteridge, B.T. Campbell, K.W. Chan, P. Ciceri, M.I. Davis, P.T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J.P. Hunt, D.J. Lockhart, Z.V. Milanov, M.J. Morrison, G. Pallares, H.K. Patel, S. Pritchard, L.M. Wodicka, and P.P. Zarrinkar, *A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(1): p. 127-32.
48. Kobayashi, S., T.J. Boggon, T. Dayaram, P.A. Janne, O. Kocher, M. Meyerson, B.E. Johnson, M.J. Eck, D.G. Tenen, and B. Halmos, *EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(8): p. 786-92.
49. Kono, S.A., M.E. Marshall, K.E. Ware, and L.E. Heasley, *The fibroblast growth factor receptor signaling pathway as a mediator of intrinsic resistance to EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer*. *Drug Resist Updat*, 2009. **12**(4-5): p. 95-102.
50. Kosaka, T., Y. Yatabe, H. Endoh, K. Yoshida, T. Hida, M. Tsuboi, H. Tada, H. Kuwano, and T. Mitsudomi, *Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(19): p. 5764-9.
51. Kumar, A., E.T. Petri, B. Halmos, and T.J. Boggon, *Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(10): p. 1742-51.

52. Kwak, E.L., R. Sordella, D.W. Bell, N. Godin-Heymann, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, D.R. Driscoll, P. Fidias, T.J. Lynch, S.K. Rabindran, J.P. McGinnis, A. Wissner, S.V. Sharma, K.J. Isselbacher, J. Settleman, and D.A. Haber, *Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(21): p. 7665-70.
53. Li, D., T. Shimamura, H. Ji, L. Chen, H.J. Haringsma, K. McNamara, M.C. Liang, S.A. Perera, S. Zaghlul, C.L. Borgman, S. Kubo, M. Takahashi, Y. Sun, L.R. Chirieac, R.F. Padera, N.I. Lindeman, P.A. Janne, R.K. Thomas, M.L. Meyerson, M.J. Eck, J.A. Engelman, G.I. Shapiro, and K.K. Wong, *Bronchial and peripheral murine lung carcinomas induced by T790M-L858R mutant EGFR respond to HKI-272 and rapamycin combination therapy*. Cancer Cell, 2007. **12**(1): p. 81-93.
54. Lynch, T.J., D.W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, S.M. Haserlat, J.G. Supko, F.G. Haluska, D.N. Louis, D.C. Christiani, J. Settleman, and D.A. Haber, *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
55. Maemondo, M., A. Inoue, K. Kobayashi, S. Sugawara, S. Oizumi, H. Isoke, A. Gemma, M. Harada, H. Yoshizawa, I. Kinoshita, Y. Fujita, S. Okinaga, H. Hirano, K. Yoshimori, T. Harada, T. Ogura, M. Ando, H. Miyazawa, T. Tanaka, Y. Saijo, K. Hagiwara, S. Morita, and T. Nukiwa, *Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR*. N Engl J Med. **362**(25): p. 2380-8.
56. Milano, A., V. De Rosa, R.V. Iaffaioli, and F. Caponigro, *Downstream intracellular effectors of epidermal growth factor receptor as targets for anticancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(6): p. 771-82.
57. Mok, T.S., Y.L. Wu, S. Thongprasert, C.H. Yang, D.T. Chu, N. Saijo, P. Sunpaweravong, B. Han, B. Margono, Y. Ichinose, Y. Nishiwaki, Y. Ohe, J.J. Yang, B. Chewaskulyong, H. Jiang, E.L. Duffield, C.L. Watkins, A.A. Armour, and M. Fukuoka, *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 947-57.
58. Moyer, J.D., E.G. Barbacci, K.K. Iwata, L. Arnold, B. Boman, A. Cunningham, C. DiOrio, J. Doty, M.J. Morin, M.P. Moyer, M. Neveu, V.A. Pollack, L.R. Pustilnik, M.M. Reynolds, D. Sloan, A. Theleman, and P. Miller, *Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase*. Cancer Res, 1997. **57**(21): p. 4838-48.
59. Mukohara, T., J.A. Engelman, N.H. Hanna, B.Y. Yeap, S. Kobayashi, N. Lindeman, B. Halmos, J. Pearlberg, Z. Tsuchihashi, L.C. Cantley, D.G. Tenen, B.E. Johnson, and P.A. Janne, *Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(16): p. 1185-94.
60. Natale, R.B., D. Bodkin, R. Govindan, B.G. Sleckman, N.A. Rizvi, A. Capo, P. Germonpre, W.E. Eberhardt, P.K. Stockman, S.J. Kennedy,

- and M. Ranson, *Vandetanib versus gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: results from a two-part, double-blind, randomized phase ii study*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(15): p. 2523-9.
61. Nowell, P.C. and D.A. Hungerford, *Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes*. *J Natl Cancer Inst*, 1960. **25**: p. 85-109.
62. Ogiso, H., R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J.H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu, and S. Yokoyama, *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 775-87.
63. Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lutolf, and P. Kleihues, *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
64. Paez, J.G., P.A. Janne, J.C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F.J. Kaye, N. Lindeman, T.J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M.J. Eck, W.R. Sellers, B.E. Johnson, and M. Meyerson, *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. *Science*, 2004. **304**(5676): p. 1497-500.
65. Pao, W., V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, and H. Varmus, *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(36): p. 13306-11.
66. Pao, W. and V.A. Miller, *Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(11): p. 2556-68.
67. Pao, W., V.A. Miller, K.A. Politi, G.J. Riely, R. Somwar, M.F. Zakowski, M.G. Kris, and H. Varmus, *Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain*. *PLoS Med*, 2005. **2**(3): p. e73.
68. Pao, W., T.Y. Wang, G.J. Riely, V.A. Miller, Q. Pan, M. Ladanyi, M.F. Zakowski, R.T. Heelan, M.G. Kris, and H.E. Varmus, *KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib*. *PLoS Med*, 2005. **2**(1): p. e17.
69. Parra, H.S., R. Cavina, F. Latteri, P.A. Zucali, E. Campagnoli, E. Morengi, G.C. Grimaldi, M. Roncalli, and A. Santoro, *Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small-cell lung cancer*. *Br J Cancer*, 2004. **91**(2): p. 208-12.
70. Perez-Soler, R., A. Chachoua, L.A. Hammond, E.K. Rowinsky, M. Huberman, D. Karp, J. Rigas, G.M. Clark, P. Santabarbara, and P. Bonomi, *Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non--small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(16): p. 3238-47.

71. Rego, R.L., N.R. Foster, T.C. Smyrk, M. Le, M.J. O'Connell, D.J. Sargent, H. Windschitl, and F.A. Sinicrope, *Prognostic effect of activated EGFR expression in human colon carcinomas: comparison with EGFR status*. Br J Cancer, 2010. **102**(1): p. 165-72.
72. Riely, G.J., M.G. Kris, D. Rosenbaum, J. Marks, A. Li, D.A. Chitale, K. Nafa, E.R. Riedel, M. Hsu, W. Pao, V.A. Miller, and M. Ladanyi, *Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(18): p. 5731-4.
73. Rosell, R., T. Moran, C. Queralt, R. Porta, F. Cardenal, C. Camps, M. Majem, G. Lopez-Vivanco, D. Isla, M. Provencio, A. Insa, B. Massuti, J.L. Gonzalez-Larriba, L. Paz-Ares, I. Bover, R. Garcia-Campelo, M.A. Moreno, S. Catot, C. Rolfo, N. Reguart, R. Palmero, J.M. Sanchez, R. Bastus, C. Mayo, J. Bertran-Alamillo, M.A. Molina, J.J. Sanchez, and M. Taron, *Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 958-67.
74. Schulze, W.X., L. Deng, and M. Mann, *Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0008.
75. Sequist, L.V., B.A. Waltman, D. Dias-Santagata, S. Digumarthy, A.B. Turke, P. Fidias, K. Bergethon, A.T. Shaw, S. Gettinger, A.K. Cosper, S. Akhavanfard, R.S. Heist, J. Temel, J.G. Christensen, J.C. Wain, T.J. Lynch, K. Vernovsky, E.J. Mark, M. Lanuti, A.J. Iafrate, M. Mino-Kenudson, and J.A. Engelman, *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. Sci Transl Med, 2011. **3**(75): p. 75ra26.
76. Sharma, S.V., D.W. Bell, J. Settleman, and D.A. Haber, *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(3): p. 169-81.
77. Shigematsu, H., T. Takahashi, M. Nomura, K. Majmudar, M. Suzuki, H. Lee, Wistuba, II, K.M. Fong, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, J.D. Minna, and A.F. Gazdar, *Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1642-6.
78. Sibia, M., R. Kroismayr, B.M. Lichtenberger, A. Natarajan, M. Hecking, and M. Holcman, *The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis*. Differentiation, 2007. **75**(9): p. 770-87.
79. Slamon, D.J., G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, and W.L. McGuire, *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
80. Sos, M.L., S. Fischer, R. Ullrich, M. Peifer, J.M. Heuckmann, M. Koker, S. Heynck, I. Stuckrath, J. Weiss, F. Fischer, K. Michel, A. Goel, L. Regales, K.A. Politi, S. Perera, M. Getlik, L.C. Heukamp, S. Ansen, T. Zander, R. Beroukhim, H. Kashkar, K.M. Shokat, W.R. Sellers, D. Rauh, C. Orr, K.P. Hoeflich, L. Friedman, K.K. Wong, W. Pao, and R.K. Thomas, *Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined*

- PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(43): p. 18351-6.
81. Sos, M.L., M. Koker, B.A. Weir, S. Heynck, R. Rabinovsky, T. Zander, J.M. Seeger, J. Weiss, F. Fischer, P. Frommolt, K. Michel, M. Peifer, C. Mermel, L. Girard, M. Peyton, A.F. Gazdar, J.D. Minna, L.A. Garraway, H. Kashkar, W. Pao, M. Meyerson, and R.K. Thomas, *PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR.* Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3256-61.
82. Sos, M.L., K. Michel, T. Zander, J. Weiss, P. Frommolt, M. Peifer, D. Li, R. Ullrich, M. Koker, F. Fischer, T. Shimamura, D. Rauh, C. Mermel, S. Fischer, I. Stuckrath, S. Heynck, R. Beroukhim, W. Lin, W. Winckler, K. Shah, T. LaFramboise, W.F. Moriarty, M. Hanna, L. Tolosi, J. Rahnenfuhrer, R. Verhaak, D. Chiang, G. Getz, M. Hellmich, J. Wolf, L. Girard, M. Peyton, B.A. Weir, T.H. Chen, H. Greulich, J. Barretina, G.I. Shapiro, L.A. Garraway, A.F. Gazdar, J.D. Minna, M. Meyerson, K.K. Wong, and R.K. Thomas, *Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions.* J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1727-40.
83. Sos, M.L., H.B. Rode, S. Heynck, M. Peifer, F. Fischer, S. Kluter, V.G. Pawar, C. Reuter, J.M. Heuckmann, J. Weiss, L. Ruddigkeit, M. Rabiller, M. Koker, J.R. Simard, M. Getlik, Y. Yuza, T.H. Chen, H. Greulich, R.K. Thomas, and D. Rauh, *Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation.* Cancer Res, 2009. **70**(3): p. 868-74.
84. Stamos, J., M.X. Sliwkowski, and C. Eigenbrot, *Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor.* J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46265-72.
85. Sun, S., J.H. Schiller, and A.F. Gazdar, *Lung cancer in never smokers--a different disease.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 778-90.
86. Tang, X., H. Shigematsu, B.N. Bekele, J.A. Roth, J.D. Minna, W.K. Hong, A.F. Gazdar, and Wistuba, II, *EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients.* Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7568-72.
87. Ullrich, A., L. Coussens, J.S. Hayflick, T.J. Dull, A. Gray, A.W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T.A. Libermann, J. Schlessinger, and et al., *Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells.* Nature, 1984. **309**(5967): p. 418-25.
88. Weinberg, R.A., *How cancer arises.* Sci Am, 1996. **275**(3): p. 62-70.
89. Westra, W.H., *Early glandular neoplasia of the lung.* Respir Res, 2000. **1**(3): p. 163-9.
90. Westra, W.H., I.O. Baas, R.H. Hruban, F.B. Askin, K. Wilson, G.J. Offerhaus, and R.J. Slebos, *K-ras oncogene activation in atypical*

- alveolar hyperplasias of the human lung*. Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 2224-8.
91. Yoshimura, N., S. Kudoh, T. Kimura, S. Mitsuoka, K. Matsuura, K. Hirata, K. Matsui, S. Negoro, K. Nakagawa, and M. Fukuoka, *EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib*. Lung Cancer, 2006. **51**(3): p. 363-8.
92. Yun, C.H., T.J. Boggon, Y. Li, M.S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson, and M.J. Eck, *Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity*. Cancer Cell, 2007. **11**(3): p. 217-27.
93. Yun, C.H., K.E. Mengwasser, A.V. Toms, M.S. Woo, H. Greulich, K.K. Wong, M. Meyerson, and M.J. Eck, *The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2070-5.
94. Yuza, Y., K.A. Glatt, J. Jiang, H. Greulich, Y. Minami, M.S. Woo, T. Shimamura, G. Shapiro, J.C. Lee, H. Ji, W. Feng, T.H. Chen, H. Yanagisawa, K.K. Wong, and M. Meyerson, *Allele-Dependent Variation in the Relative Cellular Potency of Distinct EGFR Inhibitors*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(5): p. 661-7.
95. Zhang, H., A. Berezov, Q. Wang, G. Zhang, J. Drebin, R. Murali, and M.I. Greene, *ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2051-8.

7. Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



Cécile Reuter

München, 22. Dezember 2012

Vorabveröffentlichung von Ergebnissen:

Sos, M.L., H.B. Rode, S. Heynck, M. Peifer, F. Fischer, S. Kluter, V.G. Pawar, C. Reuter, J.M. Heuckmann, J. Weiss, L. Ruddigkeit, M. Rabiller, M. Koker, J.R. Simard, M. Getlik, Y. Yuza, T.H. Chen, H. Greulich, R.K. Thomas, and D. Rauh, *Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation*. Cancer Res, 2009. **70**(3): p. 868-74.