

INAUGURAL-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Bettina Faden

aus

Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

Generierung und Charakterisierung von resistenten Zellen gegen selektive c-Met-Inhibitoren

**Gutachter: Prof. Dr. Andreas Trumpp
PD Dr. Stefan Wiemann**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung „Therapeutic Area Oncology“ der Firma Merck Serono, Merck KGaA in Darmstadt unter Anleitung von Dr. Andree Blaukat und Dr. Friedhelm Blatt durchgeführt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg,

Bettina Faden

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	X
Summary	XI
1. Einleitung	1
1.1 Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK)	1
1.1.1 Der Hepatozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor (c-Met)	2
1.1.1.1 Struktur von c-Met	2
1.1.1.2 Struktur des c-Met-Ligandens HGF.....	4
1.1.1.3 Aktivierung von c-Met durch Bindung des Liganden HGF	5
1.1.1.4 Biologische Funktion von c-Met	6
1.1.1.5 Durch c-Met regulierte Signalwege	7
1.1.1.5.1 Mitogen-aktivierter-Signalweg	7
1.1.1.5.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg	8
1.1.2 Die Rolle von c-Met bei der Entstehung von Krebs	9
1.1.2.1 Eigenschaften von Krebszellen.....	9
1.1.2.2 Der Einfluss von c-Met auf Krebserkrankungen	11
1.1.2.3 Die Hemmung der c-Met vermittelten Signaltransduktion in Tumoren....	13
1.1.2.4 Biomarker in der personalisierten Medizin	14
1.1.2.4.1 Tyrosinkinaseinhibitoren	15
1.1.2.4.1.1 EMD 1214063 und EMD 1204831	16
1.1.2.4.1.2 PF-04217903	19
1.1.2.4.2 Antikörper	20
1.2 Zelluläre Resistenzmechanismen	21
1.2.1 Erwerbung von Resistenzen gegen c-Met-Inhibitoren.....	23
1.2.2 Durchbrechung von Resistenzen gegen Tyrosinkinaseinhibitoren	23
1.3 Ziel der Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Software	25
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.5 Kits	27
2.1.6 Medien und Lösungen für die Zellkultur	28

2.1.7	Puffer, Lösungen und Medien	29
2.1.8	Antikörper	31
2.1.9	Humane Tumorzelllinien	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Zellbiologische Methoden	32
2.2.1.1	Kultivierung von adhärennten Zelllinien	32
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	32
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	33
2.2.1.4	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren	33
2.2.1.5	Generierung von resistenten Zelllinien gegen c-Met Inhibitoren	33
2.2.1.6	Bestimmung der Zellviabilität	34
2.2.1.6.1	WST-1	34
2.2.1.6.2	Alamar Blue	35
2.2.1.7	Migrationsverhalten von Zellen	35
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.2.1	Herstellung von Zelllysaten	36
2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.2.4	Western Blot-Analyse	37
2.2.2.5	Untersuchung der Phosphorylierung von humanen Rezeptor Tyrosinkinasen mit Hilfe Protein Arrays	38
2.2.2.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	39
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.3.1	Isolierung von genomischer DNA aus humanen Zelllinien	39
2.2.3.2	Isolierung von RNA aus humanen Zelllinien	39
2.2.3.3	Reverse Transkription von RNA	40
2.2.3.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA	40
2.2.3.5	Genexpressionsanalyse	40
2.2.3.6	Vergleichende Genomische Hybridisierung	41
2.2.3.7	Next Generation Sequencing	41
3. Ergebnisse		42
3.1	Bestimmung der Sensitivität gegenüber c-Met Inhibitoren	42
3.1.1	Expression- und Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors	42
3.1.2	Wirkung von c-Met-Inhibitoren auf das zweidimensionale Zellwachstumsverhalten	43
3.1.3	Zeitlicher Einfluss auf Signalproteine nach der Inhibition von c-Met in parentalen Zellen	46
3.2	Charakterisierung der erworbenen Resistenzmechanismen	48
3.2.1	Generierung resistenter Zelllinien gegen c-Met Inhibitoren	48
3.2.2	Überprüfung der Kreuzresistenz gegen andere c-Met-Inhibitoren	52
3.2.3	Stabilität von c-Met-Inhibitoren in der Zelle	53
3.2.4	Einfluss von c-Met-Inhibitoren auf die Signalproteine der c-Met-Signaltransduktionskaskade in resistenten Zellen	57
3.2.5	Kompensierende Aktivierung alternativer Signaltransduktionskaskaden	59
3.2.6	Migrationsverhalten der resistenten Zelllinien	62
3.2.7	Sequenzierung des c-Met Gens	65
3.2.8	Effekte von c-Met-Inhibitoren der Klasse II auf die Signaltransduktion und das Wachstum der resistenten Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903	67
3.2.8.1	Einfluss auf das Wachstumsverhalten im Monolayer	67
3.2.8.2	Einfluss auf die Signaltransduktionskaskade	69
3.2.9	Effekte des EGFR-Ligandens nach Inhibition des c-Met-Signalwegs	70
3.2.9.1	Einfluss auf das <i>in vitro</i> Wachstum	70

3.2.9.2	Einfluss auf die EGFR-Signaltransduktionskaskade	72
3.2.10	Genexpressionsanalysen	74
3.2.11	Analyse genetischer Aberrationen mittels der vergleichenden genomischen Hybridisierung.....	86
3.2.12	Verifizierung der Ergebnisse aus den Genexpressionsstudien.....	87
3.2.13	Sequenzierung des KRAS-Gens	89
3.3	Neue Therapieansätze.....	89
3.3.1	Spezifische Blockierung einzelner Signaltransduktionskaskaden.....	89
3.3.1.1	Blockierung des IGF-1R-Signalweges durch IGF-1R-Inhibitoren	89
3.3.1.2	Blockierung des PI3K/AKT-Signalweges durch PI3K-Inhibitoren	91
3.3.1.3	Blockierung des MAPK-Signalweges durch Mek-Inhibitoren.....	91
3.3.1.4	Blockierung des EGFR-Signalweges durch EGFR- und ErbB2-Inhibitoren	92
3.3.2	Blockierung alternativer Signaltransduktionskaskaden in Kombination mit c-Met-Inhibitoren.....	94
3.3.2.1	Blockierung der Signalwege in Kombination mit EMD 1214063.....	94
3.3.2.2	Blockierung der Signalwege in Kombination mit EMD 1204831	95
3.3.2.3	Blockierung der Signalwege in Kombination mit PF-04217903	96
3.3.3	Blockierung verschiedener alternativer Signaltransduktionskaskaden ...	98
3.3.4	Kombinierte Behandlung mit c-Met-Inhibitoren und Zytostatika	99
4. Diskussion		105
4.1	Einfluss von c-Met-Inhibitoren auf Proliferation, Signaltransduktion und Genexpression – parentale und resistente Zellen im Vergleich	106
4.1.1	Effekte der c-Met-Inhibitoren auf die Proliferation und die Signaltransduktion in parentalen und resistenten Zellen	106
4.1.2	Molekulare Änderungen im Genexpressionsprofil der resistenten Zellen..	110
4.1.3	Veränderungen im c-Met Gen als möglicher Resistenzmechanismus..	117
4.2	Alternative Behandlungsmöglichkeiten für resistente Zellen durch Kombinationstherapien.....	121
4.2.1	Duale Blockierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden	121
4.2.2	Kombinationsbehandlungen mit Zytostatika.....	123
5. Zusammenfassung und Ausblick.....		126
Literaturverzeichnis		128
Danksagung		140

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Rezeptor Tyrosinkinase c-Met und dessen Aktivierung durch seinen Liganden HGF.....	3
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Hepatozyten Wachstumsfaktor HGF.	5
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des PI3K/AKT- und des MAPK-Signalwegs.....	9
Abb. 1.4: Charakteristische Kennzeichen einer Krebszelle (Hanahan und Weinberg, 2011). 10	
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Genamplifikation (Hellman <i>et al.</i> , 2002).....	12
Abb. 1.6: Strukturformeln der c-Met-Inhibitoren.	16
Abb. 1.7: Kristallstruktur der c-Met-Inhibitoren EMD 1214063 und 1204831.....	17
Abb. 1.8: Graphische Darstellung der Inhibitionsprofile von: A) EMD 1214063 und B) 1204831.	18
Abb. 1.9: Strukturformel des c-Met-Inhibitors PF-04217903.	20
Abb. 1.10: Überblick über laufende klinischen Studien für die Blockierung der c-Met-Signaltransduktionskaskade.	21
Abb. 3.1: Nachweis der Expression von c-Met und seiner Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Stimulation mit HGF in Zelllinien mit c-Met Amplifikationen.....	43
Abb. 3.2: Wachstumsinhibierung von EBC1, MKN-45, Hs746T und NCI-H441-Zellen nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.....	44
Abb. 3.3: Expression und Phosphorylierung von Proteinen der c-Met-Signaltransduktionskaskade nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.....	46
Abb. 3.4: Zeitabhängige Hochregulation von p27 ^{Kip1} und Inhibition der Aktivität von c-Met nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.	48
Abb. 3.5: Sensitivität von MKN-45-Zellen gegenüber c-Met-Inhibitoren nach einer mehrmonatigen Inkubation in Gegenwart von c-Met-Inhibitoren.....	50
Abb. 3.6: Überprüfung der Kreuzresistenz von resistenten MKN-45-Zellen gegenüber anderen c-Met-Inhibitoren mit Hilfe eines in vitro Proliferationsversuchs.	53
Abb. 3.7: Expression von Proteinen der c-Met-Signaltransduktionskaskade in parentalen und resistenten MKN-45-Zellen nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren in Abhängigkeit einer Stimulation mit HGF.....	54
Abb. 3.8: Akkumulation von EMD 1214063 in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063.....	55
Abb. 3.9: Zeit-abhängige Inhibition der c-Met-Aktivität in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063.	56
Abb. 3.10: Expression von Proteinen der c-Met-Signaltransduktionskaskade in resistenten MKN-45-Zellen nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.	57
Abb. 3.11: Dosisabhängige Inhibition der Phosphorylierung von c-Met in MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen nach der Behandlung mit der Substanz PF-04217903. ...	59
Abb. 3.12: Analyse des Tyrosinphosphorylierung von 42 verschiedenen RTK in parentalen und resistenten MKN-45 Zellen.	60
Abb. 3.13: Phosphorylierung von 42 verschiedenen RTK in parentalen und resistenten MKN-45-Zellen im Human Phospho-RTK-Array.....	61
Abb. 3.14: Migrationsverhalten von parentalen MKN-45-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1204831.	63

Abb. 3.15: Migrationsverhalten von parentalen MKN-45-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.	63
Abb. 3.16: Migrationsverhalten von resistenten MKN-45 R50 EMD 1204831-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1204831.	64
Abb. 3.17: Vergleichendes Migrationsverhalten von parentalen und resistenten MKN-Zellen in Abhängigkeit von einer Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.	65
Abb. 3.18: Sequenzanalyse des c-Met-Gens in parentalen und resistenten MKN-Zellen.	66
Abb. 3.19: Ansprechen der resistenten MKN-45-Zellen auf den Klasse II c-Met-Inhibitor XL880.	68
Abb. 3.20: Vergleichende Expression von Proteinen der c-Met-Signaltransduktionskaskade in parentalen und resistenten MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen nach der Behandlung mit XL880.	70
Abb. 3.21: Ansprechen der parentalen MKN-45-Zellen auf c-Met-Inhibitoren in Abhängigkeit einer Stimulation mit dem EGFR-Liganden EGF.	71
Abb. 3.22: Vergleichende Expression von Proteinen der EGFR-Signaltransduktionskaskade in parentalen Zellen nach der Stimulation mit dem EGFR-Liganden EGF.	73
Abb. 3.23: Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsprofile von parentalen und resistenten MKN-45-Zellen.	75
Abb. 3.24: Hierarchische Clusteranalyse der parentalen und resistenten MKN-45-Zellen. ...	76
Abb. 3.25: Globale Betrachtung der Signifikanz der Änderungen von Einzelgenprofilen zwischen unbehandelten MKN-45 Zellen bei früher und später Passagezahl.	77
Abb. 3.26: Globale Betrachtung der Signifikanz der Änderungen von Einzelgenprofilen zwischen unbehandelten und behandelten MKN-45 Zellen.	77
Abb. 3.27: Schnittmenge der differenziell exprimierten Gene in den resistenten Zellen.	78
Abb. 3.28. Heatmap von Signaturscores von Gensignaturen mit hoher interner genweiser Kreuzkorrelation in unserem Datensatz.	80
Abb. 3.29: Expressionsanalyse von ausgewählten Genen die in den parentalen und resistenten differenziell exprimiert sind.	85
Abb. 3.30: Expression von KRAS und IGF-1R in parentalen und resistenten MKN-45-Zellen.	88
Abb. 3.31: Ansprechen der parentalen und resistenten Zellen auf die Behandlung mit einem IGF-1R- bzw. mit einem PI3K-Inhibitor.	90
Abb. 3.32: Ansprechen der parentalen und resistenten Zellen auf die Behandlung mit einem Mek-Inhibitor.	92
Abb. 3.33: Ansprechen der parentalen und resistenten Zellen auf die Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Iressa bzw. mit dem EGFR/ErbB2-Inhibitor Lapatinib.	93
Abb. 3.34: Ansprechen der resistenten Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 auf die kombinatorische Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1214063 und anderen Inhibitoren.	94
Abb. 3.35: Ansprechen der resistenten Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 auf die kombinatorische Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1204831 und anderen Inhibitoren.	96
Abb. 3.36: Ansprechen der resistenten Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 auf die kombinatorische Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor PF-04217903 und anderen Inhibitoren.	97

Abb. 3.37: Ansprechen der parentalen und resistenten Zelllinien auf die kombinatorische Behandlung mit einem PI3K- und einem Mek-Inhibitor.	98
Abb. 3.38: Ansprechen der parentalen MKN-45-Zellen auf die Kombination von Zytostatika und Signaltransduktions-Inhibitoren.....	101
Abb. 3.39: Ansprechen der MKN-45 R8 EMD 1214063-Zellen auf die Kombination von Zytostatika und Signaltransduktions-Inhibitoren.....	102
Abb. 3.40: Ansprechen der MKN-45 R50 EMD 1204831-Zellen auf die Kombination von Zytostatika und Signaltransduktions-Inhibitoren.....	103
Abb. 3.41: Ansprechen der MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen auf die Kombination von Zytostatika und Signaltransduktions-Inhibitoren.....	104

Tabellenverzeichnis

Tab.1.1: Häufigkeit der Abweichungen der c-Met-Signaltransduktionskaskade in Tumorerkrankungen.	13
Tab.2.1: Erstantikörper	31
Tab.2.2: Zweitantikörper	31
Tab.2.3: Verwendete humane Tumorzelllinien	31
Tab.3.1: Bestimmung der EC ₅₀ -Werte der c-Met Inhibitoren.	45
Tab.3.2: Nomenklatur der generierten und in den folgenden Versuchen verwendeten Zellen.	49
Tab.3.3: Bestimmung der EC ₅₀ -Werte der c-Met-Inhibitoren in parentalen und resistenten Zellen.	51
Tab.3.4: Bestimmung der EC ₅₀ -Werte des c-Met Inhibitors XL880 in parentalen und resistenten Zellen.	68
Tab.3.5: Verwendete Zelllinien für die Genexpressionsanalyse.	74
Tab.3.6. Gene die in resistenten Zellen konsistent hoch- bzw. herunterreguliert wurden.	79
Tab.3.7: Verwendete Zelllinien für die vergleichende genomische Hybridisierung.....	86

Abkürzungsverzeichnis

% (m/V)	Gewichtsprozent
% (V/V)	Volumenprozent
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
ATP	Adenositriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	Beziehungsweise
c	centi
C	Cytosin
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma oncogene</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
c-Met	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i> (Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
D-MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EC ₅₀	<i>Effective concentration 50%</i> (effektive Konzentration 50%)
EDTA	<i>Ethylen-diamin-tetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ENU	<i>Ethyl-Nitroso-Urea</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	und andere
G	Guanin
g	Gramm
Gab1	<i>Grb2-associated binding protein 1</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCN	<i>Gene copy number</i>
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
h	<i>hour</i> (Stunde)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> (Hepatozyten Wachstumsfaktor)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
IC ₅₀	<i>maximal inhibitory concentration</i> (mittlere inhibitorische Konzentration)
IGF1	<i>Insulin-like growth factor</i> (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor receptor</i> (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor)
IgG	Immunglobulin G
k	kilo
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
l	Liter

LB	Luria Bertani
m	Meter
m	milli
M	Molar
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> (Monoklonaler Antikörper)
mCRC	<i>Metastasing colorectal cancer</i> (metastasierendes Kolorektalkarzinom)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleid acid</i> (Boten-RNA)
min	Minute
n	Nano
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> (nichtkleinzelliger Lungenkrebs)
p	phospho
p21	CDK (<i>Cyclin dependent kinase</i>) Inhibitor 1
p27	CDKN1B (<i>Cyclin dependent kinase</i>) Inhibitor 1B
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	<i>Principal component</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
pY	phospho Tyrosin
RAF	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing transforming protein</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TGF α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel

Sonstige Symbole

°C	Grad Celsius
μ	mikro
%	Prozent
®	<i>Registered</i>
TM	Trade Mark

Zusammenfassung

Der Hepatozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor c-Met ist eine Rezeptor Tyrosinkinase, die vielfältige Rollen bei der Weiterleitung von extrazellulären Signalen in das Innere der Zelle spielt. Die beiden wichtigsten durch c-Met aktivierte Signalwege sind die Ras/Raf/MEK/MAPK-Kaskade und der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/AKT Signalweg (PI3K/AKT). Die durch c-Met aktivierten Signalwege sind sowohl unter normalen physiologischen Bedingungen als auch bei der Krebsentstehung von erheblicher Bedeutung. In vielen Tumoren findet man aufgrund von c-Met Mutationen, Amplifikationen oder Überexpressionen eine dauerhaft aktivierte c-Met-Signaltransduktionskaskade. c-Met ist dadurch ein attraktives Target für die Behandlung von Tumoren mit therapeutischen Antikörpern oder niedermolekularen Kinaseinhibitoren, jedoch stellt das Auftreten von Resistenzen gegenüber dem Arzneistoff eine therapeutische Herausforderung dar.

In dieser Arbeit wurde in humanen Tumorzelllinien eine Resistenz gegenüber drei verschiedene c-Met-Inhibitoren durch eine Langzeitkultivation unter Anwesenheit der entsprechenden Inhibitoren erzeugt. Bei der anschließenden Charakterisierung konnte festgestellt werden, dass eine der Zelllinien eine Mutation in der ATP-Bindendestelle der Kinasedomäne von c-Met erworben hat, in Folge dessen eine Bindung und Wirkung der Inhibitoren nicht mehr gegeben war. Im Rahmen einer vergleichenden Genexpressionsanalyse konnten eine Reihe von Kandidatengen identifiziert werden, die in den c-Met-resistenten Zelllinien ein differentielles Expressionsmuster aufwiesen. Dabei kam es in den Zelllinien ohne c-Met-Mutation vor allem zu einer deutlich verstärkten Expression von KRAS und dem IGF-1R, in Folge dessen eine vermehrte Aktivität des PI3K/AKT und MAPK-Signalweges beobachtet werden konnte, was die Blockierung des c-Met-Signalweges kompensierte.

In einem nachfolgend angestellten Ansatz wurden kombinatorische Behandlungsmöglichkeiten aufgezeigt, die die Durchbrechung der c-Met-Resistenz ermöglichen sollten. Dabei erwiesen sich insbesondere die duale Blockierung des PI3K- und MAPK-Signalweges und der kombinatorische Einsatz der Zytostatika Cisplatin bzw. 5-FU mit einem PI3K-Inhibitor als vielversprechend.

Durch die angestellten Ergebnisse konnten erste Erkenntnisse bezüglich möglicher Resistenzmechanismen gegen c-Met-Inhibitoren gewonnen werden, die für die Entwicklung von verbesserten Therapiemöglichkeiten essentiell sind.

Summary

The hepatocyte growth factor receptor c-Met is a receptor tyrosine kinase, which plays an important role in diverse signal transduction pathways. The most important signal transduction pathways are the Ras/Raf/MEK/MAPK- and the Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT-pathway. The c-Met signal transduction pathway plays a prominent role under normal physiological conditions as well as during carcinogenesis. In many tumours permanent activation of the c-Met signal transduction pathway is evident due to mutations in the c-Met gene, amplification or overexpression of c-Met. c-Met is an attractive target for the treatment of tumours with therapeutic antibodies or small molecule kinase inhibitors. However, the development of a resistance mechanism to anticancer drugs is still a therapeutic challenge.

In this study, human resistant cancer cell lines, which were long-term exposed to three different selective c-Met inhibitors, were established. Characterisation of the resistant cell lines identified a mutation in the ATP-binding site in the c-Met kinase domain of one single cell line. The result of this mutation was that binding of the inhibitors was prevented, hence they were rendered therapeutically ineffective. After performing a comparable gene expression analysis, it was possible to identify a number of candidate genes that had a differential expression profile. Significantly, cell lines without a c-Met mutation showed an increase in expression of KRAS and IGF-1R. As a consequence of this, the cells exhibit an increase in activity of the PI3K/AKT and MAPK pathways, which could compensate for the blockage of the c-Met pathway. In a subsequently implemented approach, combination therapies were demonstrated to break the c-Met resistance in the cell lines. The dual blockage of the PI3K/AKT and MAPK pathways and the combination of a cytostatic cisplatin respectively 5-FU were proved to be a promising approach.

The sustained results obtained provide initial insights regarding possible resistance mechanisms against c-Met inhibitors. This could help to develop improved therapies for the patients.

1. Einleitung

1.1 Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK)

Für vielzellige Organismen ist es essentiell, Mechanismen für die Kommunikation untereinander zu besitzen. Nur so ist das Wachstum, das Überleben, die Wanderung von Zellen oder aber auch das Differenzieren und Sterben der Zelle möglich. Für eine korrekte Steuerung all dieser zellulären Prozessen ist es wichtig, dass sich die Zellen untereinander austauschen können. Man unterscheidet dabei zwischen direkten, kontaktabhängigen Signalen, bei denen die signalsendende Zelle direkt mit der Empfängerzelle verbunden ist und indirekten Signalen, bei denen sezernierte Moleküle eine Rolle spielen. Sezernierte Moleküle können sowohl auf unmittelbar benachbarte als auch auf weiter entfernte Zellen Einfluss nehmen. Komplementäre membranständige Rezeptoren auf den Zielzellen ermöglichen eine spezifische Bindung der Moleküle und befähigen die Zellen, diese Informationen durch komplexe Signalkaskaden in das Zellinnere weiterzuleiten und zu prozessieren. Reversible, post-translationale Phosphorylierungen von Tyrosin-, Threonin- oder Serinresten, katalysiert durch spezifische Tyrosin-, Threonin- oder Serinkinasen, welche γ -Phosphat von ATP auf die entsprechenden Hydroxylgruppen übertragen, nehmen eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion ein. Diese post-translationalen Modifizierungen können sowohl aktivierende als auch inhibierende Einflüsse auf die Proteine haben. Aufgrund ihrer regulatorischen Fähigkeiten spielen Kinasen somit eine wichtige Rolle bei vielen grundlegenden zellulären Prozessen wie dem Zellwachstum, der Zellteilung, der Differenzierung, dem Zellüberleben, der Angiogenese und der Adhäsion (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Zum physiologischen Normalzustand abweichende Expressionsmengen, sowie die unkontrollierte Aktivierung durch Mutationen innerhalb einer Zelle, führen häufig zu einer Entwicklung von Tumoren. Kinasen stellen somit attraktive Strukturen für eine gezielte Krebstherapie dar.

Tyrosinkinasen werden schematisch in zwei verschiedene Klassen eingeteilt: die zytosolischen- und die membranständige Kinasen. Während erstere im Zellinneren vorliegen und dort für die Aktivierung weiterer Proteine verantwortlich sind, sind die Rezeptor Tyrosinkinasen in der Zellmembran verankert, wodurch sie extrazelluläre Stimuli direkt in die Zelle weiterleiten können.

Rezeptor Tyrosinkinasen sind Transmembranproteine mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Bis heute konnten 58 RTK, unterteilt in 20 Unterfamilien, identifiziert werden (Manning *et al.*,

2002). Sie bestehen aus einer stark glykolysierten N-terminalen extrazellulären Domäne, die eine spezifische Bindung von Liganden ermöglicht, einer C-terminalen intrazellulären Domäne, die die Kinasedomäne beinhaltet und einer Transmembrandomäne, die die extrazelluläre und intrazelluläre Domäne miteinander verbindet.

Die Bindung eines Liganden, wie z.B. eines Wachstumsfaktors, führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, in der Regel gefolgt von einer Homo- oder Heterodimerisierung zweier Rezeptoren. Die Kinasedomänen der Rezeptoren phosphorylieren sich dabei über Kreuz, wodurch der Rezeptor in seine aktive Form überführt wird. Die Phosphorylierung von Tyrosinresten außerhalb der Kinasedomäne erzeugt zudem Andockstellen für intrazelluläre Proteine und induziert eine Weiterleitung des ursprüngliche Signals über nachgeschaltete Signalproteine bis in den Zellkern, wodurch eine veränderte Genexpression hervorgerufen werden kann.

1.1.1 Der Hepatozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor (c-Met)

1.1.1.1 Struktur von c-Met

Bei dem Hepatozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor c-Met (Hepatocyte growth factor receptor/ HGFR) handelt es sich um eine Rezeptor Tyrosinkinase (Park *et al.*, 1987), die erstmalig als Onkogen entdeckt wurde, nachdem humane Osteosarkomzellen nach einer *in vivo* Behandlung mit dem Karzinogen N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin transformierende Eigenschaften aufwiesen (Cooper *et al.*, 1984). Es konnte eine Lokalisationsänderung der Translocated Promotor Region (TPR) von Chromosom 1 nach Chromosom 7 beobachtet werden, wodurch das Fusionsprotein Tpr-Met entsteht. Durch zwei Leucin-Zipper-Motive innerhalb der TPR-Domäne ist eine ligandenunabhängige Dimerisierung zweier TPR-Met Proteine möglich, wodurch eine konstitutive Phosphorylierung und Aktivierung erfolgt (Rodrigues and Park, 1993). Verglichen mit dem natürlichen Protein hat das TPR-Met-Protein eine bis zu fünfmal höhere Kinaseaktivität (Vigna *et al.*, 1999). TPR-Met konnte später in Patienten mit Magenkrebs nachgewiesen werden (Santoro *et al.*, 1996 und Soman *et al.*, 1990).

Das c-Met-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 7 im Bereich von 7q21-q31 lokalisiert und wird durch eine 21 Exons umfassende mRNA codiert. Durch alternatives Spleißen können Transkripte unterschiedlicher Länge generiert werden. Die 1408 Aminosäure lange Rezeptor Tyrosinkinase wird hauptsächlich in Geweben epithelialer Herkunft exprimiert. Der Rezeptor setzt sich aus einer 50 kDa großen extrazellulären α -Kette

und einer 145 kDa großen β -Kette zusammen. Beide werden zusammen als ein Vorläuferprotein synthetisiert und nach proteolytischer Spaltung durch die Endoprotease Furin in ein über Disulfidbrücken miteinander verbundenes membranständiges Protein überführt (Gonzatti-Haces *et al.*, 1988 und Komada *et al.*, 1993). Eine Transmembrandomäne verbindet die extra- und intrazelluläre Domäne. Der extrazelluläre Teil des Proteins setzt sich aus der Semaphorin-Domäne (Sema-Domäne), einer cysteinreichen-PSI-Domäne (Plexin/Semaphorin/Integrin-Domäne) und vier Immunglobulin-ähnlichen Teilen zusammen. Der intrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus der Juxtamembran- und der Kinasedomäne (siehe Abb. 1.1). Während die Sema-Domäne bei der Interaktion zwischen dem stimulierenden Wachstumsfaktor und dem Rezeptor eine wichtige Rolle spielt und dadurch die Dimerisierung und Aktivierung von c-Met vermittelt, führt die Bindung des Proteins c-Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma protein*) an die Juxtamembrandomäne zum Abbau des Rezeptors durch Degradation. Die am C-Terminus befindliche Kinasedomäne besteht aus zwei Bereichen, einer N-terminalen und einem C-terminalen. Beide sind über ein Scharniergelenk (Hinge-Region) miteinander verbunden. Durch Konformationsänderungen in diesem Bereich kann die Kinase aktiviert oder inaktiviert werden. In der ebenfalls dort befindlichen katalytischen Domäne findet die Bindung von ATP statt.

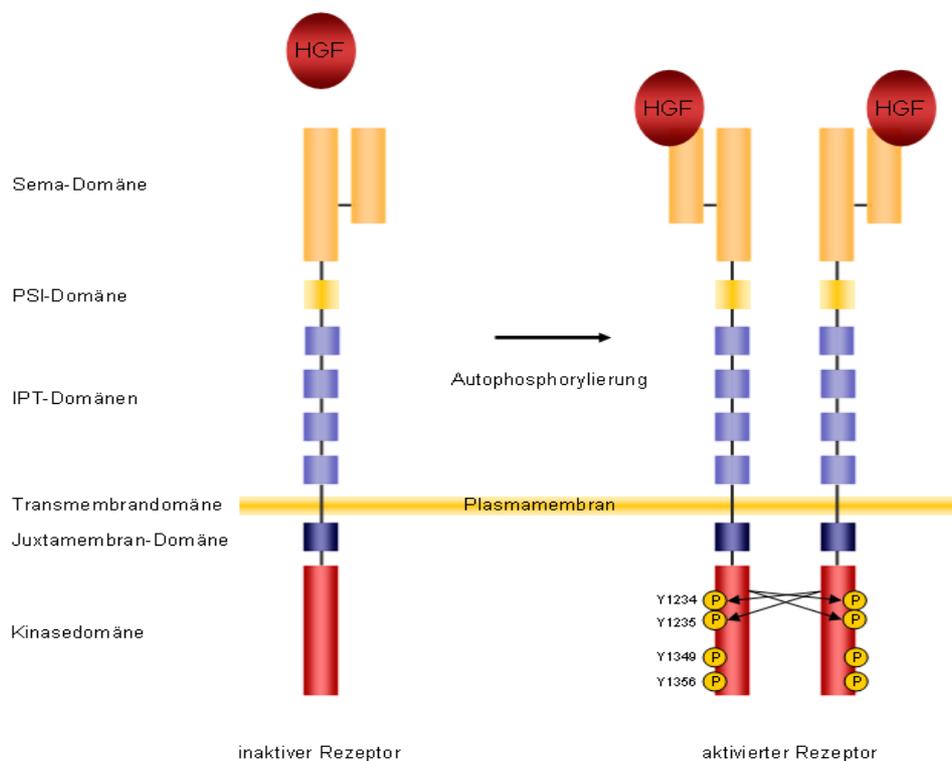


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Rezeptor Tyrosinkinase c-Met und dessen Aktivierung durch seinen Liganden HGF.

1.1.1.2 Struktur des c-Met-Ligandens HGF

Der Wachstumsfaktor HGF (*hepatocyte growth factor*, auch *scatter factor* genannt) ist der einzige bekannte Ligand des Rezeptors c-Met. Er gehört zu der Familie der Plasminogen-verwandten Wachstumsfaktoren und wird hauptsächlich von mesenchymalen Zellen (Cooper *et al.*, 1984), aber auch von Fibroblasten (Sonnenberg *et al.*, 1993) und glatten Muskelzellen (Naldini *et al.*, 1991) als Vorläuferprotein sekretiert. Das HGF-Gen befindet sich, genau wie das c-Met-Gen, auf Chromosom 7 (7q11.1-21) und kodiert für eine mRNA mit 17 Introns und 18 Exons. Nach der Translation kommt es zu einer proteolytischen Spaltung des 728 Aminosäuren umfassenden Polypeptids, wodurch ein durch Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer entsteht (siehe Abb. 1.2.). HGF kann sowohl auto- als auch parakrin auf c-Met exprimierende Epithelzellen Einfluss nehmen. Die Spaltung des Polypeptids kann durch verschiedene Serinproteasen, wie dem HGF-Aktivator, den Plasminogenaktivatoren tPA und uPA oder aber auch durch verschiedene Gerinnungsfaktoren katalysiert werden (Kataoka *et al.*, 2003, Mars *et al.*, 1993, Shimomura *et al.*, 1995). Das prozessierte HGF besteht aus einer α -Kette mit einem aminoterminalen Teil (N), gefolgt von einem 27 Aminosäuren umfassenden Hairpin Loop (HP) und vier Kringeldomänen (K1-K4). Die erste Kringeldomäne bildet zusammen mit dem aminoterminalen Teil die Bindungsdomäne, die für die Interaktion mit dem Rezeptor verantwortlich ist. Die β -Kette besteht aus einer Serin-Protease-ähnlichen Struktur (SPH), die jedoch durch einen Aminosäureaustausch keine Protease-Aktivität aufweist (Lokker *et al.*, 1992). Der strukturelle Aufbau des HGF-Proteins mit den Kringeldomänen und der Serin-Protease-ähnlichen Struktur begründet die Zugehörigkeit zu der Familie der Plasminogene (Nakamura *et al.*, 1991). Spleißvarianten, wie die beiden verkürzten Proteine NK1 und NK2, die nur aus dem aminoterminalen Teil und der ersten bzw. aus den ersten beiden Kringeldomänen bestehen, weisen ebenfalls ein, wenn auch schwächeres, Bindungsverhalten gegenüber c-Met auf und konkurrieren mit dem natürlichen HGF um den Rezeptor (Cioce *et al.*, 1996).

HGF wurde erstmals aus Leberepithelzellen von Ratten isoliert, wo er als wachstumsförderndes Protein beschrieben wurde (Nakamura *et al.*, 1984). Die Fähigkeit, Epithelzellen voneinander zu separieren und das Auswandern einzelner Zellen zu initiieren, brachte ihm den weiteren Name *scatter factor* ein (Viegna *et al.*, 1994), nachdem wiederum Nakamura *et al.* im Jahre 1991 bestätigen konnten, dass es sich dabei um das gleiche Protein handelte wie HGF. Durch die Aktivierung seines Rezeptors c-Met wirkt er als mitogener und motogener Faktor auf die Zelle ein.

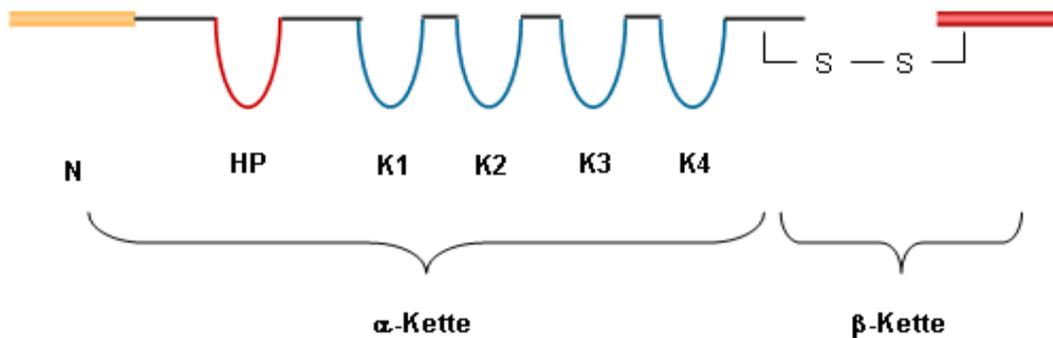


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Hepatozyten Wachstumsfaktor HGF.

1.1.1.3 Aktivierung von c-Met durch Bindung des Liganden HGF

HGF kann c-Met über zwei verschiedene Mechanismen binden. Die α -Kette des Proteins erkennt und bindet den Rezeptor an der IP3 und IP4-Domäne mit einer sehr hohen Affinität. Diese Bindung ist unabhängig von einer vorangegangenen Prozessierung von HGF. Die β -Kette bindet dagegen mit einer deutlich geringeren Affinität an die Sema-Domäne des c-Met-Rezeptors. Diese Bindung ist erst nach der Prozessierung und Aktivierung von HGF möglich und ist unerlässlich für die Aktivierung von c-Met (Trusolino *et al.*, 2010). Die Aktivierung von c-Met ist demnach eng an die lokale Expression von Proteasen gekoppelt. Die α -Kette fungiert somit als hochaffines Bindungs- und die β -Kette als Aktivierungsmodul (Nakamura *et al.*, 2011). Nach der Bindung von HGF kommt es zu einer Homodimerisierung zweier Rezeptoren mit einer anschließenden Aktivierung. Rezeptor und Ligand binden in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Gherardi *et al.*, 2006). Nach der Dimerisierung kommt es zu einer Transphosphorylierung und Aktivierung der katalytischen Untereinheit in der intrazellulären Kinasedomäne, wodurch eine Konformationsänderung erfolgt. Die ATP-Bindungsstelle wird zugänglich, woraufhin die Tyrosinreste 1230, 1234 und 1235 (alle folgenden Aminosäureangaben wurden auf die NCBI Referenzsequenz NP_000236.2 bezogen) phosphoryliert werden, wodurch erst die vollständige Aktivierung der Kinase erzielt werden kann. Die Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität bewirkt eine Phosphorylierung der Tyrosinreste 1249 und 1356, die daraufhin als Andockstelle für Adaptorproteine mit SH2-Domäne, wie z.B. Grb2 (Ponzetto *et al.*, 1996), Gab1 (Weidner *et al.*, 1996) und Shc (Pelicci, 1995), fungiert. Weitere Proteine, die mit einer dieser Tyrosinreste interagieren können und dadurch die Bindung weiterer nachgeschalteter Signalproteine ermöglichen, sind z.B. Src, PLC γ , SOS, Stat3 und PI3K (Ponzetto *et al.*, 1994, Graziani *et al.*, 1993 und Longati *et al.*, 1994).

Die Bindung dieser Proteine ist wiederum essentiell für die Weiterleitung der extrazellulären Signale über verschiedene Signalwege.

Sowohl der in der Juxtamembrandomäne lokalisierter Serinrest 985 als auch der Tyrosinrest 1003 ermöglichen eine negative Rückkopplung. Durch die Phosphorylierung des Serinrest 985 kommt es zu einer Herunterregulation des Rezeptors, und die Phosphorylierung an Tyrosin 1003 ermöglicht die Bindung von c-Cbl, wodurch eine Ubiquitinierung und Internalisierung von c-Met induziert wird (Petrelli *et al.*, 2002). Die negative Regulation der Rezeptoraktivierung wird über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) als auch über einen intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration vermittelt (Gandino *et al.*, 1991).

1.1.1.4 Biologische Funktion von c-Met

Die hohe Zahl möglicher Bindungspartner an den aktivierten Rezeptors verdeutlicht, welche vielfältige Rolle die Rezeptor Tyrosinkinase innerhalb der Zelle spielt. Die beiden wichtigsten durch c-Met aktivierte Signalwege sind die Ras/Raf/MEK/MAPK-Kaskade und der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/AKT Signalweg (PI3K/AKT). Die durch c-Met aktivierten Signalwege spielen sowohl unter normalen physiologischen Bedingungen als auch bei der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle (Birchmeier *et al.*, 2003). Diese durch c-Met getriebenen Prozesse können im adultem Organismus in besonderen Situationen wie bei der Wundheilung, der Geweberegeneration, aber auch in Tumorzellen reaktiviert werden. Ähnlich wie bei der Wundheilung kommt es bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen zuerst zu einer Zerstörung der Zellverbände und einer Infiltrierung einzelner Zellen in das umliegende Gewebe. Dort fangen die Zellen, vor Anoikis geschützt, zunächst an zu proliferieren, bevor sie schließlich in die Blutgefäße eindringen und somit in andere Gewebe transportiert werden können (Ruoslahti, 1996). Die Bindung von HGF an den Rezeptor kann eine Änderung des Adhäsionsverhaltens von epithelialen Zellen verursachen, wodurch eine Transition zu mesenchymalen Zelltypen möglich wird (Mazzone und Comoglio, 2006; Toyama *et al.*, 2011). Dieser Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) genannter Prozess ist bei der Organogenese und Angiogenese ebenfalls von Bedeutung. Bei der Reparatur von Schäden an Leber und Herz (Nakamura *et al.*, 2000 und Huh *et al.*, 2004) und bei der Wundheilung und Gewebegeneration ist eine korrekt funktionierende HGF/c-Met-Achse ebenso essentiell (Bladt *et al.*, 1995) wie beim Prozess der Differenzierung. Anschaulich demonstriert wurde dies in Mäusen, bei denen die Disregulation in der Expression von c-Met und HGF bereits während der Embryonalentwicklung zu schwerwiegenden Störungen führte. Sie wiesen neben Problemen mit der Skelettbildung, der Migration von Melanozyten und Neuralleistenzellen, auch eine Entwicklung von Tumoren unterschiedlichen Typus auf.

In Knockout-Mäusen führt die vollständige Inaktivierung des c-Met-Gens bereits innerhalb der ersten 16 Tage der Embryonalentwicklung zum Tod der Tiere. Beobachtet wurde dabei nicht nur eine mangelnde Versorgung der Embryonen aufgrund von Defekten in der Ausbildung der Plazenta, sondern auch schwerwiegende Probleme bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur, die auf einen Defekt bei der Auswanderung der Muskelprogenitorzellen zurückzuführen waren. Desweiteren wurden Defekte in der Leber beobachtet. (Bladt *et al.*, 1995).

1.1.1.5 Durch c-Met regulierte Signalwege

Die physiologische Funktion von Rezeptor Tyrosinkinase besteht darin, extrazelluläre, stimulierende Signale, z.B. durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, in den intrazellulären Bereich der Zelle zu transduzieren. Die durch c-Met aktivierten Signalwege sind unter anderem der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg und der Mitogen-aktivierte-Kinase-Signalweg.

1.1.1.5.1 Mitogen-aktivierter-Signalweg

Der Mitogen-aktivierte-Kinase-Signalweg (MAPK) spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von zellulären Prozessen wie dem Zellwachstum und der Zellteilung, sowie dem Überleben der Zelle. Die Assoziation des Adaptorproteins Grb2 an die phosphorylierte Rezeptor Tyrosinkinase ermöglicht die Bindung des Guanin-Nukleotid Austauschfaktors SOS (*son of sevenless*). SOS kann daraufhin an das membranständige Protein Ras, eine kleine GTPase, binden und den Austausch des Ras-gebundenen GDPs gegen GTP bewirken. Das nun aktivierte Ras rekrutiert und aktiviert die Kinase B-Raf, die ihrerseits die dualspezifischen MAPK-Kinasen MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase) aktiviert. Die Kinasen ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) werden daraufhin von MEK1/2 phosphoryliert. Die Signalkaskade endet mit der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die schlussendlich die Expression von zahlreichen Genen initiieren. Dies hat das Wachstum und die Teilung der Zelle zur Folge (siehe Abb. 1.3). Um eine unregelmäßige, dauerhafte Aktivierung der Signalkaskade durch das aktivierte Ras-GTP zu verhindern, unterstützen GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch eine Inaktivierung von Ras erreicht wird.

1.1.1.5.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase wird von Rezeptor Tyrosinkinasen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder kleinen G-Proteinen aktiviert und reguliert sowohl das Zellwachstum als auch das Überleben von Zellen (siehe Abb. 1.3.). Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an die Rezeptoren werden diese phosphoryliert und aktiviert. Die Untereinheiten p85 und p110 der PI3K bilden einen Komplex, und durch die Bindung an den Rezeptor über die SH2-Domäne kommt es zunächst zu einer Rekrutierung an den Rezeptor, worauf eine Aktivierung der PI3K erfolgen kann (Cantley, 2002). Nach ihrer Aktivierung phosphoryliert die PI3K Inositolphospholipide an der 3-Position des Inositolrings. Die dabei entstehenden, an der Plasmamembran lokalisierten Lipide PI-3,4-bisphosphat und PI-3,4,5-trisphosphat, fungieren als Andockstelle für intrazelluläre Signalproteine. Die Serin/Threoninkinase Akt und die Phosphatidylinositol-abhängige Proteinkinase PDK1 binden über ihre PH-Domänen (Pleckstrin-Homologie) an PI-3,4,5-trisphosphat. Die daraufhin folgende Konformationsänderung von Akt ermöglicht die Aktivierung der Kinase durch die Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin 308 durch PDK1 und der Aminosäure Serin 473 durch mTORC2/Rictor. Die Phosphorylierung an beiden Aminosäureresten ist nötig, um eine vollständige Aktivierung von Akt erzielen zu können (Alessi *et al.* 1997). Die Phosphatase PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) wirkt durch die Inhibition der Phosphorylierung des Serins 473 antagonistisch auf den Signalweg ein und verhindert dadurch eine dauerhafte Aktivierung (Bayascas und Alessi, 2005). Nach erfolgter Dissoziation von der Plasmamembran phosphoryliert Akt die antiapoptotischen Proteine BAD und Bax, die eine Hemmung der Apoptose induzieren. Ein vermehrtes Wachstum der Zelle wird über die Regulation der Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27^{Kip1} sowie des Zellzyklusproteins Cyclin D1 erreicht. Des Weiteren aktiviert Akt mTORC1, wodurch die Translation verschiedener Proteine und in dessen Folge das Wachstum der Zelle induziert wird.

Die zeitnahe Inaktivierung des Signalweges durch die Inhibition der Phosphorylierung von PI-3,4-bisphosphat und PI-3,4,5-trisphosphat durch die Phosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) verhindert ein übermäßiges Wachstum der Zelle und eine dauerhafte Inhibition der Apoptose. Durch die Beteiligung an der Apoptose-Regulation - und somit dem Zellüberleben -, trägt die PI3K/AKT-Signaltransduktionskaskade wesentlich zum Prozess der Onkogenese bei. Mutationen, sowohl zu finden innerhalb der Kinase- und der helikalen Domäne der PI3K als auch im Tumorsuppressor PTEN, sorgen z.B. für die konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs (Chalhoub *et al.*, 2009). In Pankreaskarzinomen konnte des Weiteren die Mutations-unabhängige Aktivierung der PI3K/AKT-Signaltransduktionskaskade nachgewiesen werden (Schlieman *et al.*, 2003).

Die Aktivierung des PI3K-Signalweges durch Ras und die Möglichkeit des regulatorischen Eingreifens von Akt auf die Ras/Raf/MAPK durch die Inhibition der Phosphorylierung von Raf bringt eine Verknüpfung der beiden Signalwege mit sich.

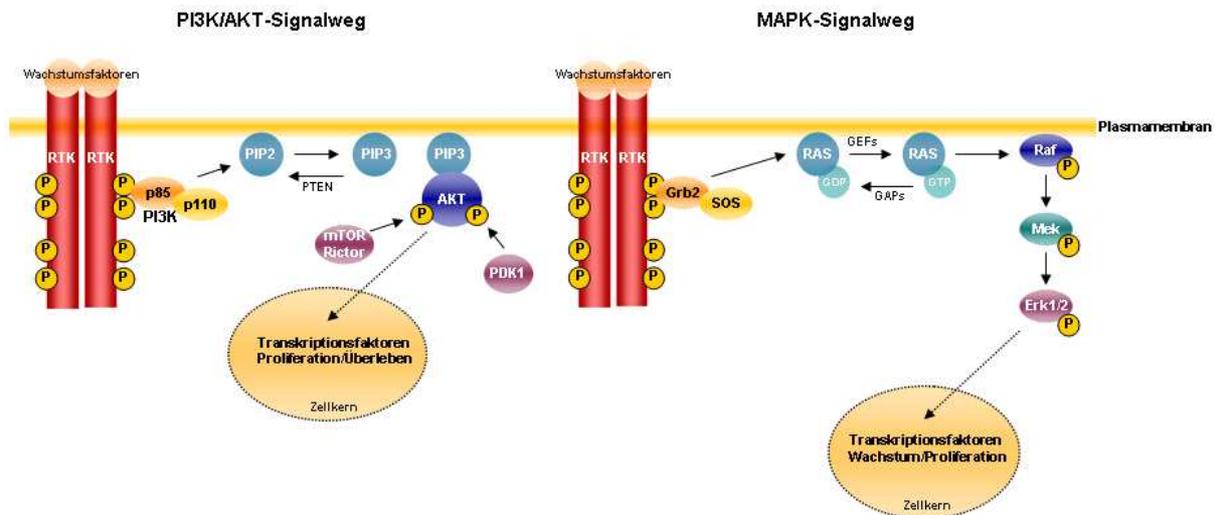


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des PI3K/AKT- und des MAPK-Signalwegs.

1.1.2 Die Rolle von c-Met bei der Entstehung von Krebs

1.1.2.1 Eigenschaften von Krebszellen

In den westlichen Industrieländern stellen Krebserkrankungen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Mehr als 400000 Krebsneuerkrankungen werden Schätzungen zur Folge jährlich in Deutschland diagnostiziert, wobei Männer am häufigsten an Prostata- und Frauen an Brustkrebs erkranken (Robert Koch-Institut, 2010). Im Jahr 2006 erlagen mehr als 200000 Patienten den Folgen ihrer Erkrankung. Trotz immer weiterer Fortschritte, sowohl in der Diagnostik als auch in der Behandlung von Tumoren, ist die Erfolgsquote bei der Behandlung nach wie vor unbefriedigend.

Der Prozess der Krebsentstehung beginnt durch die onkogene Transformation einzelner Zellen, währenddessen es zu genetischen Umprogrammierungen innerhalb der Zelle kommt. Die Verwandlung in eine maligne Zelle benötigt in der Regel mehr als eine spontane

Mutation. Häufig führt erst der Erwerb von fünf bis zehn Mutationen zu einer unerwünschten und unkontrollierten Zellvermehrung, wodurch letztendlich ein Tumor entstehen kann. Tumorzellen zeigen im Allgemeinen folgende Eigenschaften: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Umgehung des programmierten Zelltods, Umgehung von Wachstumsunterdrückern, Insensitivität gegenüber anti-proliferativen Faktoren, unbegrenzte Teilungsvermögen, vermehrte Angiogenese sowie die Fähigkeit zur Invasion in Gewebe und die Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2011 und Abb. 1.4).

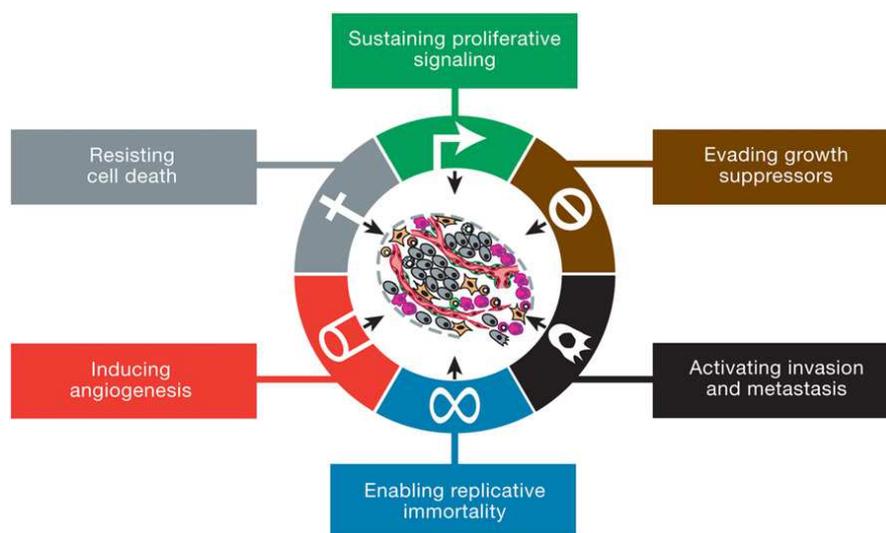


Abb. 1.4: Charakteristische Kennzeichen einer Krebszelle (Hanahan und Weinberg, 2011).

Verursacht werden diese Mutationen beispielsweise durch Fehler während der Mitose, aber auch durch Karzinogene, die von außen auf den Organismus einwirken. Dabei können Strahlungen, chemische Substanzen, aber auch Virusinfektionen die Entstehung von Mutationen begünstigen.

Gene, die bei der Entwicklung von Krebs beteiligt sein können, werden formal in zwei Klassen eingeteilt. Bei den Onkogenen ist die Aktivität oder die Expression einzelner Proteine aufgrund von Mutationen zu hoch. Man spricht von Funktionsgewinn-Mutationen (*gain of function*). Bei den Tumorsuppressorgenen liegen Funktionsverlust-Mutationen (*loss of function*) vor, in deren Folge eine verminderte Aktivität der Genprodukte vorliegt. Onkogene verhalten sich in der Regel dominant, d.h. eine Mutation in einer Kopie des Gens führt bereits zu einer gesteigerten Genaktivität. Tumorsuppressorgene liegen dagegen häufig in rezessiver Form vor und somit müssen beide Allele des Gens mutiert sein, bis es zu einer

Änderung im Phänotyp der Tumorzelle kommen kann. Viele Tumorsuppressorgene kodieren für Zellzyklusproteine oder Proteine, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen.

1.1.2.2 Der Einfluss von c-Met auf Krebserkrankungen

Viele Tyrosinkinase sind aufgrund ihrer Beteiligung an der Regulierung von Wachstumsprozessen an der malignen Transformation von Zellen beteiligt. Eine Liganden-unabhängige Dimerisierung oder Aktivierung des Rezeptors aufgrund einer Überexpression oder Mutation des Rezeptors, die Amplifikation des Gens oder aber auch die gesteigerte Sekretierung von Liganden können Ursachen für eine verstärkte, nicht mehr kontrollierte intrazelluläre Signaltransduktion sein.

Während ursprünglich das onkogene Potential von Tpr-Met (siehe 1.1.1.1) in Fibroblastenkulturen identifiziert wurde, erwies sich in Folgestudien das natürliche Protein als ebenso potent bei der Ausbildung von Tumoren. So konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass in Zellen, die c-Met oder HGF überexprimieren, das Wachstum von Tumoren vermehrt induziert wird. Ebenso kann in vielen humanen Tumorarten eine dauerhafte c-Met Aktivität beobachtet werden. Es finden sich dabei sowohl HGF-abhängige als auch -unabhängige, konstitutive Aktivierungen des Rezeptors. Die Überexpression von c-Met und/oder HGF, die autokrine oder parakrine Sekretierung von HGF oder die Entstehung von aktivierenden Mutationen in für den c-Met-Rezeptor kodierenden Bereichen kommen als mögliche Ursachen für die Zunahme von Zellwachstum und Zellproliferation, Invasion und Zellüberleben in Frage (Gentile *et al.*, 2008). Die Überexpression von c-Met, entweder als Folge einer erhöhten Anzahl von Genkopien oder verursacht durch eine gesteigerte Transkriptionsaktivität, stellt dabei die häufigste Ursache dar und korreliert mit einer schlechten klinischen Prognose (Di Renzo *et al.*, 1995 und Eder *et al.*, 2009). Amplifikationen werden häufig in Tumoren des Gastrointestinaltrakts und der Speiseröhre (Houldsworth *et al.*, 1990), aber auch in Karzinomen des Darms nachgewiesen (Di Renzo *et al.*, 1995). In Patienten mit nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen findet man häufig nach einer Behandlung mit EGFR-Inhibitoren eine Amplifikation des c-Met-Gens, wodurch eine kompensierende Aktivierung des c-Met Signalweges entsteht, um den blockierten EGFR-Signalweg ausgleichen zu können (Engelman *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass sich das c-Met-Gen auf einem fragilen Bereich des Chromosoms 7 (FRAG7G) befindet, veranlasste Hellman *et al.* im Jahre 2002 zu der Annahme, dass dies den Erwerb von onkogenen Amplifikationen begünstigt. Unter fragilen Regionen versteht man definierte Bereiche auf den Chromosomen, in denen unter spezifischen Bedingungen besonders häufig Chromosomenbrüche zu finden sind. Dabei kommt es während der Interphase zunächst zu

einem initialen Chromatidenbruch, auf welchem das entsprechende Gen lokalisiert ist. In der anschließenden Metaphase erfolgt dann eine Fusion mit dem Schwesterchromatid. Bei der Aufteilung der beiden Chromatiden während der Anaphase entsteht durch die Fusion eine Brücke zwischen den beiden Polen, und es kommt schließlich zu einem Bruch der fusionierten Chromatiden. Dadurch entstehen zwei ungleiche Tochterzellen, eine mit drei Kopien des Gens und eine mit lediglich einem Teil. Wiederholte Replikationen können dann zu einem deutlich höheren Kopiensatz der Zelle führen (siehe Abb. 1.5).

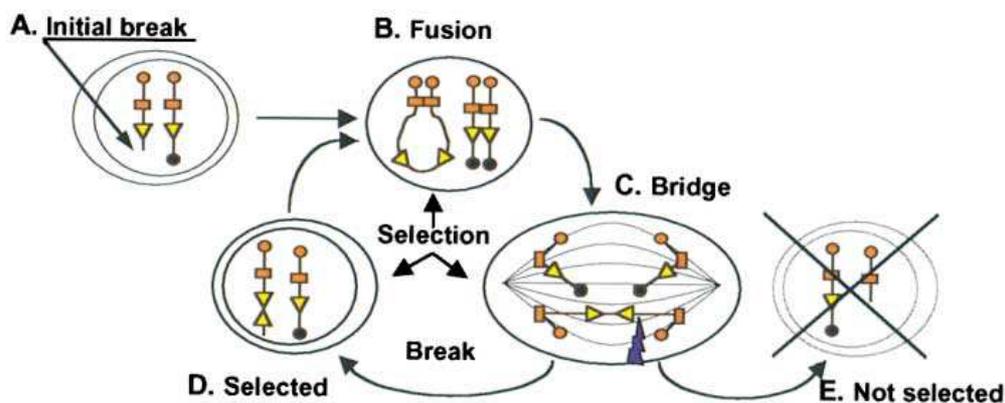


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Genamplifikation (Hellman *et al.*, 2002).

Die autokrine Sekretion von HGF durch Tumorzellen, die sowohl den Rezeptor als auch den Liganden exprimieren, konnte in Lungenkrebspatienten nachgewiesen werden (Ma *et al.*, 2008), findet sich aber auch in Gehirn- und Knochentumoren. Verschiedene Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne des *c-Met*-Gens wurden in Patienten, die an vererbbares papilläres Nierenzellkarzinom leiden, beschrieben (Dharmawardana, Giubellino, Bottaro, 2004). Oft wird durch diese Mutation die intrinsische Autoinhibierung der Kinase verhindert, wodurch *c-Met* dauerhaft aktiviert bleibt (Schmidt *et al.*, 1999). Daraus resultierend kommt es zu einer Aktivierung des RAS oder des PI3K-Signalweges, was ein vermehrtes Zellwachstum und das Zellüberleben zur Folge hat (Giordano *et al.*, 2000). Die EMT wird ebenfalls in vielen Tumoren induziert und unterstützt die Invasion und die Metastasierung der Tumorzellen massiv (Boccaccio und Comoglio, 2006).

Tab.1.1: Häufigkeit der Abweichungen der c-Met-Signaltransduktionskaskade in Tumorerkrankungen.

Dargestellt in % sind gesteigerte Expressionslevel, Mutationen und Amplifikationen von c-Met in verschiedenen Tumorarten (modifiziert nach Sattler *et al.*, 2011).

Tumorerkrankung	Expression von c-Met	Mutation im c-Met Gen	Amplifikation von c-Met
Brustkrebs	25-60	marginal	-
Darmkrebs	55-78	-	4-89
Eierstockkrebs	64	0-4	0
Gebärmutterhalskrebs	30-72	-	-
Gehirntumor	54-88	0-9	9-20
Hals und Kopf Tumore	52-68	11-27	-
Leberkrebs	68-69	0-30	-
Lungenkrebs	41-72	8-13	5-10
Magenkrebs	75-90	marginal	5-10
Mesothelioma	74-100	-	-
Nierenkrebs	54-87	13-100	
Sarkom	20-87	0-3	-
Schilddrüsenkrebs	40-91	6-10	-
Schwarzer Hautkrebs	17-39	marginal	-

1.1.2.3 Die Hemmung der c-Met vermittelten Signaltransduktion in Tumoren

Trotz immer weiter fortgeschrittener Diagnose- und Therapiemöglichkeiten bleibt der Erfolg einer Krebstherapie ungewiss. Zum einen entwickeln die zunächst auf die Therapie positiv reagierenden Tumore häufig Resistenzen, zum anderen sprechen viele Tumore schon zu Beginn der Behandlung nur ungenügend auf vorhandene Therapiemöglichkeiten an. Häufig findet man dies in heterogenen Tumoren, in denen die einzelnen Tumorzellen kein einheitliches Genexpressionsmuster aufweisen und unterschiedlich stark differenziert sind. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt dadurch unter 5 %. Da viele Tumore im Gegensatz zu pathologisch unauffälligem Gewebe jedoch ungewöhnlich hohe Mengen bestimmter Onkogene exprimieren, stellen diese selbst, oder von ihnen beeinflusste Signalproteine, attraktive Ziele für eine gezielte Krebstherapie dar. Durch die Inhibierung der Aktivität mittels spezifischer Arzneistoffe soll die Deregulation von Signaltransduktionswegen kontrolliert und somit ein weiteres Wachstum des Tumors verhindert werden. Dauerhaft aktivierte Tyrosinkinase finden sich häufig in Tumorgeweben (Giamas *et al.*, 2007) und bieten sich somit als Zielprotein der Arzneimittelentwicklung an.

In Kenntnis der unphysiologischen dauerhaften Aktivierung von c-Met und der daraus resultierende Beteiligung von c-Met bei der Entstehung vieler Tumore wurden verschiedene Strategien entwickelt, um eine dauerhafte Aktivierung des c-Met-Rezeptors pharmakologisch zu unterbinden. So wurden sowohl HGF neutralisierende- und c-Met blockierende-Antikörper als auch Inhibitoren, die die Kinaseaktivität von c-Met blockieren, entwickelt. Die Therapie mit niedermolekularen Inhibitoren scheint gegenüber den Antikörpern den Vorteil zu haben, direkt die Aktivierung der Kinase unterbinden zu können, unabhängig von dessen Aktivierungsmechanismus. Da die bisher entwickelten Antikörper die Bindung des Liganden, aber nicht die Rezeptor Dimerisierung, unterbinden können, werden diese Inhibitoren ihr Potential wahrscheinlich nur in HGF-abhängigen Tumoren entfalten können. Sowohl therapeutische Antikörper, die die Bindung von HGF an den Rezeptor hemmen, als auch Tyrosinkinaseinhibitoren, die die Aktivierung des Proteins verhindern, stehen im Mittelpunkt der gegenwärtigen Forschung (Liu, Newton und Scherle, 2009). Eine Beeinträchtigung des Zellwachstums und des Zelltods konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Smolen *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2007; Corso *et al.*, 2008). Aufgrund der hohen Spezifität und - verglichen mit herkömmlichen Zytostatika - geringeren Nebenwirkungen, verspricht man sich wesentliche Vorteile von diesen Arzneistoffen.

1.1.2.4 Biomarker in der personalisierten Medizin

Zum derzeitigen Zeitpunkt der Entwicklung konnten noch keine prädiktiven Biomarker etabliert werden, die durch die Auswahl geeigneter Patientengruppen eine personalisierte Therapie erlauben könnten. Um jedoch eine zufriedenstellende antitumorale Wirkung erzielen zu können, ist es wichtig, Patienten zu identifizieren, die einen maximalen Nutzen aus der Behandlung ziehen können. Bei der Behandlung von Kolorektaltumoren, die eine Abhängigkeit von der Aktivität des EGFR-Signalweges aufweisen, ist das KRAS-Gen ein prädiktiver Biomarker. Vor dem Einsatz einer der bereits zugelassenen Antikörper gegen den EGFR muss der Mutationsstatus des Gens im Tumor bestimmt werden, da in vielen Tumoren onkogene Mutationen im KRAS-Gen gefunden werden, die eine Resistenz gegen anti-EGFR Antikörper vermitteln. Nach dem Auftreten einer Mutation ist eine GAP-induzierte Hydrolyse von GTP zu GDP nicht mehr möglich, wodurch das Protein dauerhaft in seinem aktiven Zustand bleibt. Tumore, die Mutationen im KRAS-Gen aufweisen, die in einer konstitutiven Aktivierung des KRAS-Proteins resultieren, zeigen ein signifikant schlechteres Ansprechen auf EGFR-Inhibitoren als Patienten die die Wildtypform des Proteins exprimieren (Benvenuti *et al.*, 2007).

Um die Entscheidung zugunsten einer Therapie mit Substanzen, die die c-Met-Signaltransduktionskaskade unterbrechen, zu treffen, ist es unerlässlich, dass der Tumor abhängig von c-Met ist. Bei einer onkogenen Abhängigkeit (*oncogene addiction*) von c-Met, ist das Wachstum der Tumorzelle abhängig von einer genetischen Abberation, die zu einer verstärkten c-Met-Signaltransduktionskaskade führt. In solchen Tumoren liegt in der Regel eine konstitutive Aktivierung des Proteins vor, die häufig durch eine Amplifikation des c-Met-Gens mit einer einhergehenden hohen Expression des Proteins oder der autokrinen oder parakrinen Expression des Wachstumsfaktor HGF einhergeht. Humane Tumorzellen, die diese Kriterien erfüllen, erscheinen in der Tat sowohl *in vitro* als auch in Tiermodellen besonders sensitiv auf die Behandlung mit c-Met-Inhibitoren anzusprechen. Auch wenn die c-Met-Abhängigkeit des Tumors ein erstes wichtiges Kriterium bei der Auswahl der Patienten sein wird, ist es nichtsdestotrotz unumgänglich, durch die Charakterisierung von Sensitivitäts- und Resistenzmechanismen weitere Biomarker zu identifizieren.

1.1.2.4.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

Der Wirkmechanismus von ATP-kompetitiven Tyrosinkinaseinhibitoren besteht in der reversiblen Bindung an spezifische Aminosäuresequenzen innerhalb der Kinasedomäne des Rezeptors, wodurch die Zugänglichkeit von ATP an seine Bindungstasche verhindert wird. Eine Autophosphorylierung und anschließende Aktivierung des Rezeptors ist dadurch nicht mehr möglich. Durch die Unterbrechung der Signaltransduktionskaskade kommt es zu einer verminderten Proliferation und zu einem vermehrten Auftreten des programmierten Zelltods. Aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer Formulierung können die niedermolekularen Inhibitoren leicht in die Zellen eines Tumors eindringen und dort innerhalb kürzester Zeit ihre volle Wirkung entfalten. Bedingt durch die Tatsache, dass die ATP-bindende Domäne in Tyrosinkinasen hoch konserviert ist, sind Kinaseinhibitoren allerdings häufig nicht sonderlich selektiv. Nichtsdestotrotz befinden sich viele Tyrosinkinaseinhibitoren im Prozess der Zulassung oder werden bereits als Arzneimittel eingesetzt.

Bespiele für niedermolekulare Inhibitoren oder Antikörper, die eine Blockierung der c-Met-Signaltransduktionskaskade verursachen, sind in Abb.1.6 dargestellt. Niedermolekulare Inhibitoren werden aufgrund ihrer Eigenschaft, die aktive oder die inaktive Kinaseform zu binden, unterschieden. Während Inhibitoren der Klasse I die aktive Kinasekonformation binden, in denen der C-terminale Teil der katalytischen Domäne phosphoryliert ist, binden Inhibitoren der Klasse II die Kinase in ihrer inaktiven Form.

1.1.2.4.1.1 EMD 1214063 und EMD 1204831

EMD 1214063 und EMD 1204831 sind reversible, ATP-kompetitive c-Met Kinase Inhibitoren der Klasse I (siehe Abb. 1.6).

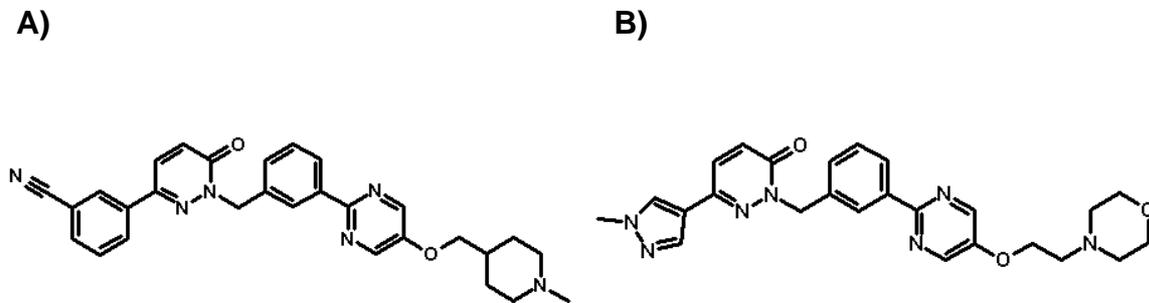


Abb. 1.6: Strukturformeln der c-Met-Inhibitoren.

A) EMD 1214063 (3-(1-(3-[5-(1-Methyl-piperidin-4-ylmethoxy)-pyrimidin-2-yl]-benzyl)-6-oxo-1,6-dihydro-pyridazin-3-yl)-benzonitrile-Hydrochloride -Hydrate)

B) 1204831 (6-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)-2-[3-[5-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)-pyrimidin-2-yl]-benzyl]-2H-pyridazin-3-one-Phosphate)

Bei der Bindung an den Rezeptor, welche in der ATP-bindenden Domäne der Kinase erfolgt, formen die Substanzen zwei Wasserstoffbrücken, zum einen mit der Hauptkette des Stickstoffatoms an Methionin 1160 in der Hinge Region und zum anderen mit der Hauptkette des Stickstoffatoms an dem Aspartatrest 1222 des DGF Motivs. EMD 1214063 formt des Weiteren zusätzliche stabilisierende, hydrophile Wechselwirkungen mit der Hauptkette des Stickstoffatoms am Tyrosinrest 1230 und den Aspartat – und Asparaginresten 1164 und 1167. EMD 1204831 bildet dagegen weitere Wasserstoffbrücken mit dem Argininrest 1086 und dem Isoleucinrest 1084 (siehe Abb.1.7).

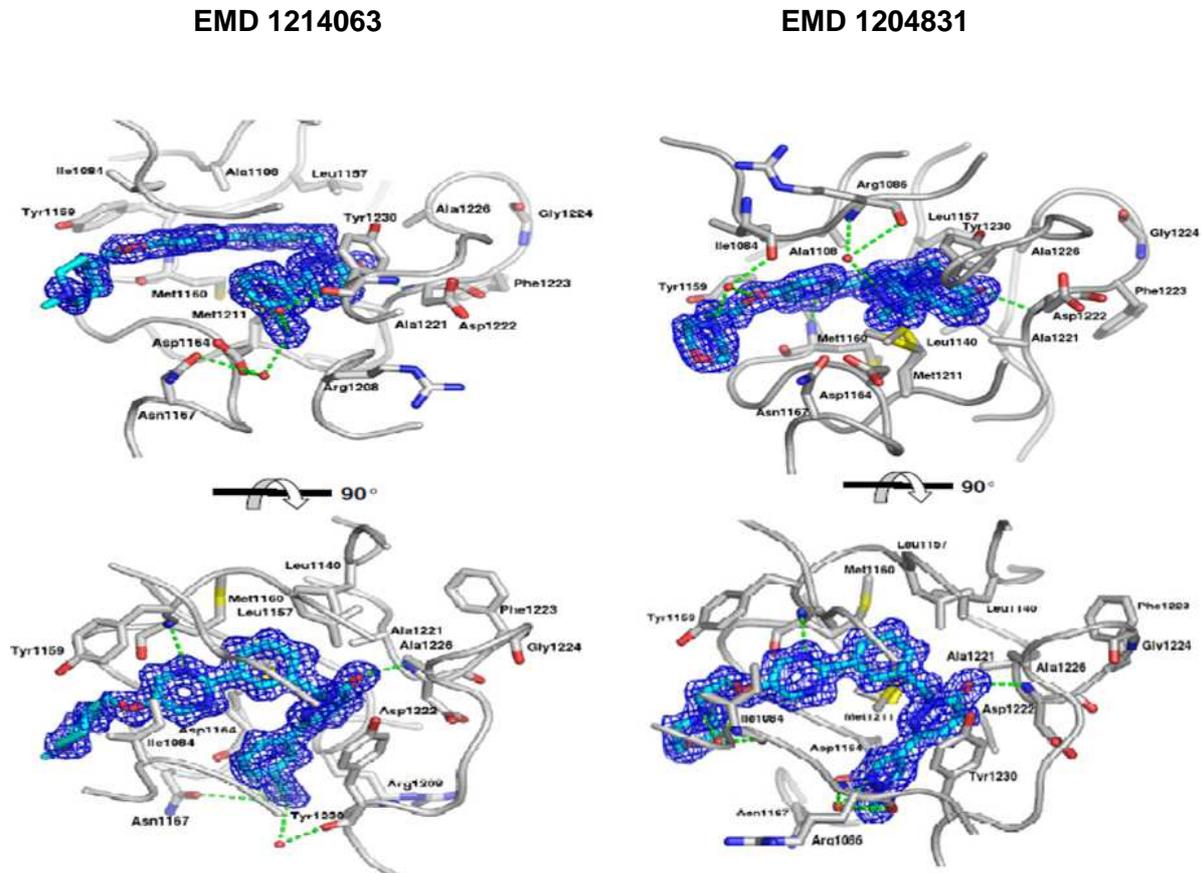
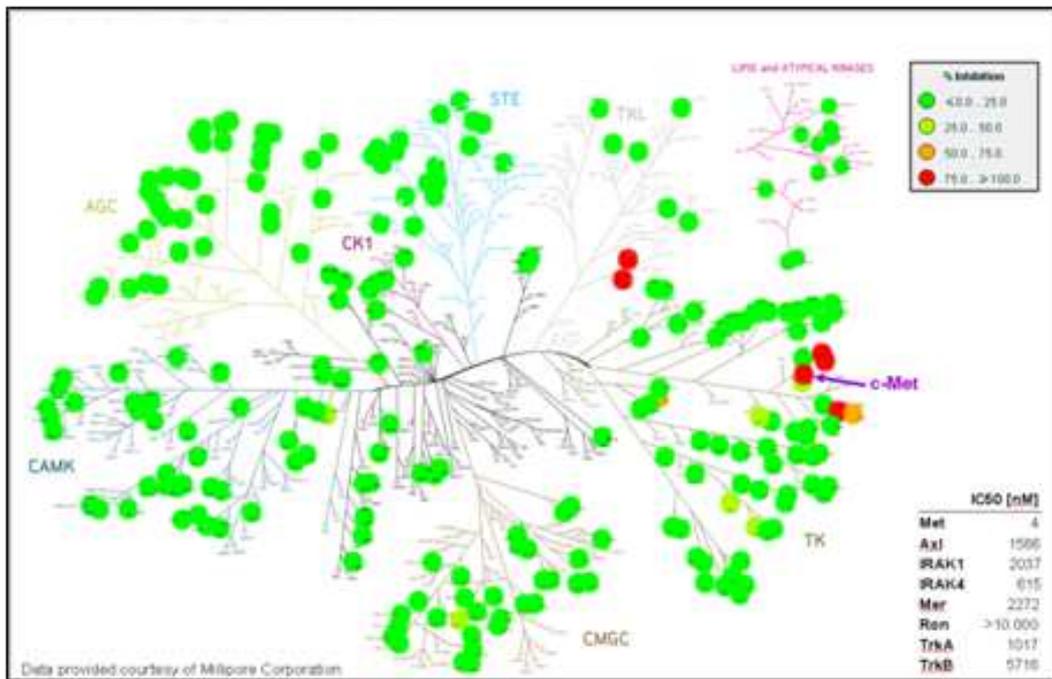


Abb. 1.7: Kristallstruktur der c-Met-Inhibitoren EMD 1214063 und 1204831.

Die Bindungstasche der Inhibitoren und benachbarte Protein-Seitenketten sind durch ein Drahtmodell dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als grün gestrichelte Linie dargestellt.

Die biochemischen Aktivitäten der Inhibitoren, bestimmt in *in vitro* Kinasereaktionen mit rekombinantem c-Met Protein und einem Peptidsubstrat, sind mit einem durchschnittlichen IC_{50} -Wert von 1,7 nM bei der Substanz EMD 1214063 und 12,4 nM bei der Substanz EMD 1204831, als sehr gut zu bezeichnen. Sie erwiesen sich zudem in einer *in vitro* Selektivitätsanalyse, bei der die Aktivität der Inhibitoren auf mehr als 240 Kinasen getestet wurde, als sehr selektive Inhibitoren. EMD 1214063 inhibierte bei der maximal eingesetzten Konzentration von 10 μ M lediglich die Kinasen Aik, Axl, Blk, Ron und TrkB zu mehr als 50 % (siehe Abb. 1.8 A) Da diesen Kinasen jedoch ebenfalls onkogenes Potential zugeschrieben wird, scheint sich dies allenfalls positiv auf die Wirkungsweise des Inhibitors auszuwirken. Der Inhibitor EMD 1204831 zeigte sich dagegen als noch selektiver, so dass bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μ M außer c-Met keine der anderen Kinasen eine mehr als 50 % reduzierte Aktivität zeigte (siehe Abb.1.8 B).

A)



B)

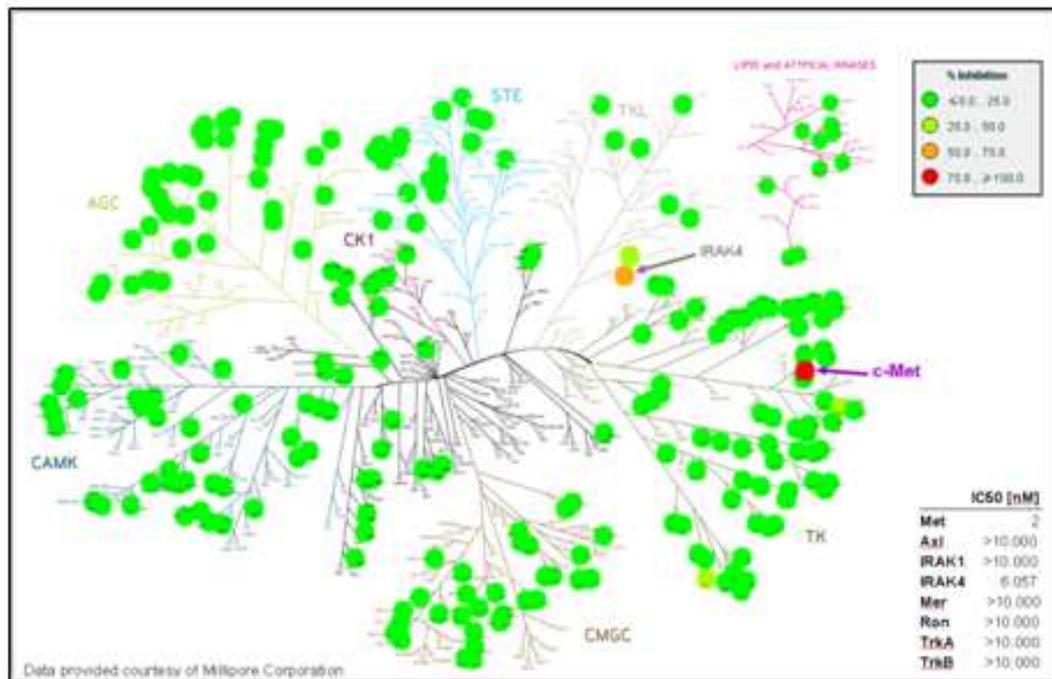


Abb. 1.8: Graphische Darstellung der Inhibitionsprofile von: A) EMD 1214063 und B) 1204831.

Getestet wurde die Aktivität von EMD 1214063 und 1204831 auf mehr als 240 Kinasen bei einer Konzentration von 10 μM . Rote Kreise zeigen Kinasen an, bei denen eine Inhibition der Kinaseaktivität von $\geq 75\%$ bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM auftritt. Orange Kreise zeigen Kinasen an, bei denen eine Inhibition der Kinaseaktivität von 50 - 75 % bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM auftritt. Grüne Kreise zeigen Kinasen an, bei denen eine Inhibition der Kinaseaktivität von $\leq 25 - 50\%$ bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM auftritt.

Pharmakodynamische Studien zeigten, dass EMD 1214063 zu einer dosisabhängigen Inhibition der Phosphorylierung von c-Met führt. Der inhibitorische Effekt konnte sowohl in HGF-abhängigen als auch in Tumorzellen, welche eine Amplifikation des c-Met-Gens oder die Expression des Fusionsproteins Tpr-Met aufweisen, gezeigt werden, wodurch die gute zelluläre Aktivität der Substanzen bestätigt wird. Die zellulären Aktivitäten der Inhibitoren wurden mit Hilfe der Lungenkarzinomzelllinie A549 bestimmt. Diese zeigte eine vollständige Inhibition der HGF-abhängigen Phosphorylierung von c-Met bei einem durchschnittlichen IC_{50} -Wert von 5,4 nM (EMD 1214063) bzw. 15 nM (EMD 1204831). Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor verhinderte die HGF-abhängige Zellmigration und führte des Weiteren zu einer vermehrten Apoptose der Zellen.

In *in vivo* Studien mit verschiedenen Mausmodellen konnten beide Substanzen ein deutlich reduziertes Tumorstadium und eine partielle bis vollständige Regression der Tumore bewirken. Untersucht wurde dies in Mausmodellen, die entweder eine Liganden-unabhängige Aktivierung von c-Met aufwiesen, HGF und c-Met koexprimierten oder aber auch Tumormodelle, die das Fusionsprotein Tpr-Met exprimierten. Eine signifikante Inhibition der Autophosphorylierung des c-Met-Rezeptors konnte in allen Tumoren gezeigt werden.

Im Zuge einer ersten klinischen Studie werden sowohl die Inhibitoren EMD 1214063 und 1204831 hinsichtlich ihrer Sicherheit, Verträglichkeit und auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften getestet als auch die maximal verträgliche Dosis bestimmt. Die Studien, werden mit Patienten, die an soliden Tumoren leiden, durchgeführt und sind derzeit noch nicht abgeschlossen.

1.1.2.4.1.2 PF-04217903

Bei der Substanz PF-04217903 (2-(4-(1-(quinolin-6-ylmethyl)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-yl)-1H-pyrazol-1-yl)ethanol methanesulfonate) der Firma Pfizer handelt es sich um einen niedermolekularen reversiblen, ATP-kompetitiven Tyrosinkinaseinhibitor der Klasse I, der selektiv die Aktivität von c-Met-Rezeptoren inhibiert. Aufgrund von *in vitro* Kinasereaktionen, bei der mehr als 100 Kinasen auf eine mögliche Sensitivität gegenüber der Substanz getestet wurden, kann die Substanz als hoch selektiv eingestuft werden (Sergei *et al.*, 2009).

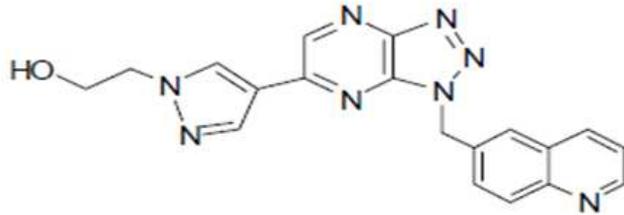


Abb. 1.9: Strukturformel des c-Met-Inhibitors PF-04217903.

1.1.2.4.2 Antikörper

Eine weitere Möglichkeit die c-Met-Signaltransduktionskaskade zu unterbrechen, ist der Einsatz von spezifischen monoklonalen Antikörpern, die anstelle des Liganden an den Rezeptor binden und somit die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor unterbinden. Mit MetMAb, einem einarmigen Antikörper der Firma Genentech, befindet sich derzeit ein Medikament im Prozess der klinischen Prüfung. Dieser Antikörper scheint im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom besonders vielversprechend in Kombination mit einem EGFR-Inhibitor zu wirken (Merchant *et al.*, 2008). Ein Nachteil dieses Antikörpers ist der nur schwache Effekt auf Tumore, die eine konstitutive, Liganden-unabhängige Aktivierung von c-Met aufweisen (Martens *et al.*, 2006). Zudem scheinen hohe HGF Konzentrationen die therapeutische Wirkung des Antikörpers zu beeinträchtigen.

Bei dem vollständig humanisierten, monoklonalen Antikörper AMG 102 der Firma Amgen handelt es sich hingegen um einen Antikörper, der gegen den Liganden HGF gerichtet ist. Durch die Interaktion zwischen Antikörper und dem Liganden soll eine Bindung und Aktivierung an den Rezeptor unterbunden werden (Kakkar *et al.*, 2007). Die Blockierung des c-Met-Signalweges ist dadurch ebenfalls auf Liganden-abhängige Tumore eingegrenzt. Auch dieser Antikörper wird derzeit im Rahmen von klinischen Studien getestet.

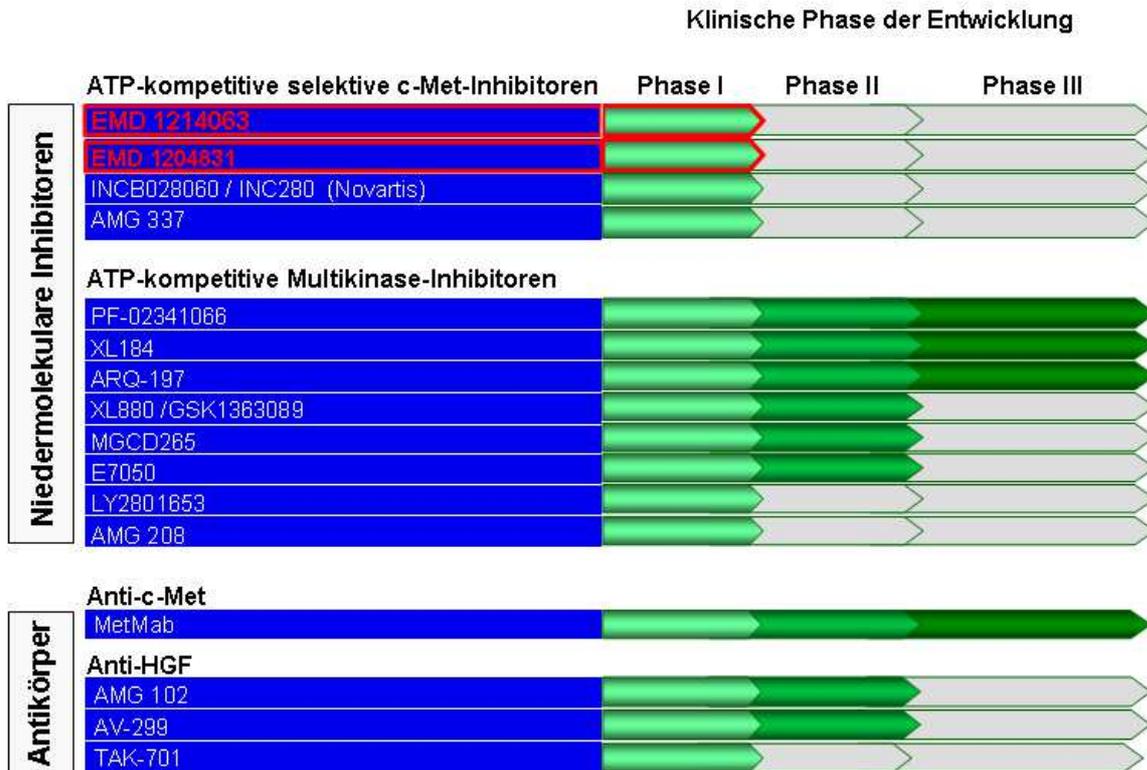


Abb. 1.10: Überblick über laufende klinischen Studien für die Blockierung der c-Met-Signaltransduktionskaskade.

1.2 Zelluläre Resistenzmechanismen

Obwohl der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren bei diversen Tumorerkrankungen die Prognose von vielen Patienten signifikant verbessert, stellt das Auftreten von primären und sekundären Resistenzen gegenüber den Arzneistoffen nach wie vor eine therapeutische Herausforderung dar. Man unterscheidet dabei primäre Resistenzen, die genetisch bedingt, bereits zu Beginn der Therapie bestehen von sekundären Resistenzen, die im Laufe der Therapie von den Tumorzellen erworben werden. Dabei beobachtet man nach einem anfänglich guten Ansprechen auf die Therapie - welches sich in Form von einem verlangsamten oder anhaltenden Tumorwachstums bzw. sogar einer Rückbildung des Tumors äußert - einen Rückfall, der häufig durch ein noch aggressiveres Verhalten des Tumors gekennzeichnet ist (Engelman und Settleman, 2008).

Die verringerte intrazelluläre Anreicherung der Inhibitoren durch eine verstärkte Expression von ABC (ATP-binding cassette)-Transportern, die das Ausschleusen von Substanzen aus dem Zytosol ermöglichen, eine Veränderung in der Verstoffwechslung der Arzneistoffe, die kompensatorische Aktivierung von pro-mitogenen und anti-apoptotischen Signalkaskaden,

aber auch die Amplifikation des Zielgens, stellen neben der Entstehung von neuen Mutationen in der Bindungsdomäne der Inhibitoren mögliche Ursachen für eine erworbene Resistenz dar (Shannon, 2002; Sleijfer *et al.*, 2007).

Die Bindung der Inhibitoren an die Kinase kann durch verschiedene Mutationen verhindert werden, ohne dass dabei die Proteinfunktion beeinträchtigt wird. So wurden in Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie Mutationen im Philadelphia Chromosom gefunden, dessen Produkt, das Fusionsprotein Bcr-Abl, die Erkrankung verursacht. Mehr als 40 verschiedene Mutationen sind in der Literatur beschrieben, die die Wirkung des Kinaseinhibitors Imatinib beeinträchtigen, da die Bindung der Substanz in der Kinasedomäne nicht mehr möglich ist. Ein Ansprechen auf die Therapie ist durch die erneute Aktivität des Bcr-Abl-Proteins nicht länger gewährleistet (Rubin *et al.*, 2006). Ein weiterer Resistenzmechanismus, der während der Behandlung mit Imatinib auftreten, aber zunächst durch eine Erhöhung der Imatinibdosis kompensiert werden kann, ist die Überexpression des Bcr-Abl Proteins. Der Einsatz von speziell entwickelten Folgeinhibitoren, die ein verändertes Bindungsmuster gegenüber der Kinase aufweisen, wie z.B. Nilotinib oder Dasatinib, bieten weitere Therapiemöglichkeiten nach dem Versagen von Imatinib in Folge der Entstehung von Mutationen in der Bindungsdomäne (Weisberg *et al.*, 2006). Nilotinib ist beispielsweise eine Substanz, welche die Bcr-Abl Kinaseaktivität auch in Anwesenheit zahlreicher möglicher Punktmutationen hemmt.

Die Inhibierung der EGFR-Signaltransduktionskaskade durch den Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib ist nach dem Auftreten der Mutation T790M, bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom, ebenfalls nicht mehr erfolgreich (Pao, 2005). Studien haben dabei gezeigt dass in den T790M-Mutanten die Bindungsaffinität von ATP an die Kinasedomäne erhöht ist, wodurch die relative Bindungsstärke des ATP kompetitiven Inhibitors herabgesetzt wird (Yun *et al.*, 2008). Pao *et al.* zeigten des Weiteren, dass eine aktivierende Mutation im KRAS-Gen ebenfalls ein möglicher Resistenzmechanismus unter dem Einsatz von EGFR-Inhibitoren ist. Dabei beobachtet man eine EGFR-unabhängige Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen.

Die kompensatorische Aktivierung anderer Signalwege konnte beispielsweise während der Therapie von ErbB2-abhängigen Brusttumoren mit dem therapeutischen Antikörper Herceptin beobachtet werden. Dabei konnte die verstärkte Signalübertragung über den EGFR, PI3K/AKT, IGF-1R und c-Met-Signalweg nachgewiesen werden (Diermeier *et al.*, 2005, Yakes *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2001 und Shattuck *et al.*, 2008). Nach der Behandlung mit den EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib konnte ebenfalls die vermehrte Expression und

Aktivierung von c-Met und PI3K gezeigt werden (Ma *et al.*, 2003 und Christensen *et al.*, 2005).

Dass der Verlust eines negativen Regulators des Zellzyklus ebenfalls ein weiterer Mechanismus für die Ausbildung von Resistenzen ist, konnten Bianco *et al.* in 2003 zeigen. Nach der Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib konnten sie den Verlust der PTEN-Expression nachweisen.

1.2.1 Erwerbung von Resistenzen gegen c-Met-Inhibitoren

Da viele c-Met-Inhibitoren Bestandteil der gegenwärtigen Forschung sind, gibt es bereits erste Daten auf Zellkulturebene, wobei Resistenzen im Laufe der Behandlung gefunden und charakterisiert werden konnten. Die Entwicklung von resistenten Zellen erfolgte dabei entweder über chemisch getriebene Mutagenesescreeens (Tiedt *et al.*, 2011) oder über eine Langzeitkultivierung der Zellen in Anwesenheit eines c-Met-Inhibitors. Cepero *et al.* postulierten im Jahr 2010, dass die entstandenen Resistenzen durch eine Amplifikation des KRAS-Gens entstehen. Des Weiteren sahen sie einen Zusammenhang zwischen der Amplifikation und dem Expressionslevel von c-Met, wobei die Amplifikationsmenge mit der Resistenz gegenüber dem Inhibitor korrelierte. Sie bedienten sich dabei zwei verschiedener Zelllinien, die wiederum mit zwei verschiedenen c-Met-Inhibitoren behandelt wurden.

Eine weitere Möglichkeit für eine c-Met-abhängige Zelle sich dem Einfluss des Inhibitors zu entziehen, stellt die alternative Aktivierung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalweges durch eine verstärkte Expression des EGFR und ErbB3 und deren Aktivierung mit den Liganden EGF und Heregulin dar. Der inhibitorische Effekt der c-Met-Inhibitoren soll somit umgangen werden (Bachleitner-Hofmann *et al.*, 2008). Da c-Met, EGFR als auch ErbB3 Signale über den MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg weiterleiten, scheint die verstärkte Signalweiterleitung über ErbB3 und den EGFR nach der Inhibition von c-Met plausibel. So konnten Bachleitner-Hofmann *et al.* in ihrer Arbeit nach dem Einsatz des c-Met-Inhibitors PHA-665752 sowohl die Inhibierung von c-Met als auch eine verminderte Interaktion zwischen den EGFR und ErbB3 zeigen. Die Stimulation mit EGF oder Heregulin konnte die Zellen vor einem Inhibitor-abhängigen Zelltod bewahren.

1.2.2 Durchbrechung von Resistenzen gegen Tyrosinkinaseinhibitoren

Um Patienten auch nach dem Erreichen einer erworbenen Resistenz weitere Behandlungsmöglichkeiten bieten zu können, kann entweder die Kombination von

Inhibitoren verschiedener Klassen, die ein unterschiedliches Bindungsverhalten aufweisen, oder die Verabreichung eines weiterentwickelten Inhibitors erfolgsversprechend sein. Sowohl die Kombination von Molekülen, die unterschiedliche Signalwege inhibieren, als auch die Kombination mit dem Therapiestandard, kann je nach Patient, ebenfalls eine sinnvolle Alternative sein.

1.3 Ziel der Arbeit

Da die Rezeptor Tyrosinkinase c-Met nicht nur unter normalen physiologischen Bedingungen bei Prozessen, wie der Proliferation, der Differenzierung und beim Überleben der Zelle eine Rolle spielt, sondern auch dessen Dysregulation ein wesentlicher Bestandteil der Entstehung von vielen Tumoren ist, wird c-Met als ein attraktives Zielmolekül für die Entwicklung von Substanzen, die die Signaltransduktionskaskade unterbrechen, betrachtet. Niedermolekulare Inhibitoren, die eine Aktivierung des Rezeptors durch die antagonistische Bindung in der Kinasedomäne verhindern, scheinen besonders effektiv den Signalweg zu blockieren. Erste Erfolge in klinischen Studien scheinen dies zu bestätigen. Die Entwicklung von sekundären Resistenzen - nach vielversprechenden Ergebnissen zu Beginn der Therapie -, werden aber auch bei diesen Substanzen lediglich eine Frage der Zeit sein. Umso wichtiger ist es daher, die Mechanismen, die zur Ausbildung von Resistenzen führen, zu charakterisieren und besser zu verstehen, um daraufhin Strategien zu entwickeln zu können, die diese Mechanismen gezielt umgehen.

In dieser Arbeit sollten daher zunächst auf Zellkulturebene Zellen generiert werden, die eine Resistenz gegen die eingesetzten Inhibitoren entwickelt haben. Anschließend sollte eine Analyse der vormals sensitiven humanen Karzinomzellen auf dessen biochemische und molekularbiologische Änderungen erfolgen, um damit Rückschlüsse auf die möglichen Ursachen der Resistenz schließen zu können. Im zweiten Teil der Arbeit sollten schließlich, unter Berücksichtigung der identifizierten Änderungen, Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden, um die Proliferation und das Überleben der Zelle auch nach dem Erwerb der Resistenzen effektiv unterbinden zu können. Angedacht waren dabei nicht nur Einzeltherapien mit dem derzeitigen Erstlinientherapeutika, sondern auch Kombinations-therapien mit Chemotherapeutika und anderen Kinaseinhibitoren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bravo Automated Liquid Handling Platform

Criterion™ Gelelektrophoresekammer für Proteingele BioRad

Criterion™ Blotter Transferkammer BioRad

Infinite M200 Plattenlesegerät Tecan

Mithras LB 940 „Multilabel-Reader“ Berthold Technologies

NanoDrop ND-1000 peQLab

VarioskanFlash

VersaDoc™ „Imaging System“ BioRad Western Blot

2.1.2 Software

i-control 1.5 Tecan

GraphPad Prism 5 GraphPad

Lasergene: EditSeq™, MegAlign™, SeqMan™ DNASTAR

MicroWin 2000™ Berthold Technologies

Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint) Microsoft

NanoDrop ND-1000 3.1.2 peQLab

Quantity One BioRad

Skant Software 2.4.3 RE for Varioskan Flash

VWorks Automation Control

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

AlamarBlue	Invitrogen
Ammoniumsulfat	Merck
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA), Albumin Fraktion V	AppliChem
Calcein-AM	Invitrogen
EDTA	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Glycerol	Merck
Glycin	Merck
Guanidin	Merck
HEPES	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
NaCl	Merck
Na_2CO_3	Merck
NaHCO_3	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
NaOH	Merck
Nonidet P-40	Roche
Phenolrot	Merck
Phosphatase Inhibitor Set II	Calbiochem
Ponceau S	Merck
Protease Inhibitor Set III	Calbiochem
Salzsäure	Merck
Tris	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck
WST-1 (wasserlösliches Tetrazoliumsalz)	Roche
Zitronensäuremonohydrat	Merck

Protein-Standards und Probenpuffer

20x „Reducing agent“ (reduzierendes Agenz)	BioRad
4x „SDS Probenpuffer“	BioRad
„Magic Mark XP Western Standard“	Invitrogen
„SeeBlue Plus2 Prestained Proteinstandard“	Invitrogen

Detektionsreagenzien

Lumi Light Western Blotting Substrate	Roche
Lumi Light PLUS Western Blotting Substrate	Roche

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	Affymetrix
Amicon Ultra-15 Zentrifugen Filtereinheit	Millipore
Criterion™ XT „Precast“ Gele	BioRad
-4-12 % BisTris, 18 oder 26 Kammern	
Criterion™ „Blotting Sandwiches“ (0,2 µm Nitrocellulose mit Filterpapieren)	BioRad
FluoroBlok Cell Culture Inserts	BD
96-Kavitätenplatten aus Polyethylen	NUNC
24-Kavitätenplatten Nunclon™ „Surface“	NUNC
6-Kavitäten-Zellkulturplatten Nunclon™ „Surface“	NUNC
1,8 ml Kryoröhrchen	NUNC
QIAshredder	Qiagen
Precellys Glas Kit 91-PCS-VK05	Peqlab
75 cm ² Zellkulturflaschen (T-75) „Nunclon™ Surface“	NUNC
175 cm ² Zellkulturflaschen (T-75) „Nunclon™ Surface“	NUNC
6 cm-Zellkulturschalen „Nunclon™ Surface“	NUNC
10 cm-Zellkulturschalen „Nunclon™ Surface“	NUNC

2.1.5 Kits

First Standard cDNA Syntesis Kit for RT-PCR	Roche
QIAamp DNA Blood Maxi Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

BCA Protein Assays	Pierce
MILLIPLEX® MAP	Millipore

2.1.6 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (+ 4500mg/l Glucose, + L-Glutamine, -Pyruvat)	Invitrogen
RPMI 1640 Medium (1x), Invitrogen (Catalog Number: 31870-074)	Invitrogen
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x)	Invitrogen
DMSO	AppliChem
Trypsin 2,5% (10x)	Invitrogen
L-Glutamin (200nM)	Invitrogen
Natriumpyruvat (200nM)	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen

Eingesetzte Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Zytostatika

EGF, rekombinant, human	Millipore
HGF, rekombinant, human	R&D Systems
EMD 1214063 (c-Met-Inhibitor)	Merck
EMD 1204831 (c-Met-Inhibitor)	Merck
PF-04217903 (c-Met-Inhibitor)	Merck
XL880	Merck
Iressa (EGFR-Inhibitor)	Merck
IGF-1R-Inhibitor	Merck
Lapatinib	Merck
GDC-0941 (Mek-Inhibitor)	Merck
PI3K-Inhibitor	Merck
Cisplatin	Merck
5-FU	Merck

Allen Inhibitoren und Zytostatika wurden mit DMSO als 10 mM Stammlösungen angesetzt und bei -20°C gelagert.

2.1.7 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit MilliQ-Wasser aus der hausauseigenen Anlage von Merck angesetzt und wenn nicht anders beschrieben bei Raumtemperatur gelagert.

HGNT-Lysepuffer

HEPES, pH 7,4	20 mM
Glycerol	10 % (V/V)
Glycerol	150 mM
Triton X-100	1 % (V/V)
EDTA	2 mM

Blockier-Lösung

BSA	5 % (m/V)
NaN ₃ in 1x TBS	0,1 % (m/V)
Phenolrot	Spatelspitze
pH 7,5	
(Lagerung bei 4°C)	

Ponceau S Färbe-Lösung

Ponceau	0,25 % (m/V)
Essigsäure	10 % (V/V)

SDS-Probenpuffer (BioRad)

	frisch angesetzt
XT Probenpuffer (4x)	25% (V/V)
XT Reduktionsmittel (20x)	5% (V/V)

Tris-buffered saline (TBS), 20x

Tris, pH 8,3	1 M
NaCl	3 M
pH 7,5 eingestellt mit HCl	

TBST

TBS (20X)	5 % (V/V)
Tween-20 (20%)	0,25 % (V/V)

10x Transferpuffer (Immunoblot)

Tris	184 mM
Glycin	1,6 M
pH 8,0	

2.1.8 Antikörper

Tab.2.1: Erstantikörper

Antigen	Verdünnung	Quelle	Katalog-Nr.	Anbieter
Met	1:1000	Kaninchen	4560	Cell Signaling
pMet [pY ^{1234/1235}]	1:1000	Kaninchen	3129	Cell Signaling
Akt	1:1000	Kaninchen	9272	Cell Signaling
pAkt [pS ⁴⁷³]	1:500	Kaninchen	9271	Cell Signaling
pAkt [pT ³⁰⁸]	1:500	Kaninchen	5965	Cell Signaling
Erk1/2	1:1000	Kaninchen	9102	Cell Signaling
Erk1/2 [pT ²⁰² /pY ²⁰⁴]	1:1000	Kaninchen	4377	Cell Signaling
p27 ^{Kip1} (D37H1) XP TM	1:1000	Kaninchen	3688	Cell Signaling
IGF1 β	1:500	Kaninchen	3027	Cell Signaling
pIGF1 [pY ¹¹³¹]pIR β [pY ¹¹⁴⁶]	1:500	Maus	3021	Cell Signaling
Cyclin D1	1:500	Kaninchen	RMAB003	Diagnostic BioSystems
KRAS (F234)	1:500	Maus	SC-30	Santa Cruz

Tab.2.2: Zweitantikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Katalog-Nr.	Anbieter
Anti-Kaninchen IgG	1:2000	Ziege	7074	Cell Signaling
Anti-Maus IgG	1:2000	Pferd	7076	Cell Signaling

2.1.9 Humane Tumorzelllinien

Tab.2.3: Verwendete humane Tumorzelllinien

Zelllinie	Herkunft	Verwendetes Medium
MKN-45	Magen	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % P/S + 2 mm L-Glutamin + 1 mM Natriumpyruvat
Hs746T	Magen	DMEM + 1 % P/S
EBC1	Lunge	Minimum Essential Medium Eagle + 1 % P/S + 2 mm L-Glutamin

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von adhärennten Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in T175-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in ihrem entsprechenden Medium kultiviert (siehe 2.1.9). Die Zellkulturarbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen in Sterilwerkbänken durchgeführt. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche und bei Erreichung einer 90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten bei 37 °C wurden die nun abgelösten Zellen in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen, resuspendiert und bei 1000 g für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Zellsediment mit frischem Medium aufgenommen und die Zellen in dem gewünschten Verdünnungsverhältnis ausgesät. Alle Zelllinien wurden sowohl mehrfach auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination untersucht als auch durch eine *Short tandem repeat* (STR)-Analyse eindeutig als die Ausgangszelllinie identifiziert.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die dauerhafte Aufbewahrung der Zellen wurden diese in Kryoröhrchen eingefroren. Die Zellen wurden dafür während ihrer Wachstumsphase geerntet und nach einem Waschschrift in Einfriermedium (Zellkulturmedium + 20% FCS + 10% DMSO) mit einer Konzentration von $2-5 \times 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und sofort bei -80 °C eingefroren und nach 24 h in einem Tank mit flüssigem Stickstoff überführt. Dieses schrittweise Vorgehen beim Einfrieren und die Verwendung von DMSO sind nötig, um eine intrazelluläre Kristallbildung zu verhindern. Das Auftauen der Zellen muss im Gegensatz zum Einfrieren rasch erfolgen, um die wieder stoffwechselaktiv werdenden Zellen nur möglichst kurz dem toxisch wirkenden DMSO auszusetzen. Dafür wurden die Zellen zunächst im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, mit warmem Zellkulturmedium gewaschen und anschließend in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspensionslösung in eine Neubauer Zellkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden 4 große Quadrate ausgezählt. Für die Ermittlung der Zellzahl pro ml wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl [1/mL]} = (\text{gezählte Zellzahl} / 4) \times 10^4$$

2.2.1.4 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Um die Auswirkungen verschiedener c-Met-Inhibitoren auf die Signaltransduktionskaskaden innerhalb der verwendeten Zelllinien darstellen zu können, wurden die Zellen zunächst in 6-Kavitäten Platten ausgesät. Nach 24 h wurde das Vollmedium durch serumfreies Medium ersetzt, um unspezifische Effekte durch die in FCS enthaltene Wachstumsfaktoren ausschließen zu können und um die Zellen in einen synchronisierten Zustand überführen zu können. Nach einer FCS-freien Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit den Inhibitoren behandelt. Dafür wurden die in DMSO gelösten Inhibitoren zunächst weiter mit DMSO seriell verdünnt und anschließend mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt und vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die eingesetzten Endkonzentrationen lagen dabei zwischen 30 und 0,003 µM. Nach der Inkubationszeit, die je nach Versuch zwischen 1 und 48 h variierte wurden aus den Zellen Protein- oder RNA Lysate hergestellt (siehe 2.2.2.1 und 2.2.3.2).

2.2.1.5 Generierung von resistenten Zelllinien gegen c-Met Inhibitoren

Für die Etablierung von resistenten Zelllinien gegen c-Met-Inhibitoren wurden die beiden Magenkarzinomzelllinien MKN-45 und Hs746T, sowie die Lungenkarzinomzelllinie EBC1 verwendet. Alle drei Zelllinien weisen eine Amplifikation des c-Met Gens und eine damit einhergehende starke HGF-unabhängige Autophosphorylierung des c-Met Proteins auf. Während die Zelllinien MKN-45 und EBC1 eine hervorragende *in vitro* und *in vivo* Sensitivität gegenüber der c-Met-Inhibitoren aufweisen, ist die Zelllinie Hs746T hauptsächlich im Mausmodell hoch sensitiv.

Für die Entwicklung von Resistenzen wurden die Zellen für 12 Monate mit steigenden Konzentrationen der c-Met-Inhibitoren behandelt. Als Startkonzentration wurde dabei eine Molarität gewählt, die dem IC₂₅ Wert der jeweiligen Zelllinie entsprach. Das Zellkulturmedium wurde alle 3-4 Tage gewechselt und enthielt die jeweils gewünschte Konzentration der

Inhibitoren. Bei Erreichung von ca. 90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert und in neuen Zellkulturflaschen ausgesät. Nach jeweils zwei Passagen mit der gleichen Inhibitorkonzentration erfolgte eine Dosissteigerung. Als Kontrolle dienten MKN-45, Hs746T und EBC1 Zellen die fortlaufend ohne Inhibitoren in Kultur gehalten wurden. Um die Vergleichbarkeit in den nachfolgenden Versuchen gewährleisten zu können, wurden die resistenten Zelllinien mindestens eine Woche in Zellkulturmedium ohne Inhibitor kultiviert, wodurch die Zellen vollständig frei von Inhibitoren sein sollten.

2.2.1.6 Bestimmung der Zellviabilität

Um den Einfluss von Kinaseinhibitoren auf die Vitalität und somit indirekt auch auf die Proliferation von Zellen bestimmen zu können, wurden zunächst jeweils 4000 Zellen pro Kavität in eine 96-Kavitätenplatte ausgesät und nach 24-stündiger Adhäsionszeit mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt. Dafür wurden die in DMSO gelösten Inhibitoren zunächst mit DMSO seriell verdünnt und anschließend mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt und vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die Konzentrationen lagen dabei zwischen 25 und 0,000095 μM . Als Kontrolle dienten Zellen, die lediglich mit dem Lösungsmittel behandelt wurden, um einen durch DMSO erzielten Effekt ausschließen zu können. Nach einer 72 stündigen Inkubationszeit unter Normalbedingungen wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Sowohl die optimale Zellzahl als auch die Inkubationsdauer der Inhibitoren wurden in Vorversuchen bestimmt.

2.2.1.6.1 WST-1

Mit Hilfe des Reagenz WST-1 ist es möglich einen direkten Rückschluss auf die Vitalität der Zellen zu ziehen. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-Benzendisulfonat wird dafür in einem Verhältniss von 1:10 in das Zellkulturmedium gegeben und durch mitochondrialen Dehydrogenasen in einen Formazan-Farbstoff gespalten. Dies ist durch einen Farbumschlag gekennzeichnet, der nach 2 h Inkubationszeit bei 37 °C photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt wurde. Die gemessene OD korreliert dabei mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Pures Zellkulturmedium diente als Negativkontrolle

2.2.1.6.2 Alamar Blue

Bei der Vitalitätsbestimmung mit Alamar Blue, wird der darin enthaltene Redoxindukator Resazurin durch das reduzierende Milieu, welches durch proliferierende Zellen entsteht, in die oxidierte Form Resorufin umgesetzt. Dies wird durch einen Farbumschlag von blau nach pink sichtbar, der 16 h nach Zugabe des Reagenz bestimmt wurde. Durch die Unterschiede im Absorptionsmaximum der reduzierten und oxidierten Form wurde photometrisch das Verhältnis bestimmt, wodurch die Vitalität der Zellen ermittelt werden konnte.

2.2.1.7 Migrationsverhalten von Zellen

Die c-Met abhängige Migration humaner Tumorzellen wurde mit einer modifizierten Boyden - Kammer analysiert. Dabei wandern die Zellen durch eine mit Poren durchsetzte Membran. Die Membran bildet dabei eine Barriere zwischen zwei Kompartimenten. Durch die unterschiedliche Befüllung der Kompartimente mit Wachstumsfaktoren wird die Migration der Zellen durch Chemotaxis induziert.

Im das oberen Kompartiment befanden sich die Zellen (5×10^4 Zellen pro Kaviatät) im serumfreien Medium, welches mit verschiedenen Konzentrationen der c-Met-Inhibitoren versetzt war. Das untere Kompartiment wurde mit Vollmedium versetzt, wodurch eine Migration der Zellen durch Chemotaxis induziert werden sollte.

Für den Versuch wurde das untere Kompartiment mit 500 μ l Vollmedium gefüllt. Die Zellen wurden trypsiniert, einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro ml eingestellt und mit der gewünschten Konzentration der c-Met-Inhibitoren versetzt. Von dieser Zellsuspensionslösung wurden daraufhin 200 μ l auf die Membraneinsätze gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Membraneinsätze wurden in neue 24 Kaviatät-Platten gegeben, die mit jeweils 500 μ l einer Calcein-AM Lösung (4 μ g/ml) versetzt waren. Calcein-AM ist ein Molekül, welches die Plasmamembran von Zellen durchdringen kann und innerhalb der Zelle zu Calcein umgewandelt wird. Dies kann fluorometrisch nach zwei Stunden bei 485 nm nachgewiesen werden, wobei nur die Zellen angefärbt werden, die durch die Membran migriert sind.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Für den Nachweis von Proteinen wurden die Zellen mit 160 µl HGNT-Lysepuffer pro Kavität einer 6-Kavitätenplatte lysiert. Dadurch wurden Zellstrukturen zerstört und die Proteine in wässrige Lösung gebracht. Die Zugabe von Protease- und Phosphataseinhibitoren im Verhältnis 1:100, sowie das Arbeiten auf Eis bzw. bei 4 °C verhindern einen proteolytischen Abbau und die Dephosphorylierung der Proteine durch zelleigene Proteasen und Phosphatasen. Nach dem Entfernen des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit kaltem D-PBS gewaschen, mit Lysepuffer versetzt und anschließend mit einem Zellschaber von Boden der Zellkulturschalen abgelöst. Das Lysat wurde daraufhin in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C über Kopf rotierend 45 Minuten inkubiert. Durch die anschließende 20 minütige Zentrifugation bei 14000 Upm und 4 °C wurden Zelltrümmer aus dem Lysat entfernt. Der Überstand des Lysates wurde entweder sofort weiterverwendet oder nach dem Einfrieren im flüssigem Stickstoff zunächst bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce) bestimmt. Bei der sogenannten Biuret-Methode reduzieren Proteine Cu^{2+} im alkalischen Milieu zu Cu^{1+} und bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der photometrisch bestimmt werden kann. Es wurde von jedem Zelllysate eine Doppelbestimmung durchgeführt. Dafür wurde jeweils 10 µl der Probe in eine 96-Kavitäten-Flachbodenplatte pipettiert und mit 200 µl der Reagenzlösung BCA (Reagenz A + Reagenz B im Verhältnis 50:1) versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen an einem Plattenlesegerät gemessen. Die zusätzliche Bestimmung der Proteinkonzentration einer Standardreihe aus Rinderserumalbumin Fraktion V in Konzentrationen zwischen 0,125 und 2 mg/ml, verdünnt in HGNT-Puffer, erlaubte die Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten durch die Erstellung einer Eichgeraden. Die Lysate wurden anschließend mit HGNT-Lysepuffer, Reduktionsmittel (10x) und Ladepuffer (4x) auf eine Proteinkonzentration von 500 µg/ml eingestellt. Da in jedem Western Blot 15 µl der Proben geladen wurden, entsprach dies immer einer Menge von 7,5 µg Protein.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht kamen diskontinuierliche Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel zum Einsatz. Durch Zugabe des anionischen Tensids SDS und des reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) wurden die Proteine sowohl einheitlich negativ geladen als auch ihre Sekundärstruktur denaturiert. Die Denaturierung stellte sicher, dass die Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten zerfielen, Proteine entfaltet und inter- bzw. intramolekulare Disulfidbrücken reduziert wurden. Die Zellysate wurden dafür nach der Zugabe von SDS und DDT für 7 min bei 99°C gekocht. Dadurch wurde eine anschließend Trennung der Proteine im elektrischen Feld nach der Molekülgröße möglich. Die Proben wurden dafür auf ein Gel, bestehend aus einer Polyacrylamid-Matrix mit spezifischer Vernetzung aufgetragen und in einem angelegten elektrischen Feld getrennt. Proteine mit kleinen Molekülgrößen wanderten dabei schneller durch das Gel zum Pluspol als größere Proteine. Die Wandergeschwindigkeit hing jedoch auch von der angelegten Spannung und dem Vernetzungsgrad des jeweiligen Polyacrylamidgels ab. Die Proteintrennung erfolgte durch 4 –12 % BisTris gepufferte Polyacrylamidgele bei konstanter Spannung von 200 V, bis die am Bromphenolblau erkennbare Pufferfront am unteren Rand der Gelkammer angelangt war.

2.2.2.4 Western Blot-Analyse

Nach der Durchführung der SDS-PAGE erfolgte der Transfer der getrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran. Dabei wurde der Transfer nach dem Nass-Verfahren in Apparaturen der Firma Biorad durchgeführt. Die Schwämme, die Membran, sowie die Whatman-Papiere wurden zunächst in Transferpuffer equilibriert. Der Aufbau der Apparatur erfolgte nach der „Sandwich“-Methode, gemäß Herstelleranweisung, wobei darauf zu achten war, Luftblasen zwischen den einzelnen Komponenten zu vermeiden. Das zusammengebaute Sandwich wurde in die Transferkammer eingesetzt und mit Transferpuffer überschichtet. Durch die Zugabe eines Kühlelements wurde die Überhitzung des Gels während des Transfers verhindert. Der Einsatz eines Magnetrührers gewährleistete eine homogene Pufferverteilung während des Transfers. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur mit einer konstanten Spannung von 100 V für 50 Minuten.

Zur Beurteilung der Effizienz des Proteintransfers wurden die Nitrocellulosemembranen aus der Apparatur entfernt und mit der Färbelösung Ponceau-S reversibel gefärbt. Dabei wurden die membrangebundenen Proteine durch Bindung des Farbstoffs sichtbar gemacht. Nach kurzem Entfärben mit MilliQ-Wasser wurde die Membran auf einem Schüttler für 1–5 h bei

Raumtemperatur blockiert. Dabei sättigte die Blockierlösung die freien, unspezifischen Bindungsstellen ab und verhinderte dadurch eine unspezifische Bindung des Antikörpers.

Um die gewünschten Proteine auf der Nitrozellulose nachweisen zu können, wurden die Membranen in einem mit Blockierlösung verdünnten Erstantikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die eingesetzte Konzentration der verwendeten Antikörper richtete sich nach den Angaben des Herstellers bzw. nach Erfahrungen aus vorherigen Versuchen. Nach der Inkubationszeit wurde unspezifisch gebundener Erstantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Die anschließende Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte unter Schütteln bei Raumtemperatur für 2 h. Bei dem eingesetzten Zweitantikörper handelte es sich um einen mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horse radish peroxidase*) gekoppelten Antikörper, der den Fc-Teil des Erstantikörpers bindet. Der Zweitantikörper wurde 1:2000 in TBS mit 5 % Magermilchpulver verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für 10-15 min mit TBST und einmalig 5 Minuten mit TBS gewaschen, um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers zu entfernen.

Mittels Peroxidase-katalysierter Chemilumineszenz wurden die an die Proteine gebundenen Antikörper detektiert. Dafür wurde die Membranen mit den ECL-Reagenzien „Lumi Light Western Blotting Substrate“ bzw. „Lumi Light PLUS Western Blotting Substrate“ (Roche) benetzt, wodurch die Detektion des Chemilumineszenzsignals mit Hilfe des Geräts „VersaDoc“ von BioRad möglich war.

Zur Kontrolle, ob die Proben wirklich einen vergleichbaren Anteil von Protein aufwiesen, wurde jeweils eine Ladekontrolle mit einem Antikörper gegen das Protein GAPDH durchgeführt

2.2.2.5 Untersuchung der Phosphorylierung von humanen Rezeptor Tyrosinkinasen mit Hilfe Protein Arrays

Mit Hilfe des Human Phospho-RTK Array Kit der Firma R&D Systems konnten die Phosphorylierungen von 42 verschiedenen Rezeptor Tyrosinkinasen in einer Probe analysiert werden. Auf den eingesetzten Membranen befinden sich Antikörpern in in Doppelproben. Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst in HGNT-Lysepuffer lysiert und mit Hilfe des Array Puffers auf eine Gesamtproteinmenge von 333 µg/ml eingestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht, wobei die Bindung an die Capture-Antikörper auf der Membran erfolgen konnte. Die Detektion erfolgte nach dem Entfernen von ungebundenen Proteinen mit Hilfe eines HRP-gekoppeltem anti-Phospho-Tyrosin Antikörpers und der Zugabe des Chemilumineszenz Substrates „Lumi Light PLUS Western

Blotting Substrate“ der Firma Roche, wodurch die Detektion des Signals mit Hilfe des Geräts „VersaDoc“ von BioRad möglich war.

2.2.2.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Menge an c-Met-Inhibitoren die sich zu einem definierten Zeitpunkt in der Zelle befanden wurde quantitativ durch HPLC bestimmt. Die Zellen wurden dafür zunächst mit D-PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Nach fünfmaligen waschen mit D-PBS wurden die Zellpellets mit 100 µL einer EtOH/H₂O (80 %/20 %) resuspendiert und in einem Precellys Glas Kit 91-PCS-VK05 überführt und aufgeschlossen. Die anschließende Analyse wurde freundlicherweise von Frau Edith Dicks aus der Abteilung „Quantitative Bioanalytics“ übernommen.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus humanen Zelllinien

Die Isolation genomischer DNA wurde mit Hilfe des DNA Blood Maxi Kits der Firma QIAGEN durchgeführt. Dafür wurden 5×10^7 Zellen geerntet, einmal mit D-PBS gewaschen und anschließend in 10 ml D-PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl QIAGEN -Protease wurden die Proben gut durchmischt, mit Lysepuffer versetzt und 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Nach Zugabe von 10 ml Ethanol wurden die Proben auf Säulen geladen, deren Oberfläche aus Silikagel besteht, wobei eine Bindung der DNA beim anschließenden Zentrifugationsschritt erfolgt. Durch anschließendes waschen mit jeweils 5 ml der Waschpuffer AW1 (Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 Minute) und AW2 (Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 Minuten) wurden RNA, Proteine und Zelltrümmer entfernt. Anschließend wurde die Säule mit 1 ml destilliertem H₂O versetzt und nach einer 5 minütigen Inkubationszeit wurde die DNA bei 5000 rpm für 2 Minuten eluiert.

2.2.3.2 Isolierung von RNA aus humanen Zelllinien

Mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits und der QiaShredder der Firma QIAGEN wurde die RNA nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die Zellen wurden dafür zunächst in 6 cm Schalen ausgesät und nach 24 h mit 350 µl RLT-Puffer (+ 1% Mercapthoethanol) benetzt und mit Hilfe eines Zellschabers lysiert. Anschließend wurden die Proben in die QIAshredder überführt und bei 10000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert. Die Zentrifugat wurde daraufhin mit 350 µl 70% Ethanol versetzt und gründlich resuspendiert. Das Zelllysat wurde dann auf

die QIAGEN RNeasy-Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei 10000 rpm abzentrifugiert. Die Säule wurde anschließend einmalig mit 700 µl RW1 Puffer für 15 Sekunden bei 10000 rpm und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer für 2 Minuten bei 10000 rpm gewaschen. Zuletzt erfolgte die Elution der RNA mit 50 µl H₂O bei 10000 rpm für eine Minute. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau wie im Protokoll beschrieben. Die Lagerung des Lysats erfolgte bei -70°C.

2.2.3.3 Reverse Transkription von RNA

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR der Firma Roche nach Herstelleranweisung. Die RNA wird dabei zunächst durch die Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Es wurden dabei außerdem Primer eingesetzt, die am Poly(A)-Schwanz der mRNA binden. Dadurch wird sichergestellt, dass jede mRNA in cDNA umgeschrieben wird,

2.2.3.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Nach der Präparation der humanen DNA wurde die Konzentration und die Reinheit mittels photometrischer Extinktionsmessung bei 260 nm und bei 280 nm an dem Spektrometer NanoDrop 1000 („Peqlab“) bestimmt. Der Quotient aus den Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm dient sowohl als Maß für den Reinheitsgrad der DNA-Lösung als auch für die Genauigkeit der Konzentrationsmessung. Liegt das Verhältnis der Proben zwischen 1,8–2,0 bezeichnet man die Probe als rein.

2.2.3.5 Genexpressionsanalyse

Für die vergleichende Analyse der Genexpression verschiedener Zelllinien wurden humane Genom Arrays der Firma Affymetrix verwendet. Die Zelllinien wurden dafür in 6 cm Schalen ausgesät und nach 24 h mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma QIAGEN lysiert (siehe 2.2.3.2). Die Umschreibung der RNA in biotinylierte cRNA, die Hybridisierung der cRNA Fragmente auf dem „Genexpressions-Chip“ der Firma Affymetrix, als auch die Messung der Microarrays wurden in der Abteilung Histopathologie II (TA Oncology – Target Research) der Firma Merck Serono nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte durch die Bioinformatikabteilung der Firma Merck Serono.

2.2.3.6 Vergleichende Genomische Hybridisierung

Mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH, engl. *comparative genomic hybridization*) können Chromosomenaberrationen wie Amplifikationen, Deletionen, Duplikationen oder unbalancierte Translokation nachgewiesen werden. Dafür wird die genomische DNA der zu testenden Probe mit einer Kontroll-DNA verglichen. Beide Proben sind dabei mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert und werden anschließend hybridisiert. Die zu testende DNA wurde mit Hilfe des DNA Blood Maxi Kits der Firma QIAGEN (siehe 2.2.3.1) gewonnen und für die folgende Analyse an die Firma Agilent abgegeben.

2.2.3.7 Next Generation Sequencing

Die Sequenzierung der intrazellulären Membran des c-Met Gens erfolgte mit Hilfe des Pyrosequenzierungsverfahren, welches mit dem Sequenzer 454 GS Junior der Firma Roche durchgeführt wurde. Nach einer zunächst erfolgten RNA-Isolation der zu testenden Zelllinien, wurde diese in cDNA umgeschrieben. Bei der nun folgenden ersten PCR mit spezifischen Fusionsprimern entstanden dabei 350-500 bp große DNA-Fragmente. Anschließend erfolgte die Immobilisierung der DNA an kleine Kügelchen, die spezifische DNA-Einzelstrangfragmente auf ihrer Oberfläche gebunden hatten. Durch nachfolgende klonale Amplifikationen wurden die Fragmente angereichert und für die Sequenzierung auf eine „PicoTiterPlate“ gegeben, deren einzelnen Kavitäten Platz für jeweils ein Kügelchen bot. Die Zugabe der vier Desoxynukleotid-Triphosphate erfolgte in einer festgelegten Reihenfolge und die Bestimmung der genauen Basenabfolge erlauben zu können. Beim Einbau von Nukleotiden, die komplementär zu der DNA-Matrize waren konnte ein Chemilumineszenz Signal registriert werden. Dieses entsteht, wenn das freiwerdende Pyrophosphat mit Hilfe der ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt wird, was wiederum die Umwandlung von Luziferin zu Oxyluziferin katalysiert, wodurch schließlich ein Lichtsignal entsteht. Die Zugabe der einzelnen Nukleotide in einer festgelegten Reihenfolge, erlaubte die Bestimmung der genauen Basenabfolge.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Sensitivität gegenüber c-Met Inhibitoren

Um Studien zu möglichen Resistenzmechanismen gegen c-Met-Kinaseinhibitoren anstellen zu können, mussten zunächst geeignete Zellmodelle identifiziert werden. Hierzu wurden Tumorzellen gesucht, die möglichst sensitiv auf die c-Met-Inhibitoren reagierten. Zellen, die eine Amplifikation oder eine aktivierende Mutation des c-Met Gens aufweisen, aber auch Tumorzellen, in denen es zu einer Koexpression von c-Met und HGF kommt, wodurch eine autokrine Aktivierung der c-Met-Rezeptors vorhanden ist, reagieren in der Regel positiv auf c-Met-Inhibitoren und schienen daher als besonders geeignet für die nachfolgenden Versuche.

3.1.1 Expression- und Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors

Für die Auswahl des geeigneten Zellsystems, wurden die Expressionsstärken von c-Met in den humanen Lungenkarzinomzelllinien EBC1 und NCI-H441, sowie den Magenkarzinomlinien MKN-45 und Hs746T zunächst mittels Western Blot Analyse bestimmt (siehe Abb. 3.1). In allen vier Zelllinien konnte die Expression von c-Met nachgewiesen werden, wobei in den Zelllinien Hs746T und EBC1 eine besonders hohe Rezeptordichte vorlag, die sich in einer deutlich stärker ausgeprägten Bandenintensität im Western Blot widerspiegelte. Die Zelllinien MKN-45 und NCI-H441 zeigten dagegen eine schwächere Expression des Proteins, aber auch hier liegt bereits eine Überexpression des Rezeptors vor. Zudem konnte gezeigt werden, dass in den Zelllinien Hs746T, MKN-45 und EBC1 bereits eine HGF-unabhängige, konstitutive Phosphorylierung des Rezeptors stattfindet. Die dadurch bereits vorhandene hohe Phosphorylierung von c-Met an den Tyrosinresten Y1234/1235 konnte durch die Stimulation mit HGF nicht weiter erhöht werden. Die Zelllinie NCI-H441 zeigte eine lediglich leichte Phosphorylierung von c-Met, welches sich nach der Zugabe des Liganden ebenfalls nicht weiter steigern ließ.

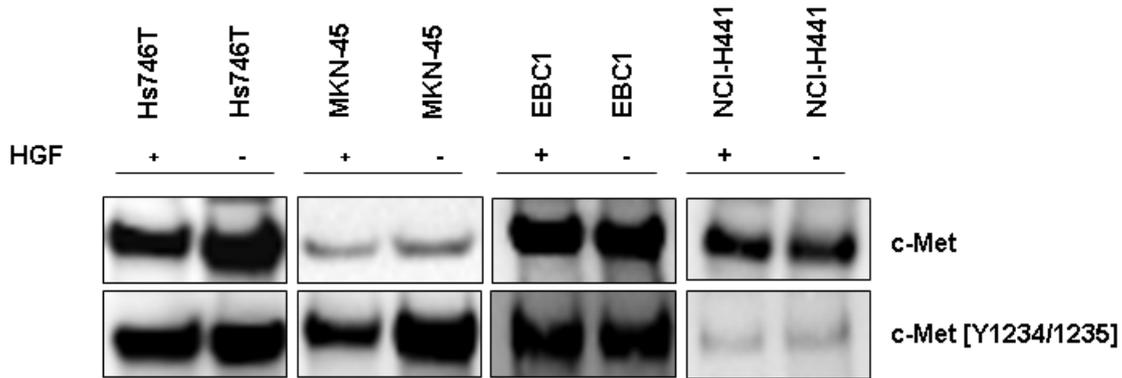


Abb. 3.1: Nachweis der Expression von c-Met und seiner Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Stimulation mit HGF in Zelllinien mit c-Met Amplifikationen.

In serumfreiem Medium inkubierte Zellen wurden für 15 min mit 100 ng/ml des c-Met-Liganden HGF stimuliert, mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot mit Antikörpern gegen c-Met bzw. gegen phospho-c-Met [Y^{1234/1235}] analysiert.

3.1.2 Wirkung von c-Met-Inhibitoren auf das zweidimensionale Zellwachstumsverhalten

Für die Bestimmung der Sensitivität der verschiedenen Zelllinien wurden zunächst *in vitro* Proliferationsversuche durchgeführt. Um zunächst die optimale Konzentration der Inhibitoren ermitteln zu können, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt (siehe Abb. 3.2). Dafür wurde jede Zelllinie in 96-Kaviatätenplatten ausgesät und nach 24 h mit absteigenden Konzentrationen der entsprechenden Inhibitoren für 72 h behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit Alamar Blue versetzt und ihre Absorption nach 18 h an einem Plattenlesegerät bestimmt. Das relative Wachstum der Zellen wurde durch den Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle bestimmt und mit Hilfe der Software GraphPad Prism graphisch dargestellt. Durch die Bestimmung der EC₅₀-Werte für jeden Inhibitor konnten die Zellen in sensitive und nicht sensitive Gruppen eingeteilt werden.

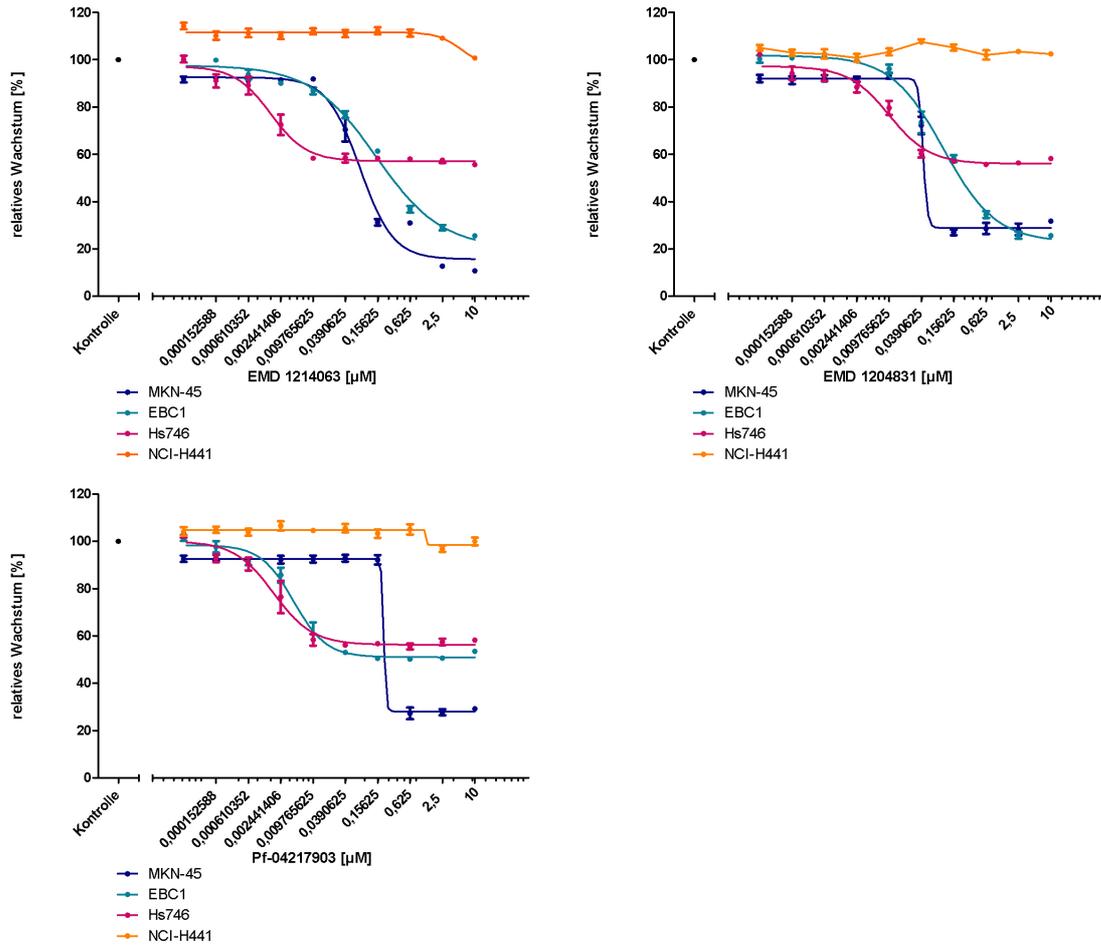


Abb. 3.2: Wachstumsinhibierung von EBC1, MKN-45, Hs746T und NCI-H441-Zellen nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.

In serumhaltigem Medium inkubierte Zellen wurden mit den unterschiedlichen c-Met-Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündiger Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Sechsfachbestimmung.

Tab.3.1: Bestimmung der EC₅₀-Werte der c-Met Inhibitoren.

	EMD 1214063			
EC ₅₀ [µM]	MKN-45	EBC1	Hs746	NCI-H441
	0,07	0,1	0,001	>10

	EMD 1204831			
EC ₅₀ [µM]	MKN-45	EBC1	Hs746	NCI-H441
	0,04	0,1	0,009	>10

	PF-04217903			
EC ₅₀ [µM]	MKN-45	EBC1	Hs746	NCI-H441
	0,2	0,004	0,001	>10

Die Zelllinien MKN-45 und EBC1 zeigten sich dabei deutlich sensitiv gegenüber allen eingesetzten c-Met Inhibitoren. Die Zellen zeigten eine dosisabhängige Wachstumsinhibition, wobei die halbmaximale Inhibition bei Konzentrationen von 0,004 und 0,1 µM erreicht wurde. Die Substanzen EMD 1214063 und EMD 1204831 zeigten sich allerdings auf der Zelllinie EBC1 potenter als die Substanz PF-04217903, die lediglich eine 50 %-ige Wachstumsinhibierung bewirken konnte. Die Substanzen EMD 1214063 und EMD 1204831 konnten dagegen eine fast 75 %-ige Wachstumsinhibierung erzielen. In der Zelllinie MKN-45 und Hs746T konnte hingegen kein Unterschied zwischen den Inhibitoren beobachtet werden. Interessanterweise zeigte die Zelllinie Hs746T trotz der hohen Dichte an aktiven Rezeptoren ein lediglich moderates Ansprechen auf die Inhibitoren, die maximale Wachstumsinhibierung lag mit 50 % deutlich niedriger als in den Zelllinien MKN-45 und EBC1 (zwischen 85-60%). Die Zelllinie NCI-H441 zeigte lediglich bei Konzentrationen von mehr als 10 µM der Substanz EMD 1214063 eine leichte Tendenz der Wachstumsinhibierung. Da diese Zelllinie keine starke Phosphorylierung des Rezeptors aufwies (siehe Abb.3.1) und bei 10 µM erste unspezifisch toxische Effekte zu befürchten sind, wurde sie daher als eine *in vitro* nicht sensitive Zelllinie eingestuft und nicht weiter verwendet.

3.1.3 Zeitlicher Einfluss auf Signalproteine nach der Inhibition von c-Met in parental Zellen

Zur Überprüfung, ob die eingesetzten c-Met-Inhibitoren eine Inhibition der Phosphorylierung und somit der Aktivität des Rezeptors bewirken und ob des Weiteren gleichzeitig eine Änderung der nachgeschalteten Effektorproteine erfolgt, wurden die im serumfreien Medium kultivierten Zellen mit absteigenden Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Um einen eventuell zeitabhängigen Effekt auf die Proteine beobachten zu können, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert und mit Hilfe eines Western Blots untersucht (siehe Abb. 3.3).

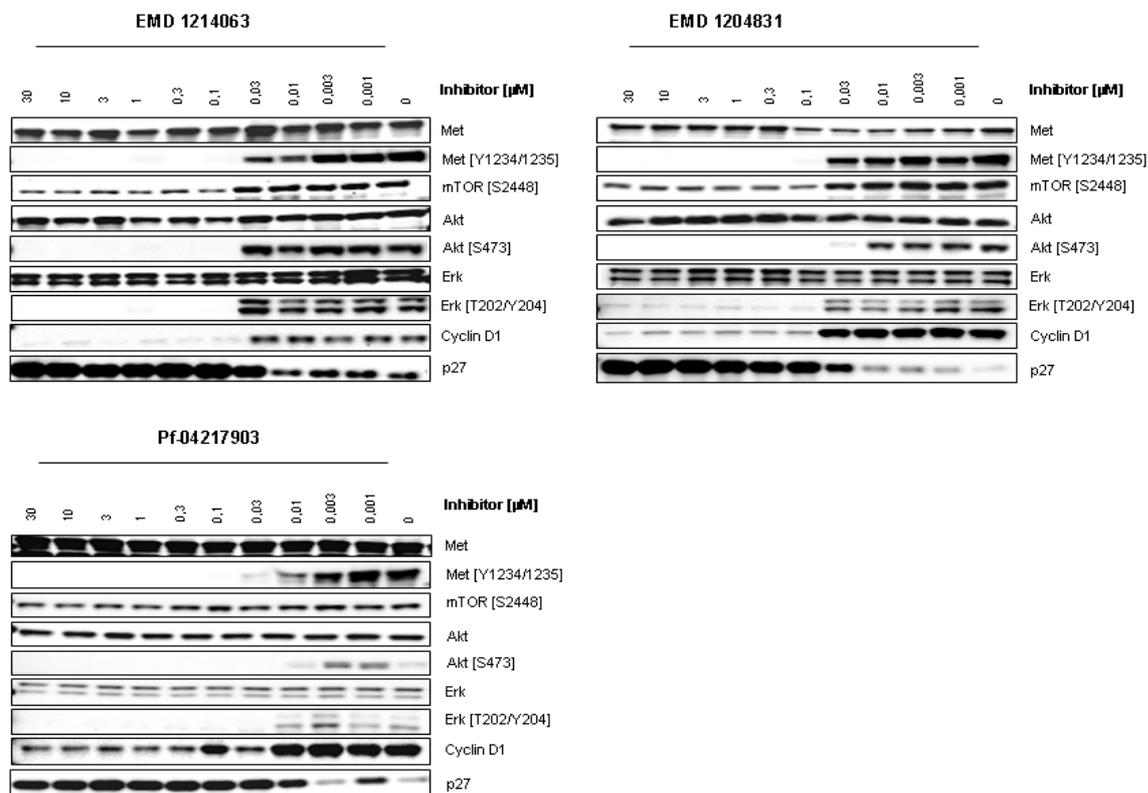


Abb. 3.3: Expression und Phosphorylierung von Proteinen der c-Met-Signaltransduktionskaskade nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.

In serumfreiem Medium inkubierte MKN-45 Zellen wurden für 1-48 h in absteigenden Konzentrationen mit den c-Met-Inhibitoren EMD 1214063, EMD 1204831 und PF-04217903 behandelt, mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot mit den entsprechenden Detektionsantikörpern (siehe Beschriftung und Tab. 2.1) analysiert. Dargestellt sind die Lysate der Zellen, welche 24 h inkubiert wurden.

In allen drei Zelllinien (gezeigt sind lediglich die Ergebnisse der Zelllinie MKN-45) konnte übereinstimmend eine dosisabhängige Inhibition der Phosphorylierung von c-Met bereits nach einer Stunde Inkubationszeit mit den entsprechenden Substanzen beobachtet werden (siehe Abb. 3.4). Die vollständige Inhibition der Phosphorylierung des Rezeptors konnte von allen eingesetzten Inhibitoren im Bereich bis 100 nM erzielt werden. Geringere Konzentrationen erzielten dagegen nur noch eine partielle Inhibition der Phosphorylierung. Eine zeitabhängige Änderung im Phosphorylierungsverlauf konnte im untersuchten Zeitraum (1-48 h) nicht beobachtet werden. Einhergehend mit der Inhibition der Phosphorylierung von c-Met konnte eine, ebenso dosisabhängige, Inhibition der Phosphorylierung der Proteine Akt [S473] und Erk [T202/Y204] detektiert werden (siehe Abb. 3.3). Auch hier waren Konzentrationen ab 100 nM ausreichend um eine vollständige Inhibition der Aktivität erzielen zu können. Einen Einfluss auf die generelle Expression der Proteine c-Met, Akt und Erk durch die Inhibitoren konnte nicht beobachtet werden.

In allen Zelllinien konnte eine veränderte Expression der Zellzyklus-regulierenden Proteine p27^{Kip1} und Cyclin D1 zeitabhängig nach einer 24-stündigen Inkubationsdauer mit den Substanzen EMD 1214063, EMD 1204831 und PF-04217903 beobachtet werden. Während die Cyclin-abhängige Kinase p27^{Kip1} bei Inhibitorkonzentrationen ≤ 100 nM weniger stark exprimiert wurde, kam es hingegen bei dem Protein Cyclin D1 zu einer deutlich gesteigerten Expression bei den gleichen Konzentrationen (siehe Abb. 3.4). Diese gegensätzliche Regulation der Proteine deutet auf eine stark verringerte Proliferationsaktivität der Zellen hin und bestätigt die zuvor im Proliferationsversuch beobachtete Wachstumsinhibition.

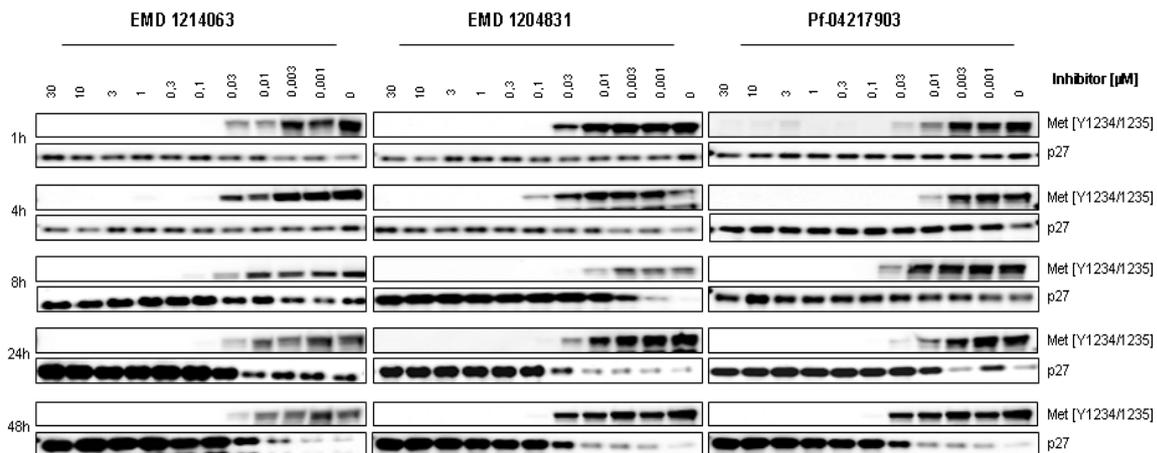


Abb. 3.4: Zeitabhängige Hochregulation von p27^{Kip1} und Inhibition der Aktivität von c-Met nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.

In serumfreien Medium inkubierte MKN-45 Zellen wurden für 1-48 h mit absteigenden Konzentrationen der c-Met-Inhibitoren EMD 1214063, EMD 1204831 und PF-04217903 behandelt, mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot mit den entsprechenden Detektionsantikörpern (siehe Beschriftung und Tab. 2.1) analysiert.

3.2 Charakterisierung der erworbenen Resistenzmechanismen

3.2.1 Generierung resistenter Zelllinien gegen c-Met Inhibitoren

Um erworbene Resistenzmechanismen charakterisieren zu können, wurden die drei sensitiven Zelllinien EBC1, MKN-45 und Hs746T über 12 Monate in Medium kultiviert, welches mit steigenden Konzentrationen der c-Met-Inhibitoren versetzt wurde. Die Konzentration der Inhibitoren wurde dabei, ausgehend von einer Konzentration die dem EC₂₅-Wert der Zelllinie entsprach, schrittweise erhöht.

Mit Hilfe von Proliferationsassays wurde die Entwicklung von Resistenzen gegenüber den Inhibitoren ermittelt. Dafür wurden die Zellen 24 h nach der Aussaat jeweils mit den drei verschiedenen c-Met-Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001 – 10 μM für 72 h behandelt. Nach anschließender 18-stündiger Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption an einem Plattenlesegerät bestimmt. Dargestellt sind jeweils zwei verschiedene Passagen der generierten Zelllinien, die unterschiedlich lange mit dem entsprechenden Inhibitor kultiviert wurden (siehe Abb. 3.5).

Tab.3.2: Nomenklatur der generierten und in den folgenden Versuchen verwendeten Zellen.

Als Ausgangslinie dienten parentale MKN-45-Zellen, die über 12 Monate kultiviert wurden. Dem Kultivierungsmedium wurde für die Generation der resistenten Zellen die Substanz EMD 1214063, EMD 1204831 bzw. PF-04217903 zugesetzt. Die Dosis wurde dabei schrittweise erhöht. Die Bezeichnung der Zelllinien wurde folgendermaßen gewählt: R steht für resistente Zelllinie. Die nachfolgende Zahl zeigt die Enddosis der Inhibitoren in μM an und die nachfolgende Nummer bezeichnet den jeweils verwendeten c-Met-Inhibitor.

Zelllinie	Verwendeter Inhibitor	Endkonzentration [μM]
MKN-45 (frühe Passage)	-	-
MKN-45 (späte Passage)	-	-
MKN-45 R1 EMD 1214063 (frühe Passage)	EMD 1214063	1
MKN-45 R8 EMD 1214063 (späte Passage)	EMD 1214063	8
MKN-45 R5 EMD 1204831 (frühe Passage)	EMD 1204831	5
MKN-45 R50 EMD 1204831 (späte Passage)	EMD 1204831	50
MKN-45 R2,5 PF-04217903 (frühe Passage)	PF-04217903	2,5
MKN-45 R30 PF-04217903 (späte Passage)	PF-04217903	30

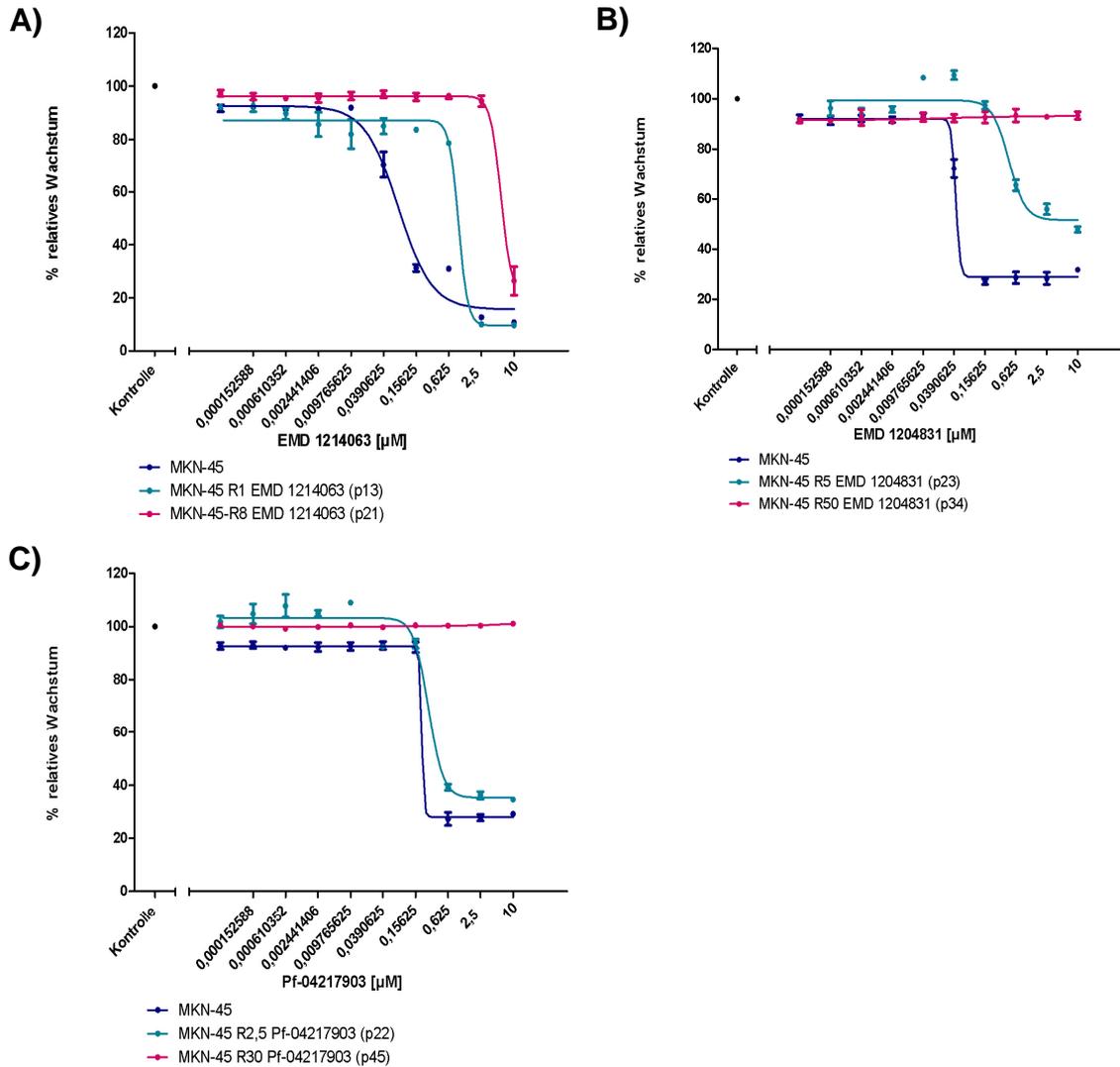


Abb. 3.5: Sensitivität von MKN-45-Zellen gegenüber c-Met-Inhibitoren nach einer mehrmonatigen Inkubation in Gegenwart von c-Met-Inhibitoren.

MKN-45-Zellen wurden für mehrere Monate mit den Substanzen EMD 1214063, EMD 1204831 und PF-04217903 kultiviert. Nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) wurden die Zellen in serumhaltigem Medium ausgesät und mit den c-Met-Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 µM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündiger Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Sechsfachbestimmung. Pro Zelllinie wurde jeweils die Sensitivität einer frühen und einer späten Passage bestimmt.

Tab.3.3: Bestimmung der EC₅₀-Werte der c-Met-Inhibitoren in parentalen und resistenten Zellen.

EMD 1214063			
EC ₅₀ [µM]	MKN-45	MKN-45 R1 EMD 1214063 (p13 → frühe Passage)	MKN-45 R8 EMD 1214063 (p21 → späte Passage)
	0,07	0,9	5,7

EMD 1204831			
EC ₅₀ [µM]	MKN-45	MKN-45 R5 EMD 1204831 (p23 → frühe Passage)	MKN-45 R50 EMD 1204831 (p34 → späte Passage)
	0,04	0,4	> 30

PF-04217903			
EC ₅₀ [µM]	MKN-45	MKN-45 R2,5 PF-04217903 (p22 → frühe Passage)	MKN-45 R30 PF-04217903 (p45 → späte Passage)
	0,2	0,2	> 30

Die Zelllinie MKN-45 R1 EMD 1214063 zeigte nach einer 3 monatigen Behandlung (Passage 13) mit der Substanz EMD 1214063, verglichen mit der sensitiven Ausgangszelllinie MKN-45, ein geringeres Ansprechen auf den Inhibitor (siehe Abb. 3.5 A) Obwohl die maximale Wachstumsinhibition mit über 80 % in beiden Linien sehr ähnlich war, konnten dennoch erste Resistenzentwicklungen beobachtet werden, die sich durch eine Verschiebung des EC₅₀-Werts von 0,07 auf 0,9 µM zeigten. Innerhalb von drei Monaten konnte somit eine mehr als 10-fache Steigerung des EC₅₀-Werts erzielt werden. Nach weiteren acht Wochen Kultivierung unter der Substanz EMD 1214063, wies die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 gegenüber der parentalen Linie eine sogar fast um 100-fach erhöhte Toleranz gegenüber der Substanz EMD 1214063 auf (siehe Abb. 3.5 A). Eine Wachstumsinhibition konnte lediglich bei Konzentrationen die 5 µM überstiegen beobachtet werden. Die maximale Wachstumsinhibition von 80 % wurde lediglich bei einer Konzentration von 10 µM beobachtet, wohingegen die parentale Zelllinie bereits bei einer Konzentration von 0,3 µM ihre maximale Wachstumsinhibition erreichte.

Die Zelllinien MKN-45 R5 EMD 1204831 zeigte drei Monate nach Behandlungsbeginn ebenfalls ein nur noch moderates Ansprechen auf den Inhibitor EMD 1204831 (siehe Abb. 3.5 B). Es konnte sowohl eine 10-fache Erhöhung des EC₅₀-Werts als auch eine geringere

maximale Wachstumsinhibition gezeigt werden. Acht Wochen später zeigte die Zelllinien MKN-45 R50 EMD 1204831 keinerlei Wachstumsinhibition mehr nach der Behandlung mit der Substanzen EMD 1204831 in den eingesetzten Konzentrationen und konnte demnach als vollständig resistent bezeichnet werden (siehe Abb. 3.5 B).

Zeigte die Zelllinie MKN-45 R2,5 PF-04217903 drei Monate nach dem Behandlungsstart noch eine sehr ähnliche Sensitivität gegenüber dem eingesetzten Inhibitor, was sich durch einen identischen EC_{50} -Wert zeigte, entwickelte sie in den folgenden acht Wochen eine vollständige Resistenz gegenüber der Substanz PF-04217903. Eine Wachstumsinhibierung konnte mit den eingesetzten Konzentrationen nicht mehr erreicht werden (siehe Abb. 3.5 C).

3.2.2 Überprüfung der Kreuzresistenz gegen andere c-Met-Inhibitoren

Da die hier verwendeten c-Met-Inhibitoren ein sehr ähnliches Bindungsmuster in der Kinasedomäne des Rezeptors aufweisen, konnte eine Kreuzresistenz der resistenten Zelllinien gegenüber den anderen Inhibitoren nicht ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurden *in vitro* Proliferationsversuche durchgeführt. Jede Zelllinie wurde dafür in 96-Kaviatätenplatten ausgesät und nach 24 h mit absteigenden Konzentrationen der entsprechenden Inhibitoren für 72 h behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit Alamar Blue versetzt und ihre Absorption nach 18 h an einem Plattenlesegerät bestimmt. Das relative Wachstum der Zellen wurde durch den Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle bestimmt und mit Hilfe der Software GraphPad Prism graphisch dargestellt.

Wie in Abb.3.6 A) dargestellt, zeigte die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 auch eine vollständige Resistenz gegenüber den Substanzen EMD 1204831 und PF-04217903. Eine Wachstumsinhibierung war bei keiner der eingesetzten Konzentrationen zu beobachten. Sehr ähnlich verhielten sich die Zelllinien MKN-45 R50 EMD 1204831 (siehe Abb. 3.6 B) und MKN-45 R30 PF-04217903 (siehe Abb. 3.6 C). Auch sie ließen lediglich bei der Behandlung mit der Substanz EMD 1214063 bei Konzentrationen, die höher als 5 μ M waren, einen Wachstumseffekt erkennen. Auch hier kann eine Wachstumsinhibierung aufgrund unspezifischer Off-Target-Effekte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse bestätigten die bereits vermutete Kreuzresistenz der Zelllinien auf c-Met-Inhibitoren mit ähnlichem Bindungsmuster.

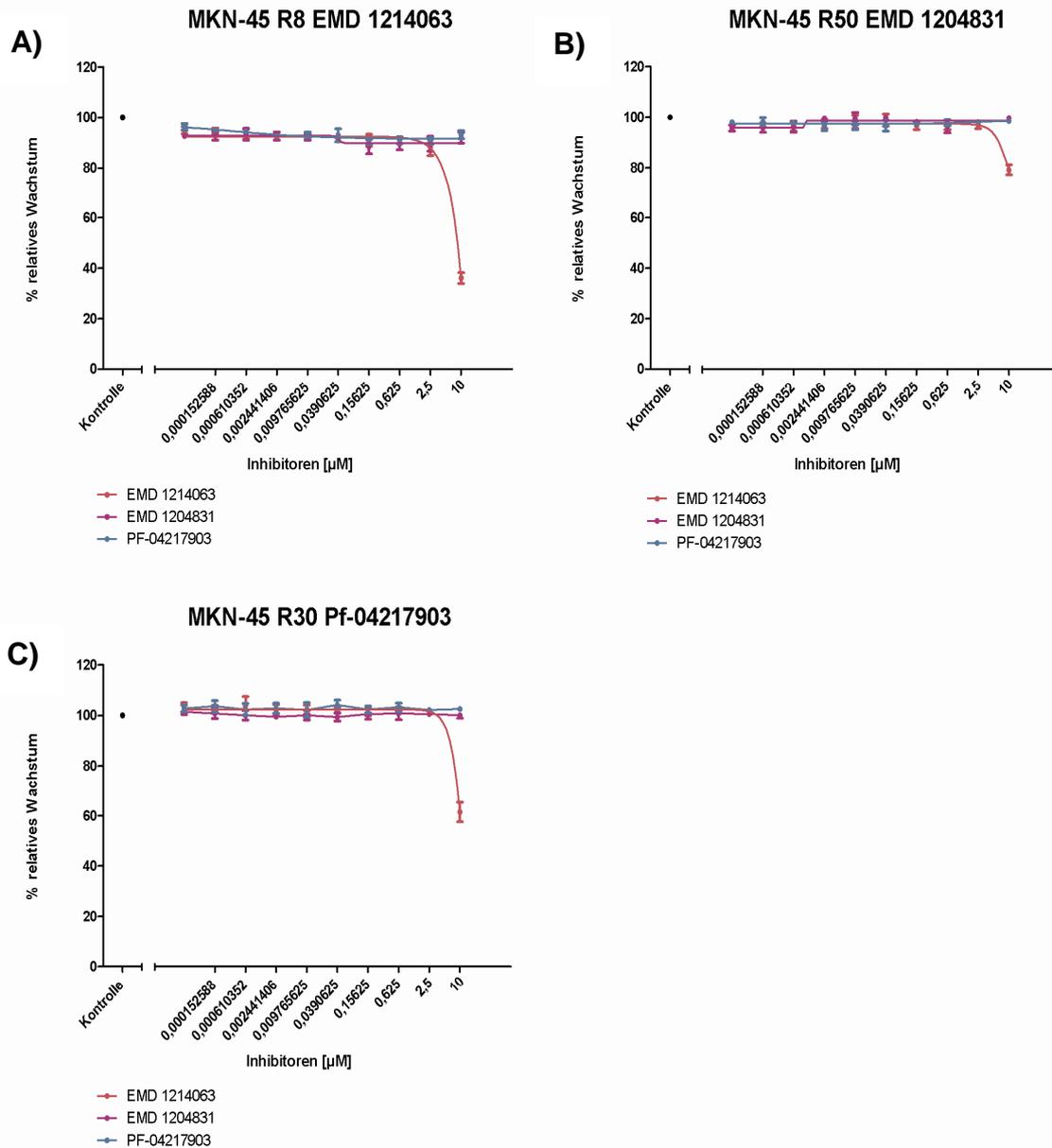


Abb. 3.6: Überprüfung der Kreuzresistenz von resistenten MKN-45-Zellen gegenüber anderen c-Met-Inhibitoren mit Hilfe eines *in vitro* Proliferationsversuchs.

Resistente MKN-45-Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) im serumhaltigen Medium ausgesät und mit den c-Met-Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündiger Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Sechsfachbestimmung.

3.2.3 Stabilität von c-Met-Inhibitoren in der Zelle

Ausgehend von einer Beobachtung vorangegangener Experimente, in denen in den resistenten Zellen, die mit der Substanz EMD 1214063 behandelt worden waren, die Phosphorylierung von c-Met nach einer Woche Inkubation in Inhibitor-freiem Medium nicht

wieder detektierbar war, sollte zunächst überprüft werden, ob die Rezeptoren nach Stimulation mit dem Liganden HGF wieder aktiviert werden können (siehe Abb. 3.7).

Die als Kontrolle fungierenden parentalen Zellen MKN-45 zeigten nach der Stimulation mit 100 ng/ml HGF eine verstärkte Phosphorylierung sowohl von c-Met [Y1234/1235] also auch von Akt [S473]. Das bereits in der unstimulierten Zelle vorhandene hohe Level von phosphoryliertem Erk [T202/Y204] konnte hingegen nicht weiter gesteigert werden. In der resistenten Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 konnte dagegen nach der Stimulation weder eine Phosphorylierung von c-Met noch von Akt detektiert werden. Eine Phosphorylierung von Erk [T202/Y204] konnte nachgewiesen werden, änderte sich nach der Stimulation mit HGF jedoch nicht. Interessanterweise scheint Erk in den resistenten Zelllinien verstärkt exprimiert zu sein, trotzdem zeigen diese Zelllinien ein geringeres Level von phosphoryliertem Erk [T202/Y204] als die parentalen Zellen. Das Verhältnis von pErk/Erk ist demnach in den resistenten deutlich geringer als in der parentalen Zelllinie.

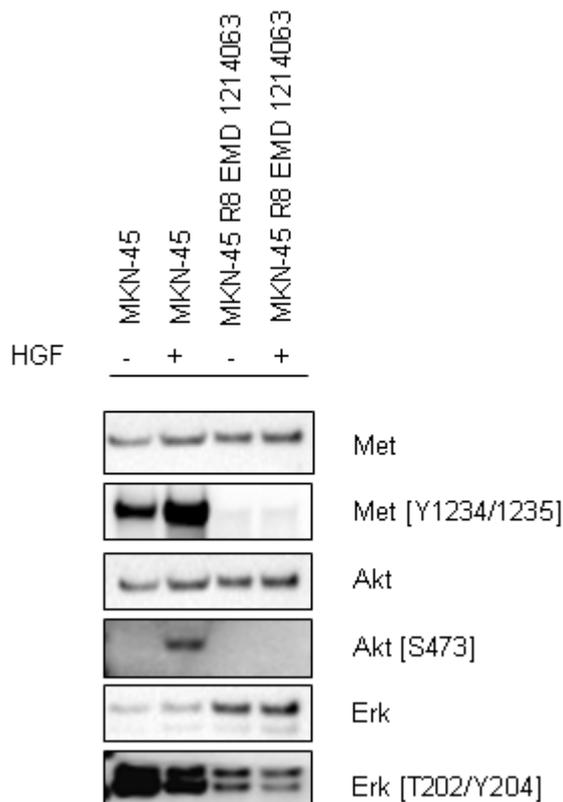


Abb. 3.7: Expression von Proteinen der c-Met-Signaltransduktionskaskade in parentalen und resistenten MKN-45-Zellen nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren in Abhängigkeit einer Stimulation mit HGF.

In serumfreiem Medium inkubierte parentale und resistente Zellen wurden für 15 min mit 100 ng/ml des c-Met-Liganden HGF stimuliert, mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Beschriftung und Tab. 2.1) analysiert.

Da die fehlende Stimulierbarkeit von c-Met auf eine mögliche Akkumulation des Inhibitors in der Zelle hindeutete, sollte die Stabilität der Substanz in der Zelle geprüft werden. Dafür wurde zunächst eine Auswaschkinetik mit den Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dafür letztmalig für 6 Stunden mit dem Inhibitor EMD 1214063 mit einer Konzentration von 8 μM behandelt, danach trypsinisiert, mehrfach gewaschen und erneut ausgesät. Während der folgenden 48 Tage wurden die Zellen ohne Inhibitoren inkubiert und zu definierten Zeitpunkten für Western Blot und HPLC-Analysen lysiert. Dadurch sollte einerseits die Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors und andererseits die Stabilität der Substanz innerhalb der Zelle überprüft werden.

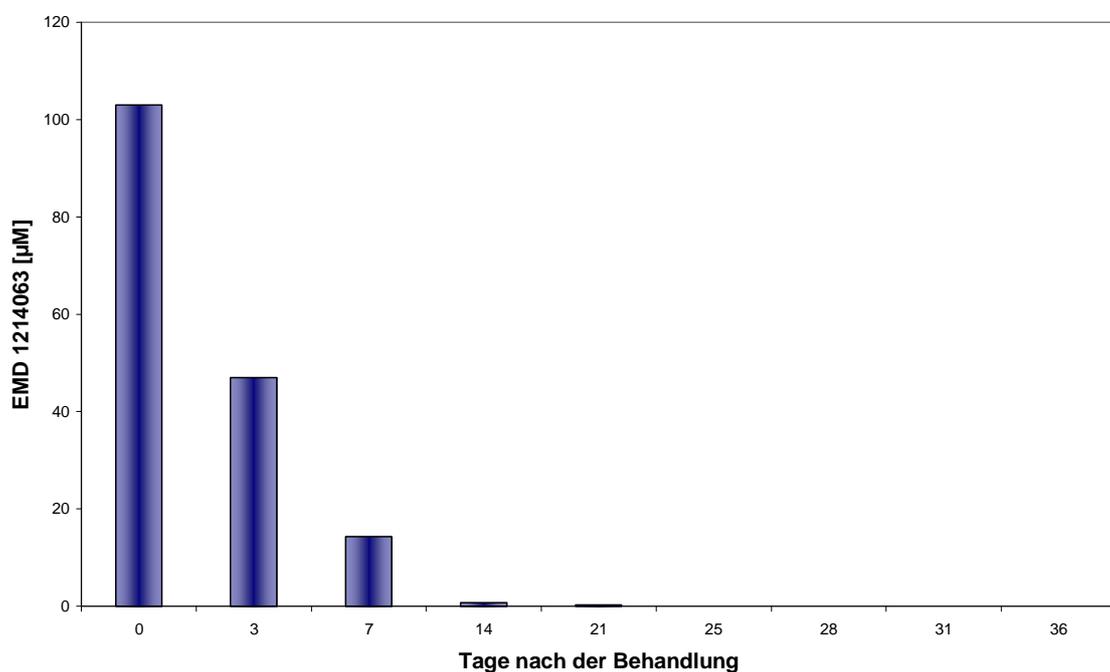


Abb. 3.8: Akkumulation von EMD 1214063 in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063.

Nach einer letzten Behandlung der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 mit EMD 1214063 wurden die Zellen ohne Inhibitor für eine Dauer von 48 Tagen inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert, mit Precellys aufgebrochen und in einem H_2O /Ethanol-Gemisch aufgenommen und mit Hilfe einer HPLC auf die innerhalb der Zelle verbliebene EMD 1214063 Konzentrationen analysiert.

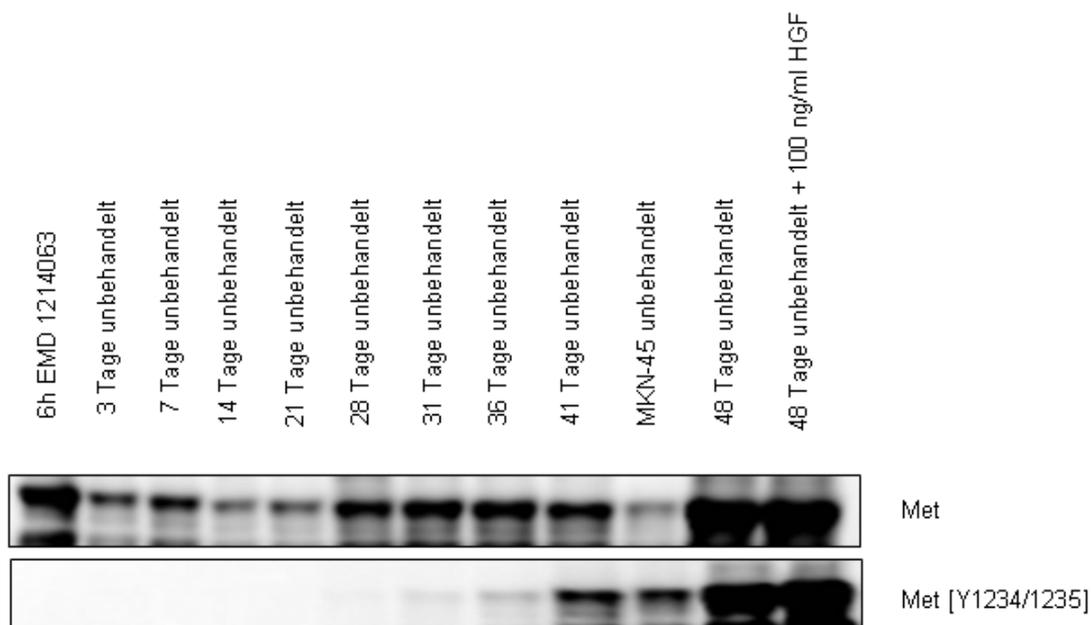


Abb. 3.9: Zeit-abhängige Inhibition der c-Met-Aktivität in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063.

Nach einer letzten Behandlung der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 mit EMD 1214063 wurden die Zellen ohne Inhibitor für eine Dauer von 48 Tagen inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Zellen mit HGNT lysiert und mit Hilfe eines Western Blots die Aktivität von c-Met mit einem spezifischen Phosphotyrosinantikörpers [Y1234/1235] bestimmt.

Wie bereits in vorherigen Experimenten beobachtet, zeigte die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 sieben Tage nach der letzten Behandlung mit EMD 1214063 keine Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors (siehe Abb. 3.9). Im Weiteren Verlauf des Experiments konnte eine sehr geringe Phosphorylierung erst 28 Tage nach dem Auswaschen des Inhibitors detektiert werden. Die vollständige Phosphorylierung, verglichen mit der unbehandelten Ausgangszelllinie MKN-45, konnte sogar erst nach 41 Tagen detektiert werden. Eine nach 48 Tagen erfolgte Stimulation mit HGF brachte erwartungsgemäß nur noch einen minimalen Anstieg der Phosphorylierung von c-Met mit sich.

In der parallel dazu durchgeführten HPLC-Analyse konnte eine starke Akkumulation der Substanz EMD 1214063 in den resistenten Zellen nachgewiesen werden, wobei Spitzenwerte von 100 μ M der Substanz in der Zelle gemessen werden konnten (siehe Abb. 3.8). Es kam somit kurzfristig nach der Inkubation zu einer 10-fachen Anreicherung des Inhibitors in der Zelle, die sich allerdings in den ersten 3 Tagen halbierte. Obwohl die Akkumulation des Inhibitors generell in den ersten 7 Tagen deutlich zurückging, konnten nach 21 Tage immer noch Spuren von EMD 1214063 in der Zelle nachgewiesen werden.

Ein Vergleichsexperiment mit den Substanzen EMD 1204831 und PF-04217903 zeigte, dass diese nicht in der Zelle akkumulierten und bereits nach 2 Tage nicht mehr nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt).

Basierend auf diesem Experiment, wurden Zellen, die ihre Resistenz in Gegenwart der Substanz EMD 1214063 entwickelt haben, vor jedem weiteren Versuch für 6 Wochen ohne Inhibitor inkubiert, um Effekte durch verbleibende Substanzen ausschließen zu können.

3.2.4 Einfluss von c-Met-Inhibitoren auf die Signalproteine der c-Met-Signaltransduktionskaskade in resistenten Zellen

Zur Klärung der Fragestellung, durch welche Mechanismen die Zellen nach der mehrmonatigen Behandlung mit c-Met-Inhibitoren Resistenzen erworben haben, sollte die c-Met Signaltransduktionskaskade zunächst auf eine mögliche Änderung hinsichtlich der Expression oder Aktivierung der Proteine geklärt werden. Die im serumfreien Medium kultivierten Zellen wurden dabei mit sinkenden Konzentrationen der jeweiligen Substanz behandelt, nach 24 Stunden lysiert und im Western Blot analysiert (siehe Abb. 3.10).

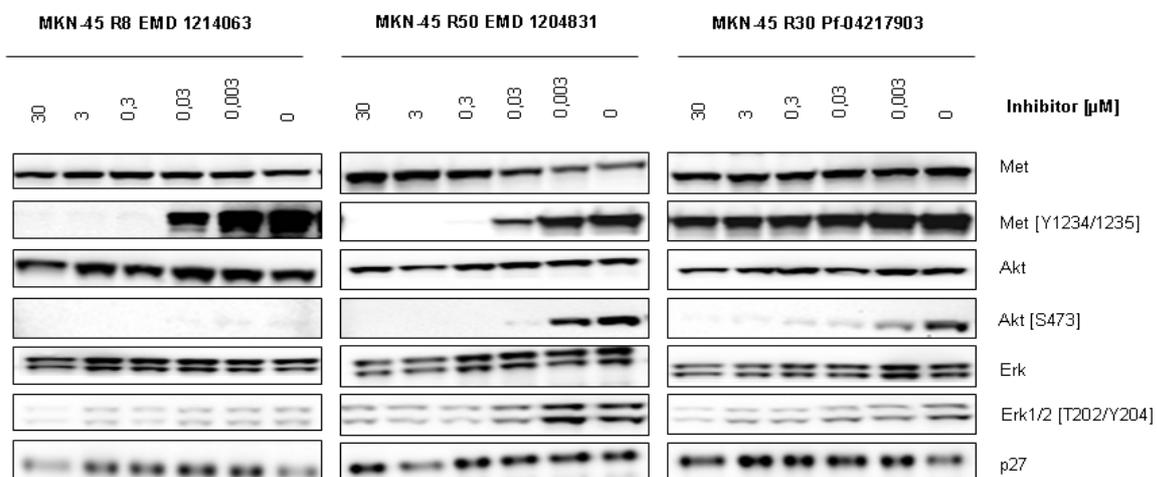


Abb. 3.10: Expression von Proteinen der c-Met-Signaltransduktionskaskade in resistenten MKN-45-Zellen nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.

In serumfreiem Medium inkubierte resistente MKN-45 Zellen wurden für 24 h mit absteigenden Konzentrationen der c-Met-Inhibitoren EMD 1214063, EMD 1204831 bzw. PF-04217903 behandelt, mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Beschriftung und Tab. 2.1) analysiert.

In den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 konnte eine dosisabhängige Inhibierung der c-Met Aktivität detektiert werden. Die Konzentration der Inhibitoren, die für die vollständige Inhibition der Phosphorylierung ausreichend war, war identisch wie in der parentalen Zelllinie (~100 nM → siehe 3.1.3 und Abb.3.3). Im Gegensatz dazu konnte in der resistenten Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 lediglich eine sehr geringe Inhibition der Phosphorylierung von c-Met mit den eingesetzten Konzentrationen erzielt werden. Die Quantifizierung der Proteinbanden (siehe Abb. 3.11) mit der Software „Quantity One“ ergab, dass die Behandlung mit der Substanz PF-04217903 in der maximal eingesetzten Konzentration von 30 µM, lediglich die Inhibition der Phosphorylierung um 60 % vermochte. Konnte in der parentalen Zelllinie noch mit einer Konzentration von 0,3 µM eine vollständige Inhibition der Phosphorylierung von c-Met erzielt werden, erreichte die Substanz in der resistenten Linie gerade einmal eine 30 %ige Inhibition der Phosphorylierung.

Des Weiteren konnte in allen resistenten Linien nur noch eine unvollständige Inhibition der Phosphorylierung von Erk beobachtet werden (siehe Abb. 3.10). Selbst nach dem Einsatz von 30 bzw. 3 µM der Inhibitoren konnte lediglich eine sehr leichte Abnahme der Erk-Phosphorylierung erreicht werden. Eine Phosphorylierung von Akt konnte in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 nicht mehr zweifelsfrei detektiert werden. Die Zelllinien MKN-45 R50 EMD 1204831 und MKN-45 R30 PF-04217903 zeigten dagegen eine dosisabhängige Inhibition der Phosphorylierung des Proteins, welche nahezu identisch mit dem Profil der parentalen Linie war. Eine Änderung im Aktivierungsniveau des Zellzyklusregulierenden Proteins p27^{Kip1} konnte in keiner Zelllinie beobachtet werden. Da die Zellen keinen Inhibitor-induzierten Zellzyklusarrest mehr aufweisen, erscheint dieses Ergebnis nicht ungewöhnlich.

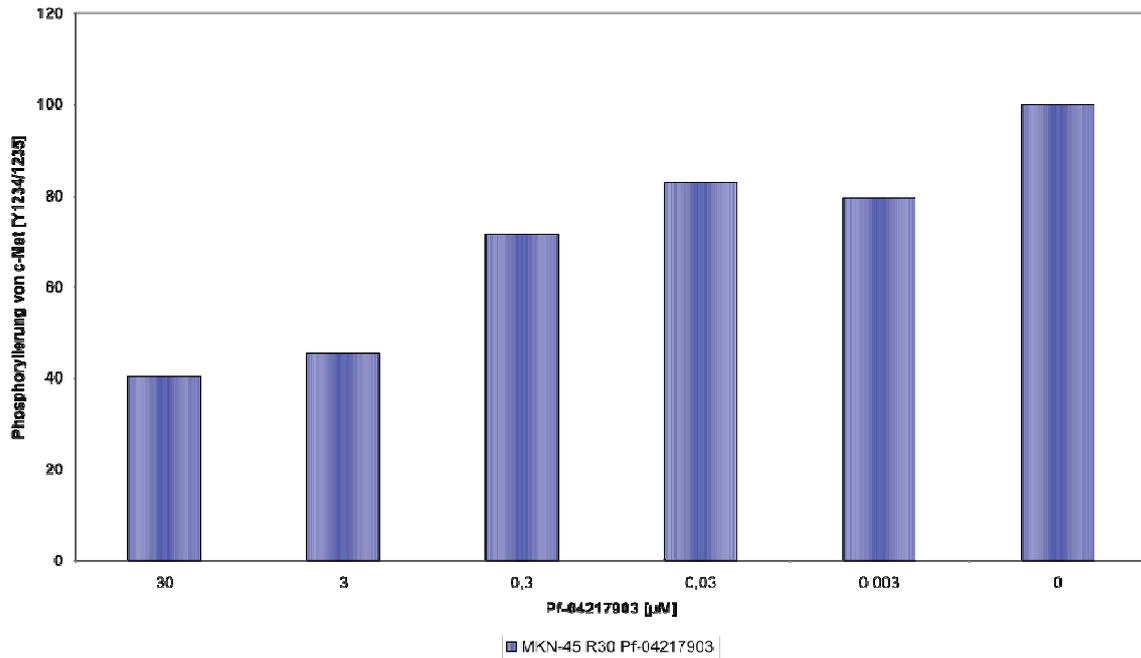


Abb. 3.11: Dosisabhängige Inhibition der Phosphorylierung von c-Met in MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen nach der Behandlung mit der Substanz PF-04217903.

In serumfreiem Medium inkubierte MKN-45 R30 PF-04217903 wurden für 24 h mit absteigenden Konzentrationen des c-Met-Inhibitors PF-04217903 behandelt, mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot analysiert. Dargestellt ist die Quantifizierung der Proteinbanden von c-Met [Y1234/1235] des Westernblots.

3.2.5 Kompensierende Aktivierung alternativer Signaltransduktionskaskaden

Die Ausbildung von Resistenzmechanismen gegen Therapeutika erfolgt häufig über die Aktivierung alternativer Signalwege. Die Tumorzellen können dadurch unabhängig von dem zu inhibierenden Protein werden, wodurch das Überleben der Zellen weiter gewährleistet werden kann. Um die mögliche Aktivierung alternativer Signaltransduktionskaskaden nach der Inhibierung des c-Met Signalweges analysieren zu können, wurde die Tyrosinphosphorylierung von 42 Rezeptor Tyrosinkinase mit im *Human Phospho-RTK Array* analysiert. Bei den durch den Array detektierten Phosphorylierungsstellen, handelt es sich um die Aktivierungsstellen der Kinasen. Verglichen wurde hierbei die RTK-Phosphorylierung in den resistenten und parental Zellen. Die Zelllinien wurden dafür in 6 cm-Schalen ausgesät, nach einer Übernachtskultivation gewaschen, mit serumfreiem Medium versetzt und 24 h später lysiert.

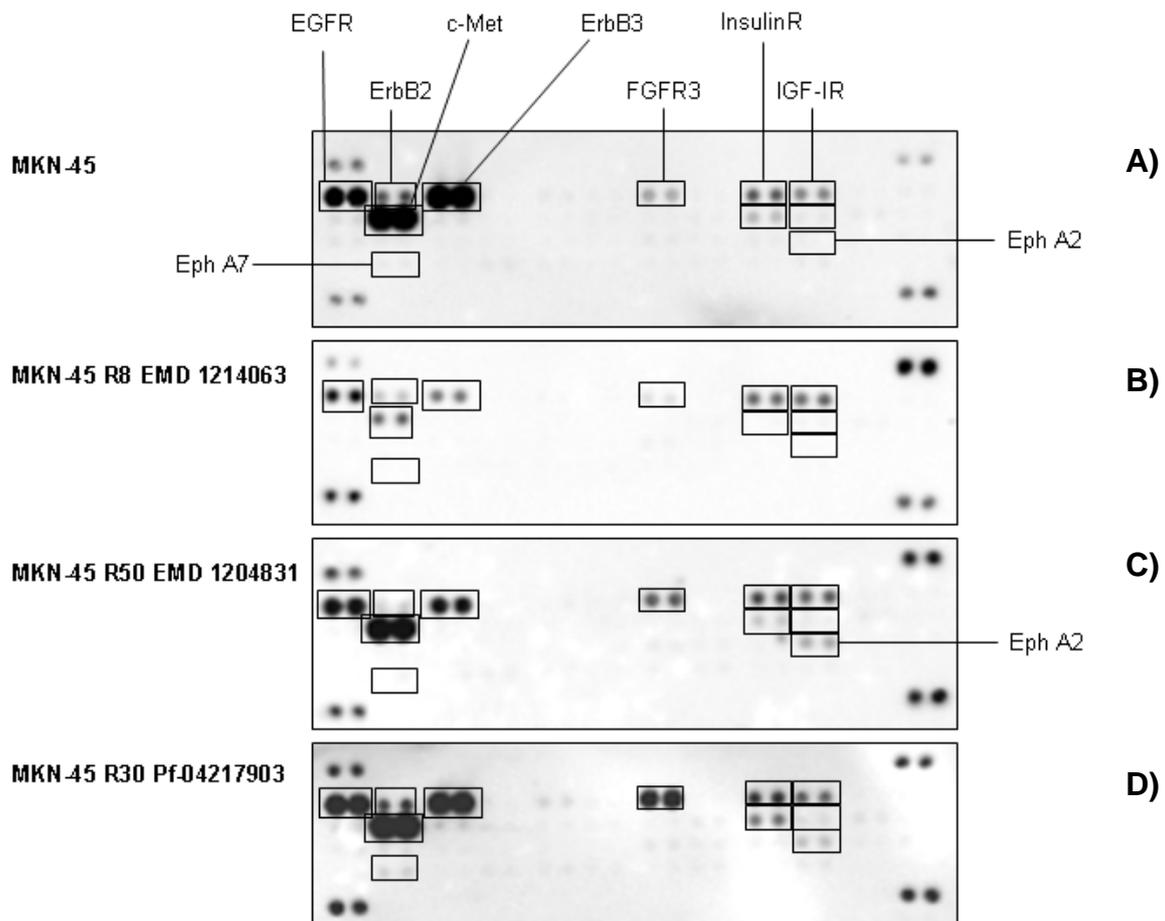


Abb. 3.12: Analyse des Tyrosinphosphorylierung von 42 verschiedenen RTK in parentalen und resistenten MKN-45 Zellen.

Lysate von parentalen und resistenten MKN-45-Zellen wurden auf einen Proteome Profiler™-Array inkubiert. Die Analyse der Tyrosinphosphorylierung der humanen RTK erfolgte mittels eines HRP-gekoppeltem Pan-Phosphotyrosin-Antikörpers und einem Chemilumineszenzreagenz.

Die parentale Zelllinie MKN-45 (siehe Abb. 3.12 A) zeigte eine sehr starke Phosphorylierung der Rezeptor Tyrosinkinase c-Met, EGFR und ErbB3. Eine deutliche, verhältnismäßig jedoch schwächer ausgeprägte Phosphorylierung wurde des Weiteren am ErbB2-Rezeptor gefunden. Am FGFR3, IGF-IR und dem Insulinrezeptor konnte jeweils eine schwache Phosphorylierung detektiert werden. Alle resistenten Zelllinien zeigten eine schwächer ausgeprägte Aktivierung der Rezeptoren c-Met, EGFR, ErbB2 und ErbB3. Verglichen mit der Ausgangszelllinie MKN-45 entsprach dies einer 250-fachen Abnahme der Phosphorylierung von c-Met in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 (siehe Abb. 3.12 B). Bei den Zelllinien MKN-45 R50 EMD 1204831 (siehe Abb. 3.12 C) und MKN-45 R30 PF-04217903 (siehe Abb. 3.12 D) konnte eine 37 bzw. 11-fache Abnahme der Tyrosinphosphorylierung detektiert werden. Die resistenten Zellen zeigten des Weiteren eine 10-35-fache verringerte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und eine 5-70-fach verringerte Aktivierung der

Rezeptoren ErbB2 und ErbB3. Im Gegensatz hierzu konnte eine bis zu 4-fach erhöhte Phosphorylierung des EPH A7 in den resistenten Zelllinien gezeigt werden. Ein verändertes Aktivierungsverhalten des FGFR3, IGF-IR und des Insulinrezeptors konnte dagegen in den resistenten Zelllinien nicht beobachtet werden.

Um die Arrays besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Signale mit der Software *Quantity One* quantifiziert und mit Hilfe der Kontrollen an den Eckpunkten der Membran normalisiert. Graphisch in einem Balkendiagramm dargestellt wurden alle signifikant veränderten Werte (siehe Abb. 3.13).

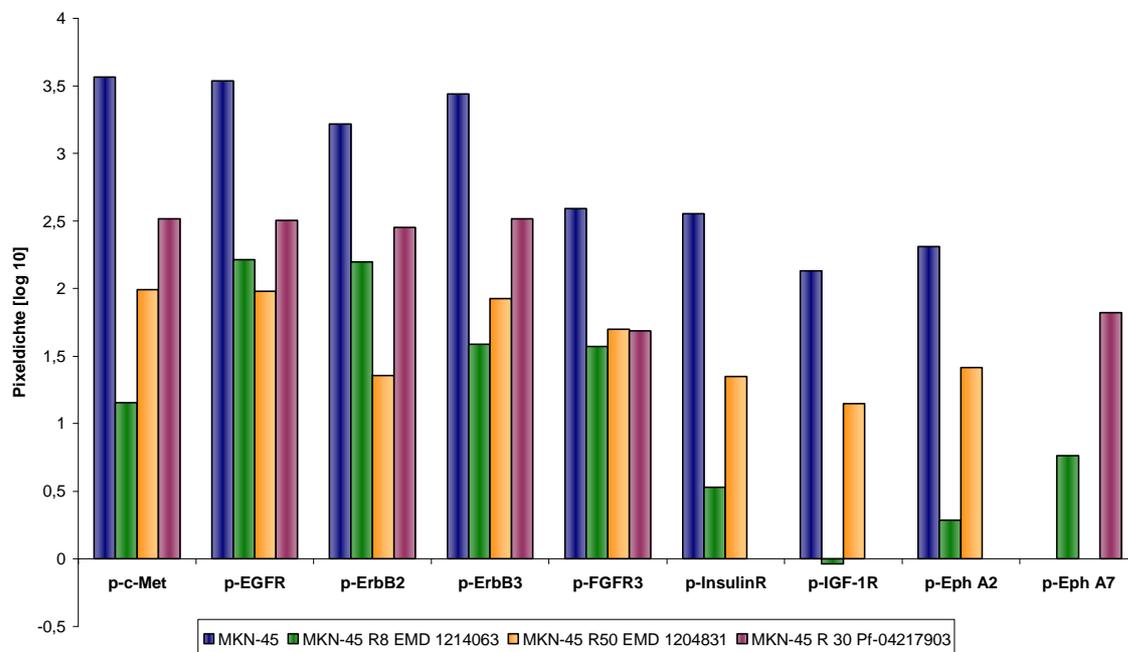


Abb. 3.13: Phosphorylierung von 42 verschiedenen RTK in parentalen und resistenten MKN-45-Zellen im Human Phospho-RTK-Array.

Lysate von parentalen und resistenten MKN-45-Zellen wurden auf einen Proteome Profiler™-Array inkubiert. Die Analyse der Tyrosinphosphorylierung humaner RTK erfolgte mittels eines HRP-gekoppeltem Pan-Phosphotyrosin-Antikörpers und einem Chemilumineszenzreagenz. Die Quantifizierung der Proteinspots erfolgte mit der Software *Quantity One*. Dargestellt sind alle signifikant veränderten Werte.

3.2.6 Migrationsverhalten der resistenten Zelllinien

Da die durch den Rezeptor c-Met beeinflusste Signaltransduktionskaskade maßgeblich am Prozess der Migration und Invasion beteiligt ist, sollte geklärt werden, ob die c-Met-Inhibitoren die gerichtete Migration der parentalen Zellen beeinflussen können und ob ein Unterschied zwischen den parentalen und resistenten Zellen besteht. Dafür wurde ein Versuch nach dem Boyden Chamber-Prinzip durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür im serumfreien Medium, welches mit den entsprechenden Inhibitoren versetzt war, in Transwells pipettiert. Als Lockstoff für die gerichtete Migration in das untere Kompartiment der Kammer diente serumhaltiges Medium, welches mit HGF versetzt war. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Quantifizierung der migrierten Zellen durch die Membran durch dessen Anfärbung mit Calcein AM und der anschließenden photometrischen Analyse an einem Plattenlesegerät und der zusätzlichen Betrachtung am Lichtmikroskop.

Die Anwesenheit der c-Met-Inhibitoren beeinflusste deutlich die Migrationsfähigkeit der parentalen Zelllinie MKN-45 (siehe Abb. 3.15). Im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollzellen, die eine deutliche gerichtete Migration nach 24 h zeigten, verhinderten die Inhibitoren in allen eingesetzten Konzentrationen eine Migration nahezu vollständig. Lediglich wenige einzelne Zellen zeigten eine Wanderung durch die Porenmembran in Richtung des serumhaltigen Mediums (siehe Abb. 3.14). Die Inhibition von c-Met und seiner Signaltransduktionskaskade hatte die Verringerung der Migration von mehr als 90 % zur Folge. Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Substanzen konnte nicht beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass c-Met beim Prozess der Migration eine essentielle Rolle spielt und selbst die Anwesenheit geringer Konzentrationen ausreichend ist um die Migration zu verhindern.

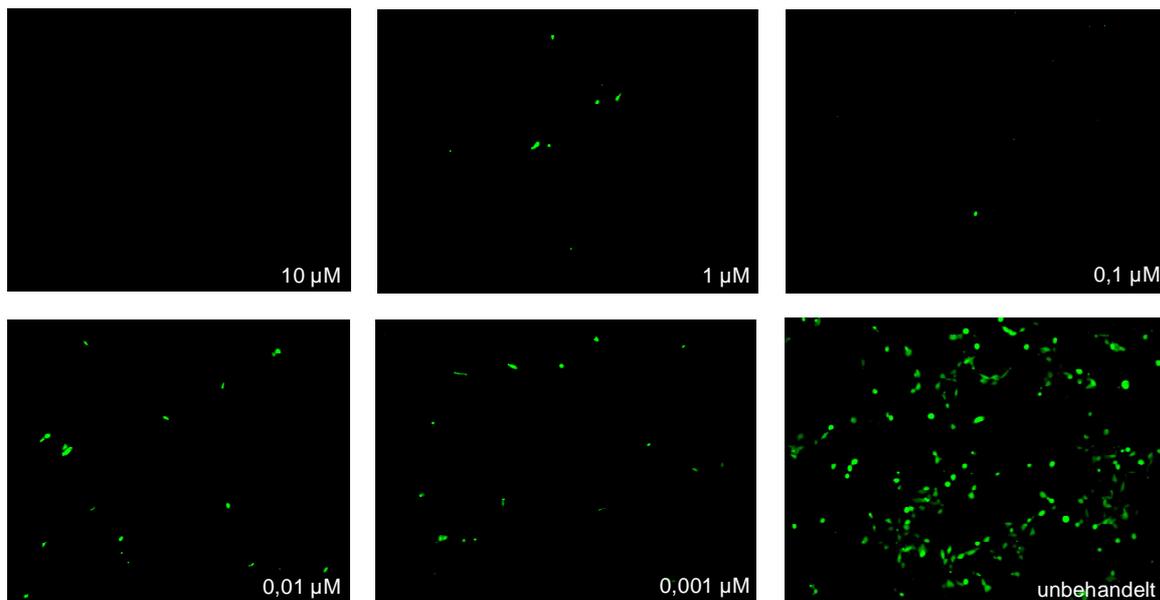


Abb. 3.14: Migrationsverhalten von parentalen MKN-45-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1204831.

Unbehandelte und mit EMD 1204831 versetzte MKN-45 Zellen wurden im serumfreien Medium für 24 h auf Transwell-Membranen mit 8 µm großen Poren kultiviert. Als Lockstoff im unteren Kompartiment diente serumhaltiges Medium. Nach dem Umsetzen in neue 24-Kaviatätenplatten wurden die in die Membran eingewanderten Zellen mit Calcein AM gefärbt und mikroskopisch untersucht.

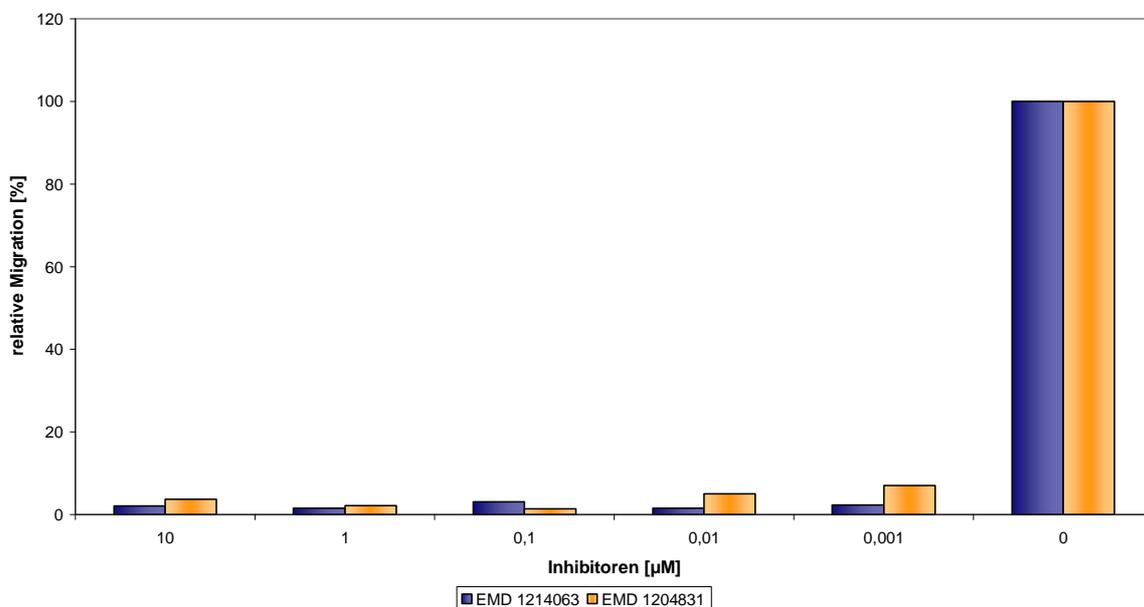


Abb. 3.15: Migrationsverhalten von parentalen MKN-45-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.

Unbehandelte und mit c-Met-Inhibitoren versetzte MKN-45 Zellen wurden im serumfreien Medium für 24 h auf Transwell-Membranen mit 8 µm großen Poren kultiviert. Als Lockstoff im unteren Kompartiment diente serumhaltiges Medium. Nach dem Umsetzen in neue 24-Kaviatätenplatten wurden die in die Membran eingewanderten Zellen mit Calcein AM gefärbt und photometrisch untersucht.

Verglichen mit der parentalen Zelllinie zeigte die Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 ein sehr ähnliches Verhalten (siehe Abb. 3.17). Die Anwesenheit der Substanz EMD 1214063 war ebenfalls in allen eingesetzten Konzentrationen ausreichend um das Wandern durch die Poren zu verhindern. Die unbehandelten resistenten Zellen zeigten ebenfalls eine ähnlich starke Migration wie die Zelllinie MKN-45. Im Gegensatz dazu zeigte die Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 eine Migration auch bei der Anwesenheit des Inhibitors EMD 1204831. Konnte bei der Zugabe von 10 μM des Inhibitors zum Medium noch ein Rückgang der Zellwanderung um 70 % detektiert werden, nahm die Migration dosisabhängig bei sinkenden Inhibitorkonzentrationen immer deutlicher zu (siehe Abb. 3.16 und 3.17).

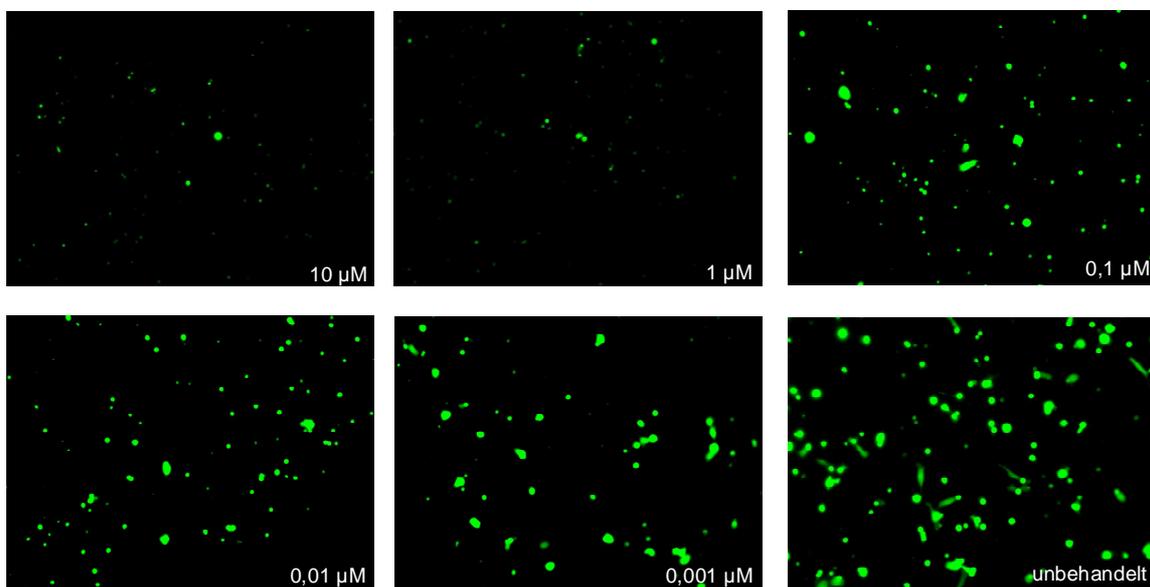


Abb. 3.16: Migrationsverhalten von resistenten MKN-45 R50 EMD 1204831-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1204831.

Resistente MKN-45 R50 EMD 1204831 Zellen wurden im serumfreien Medium für 24 h auf Transwell-Membranen mit 8 μm großen Poren kultiviert. Als Lockstoff im unteren Kompartiment diente serumhaltiges Medium. Nach dem Umsetzen in neue 24-Kaviatätenplatten wurden die in die Membran eingewanderten Zellen mit Calcein AM angefärbt und mikroskopisch untersucht.

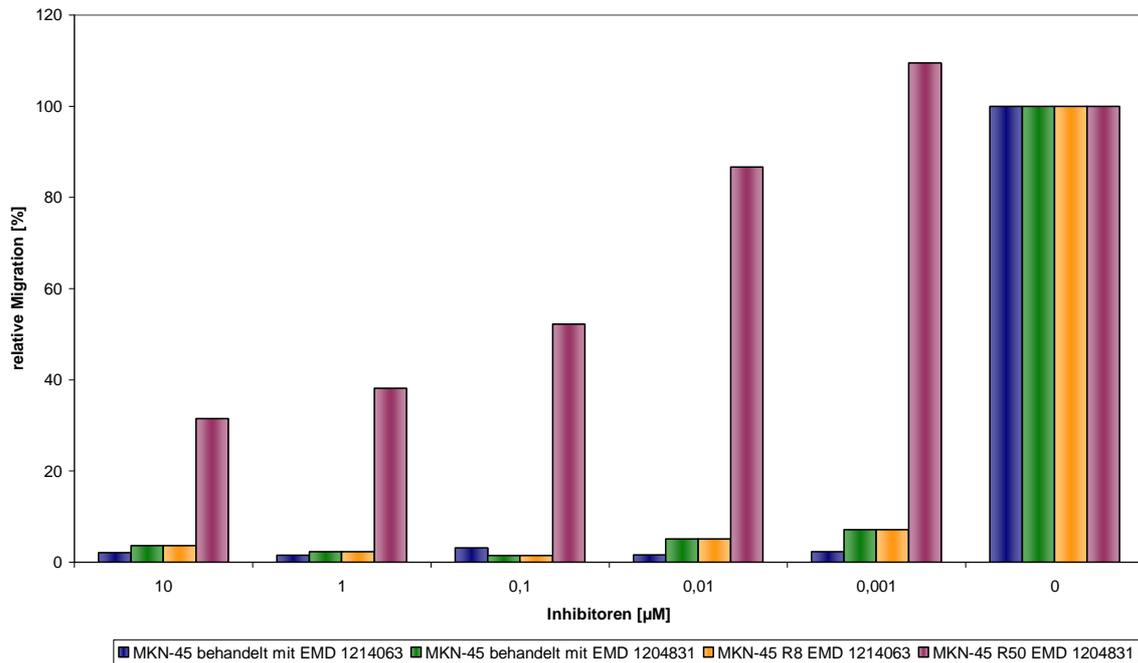


Abb. 3.17: Vergleichendes Migrationsverhalten von parentalen und resistenten MKN-Zellen in Abhängigkeit von einer Behandlung mit c-Met-Inhibitoren.

Parentale und Resistente MKN-45-Zellen wurden im serumfreien Medium für 24 h auf Transwell-Membranen mit 8 µm großen Poren kultiviert. Als Lockstoff im unteren Kompartiment diente serumhaltiges Medium. Nach dem Umsetzen in neue 24-Kaviätenplatten wurden die in die Membran eingewanderte Zellen mit Calcein AM gefärbt und photometrisch untersucht.

3.2.7 Sequenzierung des c-Met Gens

Für die Beantwortung der Frage, ob eine Mutation im c-Met Gen eine mögliche Ursache für die Ausbildung der Resistenzen ist, wurde eine Sequenzierung des c-Met Gens durchgeführt. Da das Auftreten von Mutationen aufgrund des Bindungsverhaltens von niedermolekularen Inhibitoren in der intrazellulären Domäne am wahrscheinlichsten ist, wurde diese zunächst mit Hilfe einer „Next Generation Sequencing“-Analyse sequenziert und mit der Referenz-mRNA (NCBI Reference Sequence: NM_001127500.1) abgeglichen.

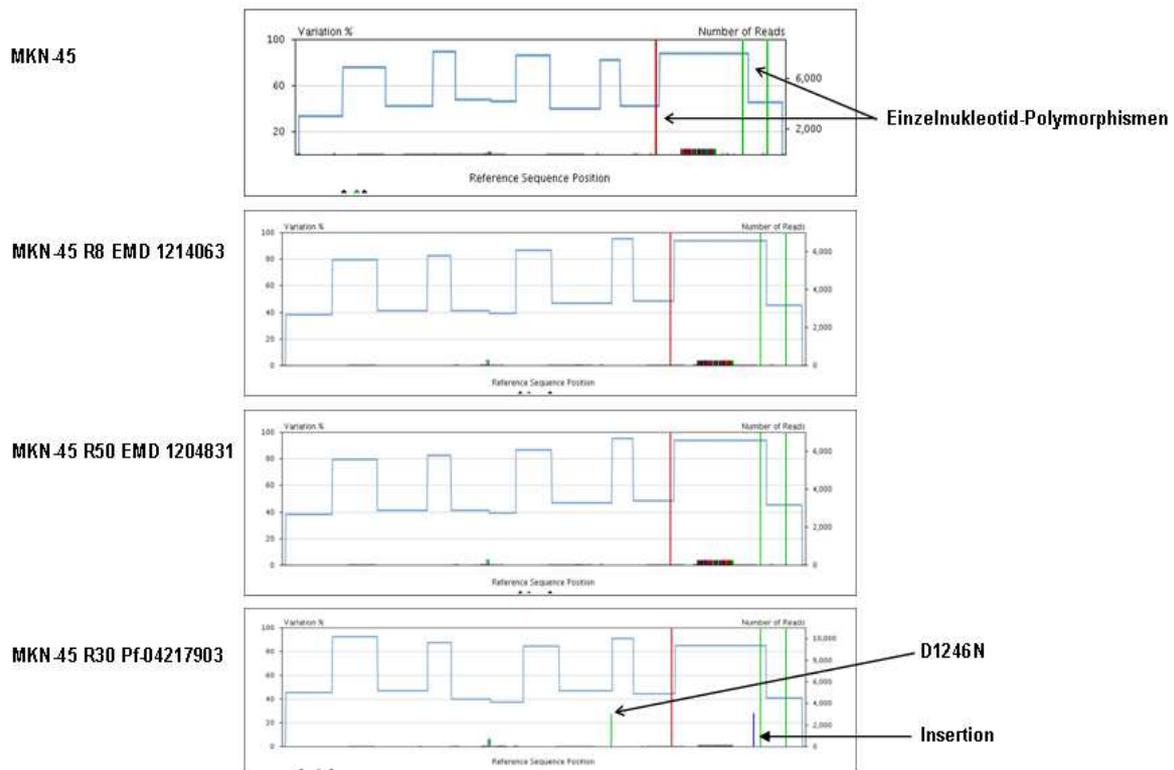


Abb. 3.18: Sequenzanalyse des c-Met-Gens in parentalen und resistenten MKN-Zellen.

Von parentalen und resistenten MKN-45-Zellen wurden zunächst RNA-Lysate hergestellt und mit Hilfe der „Next Generation Sequencing“-Technologie auf ihren c-Met-Mutationsstatus überprüft. Die erhaltene Sequenz wurde mit der Referenz-mRNA abgeglichen und bewertet.

Alle drei resistenten Zellen der Linie MKN-45 zeigten verschiedene Einzelnukleotid Polymorphismen in ihrer Gensequenz. Da diese Polymorphismen jedoch bereits in der parentalen Zelllinie MKN-45 vorlagen, und zudem weder zu einem Aminosäureaustausch noch zu einer Änderung beim Splicevorgang der mRNA führten, wurden sie als nicht relevant eingestuft und nicht weiter berücksichtigt. In der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 konnte in 27,5 % aller Reads an Position 982 eine Mutation sowohl in sense als auch in antisense Richtung detektiert werden. Dabei kam es zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure (GAC) zu Asparagin (AAC) an Position 1246. Aufgrund der Tatsache, dass das c-Met-Gen in mehreren Kopien vorliegt, kann dieser Prozentsatz als signifikant angesehen werden. Eine Abdeckungsrate von 5154 Reads unterstreicht dies noch. Da sich die Aminosäure 1246 in der ATP-bindenden Domäne des c-Met-Rezeptors befindet, könnte der Aminosäureaustausch die Bindung der niedermolekularen Inhibitoren unterbinden. Als weitere Abweichung zur parentalen Zelllinie konnte eine Insertion einer einzelnen Base detektiert werden, die im Folgenden einen Frame Shift des Proteins zur Folge hätte. Da diese Insertion jedoch nur auf einem Leseraster gefunden werden konnte, handelt es sich dabei vermutlich nur um ein technisches Problem, welches bei einer der Amplifikationsschritte entstanden ist. In den Zelllinien MKN-45 R50 EMD 1204831 und

MKN-45 R8 EMD 1214831 konnten, außer den bereits in der parentalen Linie beobachteten Abweichungen, keine Mutationen gefunden werden.

3.2.8 Effekte von c-Met-Inhibitoren der Klasse II auf die Signaltransduktion und das Wachstum der resistenten Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903

Durch vorausgehende Bindungsstudien der Substanzen EMD 1214063, EMD 1204831 und PF-04217903, die mit rekombinanten c-Met-Proteinen, die verschiedene Mutationen aufwiesen, durchgeführt wurden, war bereits bekannt, dass die Mutation D1246N die Bindung der einzelnen Inhibitoren verhindert (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung wurde durch die Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903, die eine Mutation in der ATP-bindenden Domäne des c-Met-Rezeptors aufweist, bestätigt. Wie in 3.3.4 dargestellt, zeigen die Zellen nach der Behandlung mit den Inhibitoren nur noch eine minimale Inhibition der Phosphorylierung an den Tyrosinresten 1234/1235. Im nächsten Ansatz wurden die Zellen mit dem c-Met/VEGF-Inhibitor XL880 der Firma Exelixis behandelt. Es handelt sich hierbei um einen c-Met-Inhibitor der Klasse II, der ein anderes Bindungsmuster aufweist. Im Gegensatz zu Inhibitoren der Klasse I, welche die Kinasedomäne in einer U-förmigen Konformation binden, interagieren Inhibitoren der Klasse II in einer gestreckten Konformation mit der Kinasedomäne. Dies ermöglicht die Bindung und Inaktivierung von verschiedenen Kinasen als auch von deren Mutanten. XL880 bindet und inaktiviert neben c-Met auch VEGFR2/KDR.

3.2.8.1 Einfluss auf das Wachstumsverhalten im Monolayer

Zunächst sollte der Effekt des Inhibitors auf das Zellwachstum überprüft werden. Dafür wurde jede Zelllinie in 96-Kaviatätenplatten ausgesät und nach 24 h mit absteigenden Konzentrationen der Substanz XL880 für 72 h behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit Alamar Blue versetzt und ihre Absorption nach 18 h an einem Plattenlesegerät bestimmt. Das relative Wachstum der Zellen wurde durch den Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle bestimmt und mit Hilfe der Software GraphPad Prism graphisch dargestellt (siehe Abb.3.19).

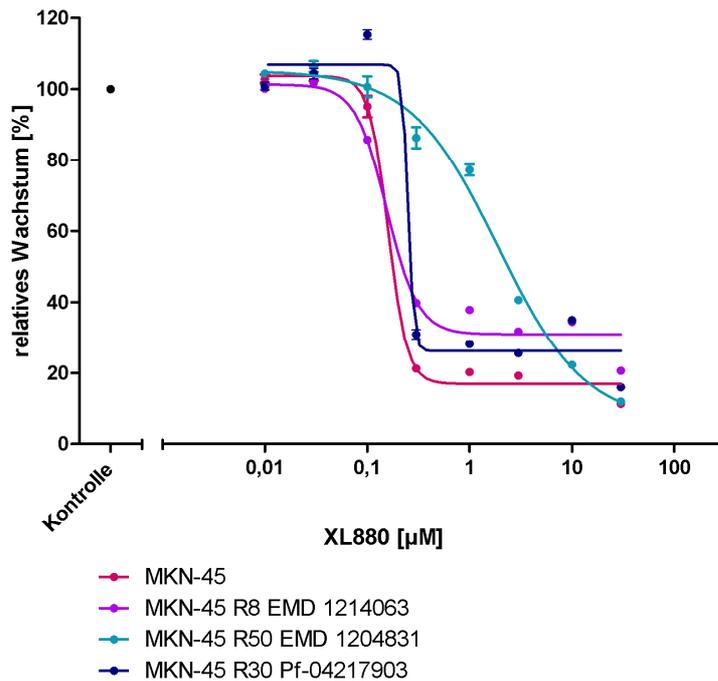


Abb. 3.19: Ansprechen der resistenten MKN-45-Zellen auf den Klasse II c-Met-Inhibitor XL880.

Resistente MKN-45-Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) im serumhaltigen Medium ausgesät und mit dem c-Met Inhibitor XL880 in Konzentrationen von 0,0001-10 µM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Sechsfachbestimmung.

Tab.3.4: Bestimmung der EC_{50} -Werte des c-Met Inhibitors XL880 in parentalen und resistenten Zellen.

EC_{50} [µM]	XL880			
	MKN-45	MKN-45 R8 EMD 1214063	MKN-45 R50 EMD 1204831	MKN-45 R30 PF-04217903
	0,16	0,15	1,8	0,25

Der Inhibitor XL880 zeigte sowohl in der parentalen als auch in der resistenten Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 einen deutlich inhibierenden Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen (siehe Abb. 3.19). Die maximale Wachstumsinhibition fiel bei der resistenten Zelllinie (75 %), verglichen mit der Ausgangszelllinie (85 %), lediglich um 10 % schwächer aus. Die EC_{50} -Werte lagen sowohl in der parentalen als auch in der resistenten Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 nahezu im gleichen nanomolaren Bereich (0,16 bzw. 0,25 µM), wodurch die gute Aktivität des Inhibitors in Bezug auf die Zelllinien noch unterstrichen wird. Die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 zeigte mit einem EC_{50} -Wert von 0,15 µM und einer maximalen Wachstumsinhibition von 70 % ein nahezu identisches Verhalten, wie die zuvor beschriebenen Zelllinien. Lediglich die Linie MKN-45 R50 EMD 1204831 zeigte mit einem

EC₅₀-Wert von 1,8 µM eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber der Substanz XL880. Die maximale Wachstumsinhibierung von fast 90 % konnte des Weiteren erst bei Konzentrationen, die größer als 10 µM waren, erreicht werden. Bei den anderen Zelllinien konnte sie dagegen bereits bei Konzentrationen, die geringer als 1 µM waren erreicht werden.

3.2.8.2 Einfluss auf die Signaltransduktionskaskade

Um den wachstumsinhibierenden Effekt des Inhibitors XL880 auf die Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 auf Proteinebene näher charakterisieren zu können, wurde die Inhibition von Signalproteine der c-Met Signaltransduktionskaskade nach 24-stündiger Behandlung, der in serumfreien Medium kultivierten Zellen, mit Hilfe eines Western Blots untersucht und mit der parentalen Zelllinie verglichen.

Dabei zeigte sich, dass XL880 sowohl in der parentalen als auch in der resistenten Zelllinie dosisabhängig eine Inhibition von c-Met bewirkt (siehe Abb. 3.20). Der Einsatz von 30 und 3 µM XL880 führte in beiden Zelllinien zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Tyrosinphosphorylierung von c-Met. Eine Phosphorylierung von c-Met, die bei den weiteren Verdünnungsschritten der Substanz stärker wurde, konnte schließlich bei einer Konzentration von 0,3 µM detektiert werden. Im Zuge der Inhibition der Phosphorylierung von c-Met konnte eine, ebenfalls dosisabhängige, Inhibition von Erk [T202/Y204] beobachtet werden. Die Inhibition der Phosphorylierung von Akt [S473] konnte aufgrund der schwachen Signale im Western Blot nur ungenügend gezeigt werden. Die starke Expression von p27^{Kip1}, die bei hohen Dosen des Inhibitors beobachtet wurde, weist auf einen Zellzyklusarrest hin und bestätigt die zuvor erzielten Ergebnisse aus dem Proliferationsversuch.

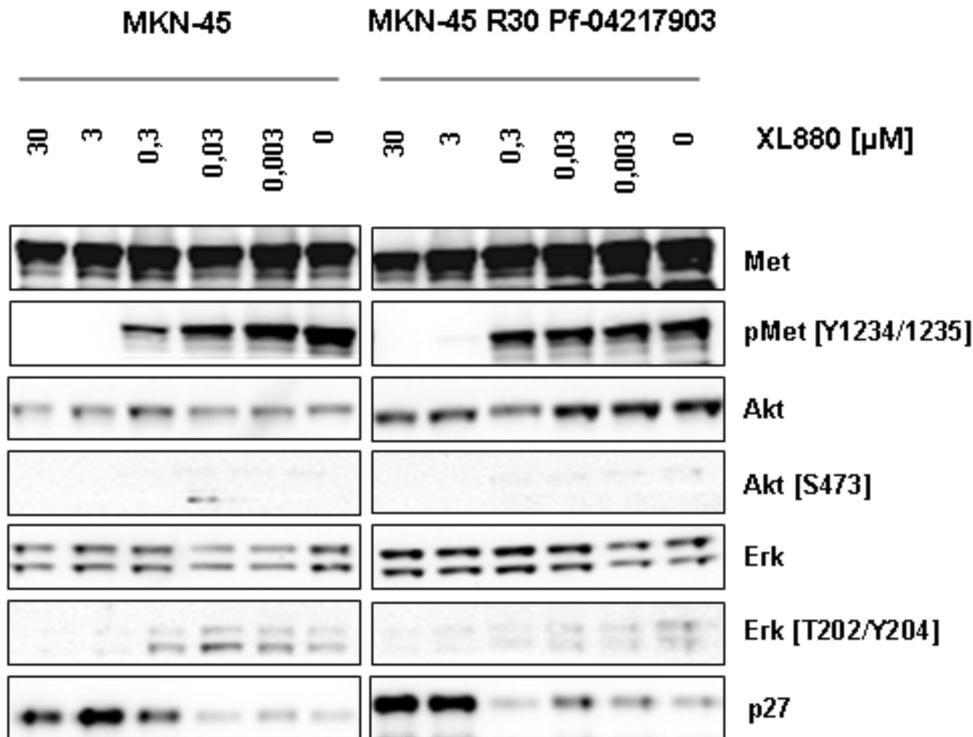


Abb. 3.20: Vergleichende Expression von Proteinen der c-Met-Signaltransduktionskaskade in parentalen und resistenten MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen nach der Behandlung mit XL880. In serumfreiem Medium inkubierte resistente MKN-45 Zellen wurden für 24 h mit absteigenden Konzentrationen des c-Met-Inhibitors XL880 behandelt, mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörper (siehe Beschriftung und Tab. 2.1) analysiert.

3.2.9 Effekte des EGFR-Ligandens nach Inhibition des c-Met-Signalwegs

3.2.9.1 Einfluss auf das *in vitro* Wachstum

Um zu untersuchen, ob die alternative Aktivierung des EGFR durch die Stimulation mit dem Liganden EGF, die Zellen vor schädlichen Effekten der c-Met-Inhibitoren bewahren vermag, wurden zunächst Proliferationsversuche mit den sensitiven parentalen Zelllinien MKN-45 durchgeführt. Die Zellen wurden dafür im serumhaltigen Medium ausgesät, nach einer Übernachtskultivierung gewaschen, mit serumfreiem Medium versetzt und nach 24 h mit 1 μM des entsprechenden c-Met-Inhibitors und entweder mit 10 ng/ml EGF oder einer Kombination aus 10 ng/ml EGF und 250 nM Iressa behandelt. Bei Iressa handelt es sich um einen niedermolekularen Inhibitor des EGFR, der bereits für die Behandlung von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, welche eine aktivierende Mutation im EGFR aufweisen, zugelassen ist. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die Zellen mit Alamar Blue versetzt und ihre Absorption nach weiteren 18 h an einem Plattenlesegerät bestimmt. Das

relative Wachstum der Zellen wurde durch den Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle bestimmt und mit Hilfe der Software Excel graphisch dargestellt.

Die dargestellten Resultate zeigen, dass die Stimulation mit EGF alleine keinen wachstumsfördernden Effekt auf die Zellen hat (siehe Abb. 3.21). Die relative Proliferation der Zellen ist in den unstimulierten Zellen genau so stark ausgeprägt wie in den stimulierten. Ein deutlicher Einfluss konnte jedoch bei der gleichzeitigen Behandlung mit den c-Met-Inhibitoren beobachtet werden. Zeigten die sensitiven Zellen nach der Behandlung mit 1 μM der Substanzen EMD 1214063, EMD 1204831 oder PF-04217903 noch eine Wachstumsinhibierung um mehr als 80 %, konnte die Stimulation mit 10 ng/ml EGF diesen Effekt nahezu vollständig kompensieren. Nach der zusätzlichen Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Iressa, um die Aktivierung des EGFR durch EGF wiederum blockieren zu können, konnte des Weiteren wieder eine leichte Abnahme der Proliferation verzeichnet werden. Iressa konnte den Liganden-abhängigen Wachstumseffekt demnach zumindest teilweise hemmen. Dieser Effekt war bei allen drei Inhibitoren vergleichbar stark ausgeprägt.

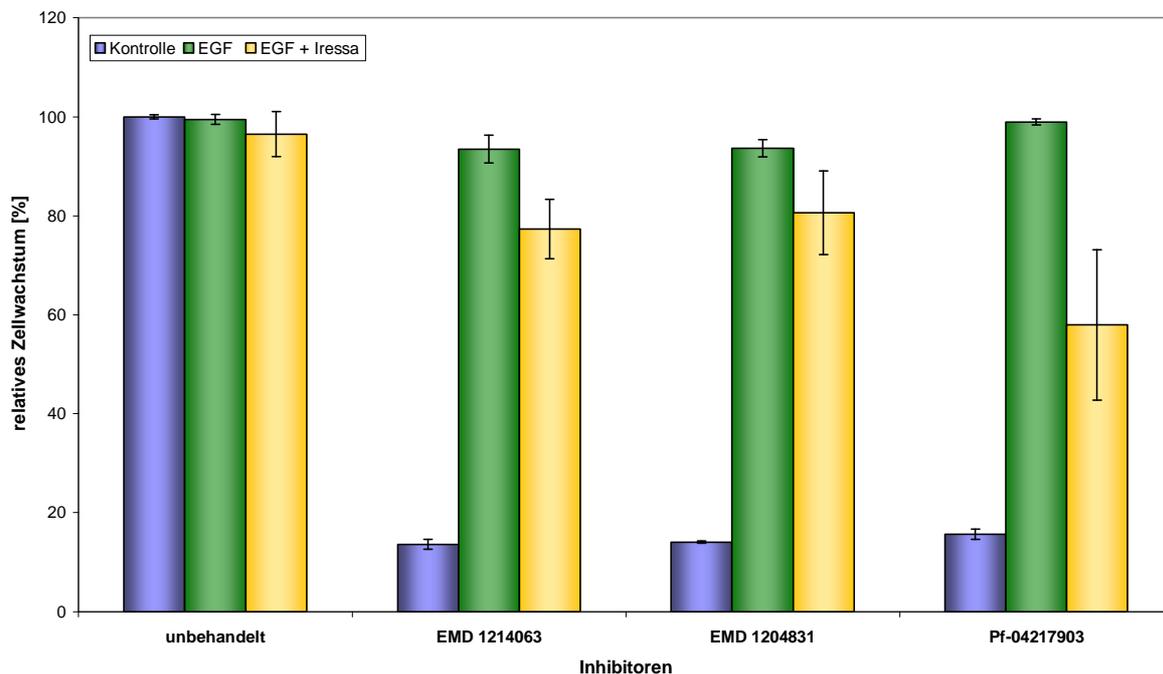


Abb. 3.21: Ansprechen der parentalen MKN-45-Zellen auf c-Met-Inhibitoren in Abhängigkeit einer Stimulation mit dem EGFR-Liganden EGF.

Parentale MKN-45-Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und nach 24 h mit den c-Met-Inhibitoren EMD 1214063, EMD 1204831 bzw. PF-04217903 mit einer Konzentration von 1 μM behandelt. Die Zellen wurden zusätzlich entweder mit 10 ng/ml EGF alleine oder in Kombination mit dem EGFR-Inhibitor Iressa (250 nM) versetzt. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen für 18 h mit Alamar Blue versetzt und anschließend die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Sechsfachbestimmung.

3.2.9.2 Einfluss auf die EGFR-Signaltransduktionskaskade

Da EGF durch die Stimulation seiner Rezeptoren die durch die c-Met-Inhibierung vermittelte Proliferationsinhibierung in zweidimensionalen Zellkulturen scheinbar verhindern vermag, sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob diese Resultate durch eine veränderte Expression oder Aktivierung von Proteinen des EGFR-Signalweges begleitet werden. Die Zellen wurden hierfür in serumfreiem Medium kultiviert, mit den Inhibitoren behandelt und nach 24 h mit dem Liganden stimuliert. Die Proteinanalyse erfolgte mittels eines Western Blots.

Die in Abb. 3.22 dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass obwohl die parentale Zelllinie MKN-45 einen lediglich geringen basalen Level an EGFR aufweist, eine deutliche Phosphorylierung desselben nach der Stimulation mit EGF möglich ist. Alle drei c-Met-Inhibitoren bewirkten des Weiteren eine dosisabhängige Inhibition der Phosphorylierung des EGFR in den unstimulierten Zellen. Dagegen konnte dieser Effekt in den stimulierten Zellen nicht beobachtet werden. Die Betrachtung des ebenfalls zu der EGFR-Familie gehörenden ErbB3-Rezeptors zeigte folgendes: obwohl die Expression des Proteins mittels der hier eingesetzten Western Blots nicht detektiert werden konnte, wurde eine extrem intensive Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors bereits ohne Stimulation mit EGF detektiert (siehe Abb. 3.12 und 3.22). Auch diese Phosphorylierung konnte dosisabhängig durch alle drei c-Met-Inhibitoren inhibiert werden. Die ebenfalls im EGFR-Signalweg involvierte Kinase Erk1/2 zeigte wie bereits im Abschnitt 3.1.3 beschrieben eine dosisabhängige Inhibierung. Interessanterweise zeigte selbige nach der Stimulation mit EGF ein umgekehrtes Aktivierungsmuster. So führte die Behandlung der Zellen mit hohen Konzentrationen der c-Met-Inhibitoren in Kombination mit dem Liganden EGF zu einem maximalen Aktivierungsniveau, das wiederum mit sinkenden Inhibitorkonzentrationen abnahm. Die Phosphorylierungen waren in diesem Fall deutlich stärker als in den unbehandelten und unstimulierten Kontrollen. Dieser Effekt konnte mit allen drei Inhibitoren erzielt werden, wobei er am stärksten bei der Substanz PF-04217903 und am schwächsten bei der Substanz EMD 1214063 ausgeprägt war.

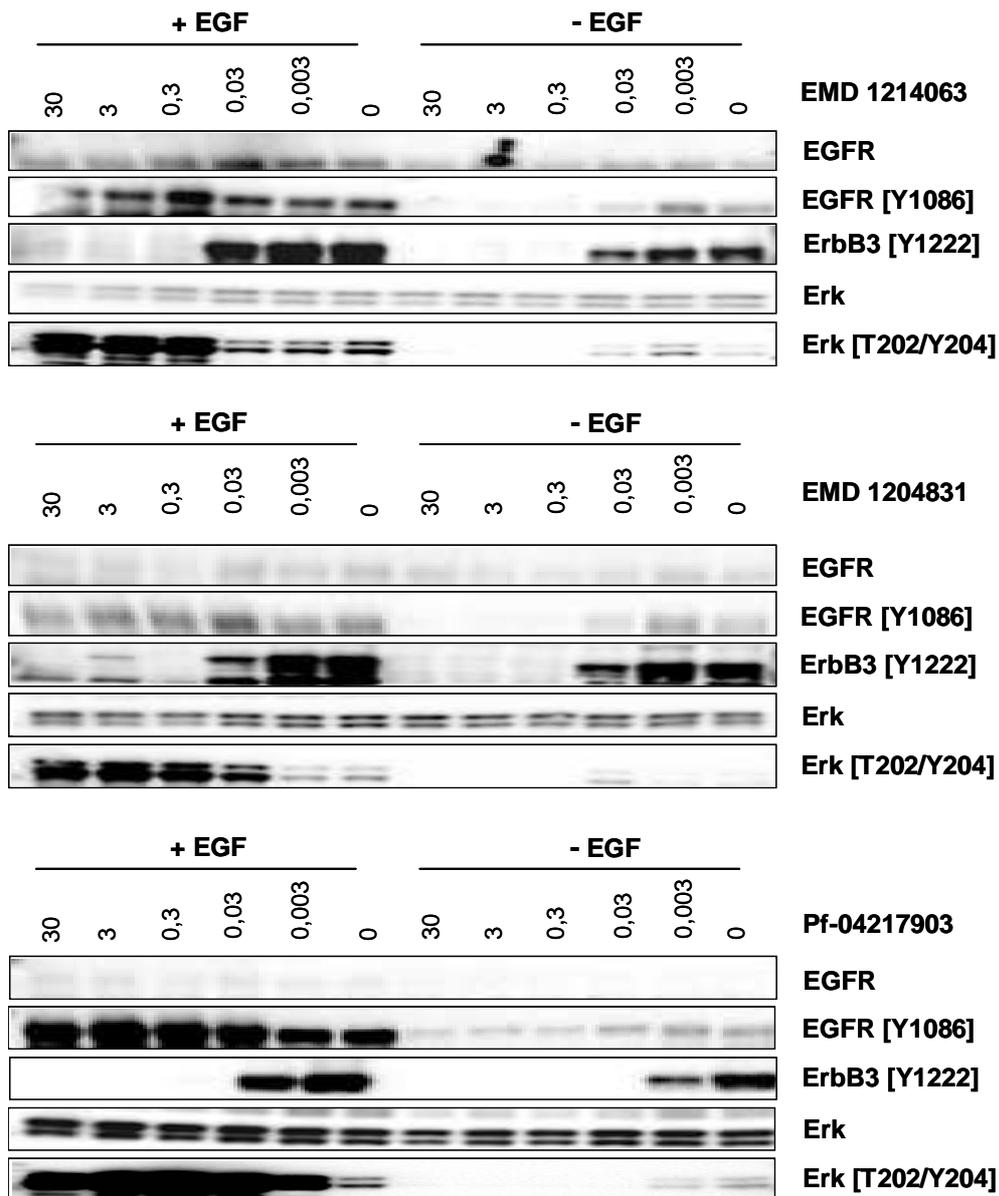


Abb. 3.22: Vergleichende Expression von Proteinen der EGFR-Signaltransduktionskaskade in parentalen Zellen nach der Stimulation mit dem EGFR-Liganden EGF.

In serumfreien Medium inkubierte parentale MKN-45 Zellen wurden für 24 h mit absteigenden Konzentrationen der c-Met-Inhibitoren EMD 1214063, EMD 1204831 bzw. PF-04217903 behandelt und anschließend für 10 min mit 10 ng/ml EGF stimuliert, mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörper (siehe Beschriftung und Tab. 2.1) analysiert.

3.2.10 Genexpressionsanalysen

Mit einer Microarray-Analyse wurden vergleichende Transkriptionsprofile der parentalen und resistenten Zellen erstellt. Durch die Identifikation signifikanter Unterschiede im Genexpressionsverhalten der Zelllinien sollten Gene gefunden werden, die mit einer Resistenz gegen c-Met-Inhibitor assoziiert sind. Für die Expressionsprofilierung wurden Genchips der Firma Affymetrix (hgu133plus2) eingesetzt. Dieses Microarray umfasst etwa 54.000 Probensets und deckt damit 19738 proteinkodierende -und demnach fast alle bekannten proteinkodierende Gene des humanen Genomes ab. Von den parentalen und den resistenten Zellen wurden jeweils eine frühe und eine späte Passage profiliert. So sollten Änderungen in der Expression einzelner Gene identifiziert werden, die mit der Passagedauer assoziiert sind. Die Zellen wurden für dieses Experiment mit identischer Zelldichte ausgesät und nach 24 h lysiert. Von jeder Zelllinie wurden fünf Replikate angefertigt. Die statistische Auswertung der Daten wurde von Dr. Eike Staub aus der Abteilung „Discovery Bioinformatics“ der Firma Merck KGaA vorgenommen.

Tab.3.5: Verwendete Zelllinien für die Genexpressionsanalyse.

Abkürzungen in der Zelllinienbeschriftung: R: Resistent, Zahl: Höchstdosis der Inhibitoren in μM .

Zelllinie	Passagezahl	Inhibitor	[μM]
MKN-45 (frühe Passage)	5	-	-
MKN-45 (späte Passage)	39	-	-
MKN-45 R2,5 EMD 1214063 (frühe Passage)	18	EMD 1214063	2,5
MKN-45 R8 EMD 1214063 (späte Passage)	37	EMD 1214063	8
MKN-45 R7,5 EMD 1204831 (frühe Passage)	25	EMD 1204831	7,5
MKN-45 R50 EMD 1204831 (späte Passage)	43	EMD 1204831	50
MKN-45 R4 PF-04217903 (frühe Passage)	24	PF-04217903	4
MKN-45 R30 PF-04217903 (späte Passage)	53	PF-04217903	30

Zunächst wurde mit dem Genexpressionsdatensatz eine Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA) erstellt. Dabei wurden die mehrdimensionalen Genexpressionsdaten der parentalen und resistenten Zellen auf einen dreidimensionalen Raum reduziert, der durch die ersten drei Hauptkomponenten aufgespannt wird. Die Hauptkomponenten sind orthogonale Linearkombinationen der 19738 Gene, sogenannte Metagene, welche optimal die Varianz der Genexpressionsprofile widerspiegeln. In der

3D-Darstellung der ersten drei Hauptkomponenten (siehe Abb.3.23) ist jeder Probe ein Punkt im Raum zugeordnet.

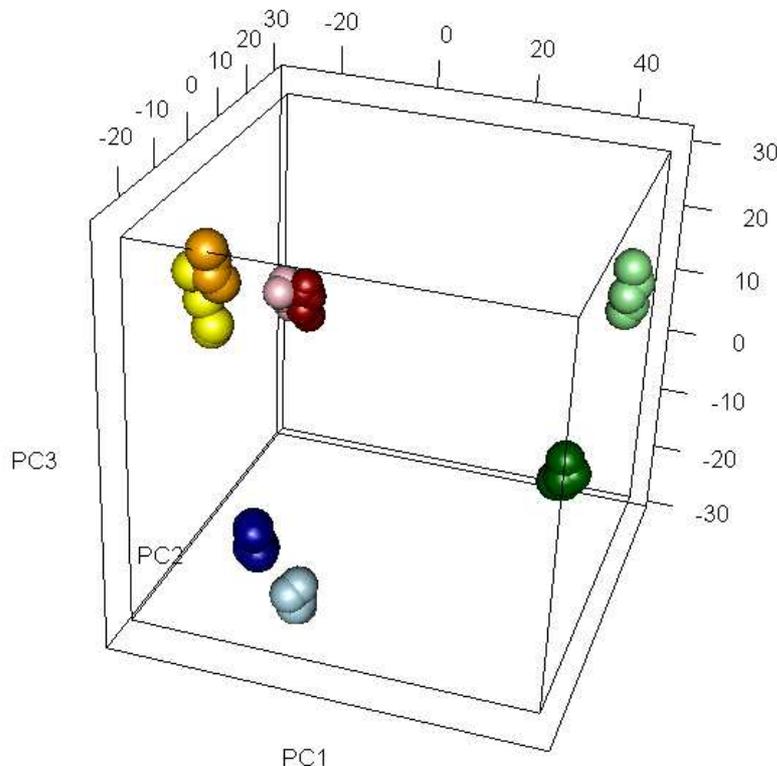


Abb. 3.23: Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsprofile von parentalen und resistenten MKN-45-Zellen.

Parentale und resistente MKN-45-Zellen wurden in identischer Zellzahl ausgesät und nach 24 h lysiert. Die mittels Microarray-Analyse ermittelten Genexpressionsprofile wurden durch eine Hauptkomponentenanalyse auf ein dreidimensionales Profil reduziert. Fünffachbestimmungen sind durch jeweils fünf gleichfarbige Punkte dargestellt. Gelb: parentale Zelllinie (frühe Passage). Orange: parentale Zelllinie (späte Passage). Rosa: MKN-45 R2,5 EMD 1214063 (frühe Passage). Rot: MKN-45 R8 EMD 1214063 (späte Passage). Hellgrün: MKN-45 R7,5 EMD 1204831 (frühe Passage). Dunkelgrün: MKN-45 R50 EMD 1204831 (späte Passage). Hellblau: MKN-45 R4 PF-04217903 (frühe Passage). Dunkelblau: MKN-45 R30 PF-04217903 (späte Passage).

Die Hauptkomponentenanalyse zeigte, dass es durch die Langzeitinkubation der Zellen mit den c-Met-Inhibitoren zu einem veränderten Genexpressionsmuster gekommen ist. Dies zeigte sich durch die Trennung der Proben verschiedener Behandlungsgruppen (farblich markiert) im Raum der durch die ersten drei Hauptkomponenten aufgespannt wird. Die Hauptkomponentenanalyse lässt vermuten, dass die parentalen Kontrollzelllinie MKN-45 im Laufe der Kultivierung ebenfalls Veränderungen im Genexpressionsmuster erfahren hat, da die Proben aus früher (gelb) und später (orange) Passagierung der unbehandelten MKN-45-Zellen separiert werden. Um die Separation der Behandlungsgruppen mit einem alternativen Verfahren zu untersuchen wurde eine hierarchische Clusteranalyse (HC) aller

Proben durchgeführt (siehe Abb.3.24, complete linkage-Verfahren, Distanzen zwischen Proben sind abgeleitet vom Korrelationskoeffizienten: $d = 1 - r_{\text{Pearson}}$). Sie zeigte eine vorrangige Gruppierung der Proben nach Behandlung, dann nach Passagenzahl, mit perfektem Clustering der Behandlungsgruppen. Die PCA und das HC liefern den Nachweis, dass die Transkriptome der unterschiedlichen MKN-45-Zellen sowohl durch die Behandlung als auch durch die Passagierungsdauer geprägt wurden.

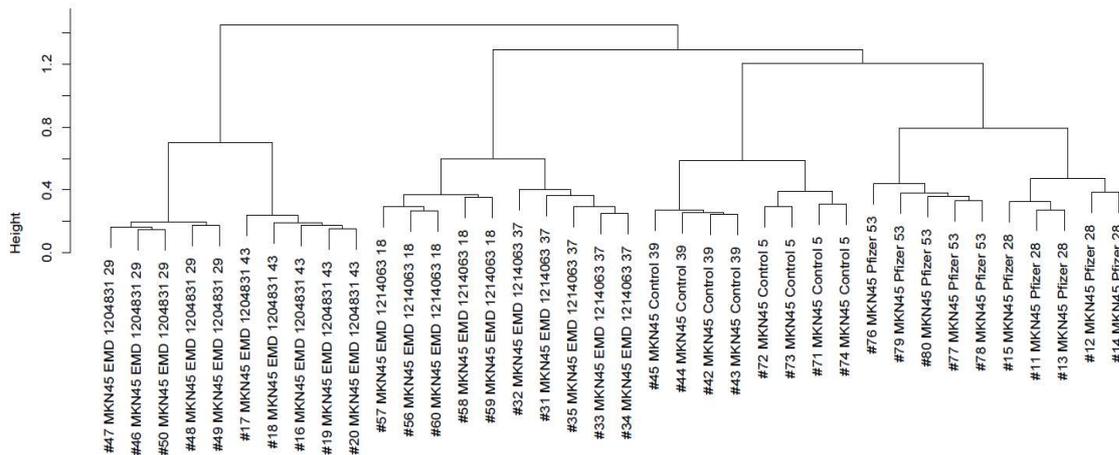


Abb. 3.24: Hierarchische Clusteranalyse der parentalen und resistenten MKN-45-Zellen.

Parentale und resistente MKN-45-Zellen wurden in identischer Zellzahl ausgesät und nach 24 h lysiert. Die mittels Microarray-Analyse ermittelten Genexpressionsprofile wurden hierarchisch geclustert. Pro Zelllinie wurden jeweils eine frühe und eine späte Passage analysiert.

Um den Einfluss der Passagierung in den unbehandelten Kontrollen zu beleuchten, wurde für jedes Gen ein t-Test bezüglich der Unterschiede von Proben aus früher und später Passagierung durchgeführt. Für jedes Gen wurde ein P-Wert ermittelt. Das Histogramm aus Abb.3.25 zeigt die für jedes Gen ermittelten P-Werten in einem Histogramm. Gäbe es keine wirklichen, allenfalls zufällige, Unterschiede in der Expression, wären die P-Werte gleichmäßig über alle Intervalle verteilt. Die Tatsache, dass mehr als 2500 Gene einen sehr geringen p-Wert aufwiesen, lässt vermuten, dass es bereits durch die lange Passage der Zellen zu einem deutlich differenziellen Genexpressionsprofil für viele Gene gekommen ist.

Um die Genexpressionsänderungen zwischen sensitiven und resistenten MKN-45-Zellen global betrachten zu können, wurden ebenfalls Histogramme der P-Werte aus paarweisen Vergleichen erstellt. Abb.3.26 zeigt deutlich, daß weit mehr Gene als zufällig zu erwarten in den sechs Vergleichen sensitiver/resistenter Zellen differenziell exprimiert wurden, unabhängig davon, ob die sensitive Referenz in den parentaler Zellen (frühe Passage) oder den ähnlich lange ohne Inhibitor passagierten Zellen besteht. Es ist zu erwarten, dass viele Gene signifikant differenziell exprimiert sind.

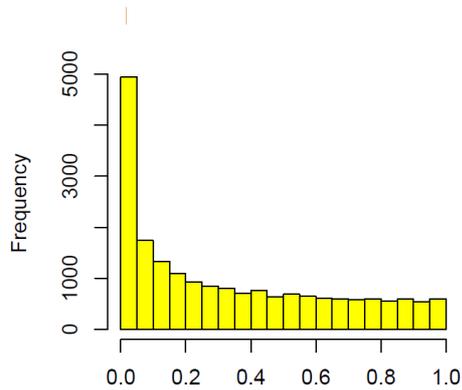


Abb. 3.25: Globale Betrachtung der Signifikanz der Änderungen von Einzelgenprofilen zwischen unbehandelten MKN-45 Zellen bei früher und später Passagezahl.

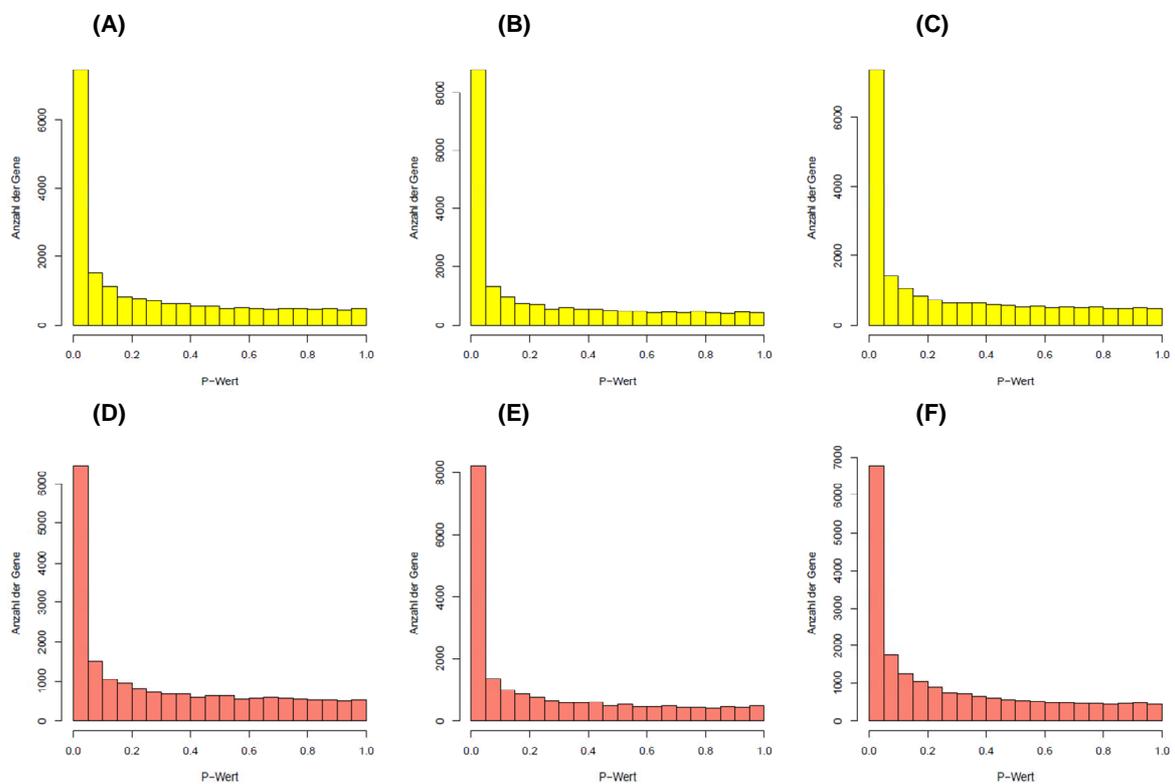


Abb. 3.26: Globale Betrachtung der Signifikanz der Änderungen von Einzelgenprofilen zwischen unbehandelten und behandelten MKN-45 Zellen.

- A) Vergleich unbehandelte Zellen bei später Passagierung gegen MKN-45 R8 EMD 1214063-Zellen bei später Passagierung.
 B) Vergleich unbehandelte Zellen bei später Passagierung gegen MKN-45 R50 EMD 1204831-Zellen bei später Passagierung.
 C) Vergleich unbehandelte Zellen bei später Passagierung gegen MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen bei später Passagierung.
 D) Vergleich unbehandelte Zellen bei früher Passagierung gegen MKN-45 R8 EMD 1214063-Zellen bei später Passagierung.
 E) Vergleich unbehandelte Zellen bei früher Passagierung gegen MKN-45 R50 EMD 1204831-Zellen bei später Passagierung.
 F) Vergleich unbehandelte Zellen bei früher Passagierung gegen MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen bei später Passagierung.

Um Gene zu identifizieren, die in den Zellen differenziell exprimiert wurden, die eine Resistenz zu einem der drei Inhibitoren erworben haben, wurden pro Inhibitor die t-Test-Resultate aus zwei Vergleichen kombiniert: a) früh/unbehandelt gegen spät/Inhibitor-behandelt, und b) spät/unbehandelt gegen spät/Inhibitor-behandelt. Von den zwei p-Werten wurde der größere p-Wert zugrunde gelegt, also eine konservative Abschätzung vorgenommen. Die logarithmischen Expressionsratios (\log_2FC) wurden gemittelt. So wurde ein p-Wert/ \log_2FC -Paar pro Gen und pro Inhibitor erhalten, das die Assoziation eines Gens mit Resistenzentwicklung beschreibt. Bei der großen Zahl von t-Tests (19738) ist eine Korrektur für multiples Testen notwendig. Mittels der Methode von Storey wurden für jedes Gene ein dem p-Wert assoziierter Q-Wert berechnet, der die zu erwartende Rate an Falsch-Positiven (false discovery rate, FDR) beschreibt, wenn man dieses Gen und solche mit kleinerem P-Wert als differenziell exprimiert definiert. Als Kriterium für differenzielle Expression wird eine FDR von 5% festgesetzt. Die Zahlen differenziell exprimierter Gene sind in Venn-Diagrammen dargestellt (siehe Abb.3.27).

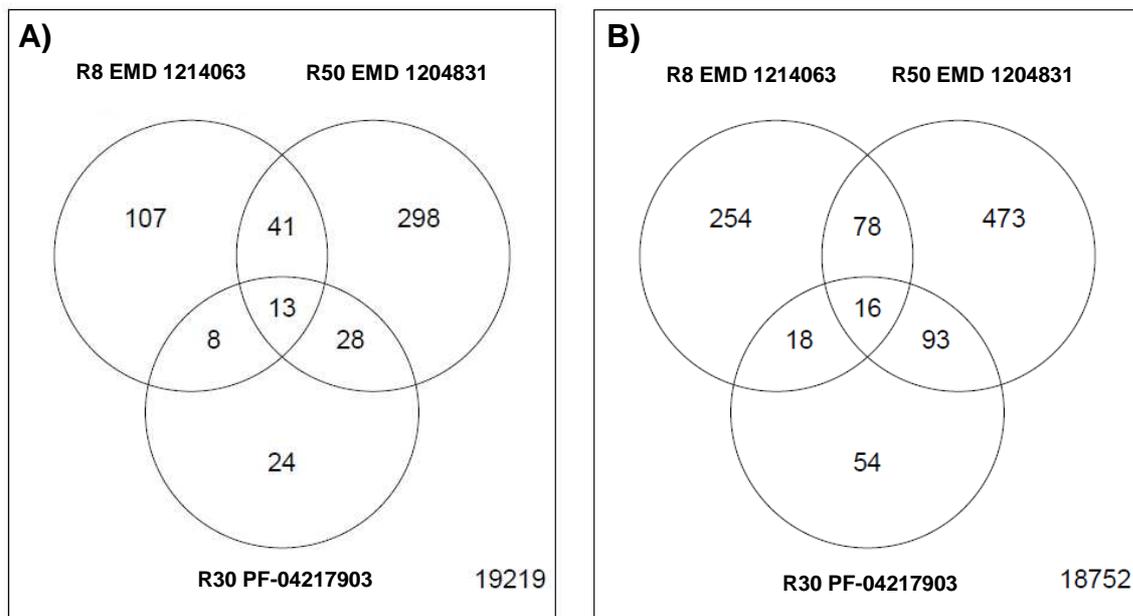


Abb. 3.27: Schnittmenge der differenziell exprimierten Gene in den resistenten Zellen.

A) Runterregulierte Gene in den resistenten Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063, R50 EMD 1214831 und PF-04217903 und

B) Hochregulierte Gene in den resistenten Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063, R50 EMD 1214831 und PF-04217903.

Insgesamt gab es bei diesen Kriterien 519 Gene, die in einer der drei c-Met-Inhibitor-resistenten Zelllinien herunterreguliert wurden. Demgegenüber standen insgesamt 986 Gene die durch ihre Hochregulation aufielen. Nur 13 bzw. 16 Gene waren

konsistent herunter bzw. heraufreguliert in Zellen, die unter Behandlung mit den drei Inhibitoren passagiert worden sind (siehe Tab.3.6).

Tab.3.6. Gene die in resistenten Zellen konsistent hoch- bzw. herunterreguliert wurden.

Runterregulierte Gene in allen resistenten Zelllinien	Hochregulierte Gene in allen resistenten Zelllinien
GAF1 (100131227)	LOC728449 (728449)
B3GALT5 (10317)	MMP1 (4312)
EPB41L5 (57669)	HCP5 (10866)
LOC283624 (283624)	KIF20A (10112)
FCGBP (8857)	LGALS1 (3956)
PSMD9 (5715)	KRT15 (3866)
ARHGAP9 (64333)	CEACAM1 (634)
ROR1 (4919)	SH3TC2 (79628)
UNC5B (219699)	FANCG (2189)
TBX15 (6913)	MMP10 (4319)
GRIN2A (2903)	PMP22 (5376)
CCRL1 (167681)	SLC6A14 (11254)
	PROCR (10544)
	CYP3A5 (1577)
	DEFB1 (1672)
	STARD9 (57519)

Eine Analyse der 519 bzw. 986 differenziell exprimierten Gene wurde mit Hilfe der Gene Ontology (GO) und Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Genannotationen durchgeführt. Nur wenige funktionelle Kategorien waren in durch Resistenz herunterregulierten Genen marginal überrepräsentiert: die Entwicklung des kardiovaskulären Systems, die Fettsäureantwort, die Bildung von Blutvesikeln, die Entwicklung der Niere und der Retinol Metabolismus. Dagegen gab es viele stark überrepräsentierte Genkategorien in den hochregulierten Genen, die sich um die Funktionen Zellzyklus und Interferon-Antwort gruppieren (p-Werte bis zu $10e^{-30}$). Alternativ wurde die differenzielle Expression mit Hilfe der sogenannten Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) und der MSIGD Datenbank von Gensignaturen (Version 3.0) untersucht. Viele Gensignaturen bestätigten die Resultate der GO-Analysen. Herauszuheben ist die tendenzielle Heraufregulation einer onkogenen Signalweg-Signature für das HRAS-Onkogen in den resistenten Zellen MKN-45 R50 EMD 1204831.

Des Weiteren wurde ein Kompendium von 67 publizierten Gensignaturen auf ihre Kohärenz, d.h. eine signifikante signaturinterne Kreuzkorrelation ihrer Gene, überprüft (siehe Abb.3.28). Dabei sind in einer Heatmap die Signaturscores aller Signaturen dargestellt, die eine mittlere interne Korrelation von mindestens $r_{\text{Durchschnitt}} = 0.2$ aufweisen. Dies bestätigte die signifikante Hochregulation der Proliferations- und Interferonantwort-Signaturen in einigen der resistenten Zellpopulationen.

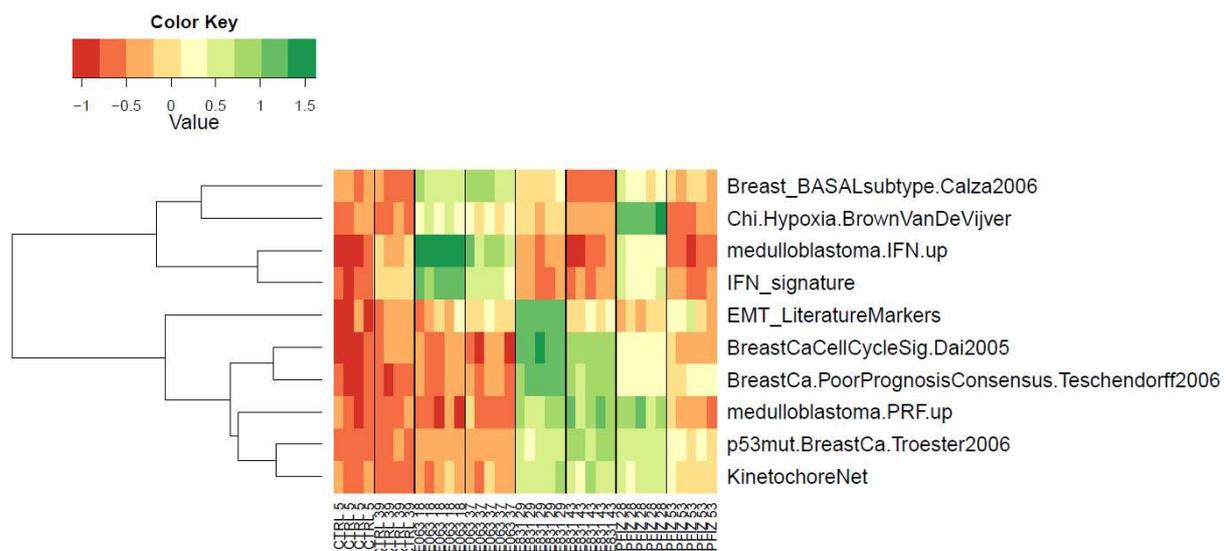


Abb. 3.28. Heatmap von Signaturscores von Gensignaturen mit hoher interner genweiser Kreuzkorrelation in unserem Datensatz.

Die Signaturscores sind durch experimentweise Aufsummierung der Z-normalisierten Expressionsprofile aller Signaturgene ermittelt.

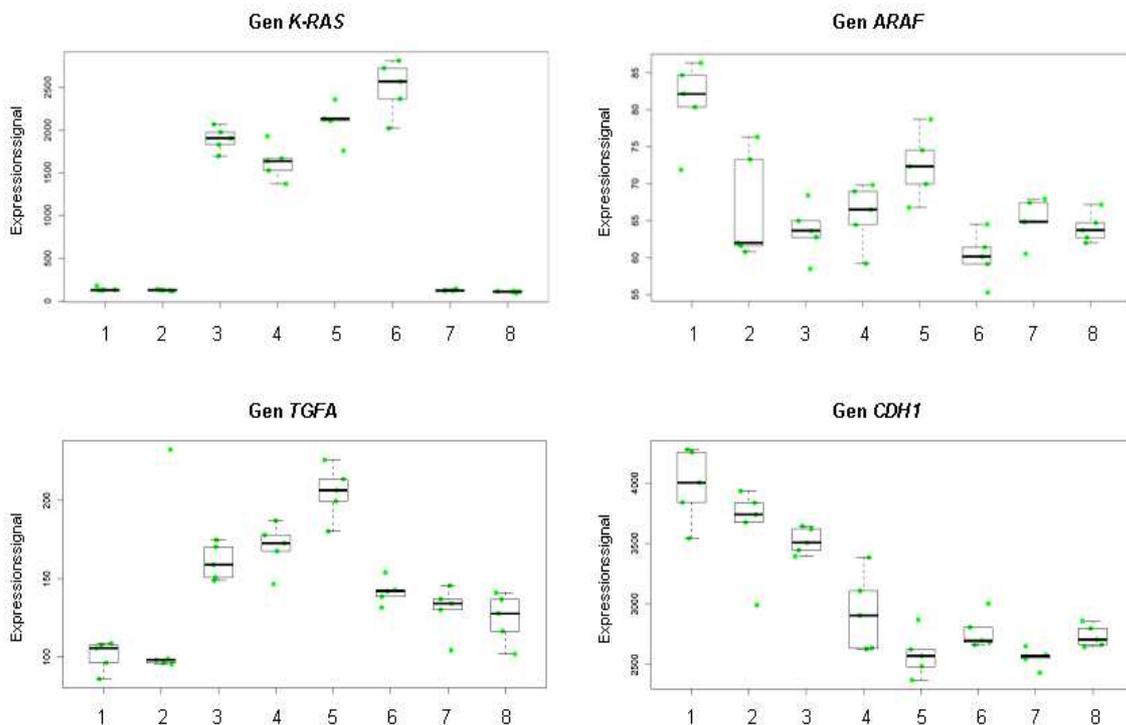
Die Suche nach überrepräsentierten funktionellen Kategorien in den Listen differenziell regulierter Gene wurde komplementiert durch gezielte Evaluationen von einzelnen Kandidatengenen. So wurden differenziell regulierte Gene, die unter anderem im RAS-, EGFR-, PI3K-, IGF-, IKKe/TBK1-, Notch- oder Wnt-Signalweg eine Rolle spielen und dabei häufig mit Krebserkrankungen assoziiert sind, gefunden. Es konnten des Weiteren auch Gene identifiziert werden, die wichtige Funktionen bei der EMT oder bei der Proliferation ausüben. Die Expressionsstärken dieser Gene wurden einzeln analysiert und verglichen. Visualisiert wurde diese Auswertung mit Hilfe von „Box-Whisker-Plots“, die das Expressionssignal darstellen. Der Expressionssignalsbereich, der sich innerhalb der Box befindet, stellt die mittlere Expression der Proben dar, wobei der horizontale Balken den Median widerspiegelt. Nach oben und unten werden durch die beiden „Whisker“ die Extremwerte der fünf Proben dargestellt. Exemplarisch dargestellt wurden einzelne Gene, die eine signifikante Abweichung in ihrem Genexpressionslevel aufwiesen.

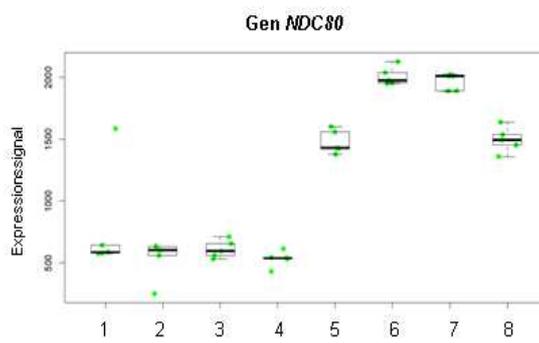
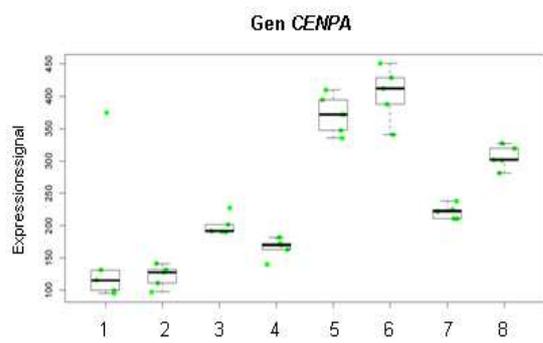
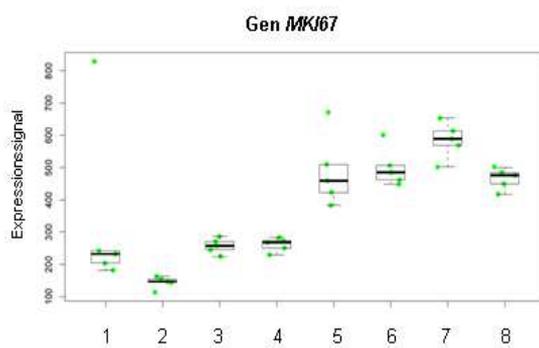
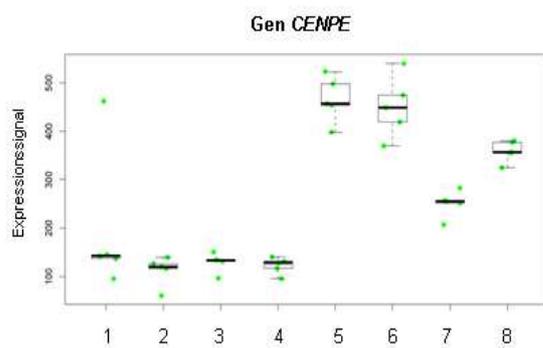
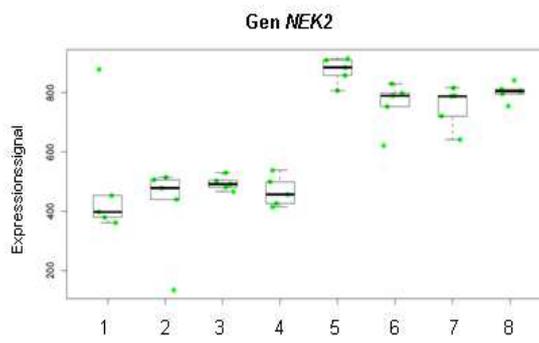
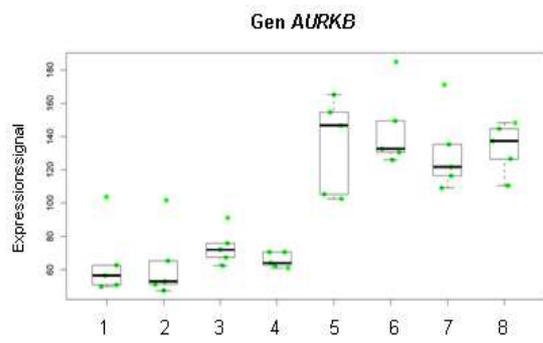
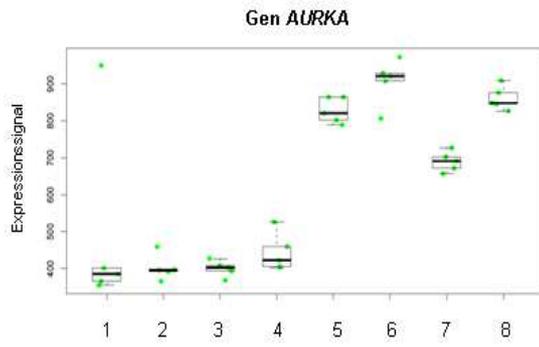
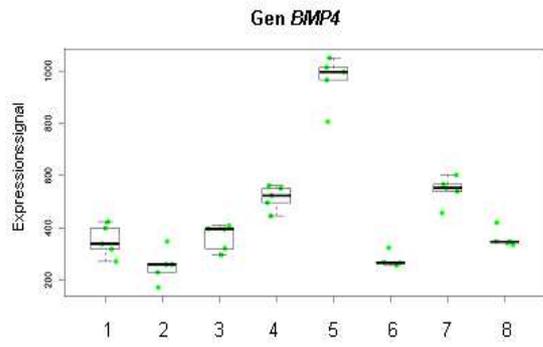
Eine stark veränderte Expressionsmuster konnte im KRAS-Gen beobachtet werden. War das basale Level von KRAS in beiden Passagen der parentale Zelllinie MKN-45 sehr gering, zeigte sich ein besonders auffällig erhöhtes KRAS-Level in den resistenten Linien, die mit den firmeneigenen Substanzen EMD 1214063 und EMD 1204831 behandelt wurden. Die Expressionsänderung konnte sowohl in den frühen als auch in den späten Passagen beobachtet werden. Die Zelllinien, die mit der Substanz PF-04217903 behandelt wurden, wiesen dagegen ein nahezu identisches Expressionmuster wie die unbehandelten Kontrollen auf. Ein ähnliches Bild zeigte sich in den Expression des IGF-1R. Auch hier zeigten die Zelllinien, die mit den Inhibitoren EMD 1214063 und EMD 1204831 behandelt wurden eine Expressionssteigerung. Allerdings konnte dieser Effekt nur in der jeweiligen späten Passage der Zellen beobachtet werden. Eine weitere wichtige Komponente des onkogenen Signaltransduktionssystem, das TGF α -Gen, ist in allen resistenten Zelllinien gegenüber den sensitiven Zellen hochreguliert. Diese Beobachtungen liefern konkrete Ansatzpunkte für weitere Studien, die den Mechanismus der Resistenzentwicklung adressieren.

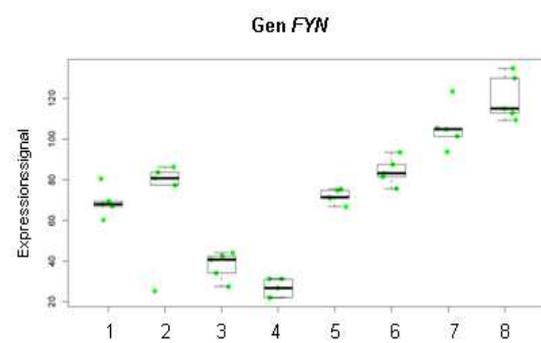
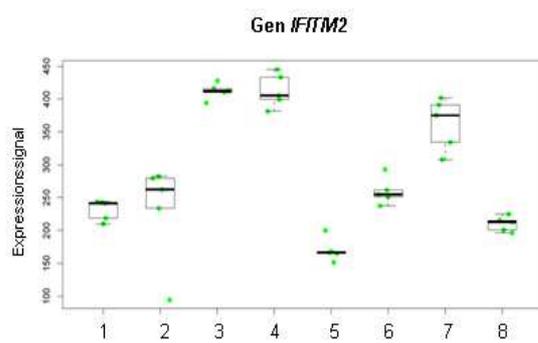
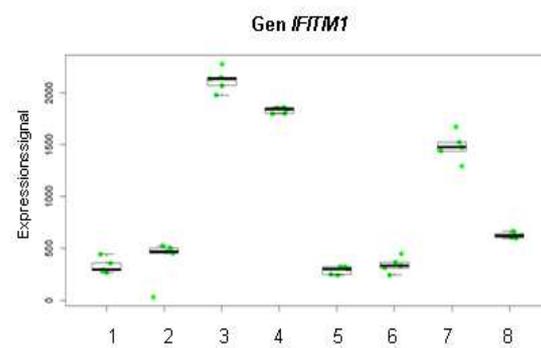
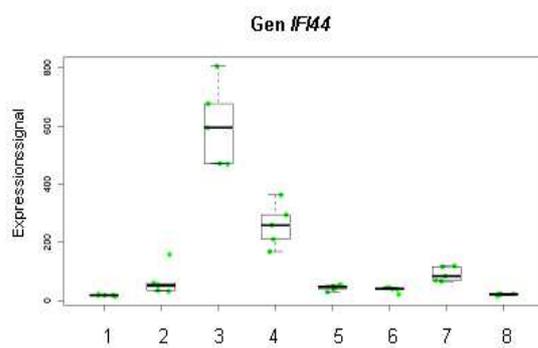
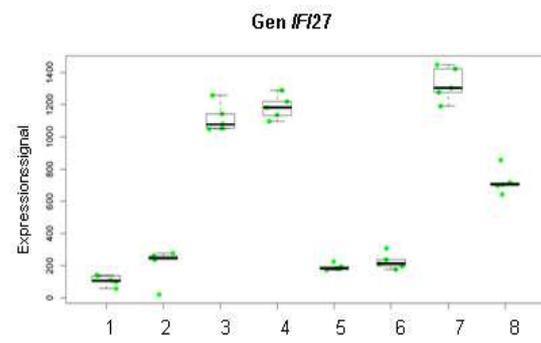
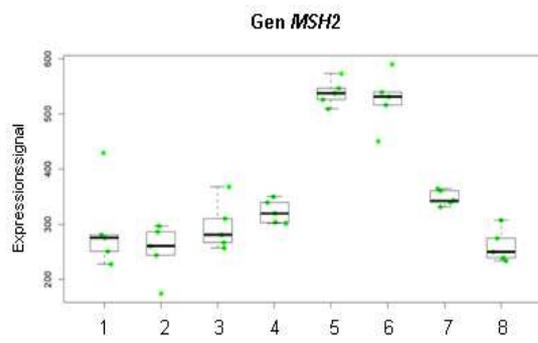
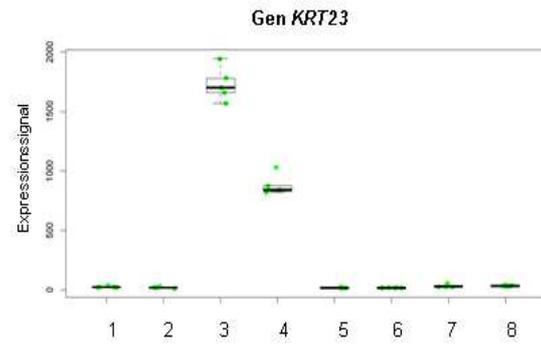
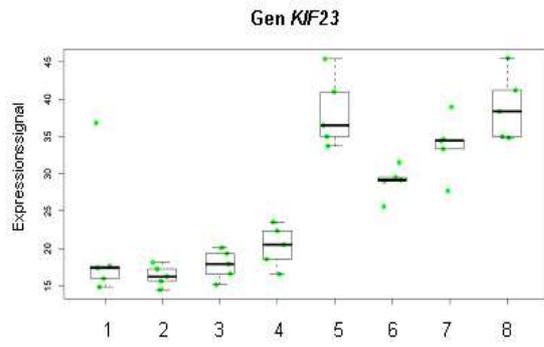
Während der Behandlung mit den c-Met-Inhibitoren kam es häufig zu Änderungen in der Expression von Zellzyklus-regulierenden Genen. Auffällig war dabei, dass die Zelllinien, welche mit den Substanzen EMD 1204831 und PF-04217903 behandelt wurden, besonders häufig eine verstärkte Expression von Genen aufwiesen, die für das Zellwachstum und dem Voranschreiten der Mitose wichtig sind. Beispielsweise zeigten sie eine vermehrte Expression der Aurorakinasen (Gen AURKA und AURKB), den Zentrosomen-assoziierten Genen CENP-E und CENP-A, der Serin/Threonin Kinase Nek2, dem Kinetochor-assoziierten Gen NDC80 und dem Kinesin Gen KIF23. Dies korreliert mit der zuvor gemachten Beobachtung, dass sich die beiden Zelllinien MKN 45 R50 EMD 1204831 und MKN-45 R30 PF-04217903, verglichen mit der parentalen und den MKN-45 R8 EMD 1214063-Zellen, sich deutlich schneller teilen (Daten nicht gezeigt).

Die Zellen, die durch Anwesenheit der Substanz EMD 1214063 eine c-Met-Inhibitorresistenz entwickelt haben, zeigten außerdem eine deutlich gesteigerte Expression des PIK3R1-Gens. Eine Hochregulation dieses Gens, welches die regulatorische Untereinheit p85 α der PI3K ist, konnte in keiner anderen Zelllinie nachgewiesen werden. Weitere Gene, welche in diesen Zellen differenziell exprimiert waren, ließen sich den Interferon-induzierten Genen zuordnen. Weitere differenziell exprimierte Gene kodierten für die Kollagenasen MMP-1 und MMP-10. Verglichen mit den beiden parentalen Kontrollzelllinien zeigten alle resistenten Subzelllinien eine vermehrte Expression des Gens. Am stärksten konnte dieser Effekt in der Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 beobachtet werden, wo eine mehr als 100-fach verstärkte

Expression detektiert werden konnte. Die beiden anderen Zelllinien zeigten eine bis zu 10-fache verstärkte Genexpression. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Expressionsanalyse von sogenannten ABC-Transportern. Hierbei handelt es sich um Transmembranproteine, welche spezifische Substrate unter Energieeinsatz aus der Zelle herauspumpen können. In vielen Tumoren konnte die vermehrte Expression dieser Proteine gezeigt werden, was häufig mit einer verringerten Sensitivität gegenüber Krebsmedikamenten korreliert. Eine erhöhte Expression der verschiedenen Transporter konnte jedoch in keiner resistenten Zelle detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnten wir eine stark erhöhte Expression eines Cytochrome P450 Oxidase-kodierenden Gens feststellen: CYP3A5 war in allen resistenten Zellen um mindestens 1,5-fach bis maximal etwa 5-fach hochreguliert.







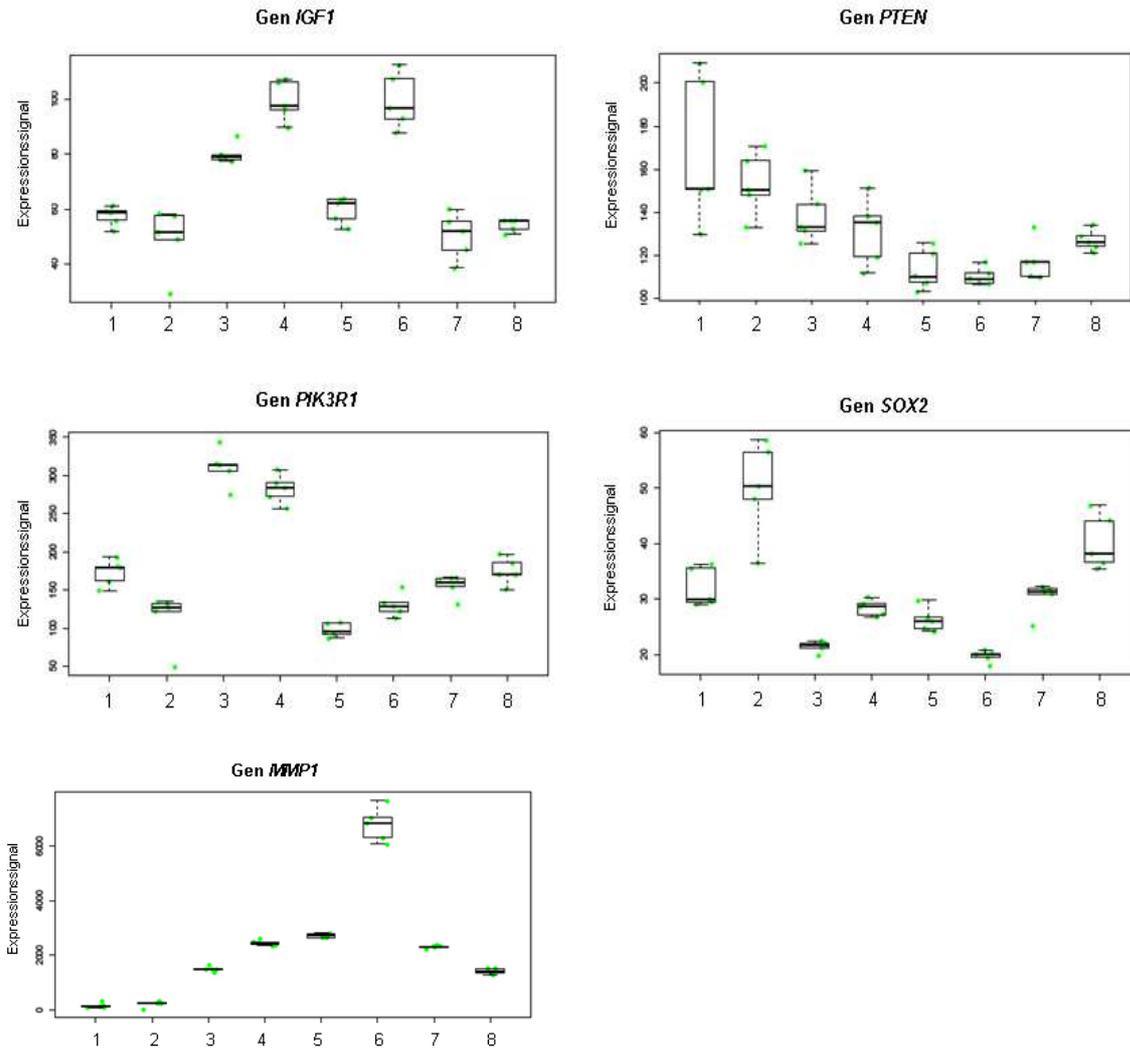


Abb. 3.29: Expressionsanalyse von ausgewählten Genen die in den parentalen und resistenten differenziell exprimiert sind.

Parentale und resistente MKN-45-Zellen wurden auf ihr Expressionslevel von ausgewählten Genen analysiert und mittels eines Box-Whisker-Plots graphisch dargestellt. Fünffachbestimmungen sind durch jeweils fünf gleichfarbende Punkte dargestellt. 1: MKN-45 (frühe Passage). 2: MKN-45 (späte Passage). 3: MKN-45 R8 EMD 1214063 (frühe Passage). 4: MKN-45 R8 EMD 1214063 (späte Passage). 5: MKN-45 R50 EMD 1204831 (frühe Passage). 6: MKN-45 R50 EMD 1204831 (späte Passage). 7: MKN-45 R30 PF-04217903 (frühe Passage). 8: MKN-45 R30 PF-04217903 (späte Passage).

3.2.11 Analyse genetischer Aberrationen mittels der vergleichenden genomischen Hybridisierung

Mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung wurden vergleichende Chromosomenanalysen der parentalen und resistenten Zellen durchgeführt. Dabei ist es möglich vorhandenen Amplifikationen und Deletionen genomweit zu detektieren. Durch die Analyse versprach man sich Genabberationen zu finden, die möglicherweise mit einer c-Met-Inhibitorresistenz in Einklang zu bringen sind. Dafür wurden humane Genchips der Firma Agilent Technologies eingesetzt. In diesem Versuch wurden von den parentalen und den resistenten Zellen jeweils eine frühe und eine späte Passage analysiert. Dadurch sollten mögliche Veränderungen des Genoms, welche erst im Laufe der Kultivierungszeit erworben wurden, identifiziert werden. Hierfür wurde zunächst die DNA der Zellen isoliert. Die Analyse der DNA erfolgte in Kooperation mit der Firma Agilent und der Abteilung „Bioinformatics“ der Firma Merck KGaA, mit deren Hilfe die Auswertung der Proben erfolgte.

Tab.3.7: Verwendete Zelllinien für die vergleichende genomische Hybridisierung.

Abkürzungen in der Zelllinienbeschriftung: R steht für resistent und die Zahl für die Höchtdosis der Inhibitoren in μM .

Zelllinie	Passagezahl	Inhibitor	[μM]
MKN-45 (frühe Passage)	5	-	-
MKN-45 (späte Passage)	39	-	-
MKN-45 R2,5 EMD 1214063 (frühe Passage)	18	EMD 1214063	2,5
MKN-45 R8 EMD 1214063 (späte Passage)	37	EMD 1214063	8
MKN-45 R7,5 EMD 1204831 (frühe Passage)	25	EMD 1204831	7,5
MKN-45 R50 EMD 1204831 (späte Passage)	43	EMD 1204831	50
MKN-45 R4 PF-04217903 (frühe Passage)	24	PF-04217903	4
MKN-45 R30 PF-04217903 (späte Passage)	53	PF-04217903	30

Die Auswertung der Daten ergab, dass in allen Proben zusammen eine Amplifikation in insgesamt 195 Genen vorlag. Die Anzahl der Amplifikationen in den verschiedenen Zelllinien war dabei vergleichbar. Die Zelllinien, welche mit den Substanzen EMD 1214063 und EMD 1204831 behandelt wurden, zeigten dabei eine Amplifikation des IGF-1R, wodurch eine Korrelation zu den in 3.3.10 beschriebenen Genexpressionsprofilen besteht. Des Weiteren konnte in mehreren Proben die Amplifikation der Gene NEK3, ETV1 und SLIT2 gezeigt werden. Die in 3.3.10 beschriebene starke Expression von KRAS, in den Zelllinien, die mit den Substanzen EMD 1214063 und 1204831 behandelt wurden, kann verschiedene

Ursachen haben. Die Möglichkeit einer Amplifikation des KRAS-Gens konnte durch diesen Versuch jedoch bereits ausgeschlossen werden.

Des Weiteren konnten insgesamt in allen Proben 174 Gene detektiert werden, die eine Deletion aufwiesen. Die Anzahl der Deletionen in den verschiedenen Zelllinien war auch hierbei ähnlich. Unter diesen Genen waren unter anderem die für regulatorische RNAs kodierenden Gene MEG3 und MEG5, sowie der Calcitonin Rezeptor und das für ein Zytoskelettprotein kodierende Gen EVL.

Eine Korrelation zwischen einer Amplifikation bzw. Deletion und der entsprechenden Genexpression war jedoch nicht in jedem Fall gegeben.

3.2.12 Verifizierung der Ergebnisse aus den Genexpressionsstudien

Die zuvor mittels der Genexpression-Studien detektierten Änderungen der Expression einiger Gene sollten anschließend mit Hilfe einer Western Blot Analyse überprüft werden. Dafür wurden von den parentalen und resistenten Zellen Lysate hergestellt und auf die Expression von KRAS und IGF-1R untersucht. Es wurde dabei sowohl eine mittlere als auch eine niedrige Passage der resistenten Zelllinien berücksichtigt. Die Analyse von resistenten Zellen, die drei Monate ohne Inhibitor kultiviert wurden, diente dabei als Kontrolle für eine dauerhafte Änderung im Expressionsprofil.

Deutlich erkennbar in der Westernblotanalyse zeigte sich die verstärkte Expression von KRAS in den beiden resistenten Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 (siehe Abb. 3.30). Die Proteinexpression war in der Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 jedoch deutlich stärker ausgeprägt und bestätigte somit die Ergebnisse der vorangegangenen Genexpressionsstudie. Die früheren Passagen der beiden resistenten Linien (MKN-45 R2,5 EMD 1214063 und MKN-45 R7,5 EMD 1204831) zeigten ebenfalls eine deutliche KRAS-Expression. Vergleichend zu diesen Ergebnissen konnte in der parentalen Zelllinie MKN-45, genau wie der in der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 keine Überexpression von KRAS detektiert werden. Somit konnte auch hier das Ergebnis der Genexpressionsstudie bestätigt werden.

Interessanterweise zeigte die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 eine deutlich geringere Expression von KRAS nach einer dreimonatigen Inkubation ohne den Selektionsdruck des Inhibitors. Zwar konnte noch eine KRAS-Expression detektiert werden, jedoch waren die Banden deutlich schwächer ausgeprägt. In der Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 konnte

eine Reduktion der KRAS-Expression nach der Inhibitorfreien Zeit dagegen nicht beobachtet werden.

Das Expressionsprofil der Affymetrixstudie für den IGF-1R konnte auf Proteinebene ebenfalls bestätigt werden (siehe Abb. 3.30). Die späten Passagen der beiden Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 zeigten, verglichen mit der parentalen Zelllinie MKN-45 eine ebenfalls deutlich gesteigerte Expression, die jedoch nach drei Monaten Kultivierung ohne die jeweilige Substanz wieder auf das basale Niveau der parentale Zelle zurückging. Die beiden frühen Passagen der resistenten Zellen zeigten dagegen noch keine gesteigerte Expression des IGF-1R. In der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 konnte, konform mit der Genexpressionsstudie, keine Expression des IGF-1R nachgewiesen werden.

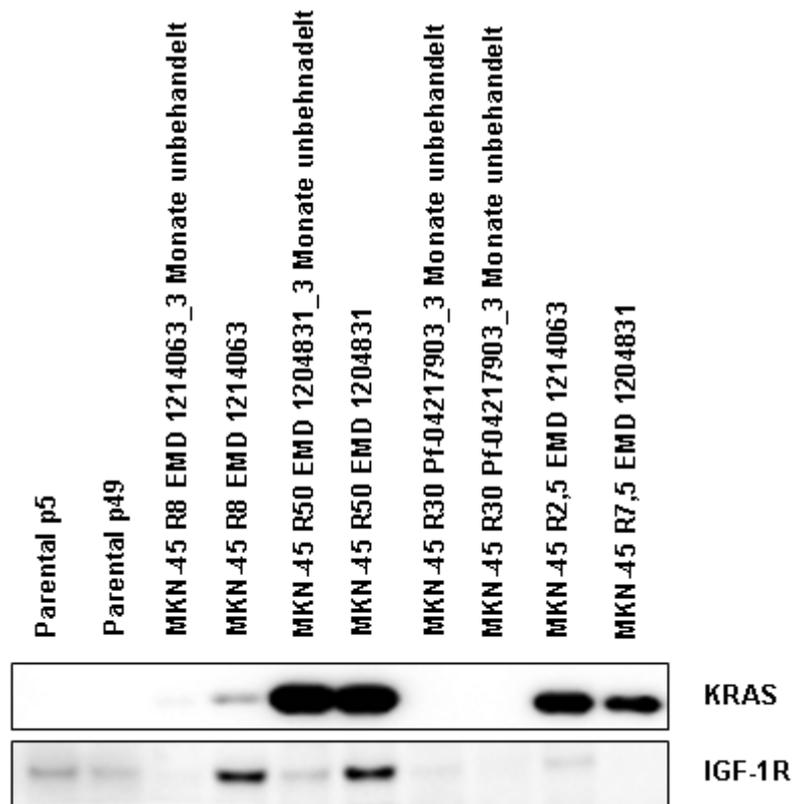


Abb. 3.30: Expression von KRAS und IGF-1R in parentalen und resistenten MKN-45-Zellen. In serumfreiem Medium inkubierte parentale und resistente MKN-45 Zellen wurden mit HGNT-Lysepuffer lysiert und im Western Blot auf die Expression von KRAS und IGF-1R analysiert.

3.2.13 Sequenzierung des KRAS-Gens

Nach dem die durch die Genexpressionsanalysen detektierte Hochregulation von KRAS in den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 biochemisch mittels Western Blot Analyse bestätigt werden konnte, erfolgte eine Sequenzierung von Codon 12 und 13 des KRAS-Gens. Da onkogene Punktmutationen mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90 % in einer dieser beiden Codons auftreten, wurden nur diese bei der Sequenzierung berücksichtigt. In den Zelllinien konnten, verglichen mit der Referenzsequenz, keine Mutationen detektiert werden. Die zur Kontrolle sequenzierten Zelllinien MKN-45 und MKN-45 R30 PF-04217903, bei denen keine vermehrte Expression von KRAS vorhanden war, wiesen ebenfalls keine Mutationen auf.

3.3 Neue Therapieansätze

3.3.1 Spezifische Blockierung einzelner Signaltransduktionskaskaden

Basierend auf den oben gezeigten molekularen Änderungen der resistenten Zellen, sollten im nächsten Teil der Arbeit sinnvolle Behandlungsstrategie entwickelt werden, mit deren Hilfe das Wachstum und die Proliferation der Zellen verhindert oder verzögert werden kann. Dafür wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die zunächst einzeln und dann in Kombination auf ihren anti-proliferativen Effekt hin untersucht wurden. Um die Auswirkungen der verwendeten Inhibitoren auf das Wachstum der parentalen und resistenten Zelllinien untersuchen zu können, wurde jede Zelllinie in 96-Kaviatätenplatten ausgesät und nach 24 h mit absteigenden Konzentrationen der eingesetzten Substanzen für 72 h behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit Alamar Blue versetzt und ihre Absorption nach 18 h an einem Plattenlesegerät bestimmt. Das relative Wachstum der Zellen wurde durch den Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle bestimmt und mit Hilfe der Software GraphPad Prism graphisch dargestellt.

3.3.1.1 Blockierung des IGF-1R-Signalweges durch IGF-1R-Inhibitoren

Nach Analyse der vorherigen Experimente, in denen in den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 mittels Gen- und Proteinexpressionsstudien eine vermehrte Expression des IGF-1R nachgewiesen werden konnte, schien es zunächst sinnvoll den IGF-1R-Signalweg durch spezifische IGF-1R-Inhibitoren zu blockieren. Zum Einsatz kam dabei ein IGF-1R-Inhibitor

(MSC 1874416-A) der Firma Merck, welcher sich durch eine gute Selektivität auszeichnete. Als Kontrolle diente sowohl die parentale Zelllinie MKN-45 als auch die Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903, die beide keine gesteigerte Expression des Rezeptors zeigten.

Die Wachstumskurven der mit dem IGF-1R-Inhibitor behandelten Zellen (siehe Abb. 3.31 A) boten ein relativ einheitliches Bild. Alle Zelllinien tolerierten den Inhibitor bis zu einer Konzentration von 2,5 μM , ohne eine Wachstumsinhibierung zu zeigen. Die Behandlung mit 10 μM des Inhibitors führte zwar zu einer Reduktion im Wachstumsverhalten der Zellen, der in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 mit 50 % am deutlichsten ausfiel, jedoch zeigten die anderen Zelllinien nur eine marginale Änderung im Proliferationsverhalten, wobei eine Wachstumsinhibition von mehr als 30 % nicht überschritten werden konnte. Eine Korrelation zwischen den Expressionsstatus des Rezeptors und der Sensitivität gegenüber dem IGF-1R-Inhibitor konnte demnach nicht beobachtet werden.

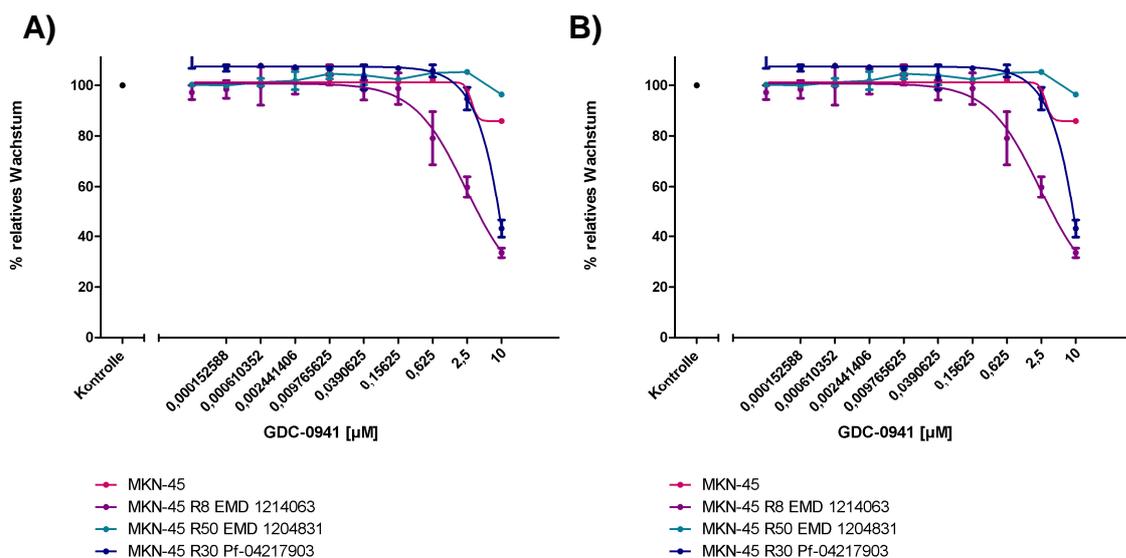


Abb. 3.31: Ansprechen der parentalen und resistenten Zellen auf die Behandlung mit einem IGF-1R- bzw. mit einem PI3K-Inhibitor.

Parentale und resistente Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und mit IGF-1R- bzw. PI3K-Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

3.3.1.2 Blockierung des PI3K/AKT-Signalweges durch PI3K-Inhibitoren

Aufgrund der engen Verknüpfung des c-Met-Signalweges mit dem PI3K/AKT-Signalweg und der Tatsache dass zwei der resistenten Zelllinie eine sehr starke Expression von KRAS aufwiesen, was wiederum häufig zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweg führt, sollte eben dieser mit einem Inhibitor blockiert werden. Verwendet wurde hierfür der niedermolekulare PI3K-Inhibitor GDC-0941 der Firma Genentech.

Wie in Abb.3.31 B) dargestellt bewirkte die Behandlung der parentalen Zelllinie MKN-45 eine *in vitro* Wachstumsinhibierung erst bei Konzentrationen, die höher als 2,5 μM waren. Die Zellen zeigten sich in diesem Experiment mit einem EC₅₀-Wert von 2,9 μM und einer maximalen Wachstumsinhibierung mit gerade einmal 15 % als nicht sehr sensitiv gegenüber dem Inhibitor. Konnte bei der Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 ebenfalls keine signifikante Hemmung der Proliferation beobachtet werden, zeigten die Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R30 PF-04217903 nach der Behandlung mit höheren Konzentrationen der Substanz ein leichtes Ansprechen auf den Inhibitor. Die EC₅₀-Werte lagen mit 2,3 bzw. 10 μM zwar ebenfalls sehr hoch, jedoch zeigten beide Zelllinien ein deutlicheres Ansprechen nach der Behandlung mit hohen Konzentrationen der Substanz, wodurch eine 60 % Wachstumsinhibierung erreicht werden konnte.

3.3.1.3 Blockierung des MAPK-Signalweges durch Mek-Inhibitoren

Ein Einsatz eines Mek-Inhibitors schien aufgrund folgender Tatsachen ratsam: zum einen das stark erhöhte Expressionslevel von KRAS in den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 und zum anderen die dauerhafte Aktivierung von Erk1/2 in allen resistenten Zellen, die sich mit Hilfe der c-Met-Inhibitoren nicht mehr vollständig inhibieren lassen konnte. Für die Inhibition dieses Signalweges wurde ein firmeneigener Mek-Inhibitor (MSC 1936369-B) eingesetzt, welcher sich durch eine hohe Selektivität und Spezifität auszeichnet. Auch dieser Inhibitor wird derzeit im Rahmen von klinischen Studien auf sein Wirkungsprofil getestet.

Die Wachstumskurven dieses Experiments zeigten ein recht einheitliches Bild. Wie in Abb. 3.32 dargestellt zeigte die parentale Zelllinie nach Behandlung mit der Substanz eine lediglich geringe Wachstumsinhibierung. Der Einsatz der maximalen Konzentration führte zu einer nahezu vollständigen Wachstumsinhibierung, der EC₅₀-Wert lag mit 7,2 μM in einem jedoch hoch zu bewertendem Bereich. Auf der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 zeigte sich die Substanz ähnlich ineffektiv, auch hier konnte eine 90 %ige Wachstumsinhibierung

erst bei einer Konzentration von 3,4 μM beobachtet werden. Die Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 zeigte sich sogar vollständig resistent gegenüber dem Mek-Inhibitor. Ein wachstumsinhibierender Effekt konnte hier nicht beobachtet werden. Ein ebenfalls nur moderates Ansprechen auf die Substanz konnte in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 gezeigt werden, hier wurde ein EC_{50} -Wert von 3,7 μM und eine lediglich 50 %-ige Wachstumsinhibierung beobachtet.

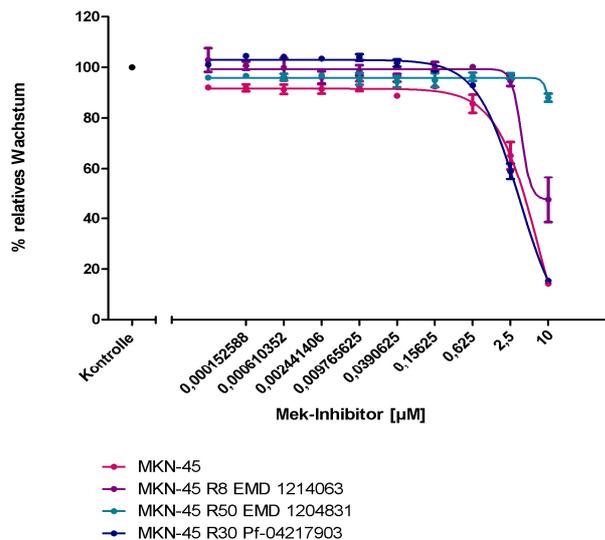


Abb. 3.32: Ansprechen der parentalen und resistenten Zellen auf die Behandlung mit einem Mek-Inhibitor.

Parentale und resistente Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und mit einem Mek-Inhibitor in Konzentrationen von 0,0001-10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

3.3.1.4 Blockierung des EGFR-Signalweges durch EGFR- und ErbB2-Inhibitoren

Da die kompensatorische Aktivierung des c-Met-Signalweges, mit einer einhergehenden vermehrten Expression des c-Met-Rezeptors, ein häufig beobachteter Resistenzmechanismus bei der Behandlung von EGFR-abhängigen Tumoren mittels Antikörper oder EGFR-Inhibitoren ist, wäre ein umgekehrtes Ereignis ebenfalls denkbar. Für die Blockierung des EGFR-Signalweges wurden zum einen der niedermolekulare EGFR-Inhibitor Iressa, zum anderen der duale ErbB2/EGFR-Inhibitor Lapatinib eingesetzt. Bei Iressa konnten in EGFR-abhängigen Tumorzellen IC_{50} -Werte von bis zu 0,033 μM (Wakeling *et al.*, 2002) und bei Lapatinib in ErbB2-abhängigen Tumorzellen IC_{50} -Werte von bis zu 0,01 μM detektiert werden (Kondo *et al.*, 2010).

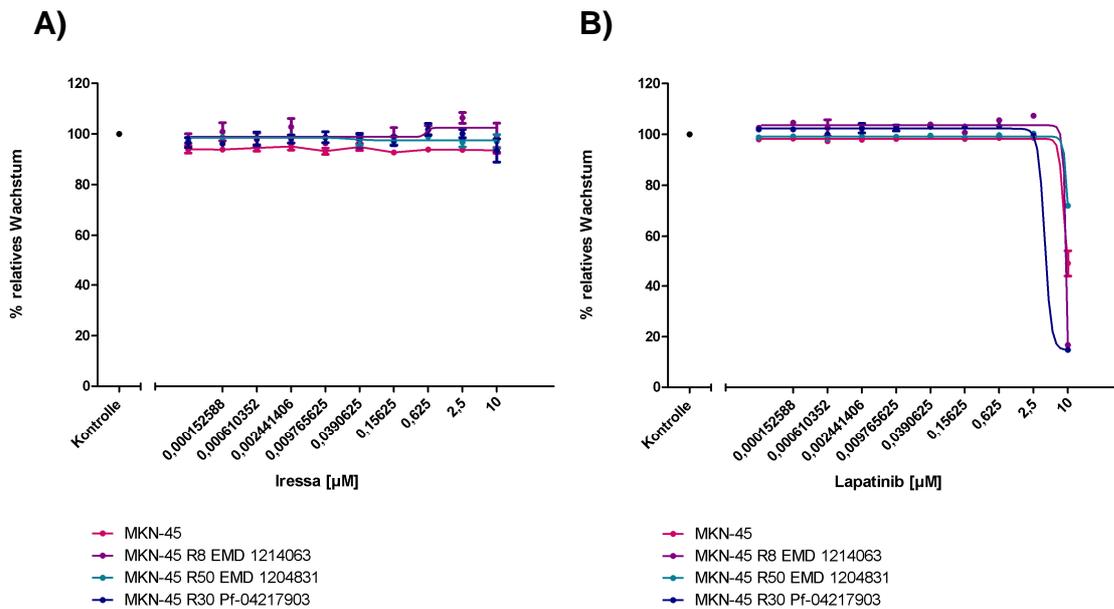


Abb. 3.33: Ansprechen der parentalen und resistenten Zellen auf die Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Iressa bzw. mit dem EGFR/ErbB2-Inhibitor Lapatinib.

Parentale und resistente Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und mit dem EGFR-Inhibitor Iressa bzw. mit dem EGFR/ErbB2-Inhibitor Lapatinib in Konzentrationen von 0,0001-10 µM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

Unter der Behandlung mit dem niedermolekularen EGFR-Inhibitor Iressa zeigten alle Zellen ein uneingeschränktes Wachstum bei den eingesetzten Konzentrationen (siehe Abb. 3.33 A). Ein inhibierender Effekt konnte auf keiner der Zelllinien beobachtet werden. Nach der Behandlung mit dem ErbB2/EGFR-Inhibitor Lapatinib konnte in den Zelllinien MKN-45 R30 PF-04217903 und MKN-45 R8 EMD 1214063 dagegen eine Wachstumsinhibierung von 90 % und EC_{50} -Werte von 12 und 3,9 µM festgestellt werden (siehe Abb. 3.33 B). Verglichen mit der parentalen Zelllinie MKN-45, die eine lediglich 50 %-ige Wachstumsinhibierung und einen EC_{50} -Wert von 8,5 µM aufwies, scheint die Behandlung mit Lapatinib demnach effektiver in der resistenten Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 zu sein. In der Zelllinien MKN-45 R50 EMD 1204831 konnte dagegen nur ein sehr geringer Effekt erzielt werden, der des Weiteren erst bei der maximal eingesetzten Konzentration ersichtlich wurde.

3.3.2 Blockierung alternativer Signaltransduktionskaskaden in Kombination mit c-Met-Inhibitoren

Da die zuvor getesteten Substanzen auf die resistenten Zellen keinen nennenswerten anti-proliferativen Effekt hatten, sollten als nächstes verschiedene Kombinationsexperimente durchgeführt werden. Zunächst wurden die zuvor verwendeten Substanzen mit den einzelnen c-Met-Inhibitoren kombiniert.

Dafür wurde jede Zelllinie in 96-Kaviatätenplatten ausgesät und nach 24 h mit absteigenden Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren für 72 h behandelt. Die Zugabe der kombinierten Inhibitoren erfolgte dabei gleichzeitig. Die Zellen wurden anschließend mit Alamar Blue versetzt und ihre Absorption nach 18 h an einem Plattenlesegerät bestimmt. Das relative Wachstum der Zellen wurde durch den Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle bestimmt und mit Hilfe der Software GraphPad Prism graphisch dargestellt.

3.3.2.1 Blockierung der Signalwege in Kombination mit EMD 1214063

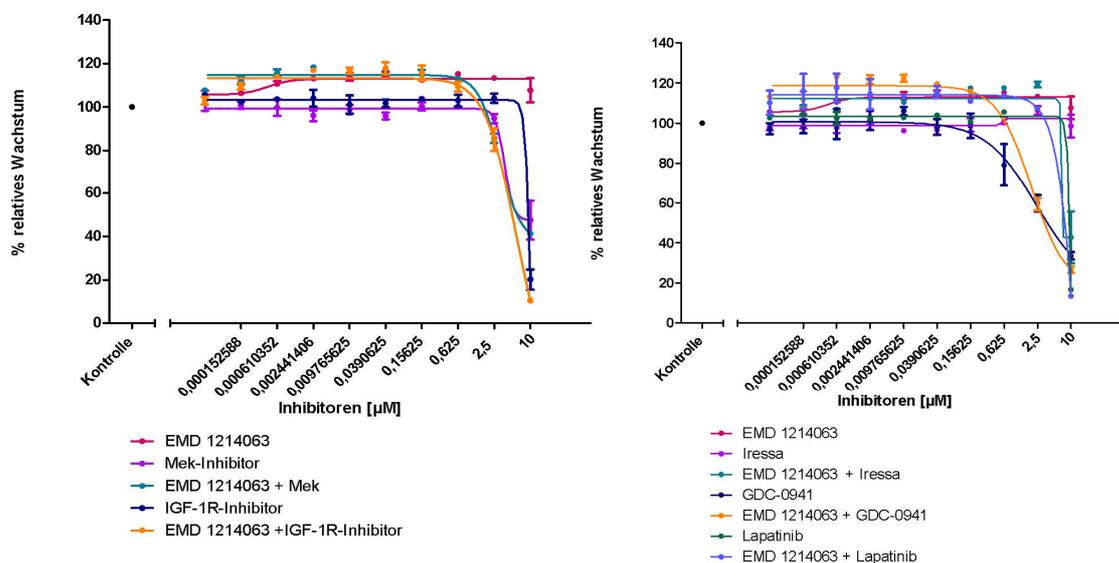


Abb. 3.34: Ansprechen der resistenten Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 auf die kombinatorische Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1214063 und anderen Inhibitoren.

Resistente MKN-45 R8 EMD 1214063-Zellen wurden nach dem Auswaschen des Inhibitors (6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und zeitgleich mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1214063 und anderen Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 µM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

Wie in Abb. 3.34 dargestellt, konnte in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 die duale Inhibition von c-Met und Mek durch den Inhibitor EMD 1214063 und dem Mek-Inhibitor keine vermehrte Wachstumshemmung induzieren. Die gezeigte Wachstumskurve der Kombinationsbehandlung verläuft nahezu identisch, wie die der Einzelbehandlung mit dem Mek-Inhibitor. Nach gleichzeitiger Behandlung mit dem IGF-1R-Inhibitor konnte zwar eine leichte Verschiebung der Wachstumskurve beobachtet werden, jedoch wurde diese erst beim Einsatz von hohen Inhibitorkonzentrationen erreicht. Der bestimmte EC_{50} -Wert betrug dabei $5,6 \mu\text{M}$. Die im nächsten Ansatz geprüfte Kombination des c-Met-Inhibitors mit dem EGFR-Inhibitor Iressa zeigte, dass die alleinige Behandlung mit Iressa oder dem c-Met-Inhibitor noch keinen Effekt auf die Zelllinie hatte, die Kombination der beiden Substanzen aber eine Wachstumsinhibierung von 60 % bewirkte. Aber auch dieser Effekt ließ sich erst bei Konzentrationen im μM -Bereich nachweisen. Die Kombination mit Lapatinib konnte hingegen keine anti-proliferativen Effekte bewirken. Die Kombinationsbehandlung von EMD 1214063 mit GDC-0941 erwies sich ebenfalls als nicht effektiver, als die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor alleine.

3.3.2.2 Blockierung der Signalwege in Kombination mit EMD 1204831

Die resistente Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 zeigte sich in jedem durchgeführtem Kombinationsexperiment als besonders insensitiv. Zeigte sie bereits bei der Anwesenheit von der maximal eingesetzten Konzentration des c-Met-Inhibitors EMD 1204831 eine völlig unbeeinflusstes Wachstumsverhalten, konnte auch die Zugabe der anderen Inhibitoren keinen signifikanten Proliferationsstopp bewirken. Ein additiver Effekt konnte in keiner getesteten Kombination gezeigt werden (siehe Abb. 3.35).

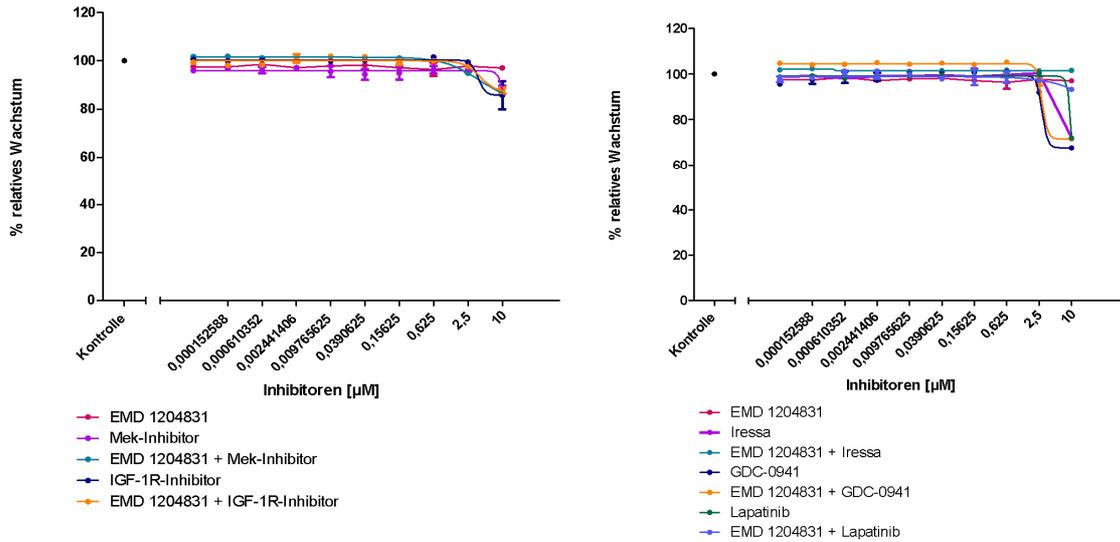


Abb. 3.35: Ansprechen der resistenten Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 auf die kombinatorische Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1204831 und anderen Inhibitoren.

Resistente MKN-45 R50 EMD 1204831-Zellen wurden nach dem Auswaschen des Inhibitors (2 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und zeitgleich mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1204831 und anderen Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 µM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

3.3.2.3 Blockierung der Signalwege in Kombination mit PF-04217903

Nach der Behandlung der resistenten Zelllinien MKN-45 R30 PF-04217903 mit der Inhibitorkombination PF-04217903 und dem Mek-Inhibitor konnte eine Wachstumsinhibierung der Zellen um 65 % beobachtet werden. Diese war, verglichen mit der Einzelbehandlung mit dem Mek-Inhibitor (50 %), zwar nicht deutlich stärker ausgeprägt, jedoch konnte die Verschiebung des EC_{50} -Wertes von 10 auf 6,6 µM gezeigt werden. Bei allen weiteren Kombinationen konnte jedoch kein additiver Effekt mehr beobachtet werden (siehe Abb. 3.36).

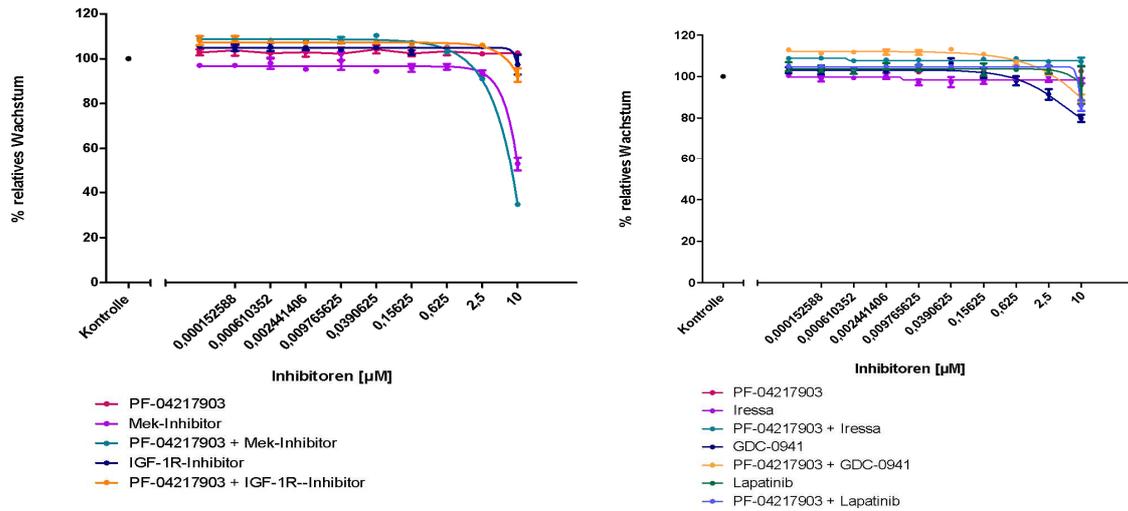


Abb. 3.36: Ansprechen der resistenten Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 auf die kombinatorische Behandlung mit dem c-Met-Inhibitor PF-04217903 und anderen Inhibitoren.

Resistente MKN-45 30 PF-04217903-Zellen wurden nach dem Auswaschen des Inhibitors (2 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und zeitgleich mit dem c-Met-Inhibitor EMD 1214063 und anderen Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 µM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

3.3.3 Blockierung verschiedener alternativer Signaltransduktionskaskaden

Nach der bereits erfolgter Kombination von den c-Met-Inhibitoren mit Inhibitoren von anderen Zielproteinen, sollte im nächsten Schritt eine Kombinationsstrategie etabliert werden, bei denen verschiedene Signaltransduktionswege inhibiert wurden. Da die Genexpressionsdaten bereits auf eine wichtige Rolle des PI3K- und MAPK-Signalweges schließen ließen, wurde zunächst der kombinatorische Einsatz des Mek und PI3K-Inhibitors erprobt. Dabei zeigte sich, dass alle vier Zelllinien ähnlich gut auf die Behandlung reagierten, was sich in einem deutlichen Proliferationsverlust äußerte. Am sensitivsten waren dabei die parentalen und MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen. Die zeigten eine mehr als 90 %-ige Wachstumsinhibierung bei EC_{50} -Werten von 0,49 und 0,45 μM . Die Zelllinien MKN-45 R50 EMD 1204831 und MKN-45 R8 EMD 1214063 zeigten eine 70-80 %-ige Wachstumsinhibierung bei EC_{50} -Werten von 0,52 und 1,9 μM und waren damit weniger sensitiv.

Alle anderen getesteten Kombinationen zeigten dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen (Daten nicht gezeigt).

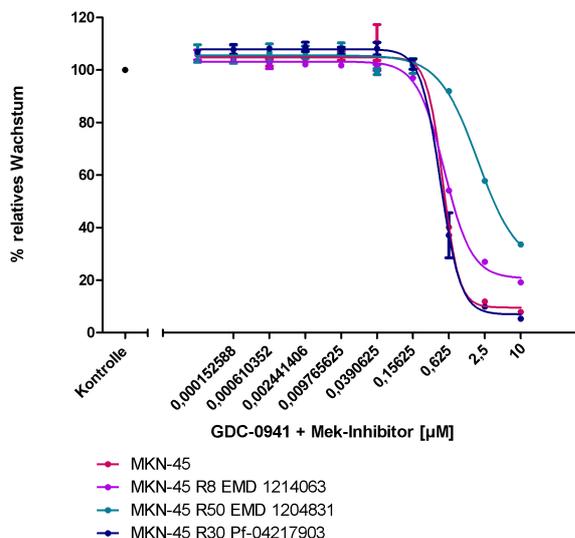


Abb. 3.37: Ansprechen der parentalen und resistenten Zelllinien auf die kombinatorische Behandlung mit einem PI3K- und einem Mek-Inhibitor.

Parentale und resistente Zellen wurden nach dem Auswaschen des Inhibitoren (2-6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und zeitgleich mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 und einem Mek-Inhibitor in Konzentrationen von 0,0001-10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

3.3.4 Kombinierte Behandlung mit c-Met-Inhibitoren und Zytostatika

Nach bei der Behandlung mit den vorher eingesetzten Inhibitoren keine signifikanten Ergebnisse bezüglich einer Wachstumsinhibierungen der resistenten Zelllinien erzielt werden konnten, sollten diese anschließend mit Zytostatika kombiniert werden, um durch additive oder synergistische Effekte möglicherweise ein besseres Resultat erzielen zu können. Zum Einsatz kamen dabei das platinbasierende Chemotherapeutikum Cisplatin und das Fluoropyrimidin 5-Fluorouracil (5-FU). Beide Präparate werden standardmäßig bei der Therapie des Magenkarzinoms eingesetzt und wurden deshalb für die folgenden Kombinationsstudien ausgewählt.

Bei der Behandlung mit Cisplatin als Einzelsubstanz konnte sowohl auf den parentalen als auch auf den drei resistenten Zellen ein lediglich moderates Ansprechen beobachtet werden (siehe Abb. 3.38 A, 3.39 A, 3.40 A und 3.41 A). Die Zellen zeigten zwar einen antiproliferativen Effekt und eine maximale Wachstumsinhibierung zwischen 60 und 100 %, allerdings mussten dafür Konzentrationen von 2,5 μM überschritten werden. Die EC_{50} -Werte waren daher mit Konzentrationen zwischen 2,6 und 4,6 μM entsprechend hoch. Konnten nach der Behandlung mit den Zytostatika bzw. mit den einzelnen Inhibitoren alleine noch keine deutlich signifikanten, anti-proliferativen Effekte auf den resistenten Zellen gezeigt werden, war das Ergebnis umso eindrucksvoller, wenn das Zytostatikum Cisplatin in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 verwendet wurde. Die Blockierung des PI3K-Signalweg in Kombination mit dem DNA-schädigendem Mechanismus des Cisplatins, führte zu einer drastisch reduzierte Proliferation und konnte nicht nur in der parentalen, sondern auch in den beiden resistenten Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R30 PF-04217903 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.38 A, 3.39 A und 3.41 A). Da der additive Effekt dieser beiden Substanzen bereits bei den geringsten Dosierungen der beiden Substanzen zu beobachten war, konnte eine Verschiebung der EC_{50} -Werte um mehr als zwei Potenzen erreicht werden. Einzig in der Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 konnte, verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Cisplatin, keine gesteigerte Wachstumsinhibierung nach Behandlung mit dieser Kombination beobachtet werden (siehe Abb. 3.40 A).

Für die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 erwies sich der gemeinsame Einsatz von Cisplatin und einem Mek-Inhibitor als eine ebenfalls sehr effiziente Kombination (siehe Abb. 3.39 A). Die Zellen zeigten selbst bei den geringsten Konzentrationen der beiden Therapeutika schon eine 60 %-ige Wachstumsreduktion und einen EC_{50} -Wert von 0,1 μM . Die Zelllinie sprach demnach sehr gut auf die gewählte Kombination an. In den anderen drei

Zelllinien konnte dieses gute Ansprechen nicht gezeigt werden. Die parentale Zelllinie MKN-45 zeigte verglichen mit der Behandlung mit nur einer der beiden Substanzen zwar eine positive Verschiebung ihrer Wachstumskurven, jedoch war diese bei Weitem nicht so stark ausgeprägt. Die resistenten Linien MKN-45 R30 PF-04217903 und MKN-45 R50 EMD 1204831 zeigten kein verstärktes Ansprechen auf diese Kombination. Eine Kombination von Cisplatin und den verschiedenen c-Met-Inhibitoren zeigte des Weiteren ebenfalls keinen Effekt. Die resistenten Zellen reagierten bei gleichzeitiger Anwesenheit des Zytostatikums nicht sensitiver auf die c-Met-Inhibitoren. Auch nach weiteren durchgeführten Kombinationsstudien, bei denen Cisplatin gleichzeitig mit Iressa, Lapatinib oder dem IGF-1R-Inhibitor verabreicht wurde, konnten keine signifikanten Wachstumsinhibierungen beobachtet werden.

In einem zweiten Ansatz wurden die zuvor etablierten Kombinationen wiederholt, wobei anstelle des Cisplatins das Zytostatikum 5-FU verwendet wurde. Alle vier Zelllinien zeigten nach der Einzelbehandlung mit 5-FU eine moderate Wachstumsinhibition (siehe Abb. 3.38 C, 3.39 C, 3.40 C und 3.41 C). Die Zellen zeigten sich, verglichen mit der Behandlung mit Cisplatin, insgesamt jedoch weniger sensitiv auf die Substanz, was sich in einer weniger starken Proliferationshemmung widerspiegelte. Die maximale Inhibition lag bei allen Zelllinien lediglich zwischen 50 und 70 %. Hier wurden EC_{50} -Werte zwischen 0,7 und 1,7 μM erreicht. Kombinierte man jedoch 5-FU mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 bot sich ein ähnlich gutes Resultat, wie nach der Kombination mit Cisplatin. Alle Zelllinien zeigten hierbei, verglichen mit der alleinigen Behandlung mit 5-FU, einen deutlichen proliferationshemmenden Effekt. Besonders stark ausgeprägt war dieser Effekt wieder bei den parentalen, den MKN-45 R8 EMD 1214063 und den MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen. Diese drei Zelllinien fielen besonders durch eine 100 %-ige Wachstumsinhibierung, mit EC_{50} -Werten von 0,02 (MKN-45 R8 EMD 1214063) bis 0,1 μM (Parental und MKN-45 R30 PF-04217903), auf. Die Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831, die auf die kombinierten Behandlung von Cisplatin und GDC-0941 noch kein vermindertes Wachstum zeigte, zeigte bei dieser Kombination jedoch ebenfalls eine signifikante Verschiebung der Wachstumskurve. Verglichen mit den drei anderen Zelllinien fiel diese zwar moderater aus und zeigte sich hauptsächlich bei dem Einsatz von hohen Konzentrationen an 5-FU und GDC-0941, eine vollständige Wachstumsinhibierung konnte trotzdem erzielt werden. Der EC_{50} -Wert lag hierbei bei 0,02 μM .

Alle anderen getesteten Kombinationen konnten das Zellwachstum der einzelnen Linien nicht signifikant reduzieren. Keine der verwendeten Zelllinien reagierte dabei sensitiver als nach der Einzelbehandlung der jeweiligen Substanz. Zusammenfassend scheint die

Blockierung der PI3K-Signalkaskade in Kombination mit der DNA- bzw. RNA-schädigenden Wirkung von Cisplatin und 5-FU besonders wirkungsvoll zu sein, wohingegen die zusätzliche Behandlung mit Zytostatika die Zellen nicht für die c-Met-Inhibitoren zu sensibilisieren vermag.

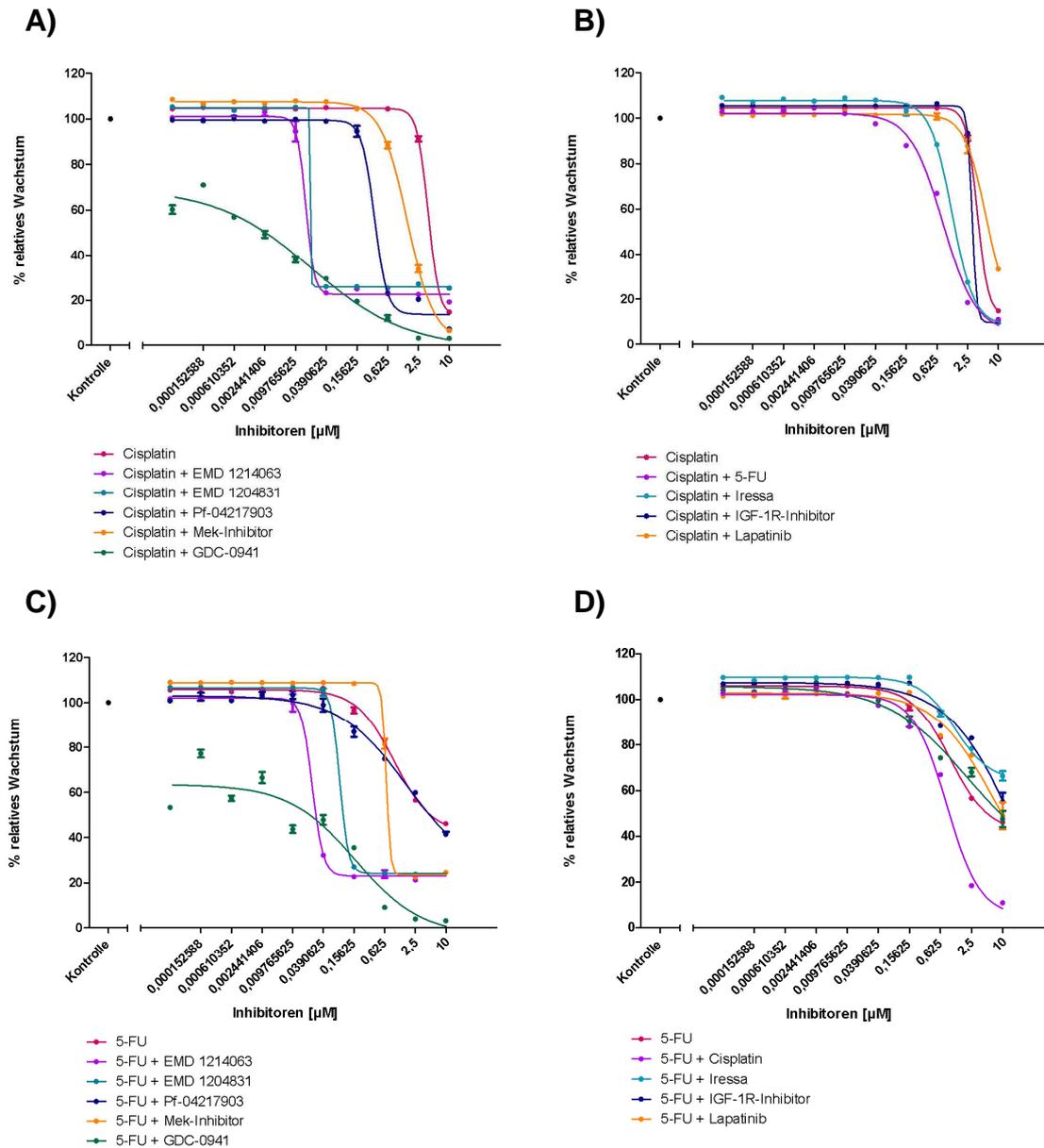


Abb. 3.38: Ansprechen der parentalen MKN-45-Zellen auf die Kombination von Zytostatika und Signaltransduktions-Inhibitoren.

MKN-45-Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) im serumhaltigen Medium ausgesät und in Kombinationsexperimenten mit Zytostatika und Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

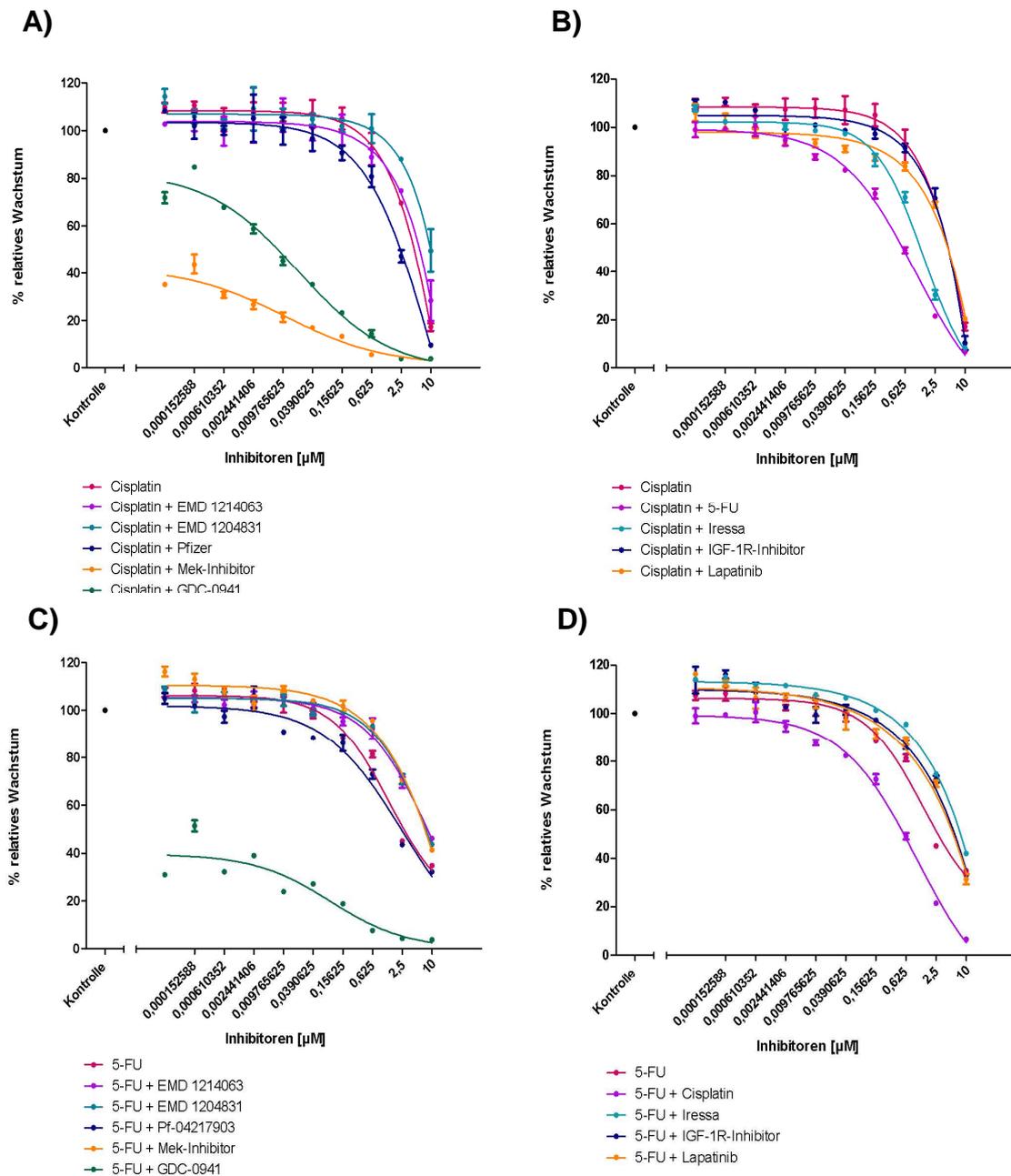


Abb. 3.39: Ansprechen der MKN-45 R8 EMD 1214063-Zellen auf die Kombination von Zytostatika und Signaltransduktions-Inhibitoren.

MKN-45-Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und in Kombinationsexperimenten mit Zytostatika und Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001-10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

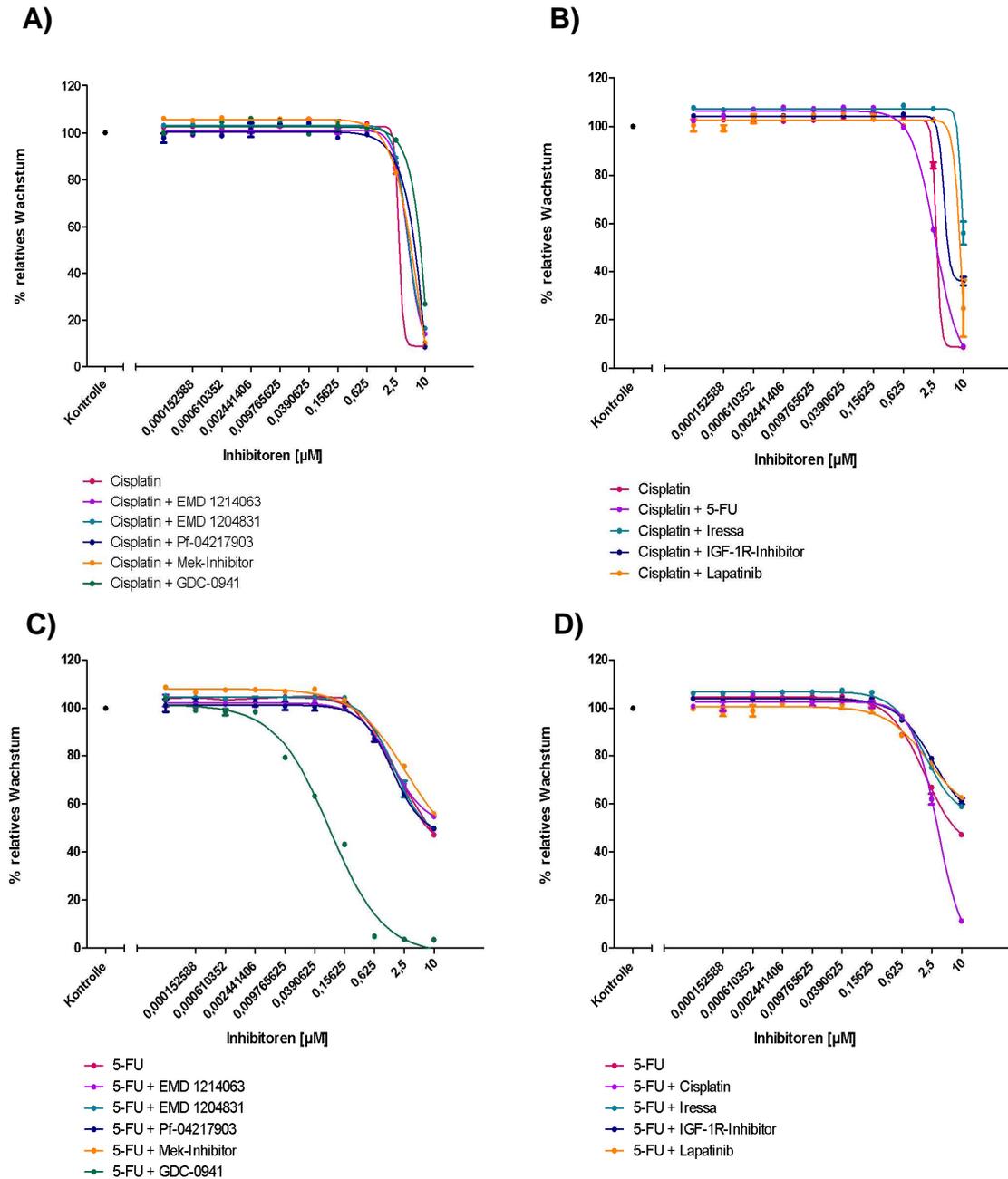


Abb. 3.40: Ansprechen der MKN-45 R50 EMD 1204831-Zellen auf die Kombination von Zytostatika und Signaltransduktions-Inhibitoren.

MKN-45-Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und in Kombinationsexperimenten mit Zytostatika und Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001- 10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

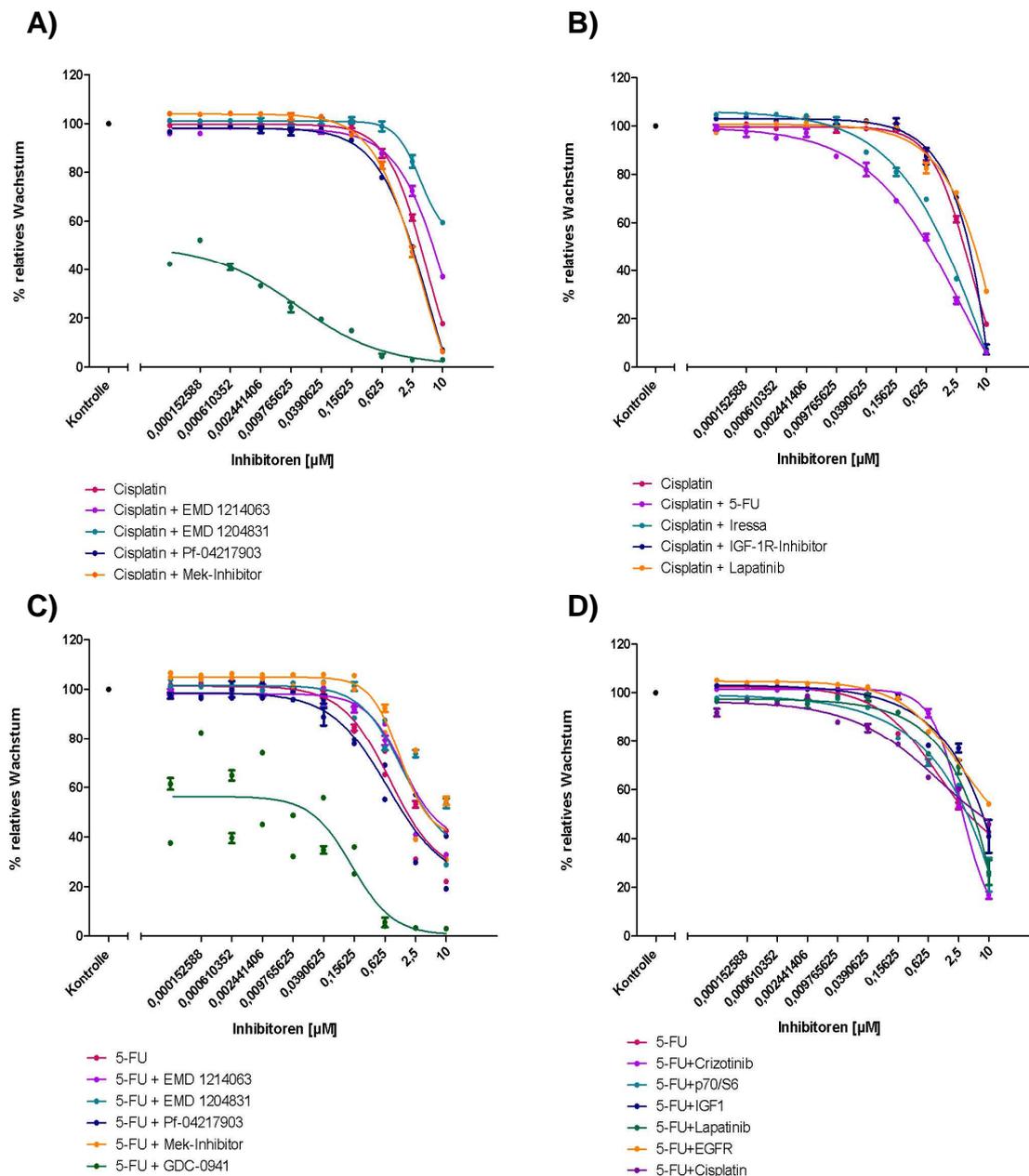


Abb. 3.41: Ansprechen der MKN-45 R30 PF-04217903-Zellen auf die Kombination von Zytostatika und Signaltransduktions-Inhibitoren.

MKN-45-Zellen wurden nach dem Auswaschen der Inhibitoren (2-6 Wochen) in serumhaltigem Medium ausgesät und in Kombinationsexperimenten mit Zytostatika und Inhibitoren in Konzentrationen von 0,0001 10 μM für 72 h behandelt. Nach einer 18-stündigen Inkubation der Zellen mit Alamar Blue wurde die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle entspricht einer 100 %-igen Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

4. Diskussion

Der Fokus bei der Entwicklung von neuen Therapieansätzen gegen Krebserkrankungen liegt heute infolge immer größerem Verständnis der Krankheitsursachen auf der personalisierten Medizin. Man verspricht sich dadurch, den bestmöglichen Behandlungserfolg für den einzelnen Patienten erzielen zu können. Der Einsatz von selektiven niedermolekularen Kinaseinhibitoren oder therapeutischen Antikörpern, deren Zielproteine häufig in Tumorzellen überexprimiert sind, scheint dabei besonders vielversprechend zu sein. Der Hepatozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor c-Met, der in vielen Tumoren überexprimiert und aktiviert ist, stellt dabei ein wichtiges Zielmolekül dar, und einige Inhibitoren befinden sich bereits in klinischen Testphasen. Das allgegenwärtige Problem der primären oder sekundären Resistenz gegenüber der Behandlung mögen jedoch auch diese Substanzen nicht zu verhindern. Die möglichen Ursachen für die Resistenzbildung sind dabei häufig vielfältig und komplex. Die molekulare Analyse der Resistenzmechanismen und die Entwicklung von sinnvollen Zweitlinientherapien sind demnach unerlässlich für einen dauerhaften Behandlungserfolg.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, Zelllinien zu generieren, die eine sekundäre Resistenz gegen c-Met-Inhibitoren durch eine Langzeitkultivierung in Anwesenheit der entsprechenden Inhibitoren erworben haben. Im Weiteren sollten die molekularen Veränderungen dieser Zellen charakterisiert und weitere Therapiemöglichkeiten entwickelt werden. Ein alternativer Ansatz wären chemisch getriebene Mutagenese Screens gewesen, bei denen in den Zellen Mutationen durch ENU induziert werden. Dabei können besonders schnell und einfach Mutationen in der Kinasedomäne des Zielgens selektiert werden. Dies wird für eine gezielte Identifizierung von Resistenz-vermittelnden Mutationen im Zielgen benutzt (Tiedt *et al.*, 2011).

4.1 Einfluss von c-Met-Inhibitoren auf Proliferation, Signaltransduktion und Genexpression – parentale und resistente Zellen im Vergleich

4.1.1 Effekte der c-Met-Inhibitoren auf die Proliferation und die Signaltransduktion in parentalen und resistenten Zellen

Für die Auswahl eines geeigneten Zellsystems, in denen es nach der Behandlung mit c-Met-Inhibitoren zu einer Inaktivierung der c-Met-Signaltransduktionskaskade und zu einer Wachstumsinhibition kommt, wurde zunächst der Nachweis einer Expression und Aktivierung der Kinase mittels Proteinexpressionsstudien erbracht. In Western Blot Analysen der Zelllinien MKN-45, EBC1 und Hs746T konnte sowohl die starke Expression des c-Met-Rezeptors als auch dessen konstitutive Phosphorylierung und Aktivierung, ohne eine vorangegangene Stimulation mit dem Liganden HGF, nachgewiesen werden. Zurückzuführen ist dies auf eine starke Amplifikation des c-Met-Gens (> 10 Kopien), wodurch eine hohe Rezeptordichte in der Zellmembran, eine Liganden-unabhängige Dimerisierung und die Aktivierung der Rezeptoren verursacht werden (Rege-Cambrin *et al.*, 1992; Beau-Faller *et al.*, 2008; Cappuzzo *et al.*, 2009). Ausgehend von Veröffentlichungen, die besagen, dass die starke konstitutive Phosphorylierung von c-Met mit einer Sensitivität gegenüber niedermolekularen c-Met-Inhibitoren korreliert (Smolen *et al.*, 2006), wurde zunächst dies überprüft. Neben Proliferationsversuchen wurden auch Western Blot Analysen zur Überprüfung einer Inhibition von c-Met auf Proteinebene durchgeführt. Alle drei Zelllinien zeigten nach der Behandlung mit den drei verschiedenen c-Met-Inhibitoren EMD 1214063, EMD 1204831 und PF-04217903 eine dosisabhängige Inhibition der Phosphorylierung des Rezeptors und bestätigten die publizierten Ergebnisse. Die nicht mehr detektierbare Phosphorylierung bei Konzentrationen von $\geq 0,1 \mu\text{M}$ unterstreicht hierbei die ausgesprochen gute Potenz der drei Inhibitoren. Des Weiteren korrelierten die auf Proteinebene erhaltenen Ergebnisse mit den Resultaten der Proliferationsversuche. Auch hier konnte in allen drei Zelllinien eine signifikante, dosisabhängige Wachstumsinhibition gezeigt werden. IC_{50} -Werte zwischen 1 und 200 nM bestätigten dabei einmal mehr das Potential der hoch selektiven Inhibitoren. Dieses Ergebnis wird durch vorangegangene Studien unterstützt, die besagen, dass Tumorzellen, die eine c-Met-Abhängigkeit durch eine Amplifikation des Gens aufweisen, besonders sensitiv auf Inhibitoren ansprechen (Smolen *et al.*, 2008 und Engelman *et al.*, 2007). Die induzierten anti-proliferativen Effekte lassen sich vermutlich auf die Blockierung des PI3K- und MAPK-Signalweges und die differenzielle Expression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen wie p21, p27 und Cyclin D1 zurückführen, die auf Proteinebene ebenfalls in einer dosisabhängigen Weise gezeigt werden konnten. Die Inhibitoren EMD 1214063 und 1204831 führten des Weiteren zu einer dosisabhängigen

Dephosphorylierung des EGFR und des ErbB3-Rezeptors. Dies bestätigt Daten von Bachleitner-Hofmann *et al.* aus dem Jahr 2008, die besagen, dass es zu einer Transaktivierung des EGFR und des ErbB3-Rezeptors durch die Interaktion mit c-Met kommt, wodurch die Inhibierung der Phosphorylierung durch c-Met-Inhibitoren erklärt werden kann (Bachleitner-Hofmann *et al.*, 2008 und Khoury *et al.*, 2005).

Das Expressions- und Aktivierungslevel des c-Met-Rezeptors konnte in den durchgeführten *in vitro* Versuchen jedoch nicht als alleiniges Kriterium hinsichtlich einer möglichen Sensitivität gegenüber den Inhibitoren herangezogen werden. Obwohl in der Zelllinie Hs746T eine große Menge des phosphorylierten Rezeptors nachgewiesen und mittels der Inhibitoren eine vollständige Inhibition erreicht werden konnte, war die *in vitro* Sensitivität gegenüber der Substanz im Proliferationsversuch trotzdem nur ungenügend, da eine 100%ige Wachstumsinhibierung auch bei Anwesenheit von sehr hohen Konzentrationen der Substanzen nicht erreicht werden konnte. Interessanterweise zeigte die Zelllinie Hs746T eine deutlich langsamere Verdoppelungszeit, als die beiden anderen Zelllinien. Dies steht klar im Gegensatz zu der Sensitivität dieses Modells *in vivo*. *In vivo* induziert die Inhibition von c-Met eine Regression von etablierten Hs746T-Tumoren. Hs746T stellt dabei sogar eines der am stärksten vom c-Met-abhängigen Modelle dar. Eine Korrelation zwischen der Zellteilungsrate und der Sensitivität gegenüber den c-Met-Inhibitoren könnte demnach denkbar sein. Dass die Überexpression des Rezeptors nicht als alleiniges Kriterium für die Sensitivität einer Zelllinie gelten kann, konnte anhand der NSCLC-Zelllinie NCI-H441 besonders deutlich gezeigt werden. Sie zeigte im Proliferationsversuch keinerlei Sensitivität gegenüber den c-Met-Inhibitoren und ist somit für *in vitro* Experimente nicht geeignet. Allerdings gilt auch diese Zelllinie als hochsensitiv im Mausmodell. Dementsprechend wird deutlich, dass man von reinen *in vitro* Ergebnissen nicht unmittelbar auf die Sensitivität *in vivo* schließen kann. Diese vergleichbaren Ergebnisse, erzielt in drei verschiedenen c-Met-abhängigen Tumormodellen bei Einsatz unter Behandlung mit drei verschiedenen Inhibitoren, lassen darauf schließen, dass die Behandlung mit niedermolekularen c-Met-Inhibitoren in c-Met-abhängigen Tumoren sehr vielversprechend ist.

Um Resistenz-assoziierte Änderungen in den Zellen charakterisieren zu können, wurden zunächst resistente Zelllinien durch eine kontinuierliche Kultivierung bei Anwesenheit von steigenden Dosen der c-Met-Inhibitoren behandelt, wodurch sich aus den parental, vormals sensitiven Zelllinien, resistente Sublinien entwickelt konnten (MKN-45 R8 EMD 1214063, MKN-45 R50 EMD 1204831 und MKN-45 R30 PF-04217903). Für alle Zelllinien konnte die erfolgte Resistenzentwicklung in Proliferationsversuchen bestätigt werden. In anschließend angestellten Western Blot Analysen konnte beobachtet

werden, dass die resistenten Zellen MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 ein vergleichbares Bild wie die parentalen Zellen hinsichtlich der Aktivierung von c-Met aufwiesen. Auch hier konnte, wie in der parentalen Zelllinie, die konstitutive Aktivierung von c-Met bestätigt werden, die sich mit den gleichen Inhibitorkonzentrationen vollständig blockieren ließ. Ein gestörtes Bindungsverhalten der Inhibitoren, sichtbar durch eine nicht länger mögliche Inhibition der Phosphorylierung des Rezeptors, welches durch Mutationen in der Kinasedomäne erklärt werden könnte und bereits durch Tiedt *et al.* in 2011 publiziert wurde, konnte nicht beobachtet werden. Einzig die Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 zeigte nach der Behandlung eine lediglich schwach ausgeprägte Inhibition der Phosphorylierung der konstitutiv aktiven Kinase, was bereits auf einen differenziellen Mechanismus der Resistenzentwicklung schließen lässt.

Die Charakterisierung der durch die Inhibitoren induzierten Wachstumsinhibition in den parentalen Zellen erfolgte mittels Westernblotanalyse von nachgeschalteten Proteinen innerhalb der c-Met-Signaltransduktionskaskade. Hierbei zeigte sich, dass es in Folge der Inhibition von c-Met zu einer Hemmung des PI3K/AKT- und des MAPK-Signalwegs kommt. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde dies durch eine dosisabhängige Inhibition der Phosphorylierung der Proteine Akt [Ser473] und Erk1/2 [T202/Y204] gezeigt. Da die Aktivierung von Erk1/2 zum Voranschreiten des Zellzyklus führt und gleichzeitig anti-apoptotisch wirkt (Cross *et al.*, 2000 und Wilkinson und Millar, 2000), könnte dies die verminderte Proliferationsfähigkeit der Zellen unter Einfluss der c-Met-Inhibitoren erklären. In Kombination mit der zusätzlichen Aktivitätshemmung von Akt, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Zellzyklusprogression und der Hemmung der Apoptose spielt, sind ein Zellzyklusarrest und die Apoptose der Zellen ein erwartetes Ergebnis.

Des Weiteren konnte eine differenzielle Expression der Zellzyklus-assoziierten Proteine p27^{Kip1} und Cyclin D1 gezeigt werden. Dabei wurde das als Zellzyklusinhibitor agierende Protein p27^{Kip1} vermehrt und das als Zellzykluspromotor agierende Protein Cyclin D1 weniger stark exprimiert. Zusammen spricht dies für einen Arrest am G₁/S-Übergang im Vorgang der Zellteilung und könnte die verminderte Proliferation erklären (Tannapfel und Wittekind, 2002). In den resistenten Zellen, die keine Wachstumsinhibition nach Behandlung mit den Inhibitoren aufwiesen, konnte diese Beobachtung erwartungsgemäß nicht gemacht werden.

Die resistenten Zellen zeigten nach der Behandlung zwar noch eine Inhibition von Akt am Serinrest 473, jedoch wurde die Phosphorylierung von Erk an den Aminosäureresten T202 und Y204 nicht beeinflusst. Die generierten Daten deuten jedoch darauf hin, dass die phospho-Erk-Level in den resistenten Zellen grundsätzlich reduziert sind. Dieses

möglicherweise auf den fehlenden Stimulus von c-Met zurückzuführendes Ereignis könnte zu der beobachteten vermehrten Expression von Erk führen. Die noch vorhandenen pErk Levels hängen allerdings nur zu einem kleinen Teil von c-Met ab. Es lässt sich demnach vermuten, dass sich in den beiden Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 eine c-Met-unabhängige Proliferation unter ungestörter Aktivierung des MAPK-Signalwegs eingestellt hat. Dies ist insofern von Bedeutung, als das Erk1/2 eine Hauptkomponente des MAPK-Signalweges ist. Nach einer erfolgten Aktivierung transloziert Erk1/2 in den Zellkern und ist dort maßgeblich an der Expression von z.B. Cyclin D1 (Lavoie *et al.*, 1996) und der Unterdrückung von p27^{Kip1} beteiligt (Cheng *et al.*, 1998). Die in den resistenten Zellen nicht vorhandene Zellzyklusarretierung nach Behandlung mit den c-Met-Inhibitoren kann durch dieses Expressionsmuster erklärt werden. Dass die Phosphorylierung und Aktivierung von Erk1/2 trotz einer Inhibition des c-Met-Signalweges aufrechterhalten wird, deutet darauf hin, dass der MAPK-Signalweg durch andere Membranrezeptoren aktiviert wurde. Eine Aktivierung durch den EGFR- oder den IGF-1R scheint dabei denkbar zu sein. Bei einer Evaluierung der differenziellen Aktivierung von 42 verschiedenen Rezeptor Tyrosinkinasen konnte dies zunächst jedoch nicht bestätigt werden, da keine signifikanten differenziell phosphorylierten Rezeptoren identifiziert werden konnten, die auf eine kompensatorische Aktivierung alternativer Signalwege in den resistenten Zellen schließen ließ.

Unterschiedliche Effekte der einzelnen Inhibitoren auf die Signaltransduktion konnten nicht beobachtet werden. Die Inhibition der nachgeschalteten Proteine war sowohl in den verschiedenen Zelllinien als auch nach Behandlung mit den unterschiedlichen Inhibitoren nahezu gleich. Daher ist anzunehmen, dass die leicht abweichenden EC₅₀-Werte der Proliferationsversuche durch Abweichungen im Affinitätsverhalten der Inhibitoren begründet sind. EMD 1214063 scheint demnach potenter zu sein, da auf allen Zelllinien die niedrigsten EC₅₀-Werte mit dieser Substanz erzielt werden konnten. Da der vollständige Wirkmechanismus des Inhibitors EMD 1214063 noch nicht verstanden ist, kann nur vermutet werden, dass dies mit der sehr langsamen Dissoziation der Substanz von seinem Substrat zusammenhängt. Diese Vermutung könnte durch interne Biocore-Analysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) und untermauert die Beobachtung, dass die Substanz besonders lange in der Zelle akkumuliert (siehe Abschnitt 3.2.3).

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die Behandlung mit c-Met-Inhibitoren bei gleichzeitiger Anwesenheit des EGFR Liganden EGF zu einer extrem starken Phosphorylierung von Erk [T202/Y204] führte. Diese war umso stärker, je höher der entsprechende Inhibitor konzentriert war. Der EGFR selbst zeigte zwar ein ähnliches Bild, die Phosphorylierung war im Ganzen jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die Zellen, die einer c-Met-Abhängigkeit unterliegen,

unter dem Druck des Inhibitors hoch sensitiv auf Liganden anderer Rezeptor Tyrosinkinase reagieren und ihre Signaltransduktion somit auf den EGFR-Signalweg verlagern um zu überleben. Bei einer partiellen Inhibierung von c-Met durch niedrige Konzentrationen scheint diese Reaktion der Zellen nicht in diesem Maße nötig zu sein. Dieser sogenannte „Rezeptor-Crosstalk“ konnte auch schon in der Klinik beobachtet werden. In Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom konnte man häufig nach einer Behandlung mit EGFR-Inhibitoren eine Amplifikation des c-Met-Gens nachweisen, wodurch eine kompensierende Aktivierung des c-Met Signalweges entsteht, um den blockierten EGFR-Signalweg ausgleichen zu können (Engelman *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2000; Karamouzis *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Erkenntnisse werden in der Klinik bereits kombinierte Blockierungen des EGFR- und c-Met-Signalweges getestet. Ein Beispiel dafür ist die Kombination des EGFR-Inhibitors Tarceva mit dem c-Met-Antikörper MetMab, die derzeit in NSCLC-Patienten getestet werden (Brugger und Thomas, 2012).

Laut Bachleitner-Hofmann *et al.* führt jedoch die c-Met-unabhängige ErbB-Aktivierung durch EGF oder Heregulin zu einer verstärkten Zellproliferation, wenn die Zellen unter Behandlung mit einem c-Met-Inhibitor stehen. Diese Kompensation erfolgt über die erneute Aktivierung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalweges. Dies korreliert mit den in Abschnitt 3.2.9.1 (Abb. 3.21) dargestellten Ergebnissen und lässt vermuten, dass eine zusätzliche kombinierte Inhibition des MAPK- und PI3K/AKT-Signalweges in Zellen, die neben der c-Met-Amplifikation eine vermehrte Aktivierung der ErbB-Rezeptoren aufweisen, sinnvoll sein kann.

4.1.2 Molekulare Änderungen im Genexpressionsprofil der resistenten Zellen

Um ein besseres Verständnis für die möglichen Ursachen der Resistenzentwicklung zu bekommen, wurden Microarray-Analysen der resistenten und parentalen Zellen durchgeführt, wobei das Genexpressionsprofil von 20000 Genen erstellt und miteinander verglichen wurde. Pro Zelllinie wurden jeweils eine frühe und eine späte Passage analysiert, um einen unspezifischen Effekt, ausgelöst durch den langen Kultivierungszeitraum, ausschließen zu können. Dabei wurde jedoch grundlegend festgestellt, dass durch die Kultivierung zwar vereinzelte Unterschiede in der Genexpressionsstärke beobachtet wurden, diese jedoch als nicht signifikant angesehen werden können. Die Zellen haben dementsprechend keine weitreichenden Änderungen durch die Langzeitkultivierung erfahren.

Vergleicht man jedoch die Profile der parentalen und resistenten Zellen, wird schnell klar, dass sich die resistenten Zellen deutlich von den parentalen Zellen entfernt haben. In den resistenten Zelllinien wurden hauptsächlich wachstumsfördernde und den Zellzyklus positiv

regulierende Gene vermehrt exprimiert. Betrachtet man die differenziell regulierten Gene in den einzelnen resistenten Zelllinien und vergleicht diese mit der parentalen Linie, fällt auf, dass die Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 eine starke Änderung im Genexpressionsmuster aufwiesen, dies zum Teil jedoch sehr ähnlich verändert waren, d.h., es konnten einige Gene gefunden werden, die in beiden Zellen hoch- oder runterreguliert wurden. Dahingegen zeigte die Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 insgesamt eine weniger starke Änderung im Genexpressionsprofil, welches insgesamt deutlich mehr dem der parentalen Ausgangszelllinie MKN-45 glich. Dies untermauert die bereits angestellten Vermutungen, dass durch die Inhibitoren EMD 1214063 und 1204831, im Gegensatz zu PF-04217903, ein anderer Mechanismus zur Resistenz geführt haben muss. Die Ähnlichkeit des Genexpressionsprofil der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 zur parentalen Linie MKN-45 lässt vermuten, dass die vorhandene Mutation in der Kinasedomäne die wichtigste Rolle bei der Entstehung der Resistenz gespielt hat, wodurch eine starke Anpassung der Genexpression nicht nötig war. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass sich die Resistenz in dieser Zelllinie besonders schnell sprunghaft ausgebildet hat, noch bestärkt.

Betrachtet man die einzelnen differenziell regulierten Gene im generellen, fällt auf, dass die Zelllinien, welche mit den Substanzen EMD 1204831 und PF-04217903 behandelt wurden, besonders häufig eine verstärkte Expression von Genen aufwiesen, die für das Zellwachstum und dem Voranschreiten der Mitose wichtig sind, wie z.B. die Aurorakinase (Gen *AURKA* und *AURKB*), den Zentrosomen-assoziierten Genen CENP-E und CENP-A, der Serin/Threonin Kinase Nek2, dem Kinetochor-assoziierten Gen NDC80 und dem Kinesin Gen KIF23. Diese Beobachtung ist bei Tumorzellen, die sich durch ein unkontrolliertes Wachstum auszeichnen, zwar nicht ungewöhnlich, aber die vermehrte Expression, verglichen mit der parentalen Tumorzelle, macht deutlich, dass die Zellen noch aggressiver proliferieren. Die Induktion von proliferationsstimulierenden Genen konnte vorher bereits vermutet werden, da die Zellen im Laufe des Kultivierungszeitraums eine deutlich verminderte Verdoppelungszeit aufwiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die während der Behandlung resistent gewordenen Zellen besonders stark proliferieren, was die Prognose für den Patienten zusätzlich verschlechtern würde. Über Nek2, welches bei der Teilung der Zentrosomen eine Rolle spielt, und bei einer Überexpression eine vermehrte Zellteilung induzieren kann (Fry *et al.* 1998), wurde des Weiteren von Schmitt und Hillengass angenommen, dass dies mit einer Resistenz gegenüber Doxorubicin und Bortezomib bei der Behandlung von Multiplen Myelomen in Verbindung gebracht werden kann (ASH Orlando, 2010).

In der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 konnte eine vermehrte Expression des PIK3R1-Gens nachgewiesen werden. Das Genprodukt der PIK3R1 ist die regulatorische Untereinheit p85 α der PI3K und spielt eine Schlüsselrolle in diesem Signalweg (Cantley, 2002). Durch eine vermehrte Expression dieses Proteins könnte das Überleben der Zelle gefördert werden. So konnten bereits Mutationen im PIK3R1-Gen in Darmkrebszellen nachgewiesen werden, die die Interaktion zwischen der p85 α und p110-Untereinheit stabilisieren, wodurch die inhibitorische Aktivität von p110 aufgehoben wird. Dies resultiert in einem vermehrten Zellüberleben durch die Förderung eines dauerhaft aktiven Akt-Signalweges (Jaiswal *et al.*, 2009). Da eine Amplifikation des Gens durch die CGH-Analyse ausgeschlossen werden konnte, scheint eine aktivierende Mutation im PIK3R1-Gen auch in diesem Fall möglich zu sein. Die vermehrte Aktivierung des PI3K-Signalweges kann zusätzlich auch über eine aktivierende Mutation im PI3K-Gen oder durch andere Wachstumsfaktor/Rezeptor Tyrosinkinase-Kombinationen induziert worden sein. In Betracht gezogen werden können dabei die zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren gehörenden Kinasen ErbB2 und ErbB3, die sowohl in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 als auch in MKN-45 R50 EMD 1204831 3-fach verstärkt exprimiert wurden. Die Überexpression der ErbB-Rezeptoren konnte in vielen Tumoren nachgewiesen werden und korreliert häufig mit einer schlechten Prognose der Patienten (Slamon *et al.*, 1987). Diese Kinasen bilden zusammen häufig Heterodimere und können diverse Signalwege, wie z.B. den MAPK- (Hill und Treisman, 1995) und PI3K/AKT-Signalweg aktivieren (Morandell *et al.*, 2008), was schlussendlich wieder zu einem Zellwachstum und der Proliferation der Zelle führt. Auch eine Heterodimerisierung von c-Met und ErbB2 bzw. ErbB3 in Lungenkrebszellen, die eine Amplifikation des c-Met-Gens aufweisen, wurde bereits diskutiert (Tanizaki *et al.*, 2011). Dabei konnte ebenfalls eine vermehrte Proliferation der Zellen, induziert durch eine gesteigerte Aktivität des MAPK- und Akt-Signalweges, beobachtet werden. Des Weiteren zeigen Magentumorzellen, die eine konstitutive Aktivierung von c-Met und ErbB3 aufweisen, eine signifikant verringerte Sensitivität gegenüber einer Therapie mit c-Met-Inhibitoren (Bachleitner-Hofmann *et al.*, 2008 und Corso *et al.*, 2010). Eine vermehrte Expression der Kinasen scheint auch eine Rolle bei einer anti-EGFR-gerichteten Tumorthherapie zu spielen. So konnte in NSCLC-Zellen, die eine Resistenz gegen den therapeutischen Antikörper Cetuximab entwickelt haben, eine vermehrte Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 nachgewiesen werden (Wheeler *et al.*, 2008), wodurch die Blockierung des EGFR kompensiert werden kann. Auch die beobachtete anhaltende Aktivierung von Erk1/2 (T202/Y204), die sich auf Proteinebene nach der Inhibition von c-Met in den resistenten Zellen nachweisen ließ, könnte dadurch erklärt werden. Bei der Ausbildung von Resistenzen während einer Tamoxifentherapie bei Patienten, die an Brustkrebs leiden, wurde bereits ein Zusammenhang mit der Aktivierung von Erk1/2 und PI3K diskutiert (Riggins *et al.*, 2006).

Außerdem gibt es bereits Publikationen, die besagen, dass der c-Met- und EGFR-Signalweg über den ErbB3-Rezeptor miteinander verknüpft sind, was zu einer Ausbildung von Resistenzen gegen anti-EGFR-Therapien in NSCLC führen kann. Dabei sollen Amplifikationen im c-Met-Gen in einer ErbB3-getriebenen Aktivierung des PI3K resultieren (Engelman *et al.*, 2007). Demnach wäre es denkbar, dass im Falle der Resistenz gegen c-Met-Inhibitoren ebenfalls der ErbB3-Rezeptor die Aktivierung von PI3K unterstützt. Des Weiteren publizierten Engelman *et al.* in 2006, dass die EGFR-unabhängige Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges in Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, die die Mutation T790M im EGFR aufweisen, bereits zu einer Resistenz gegenüber dem niedermolekularen EGFR-Inhibitor Iressa führt. Eine weitere Hypothese beruht auf einer Veröffentlichung von Tang *et al.* in 2010. In dieser wird postuliert, dass in Zellen von Eierstocktumoren, die eine Überexpression von c-Met aufweisen und resistent gegenüber einer Behandlung mit Zytostatika waren, die Aktivierung des MAPK-Signalweges abhängig von PI3K ist, wodurch die Aktivität von Erk1/2 bei gleichzeitiger Inhibition von c-Met erklärt werden kann. Diese Daten deuten daraufhin, dass der Aktivierung des PI3K/AKT- und des MAPK-Signalweges in Anwesenheit von c-Met-Inhibitoren eine immense Bedeutung beigemessen werden muss.

Ein weiteres stark differenziell exprimiertes Protein stellte der IGF-1R dar. In den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 konnte eine deutlich verstärkte Expression nachgewiesen werden. Der IGF-1R spielt eine wichtige Rolle beim Prozess der Krebsentstehung, da er z.B. den PI3K-Signalweg aktiviert und dadurch zum Überleben der Zelle beiträgt (Baserga *et al.*, 1997) und zum anderen die Proliferation und Ausbreitung von Tumoren fördert. Die Entstehung der IGF-1R-Amplifikation und Überexpression unterstützt Berichte, in denen postuliert wird, dass die mehrmonatige Behandlung mit Cisplatin zur Entstehung einer Resistenz führt, die auf eine Überexpression des IGF-1R, mit einer einhergehenden Aktivierung der PI3K, beruht (Eckstein *et al.*, 2009). Dass in der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 ebenfalls eine vermehrte Expression des PI3K gezeigt werden konnte, lässt auf einen ähnlichen Mechanismus schließen.

In vielen Tumoren, wie z.B. in Geweben von Brust, Lunge oder Magen-Darm-Trakt, konnte eine vermehrte Expression des IGF-1R nachgewiesen werden (Yao *et al.*, 2003), was zu einem gesteigerten Wachstum, einer Inhibition der Apoptose oder zu einer Zelltransformation führen kann (Baserga, 1995). Verschiedenen Arbeitsgruppen schreiben dem IGF-1R außerdem eine Rolle bei der Entstehung von Resistenzen, die im Rahmen einer Krebstherapie entstehen, zu. Nahta *et al.* beschrieben bereits in 2005, dass in Herceptin-resistenten Zellen häufig eine vermehrte IGF-1R-Expression nachgewiesen werden kann. Diese Eigenschaften unterstreichen das Potential, welches der IGF-1R bei einer

unkontrollierten Aktivierung auf die Zellen ausüben kann und untermauert die Annahme, dass er einen wichtigen Beitrag zum Erlangen der Resistenzen in den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 beigetragen hat. Die Beobachtung, dass in den beiden frühen Passagen der Zelllinien der IGF-1R in geringeren Mengen exprimiert wurde, deutet daraufhin, dass diese Veränderung in den Zellen erst nach einer längeren Kultivierungsdauer unter Einfluss der Inhibitoren entstanden ist, und sich dieser Effekt im Laufe der Zeit verstärkt hat. In nachfolgend angestellten Genomanalysen konnte die Fragestellung, ob die vermehrte Expression des IGF1R durch eine Amplifikation hervorgerufen wird, positiv beantwortet werden. Beide Zelllinien zeigten eine Amplifikation des entsprechenden Gens. Denkbar wäre auch eine zusätzliche autokrine Produktion der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren. Eine Koexpression des IGF-1R und seinen Liganden hat unter anderem eine vermehrte Aktivierung des MAPK-Signalweges zur Folge. Dies würde wiederum mit der zuvor im Western Blot gemachten Beobachtung, der dauerhaften Aktivierung von Erk1/2, korrelieren.

Das Gen, welches in den unter Einfluss der Inhibitoren EMD 1214063 und EMD 1204831 resistent gewordenen Zellen am stärkste heraufreguliert war, ist das Proto-Onkogen *KRAS*. Das monomere kleine G-Protein gilt als prädiktiver Biomarker bei einer anti-EGFR-Therapie im Rahmen einer Behandlung von metastasierendem Darmkrebs. So reagieren Patienten deutlich sensitiver auf die Therapie, wenn ihre Tumorzellen den *KRAS*-Wildtyp und nicht eine aktivierende Mutante exprimieren (Di Fiore *et al.*, 2007; Bokemeyer *et al.*, 2009). *KRAS* spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des MAPK-Signalweges und führt somit zu einer vermehrten Proliferation und dem Überleben der Zelle. In der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 konnte sowohl in der frühen als auch in der späten Passage eine bis zu 16-fach verstärkte Genexpression nachgewiesen werden. Die Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 zeigte sogar eine bis zu 20-fach verstärkte Expression. In der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 war der Expressionslevel dagegen auf einem vergleichbar niedrigen Niveau wie in der parentalen Zelllinie. Dies ist plausibel, da in dieser Zelllinie der Selektionsdruck durch die c-Met-Mutation aufgehoben wurde, und untermauert die Hypothese, dass in den beiden anderen Zelllinien *KRAS* bei der Resistenzentwicklung eine große Rolle gespielt hat. Dieser Befund korreliert mit veröffentlichten Daten die besagen, dass die virale Transfektion von Wildtyp *KRAS* in sensitive GLT-16-Zellen eine Resistenzentwicklung gegenüber einem c-Met-Inhibitor induziert (Cepero *et al.*, 2010). Grundlage für dieses Experiment, bei denen zunächst durch Langzeitkultivierung resistente Zellen gewonnen wurden, waren jedoch Ergebnisse, die die Amplifikation von *KRAS* und c-Met als Resistenzmechanismus identifizierten. Da die in diesen Experimenten verwendeten GLT-16-Zellen Subklone der MKN-45-Zellen darstellten, wird deutlich, wie

komplex der Prozess der Entstehung von Resistenzen ist, und dasd viele verschiedene Ereignisse schlussendlich zum Erwerb von Resistenzen beitragen können. Da in dieser Arbeit eine Amplifikation oder eine Mutation des KRAS-Gens als Ursache für die verstärkte Expression ausgeschlossen werden konnte, scheint eine epigenetische Veränderung möglich zu sein, die KRAS schließlich dauerhaft aktiviert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Überexpression von KRAS mit einer Aktivierung des MAPK-Signalweges einhergeht, was den beiden Zelllinien somit vermutlich die Unabhängigkeit vom c-Met-Signalweg ermöglicht. Die Tatsache, dass diese starke differenzielle Expression in zwei unabhängigen resistenten Zelllinien gefunden wurde, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass diese Veränderung maßgeblich an der Resistenzentwicklung beteiligt war.

Die differenzielle Expression der Gene KRAS und IGF-1R konnte in einer daraufhin folgenden Western Blot Analyse auf Proteinebene bestätigt werden. Dabei konnte jedoch beobachtet werden, dass der Effekt der verstärkten Expression nur von temporärer Natur war. Wurden die Zellen vor der Proteinanalyse drei Monate ohne die c-Met-Inhibitoren inkubiert, konnte eine deutliche Reduktion der Expressionsstärke des IGF-1R in beiden Zelllinien beobachtet werden. Dies könnte durch einen Verlust der Kopienzahl des IGF-1R-Gens verursacht worden sein und könnte durch eine erneute Genomanalyse überprüft werden.

Die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 zeigte nach einer Kultivierungsdauer von drei Monaten ohne Inhibitor eine deutlich verringerte Proteinexpression von KRAS. In der Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 konnte dies nicht beobachtet werden. Dies und die Tatsache, dass das KRAS-Gen in diesen Zelllinien weder mutiert (siehe 3.2.13) noch amplifiziert (siehe 3.2.11) war, lässt den Schluss zu, dass es sich dabei um eine transkriptionelle Änderung handelt, die unter Selektionsdruck bei Anwesenheit der Inhibitoren nötig ist. Die Frage, warum die Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 im Gegensatz zu der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 KRAS auch ohne Selektionsdruck weiterhin überexprimiert, konnte bisher nicht geklärt werden.

Zur Überprüfung, ob die Zellen in Abwesenheit der Inhibitoren ihre Resistenz verloren haben, wurden erneut Proliferationsversuche angestellt. Dabei zeigten sich die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 sensitiver, jedoch immer noch resistenter als die parentale Linie. Bei der Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 konnte hingegen weiterhin kein Effekt bezüglich der Proliferation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die Hypothese, dass KRAS eine Schlüsselrolle beim Prozess der Resistenzentwicklung zukommt. Zur Erklärung der abschließenden Frage, ob der IGF-1R und KRAS wirklich verantwortlich für die

Entwicklung der Resistenz in den beiden Zelllinien sind, sollten Knockdown-Studien zur Prüfung einer erneuten Sensitivierung der Zellen angestellt werden. So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass siRNA gegen den IGF-1R in *in vitro* und *in vivo* Studien ein verringertes Tumorwachstum und die Apoptose der Zellen induzieren konnte (Shu *et al.*, 2011 und An *et al.*, 2010). Der stabile Knockdown von onkogenem KRAS in NSCLC-Tumoren war bisher hingegen weniger erfolgreich. Es konnte zwar eine deutliche Abschwächung in der Aktivität des MAPK-Signalweges bestätigt werden, jedoch war die Apoptoseinduktion und der Effekt auf die Zellproliferation lediglich ungenügend. Allerdings konnte in diesen Zellen eine vermehrte Sensitivität gegenüber p38 und EGFR-Inhibitoren verzeichnet werden, was die Möglichkeit eröffnen könnte, eine kombinatorische Therapie anzustreben (Sunaga *et al.*, 2011). Käme es im Rahmen eines Knockdowns des IGF-1R oder KRAS in unseren resistenten Zellen durch die vollständige Inhibierung der Signalwege unter gleichzeitiger Behandlung mit c-Met-Inhibitoren tatsächlich zu einem Zellzyklusarrest oder der Apoptose, würde dies die Annahme, dass KRAS und der IGF-1R eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Resistenz spielen, deutlich untermauern.

Ein weiteres interessantes Protein, welches in allen resistenten Zellen vermehrt exprimiert wurde, war die Matrix Metalloproteinase 1 (MMP1). Sie gehört zu den Endopeptidasen und spielt eine wichtige Rolle beim Auf-, Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix, hauptsächlich bei Prozessen wie der Wundheilung und während dem Wachstum und der Entwicklung (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Eine veränderte Expression von Matrix Metalloproteinase wird u.a. mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht. Um die Metastasierung von Krebszellen in ihre Umgebung gewährleisten zu können, muss die extrazelluläre Matrix zunächst abgebaut werden. Die vermehrte Expression von MMPs in Tumoren und die Beteiligung von MMP1 an der Invasion von Brustkrebszellen konnte bereits beschrieben werden (Ueno *et al.*, 1997; Pei, 2005; Vizoso *et al.*, 2007). Die vermehrte Expression von MMP1 in allen resistenten Zelllinien könnte daraufhin deuten, dass sie eine besonders hohe Migration und Invasivität aufweisen, was mit einer vermehrten Aggressivität des Tumors einhergehen könnte. Diese Hypothese wird durch das durchgeführte Migrationsexperiment aber lediglich teilweise unterstützt, da nur in der Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 eine vermehrte Migration nachgewiesen werden konnte. Allerdings konnte in dieser Zelllinie auch die mit Abstand stärkste Expression des Gens nachgewiesen werden. Es wäre demnach denkbar, dass die starke MMP1-Expression die Migration dieser Zelllinie induziert. Der Transkriptionsfaktor *Activator Protein-1* (AP-1) induziert die Expression von MMP1. Interessanterweise wird AP-1 u.a. von Erk1/2 aktiviert (Park *et al.* 2011), was wiederum die vermehrte Expression in den resistenten Zellen erklären könnte.

Der Einfluss von ATP-Transportern, die verschiedene Substrate durch ATP-Hydrolyse über die Zellmembran aus der Zelle herausschleusen können, wurde mehrfach als Resistenzmechanismus beschrieben (Perez-Tomas, 2006). Viele resistente Zellen zeigen in diesem Zusammenhang eine Überexpression dieser Transporter mit einer dadurch verringerten Zytostatikumkonzentration innerhalb der Zelle, wodurch es weiterhin häufig zu einem Versagen der konventionellen Chemotherapie kommt (Dean *et al.*, 2001). Mit Hilfe der vorliegenden mRNA-Daten konnte jedoch gezeigt werden, dass in allen resistenten Zelllinien keine vermehrte Expression von ABC-Transportern vorhanden war. Dies korreliert mit den Ergebnissen der HPLC-Studie, bei der eine starke Akkumulation des Inhibitors EMD 1214063 bis zu 30 Tage in der Zelle nachweisbar war. Aufgrund dieser beiden Beobachtungen kann ein aktives Entfernen der Inhibitoren aus der Zelle durch Transporter als Resistenzmechanismus ausgeschlossen werden.

4.1.3 Veränderungen im c-Met Gen als möglicher Resistenzmechanismus

Als weitere Möglichkeit für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Kinaseinhibitoren, müssen Mutationen im Zielgen in Betracht gezogen werden. Bei Erwerbung von sekundären Resistenzen entstehen diese häufig während der Therapie. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die sogenannte Gate-Keeper-Mutation im EGFR (T790M), die in ca. 50% aller Patienten nach der Behandlung mit dem EGFR-Inhibitoren Iressa oder Erlotinib entsteht. Eine Bindung der Inhibitoren an die ATP-Bindungstasche der Kinasedomäne wird danach durch eine erhöhte Affinität von ATP unterdrückt, die mit einer veränderten Signaltransduktionskaskade einhergeht. Aber auch in Zellen, die eine Resistenz gegenüber c-Met-Inhibitoren entwickelt haben, konnte eine Mutation im c-Met-Gen als Ursache identifiziert werden. Dabei kam es nach Behandlung von SNU638-Zellen mit den c-Met-Inhibitoren PHA-665752 und Pf-2341066 zu einem Aminosäureaustausch von einem Tyrosin zu einem Histidin bzw. zu einem Cystein an Position 1230, was mit einer verringerten Affinität von c-Met-Inhibitoren der Klasse II einherging (Qi *et al.*, 2011 und Tiedt *et al.*, 2011).

Vieles deutete im Vorfeld daraufhin, dass die Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 eine Mutation erworben haben könnte, da sie auf Proteinebene nur noch eine sehr ungenügende Inhibition der Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors nach der Behandlung mit den Inhibitoren zeigte (siehe Abschnitt 3.2.4 und Abb. 3.10). Durch die Sequenzierung konnten die ersten Hinweise auf eine Mutation in der Kinasedomäne, welche die Bindungsaffinität der Inhibitoren deutlich herabsetzen würde, manifestiert werden. So konnte eine Mutation in der Kinasedomäne, die einen Aminosäureaustausch von Asparaginsäure (GAC) zu Asparagin

(AAC) an Position 1246 zu Folge hatte, in der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903, nicht aber in den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831, bestätigt werden. Bei dieser Mutation bleibt die Kinasedomäne funktionell intakt, es kommt jedoch zu einer Beeinträchtigung der Bindung von c-Met-Inhibitoren der Klasse I. Dieses Ergebnis unterstützt interne Daten, die zuvor in *in vitro* Kinasereaktionen mit rekombinantem Protein angestellt wurden. Dabei konnte die Aktivität des mutierten c-Met-Proteins (D1246N) durch die Inhibitoren nicht mehr gehemmt werden. Kristallstrukturanalysen von c-Met und Inhibitoren der Klasse I zeigen des Weiteren, dass ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle die Bindung des Inhibitors beeinflussen kann. Bindungsstudien mit einem c-Met-Inhibitor der Firma Pfizer zeigten, dass die Mutation D1246H die Bindung des Inhibitors inhibiert ($IC_{50} > 10\mu\text{M}$) (Timofeevski *et al.*, 2009). Darüberhinaus konnte in Publikationen gezeigt werden, dass D1246H/N-Mutationen aktivierende Mutationen darstellen, die in Patienten mit Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden konnten (Maritano *et al.*, 2000). Dabei konnten sowohl somatische als auch Keimbahnmutationen detektiert werden.

Man kann demnach davon ausgehen, dass eine Bindung durch diesen Aminosäureaustausch behindert wird. Die nachfolgend angestellten Proliferations- und Western Blot Analysen mit dem Klasse II c-Met-Inhibitor XL880 manifestierten diese Ergebnisse weiter. Mit diesem Inhibitor konnte, bedingt durch ein differenzielles Bindungsmuster, sowohl eine vollständige Inhibition der Phosphorylierung von c-Met als auch eine dosisabhängige Wachstumsinhibition erzielt werden. Dies unterstützt Publikationen, in denen gezeigt werden konnte, dass Zellen mit der Mutation Y1230H sensitiv auf Inhibitoren der Klasse II reagieren (Bellon *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2010 und Tiedt *et al.*, 2011).

Zur Beantwortung der Frage, ob die in dieser Arbeit identifizierte Mutation als alleiniger Verursacher der Resistenz in Betracht gezogen werden kann, musste zunächst geklärt werden, warum die Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 eine partielle Inhibition der Phosphorylierung von c-Met nach Behandlung mit Inhibitoren der Klasse I zeigte. Diese geringfügige Inhibition der Phosphorylierung korrelierte mit dem Ergebnis der Sequenzanalyse. Dabei konnte in lediglich 27,5 % aller Reads die Mutation detektiert werden. Vergleicht man dies wiederum mit der Quantifizierung der Proteinexpression von c-Met (Y1234/1235) (siehe 3.2.4 Abb.3.11), wird ersichtlich, dass die gefundene Mutationsrate dem Inhibitionsgrad der Phosphorylierung der Zellen ähnelt. Dort konnte eine ca. 60 %-ige Inhibition der Phosphorylierung beobachtet werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass nicht alle Allele des amplifizierten Gens mutiert sind, sondern lediglich 40 % der Allele eine Mutation aufweist, und die Inhibitoren auf die exprimierten Wildtyp Proteine

weiterhin einen inhibitorischen Effekt bewirken können. Dass lediglich eine Subpopulation der Zellen das mutierte Gen trägt, scheint nicht sehr wahrscheinlich zu sein, da die Zellen unter dem Selektionsdruck des Inhibitors einen deutlichen Wachstumsvorteil haben, und es somit im Laufe der Zeit zu einer natürlichen Ausdünnung der Zellen mit Wildtyp-c-Met kommen sollte. Dass im Proliferationsversuch keine Effekte auf das Wachstum beobachtet werden konnten, könnte darin begründet liegen, dass die mutierten Allele, die durch die Inhibitoren nicht mehr inhibiert werden können, ausreichend sind, um das Überleben der Zellen zu unterstützen. Da es sich zudem um eine aktivierende Mutation handelt, liegt wahrscheinlich zusätzlich eine verstärkte Signaltransduktion vor. Dass lediglich einzelne Allele eines amplifizierten Gens mutiert sein können, publizierten Engelman *et al.* bereits in 2006. So konnten sie eine Mutation im EGFR von Zelllinien, die eine Resistenz gegenüber dem Inhibitor Iressa erworbene hatten, ebenfalls nur in einzelnen Allelen nachweisen. Allerdings verhielten sich diese Allele als weitaus dominanter, so dass eine dauerhafte Phosphorylierung von Akt, Erk1/2 und des EGFR und ErbB3-Rezeptors gegeben war (Engelman *et al.*, 2006).

Ob die Mutation tatsächlich im Laufe der Behandlung durch ein spontanes Event entstanden ist, oder ob eventuell in der sensitiven Ausgangszelllinie MKN-45 bereits ein Allel mutiert war, welches sich unter dem Einfluss des Inhibitors angereichert hat, kann abschließend nicht eindeutig beurteilt werden, da die Sequenzierungsmethode möglicherweise nicht sensitiv genug ist. Jedoch lässt die Tatsache, dass die beiden anderen resistenten Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 keine Mutation aufwiesen, obwohl sie ebenfalls mit c-Met-Inhibitoren der Klasse I behandelt wurden, diese Theorie unwahrscheinlich erscheinen.

Demnach kann zusammenfassend gesagt werden, dass alles daraufhin deutet, dass in der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 der Aminosäureaustausch von Asparaginsäure (GAC) zu Asparagin (AAC) an Position 1246 in einzelnen Allelen des c-Met-Gens ausreichend ist, um die Resistenz der Zelllinie gegenüber c-Met-Inhibitoren der Klasse I zu vermitteln. Dies konnte durch Studien mit rekombinantem Protein untermauert werden. Um diese Ergebnis endgültig verifizieren zu können, wäre es denkbar die Überexpression des Proteins D1246N in der parentalen Zelllinie MKN-45 durch eine Transfektion zu induzieren und dann den Einfluss der c-Met-Inhibitoren erneut zu analysieren. In Bezug auf die Klinik wäre die Behandlung von Patienten mit vergleichbaren Mutationen in der Kinasedomäne mit einem c-Met-Inhibitor der Klasse II denkbar. Eine deutliche Erhöhung des Inhibitorosis, wie es zum Teil in der Klinik angewendet wird, scheint auf den ersten Blick als nicht sehr vielversprechend, da die in dieser Arbeit generierten Zelllinien selbst bei Konzentrationen,

die größer als 50 μM waren, keine eingeschränkte Proliferation zeigten. Wichtig wäre die Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation, die, verglichen mit dem Ausgangsinhibitor, ein differenzielles Bindungsmuster aufweisen und somit die Inhibierung des Proteins nach dem Auftreten von Mutationen noch weiter gewährleisten sollen. Ein erfolgreiches Beispiel ist dabei der Bcr-Abl-Inhibitor Gleevec, von dem bereits Inhibitoren der zweiten und dritten Generation existieren, die ein verändertes Bindungsverhalten aufweisen. Deren Entwicklung basierte auf mathematischen Modellen die die Mutationsfrequenz des Tumortyps mit einbezogen. Die gleichzeitige Behandlung von drei unterschiedlichen Inhibitoren kann die Entstehung von Resistenzen unterdrücken und einen heterogenen Tumor erfolgreich zur Regression bringen (Kantarjian *et al.*, 2011).

Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang war weiterhin, ob verschiedene c-Met-abhängige Zellen während der Behandlung mit dem gleichen Inhibitor eine vergleichbare Veränderung durchlaufen, um resistent zu werden. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die Lungenkrebszelllinie EBC1, die eine Resistenz gegenüber der Substanz PF-04217903 entwickelt hat, ebenfalls sequenziert (Daten nicht gezeigt). In dieser Subzelllinie konnte jedoch keine Mutation im c-Met-Gen identifiziert werden. Des Weiteren zeigte diese Zelllinie auf Proteinebene eine dosisabhängige Inhibition der Phosphorylierung nach Behandlung mit den c-Met-Inhibitoren. Dies unterstreicht die Annahme, dass es viele verschiedene Ursachen für die Entwicklung von Resistenzen gibt, was die Stellung einer Prognose im Vorfeld der Behandlung schwierig erscheinen lässt.

Da Mutationen aber definitiv einen hohen Stellenwert in der Klinik haben werden und insbesondere die Mutation D1246N bereits in unbehandelten Krebspatienten nachgewiesen werden konnte, und zusätzlich immer die Möglichkeit einer primären Resistenz aufgrund von anderen bereits vorhandenen Mutationen gegeben ist, wäre es in Hinblick auf einen optimalen therapeutischen Effekt ratsam, den c-Met-Mutationsstatus im Tumormaterial der Patienten vor Therapiebeginn analysieren zu lassen.

4.2 Alternative Behandlungsmöglichkeiten für resistente Zellen durch Kombinationstherapien

4.2.1 Duale Blockierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden

Mit Hilfe der im ersten Teil der Arbeit erbrachten Hinweise auf Veränderungen in den resistenten Zellen sollten Kombinationsstrategien entwickelt und evaluiert werden, um eine Durchbrechung der Resistenz gegen die c-Met-Inhibitoren durch einen Zellzyklusarrest oder durch eine Initiierung der Apoptose erreichen zu können. Zum Einsatz kamen dabei Zweierkombinationen, wobei zum einen die c-Met-Inhibitoren mit anderen Signaltransduktions-Inhibitoren oder mit Zytostatika kombiniert wurden. Der kombinatorische Einsatz mehrere Inhibitoren scheint in dem Fall, wenn mehrere Kinasen überexprimiert sind, für einen dauerhaften Therapieerfolg ratsam zu sein. So konnten bereits durch die Kombination aus dem EGFR-Inhibitor Iressa und dem c-Met-Inhibitor PHA-665752 ein additiver Effekt in NSCLC-Zellen erzielt werden, wenn beide Kinasen überexprimierter waren (Engelman *et al.*, 2007). Da Engelman mutmaßte, dass die Resistenz gegen die EGFR-Inhibitoren durch eine c-Met-induzierte Aktivierung von ErbB3 vermittelt wird, konnte dementsprechend nur durch eine kombinierte Therapie eine Wachstumsinhibierung erwartet werden. Qi *et al.*, konnten außerdem zeigen, dass bei der Margenkrebszelllinie SNU638, die resistent gegenüber dem c-Met-Inhibitor Pf-2341066 war eine verstärkte Aktivierung des EGFR aufgrund einer Überexpression des Liganden TGF α vorlag. Diese Zellen konnten ebenfalls aus einer Kombinationsbehandlung mit einem EGFR-Inhibitor positiven Nutzen ziehen (Qi *et al.*, 2011). Bei einer Phase II-Studie, bei der die kombinatorische Wirksamkeit von dem anti-c-Met-Antikörper MetMab und Erlotinib evaluiert wurde, konnte, verglichen mit der Kombination von Erlotinib mit einem Placebo-Präparat, eine signifikant verlängerte Überlebensrate der NSCLC-Patienten von 4,6 auf 12,6 Monate erzielt werden (Spigel *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit wurde daher in einem ersten Ansatz zunächst die Kombination von den c-Met-Inhibitoren mit dem EGFR-Inhibitor Iressa überprüft. Dabei konnte jedoch kein Effekt auf das Zellwachstum der resistenten Zellen beobachtet werden, wenngleich die Zelllinie MKN-45 R50 EMD 1204831 eine 2-fach erhöhte Expression des EGFR auf mRNA-Ebene zeigte. Da sowohl die Mono- als auch die Kombinationstherapie keinen antiproliferativen Effekt erzielen vermochte, wurde die Theorie über eine ausschließlich durch den EGFR vermittelten Resistenz, auch in dieser Zelllinie falsifiziert.

Aufgrund der bereits diskutierten Rolle, die dem IGF-1R bei der Krebsentstehung zukommt, gibt es bereits einige Studien, die die duale Inhibition des IGF-1R mit anderen Rezeptoren untersucht haben. So veröffentlichte Browne *et al.*, dass die duale Inhibition des IGF-1R und des ErbB2 zu einer verbesserten Sensitivität in ErbB2-positiven Brusttumoren gegenüber Herceptin führt (Browne *et al.*, 2011). Auch konnte bereits gezeigt werden, dass eine kompensatorische Hochregulation des IGF-1R während der Behandlung mit anti-EGFR-Therapeutika möglich ist. Dies führt zu einer Aktivierung des ErbB3 mit einer daraus resultierenden Aktivierung ErbB3/Akt-Signalweges (Desbois-Mouthon *et al.*, 2009).

Da ein Crosstalk zwischen dem IGF-1R und c-Met ebenfalls möglich sein könnte, wurde im nächsten Schritt die Wirkung einer dualen Blockade des c-Met- und des IGF-1R-Signalweges getestet. Aufgrund der Amplifikation und Überexpression des IGF-1R schien ein Effekt vor allem auf den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 denkbar zu sein. Leider konnten auch hier die Erwartungen nicht erfüllt werden. Die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 zeigte zwar, verglichen mit der parentalen Linie MKN-45 und den anderen resistenten Zellen, den stärksten Effekt auf die Proliferation, dieser war jedoch erst bei hohen Inhibitorkonzentrationen erreicht, wodurch unspezifische Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden können. Eine weitere Erklärung dafür könnte jedoch auch sein, dass der Inhibitor, welcher intern entwickelt wurde, aber aus verschiedenen Gründen den Sprung in die klinische Phase nicht geschafft hat, nicht potent genug war. Es könnte daher sinnvoll sein, die Experimente entweder mit einem bereits klinisch erprobten IGF-1R-Inhibitor, einem Antikörper oder mittels Knock-Down-Technologien durchzuführen. Hierdurch könnte geklärt werden, ob eine Inhibition des IGF-1R ausreichend ist, um einen Wachstumseffekt zu induzieren und ob einer Amplifikation und Überexpression eine Schlüsselrolle bei der Resistenzvermittlung zugesprochen werden kann.

Aufgrund der starken Expression von KRAS in den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 mit einer einhergehenden Aktivierung des MAPK-Signalweges erscheint es sinnvoll, eben diesen zu blockieren. Da es keine Substanzen gibt, die KRAS direkt inhibieren, sollte mit Hilfe eines Mek-Inhibitors der MAPK-Signalweg inhibiert werden. Der bei einer Monotherapie beobachtete Effekt auf die Proliferation in den parentalen, als auch in den resistenten Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R30 PF-04217903, konnte jedoch durch eine Kombinationstherapie mit den c-Met-Inhibitoren nicht gesteigert werden. Dies könnte bedeuten, dass die kombinierte Blockierung von Mek und c-Met nicht ausreichend ist, um die Resistenz der Zellen durchbrechen zu können. Da KRAS jedoch auch auf den Akt-Signalweg Einfluss nehmen kann, wurde als nächstes die kombinatorische Behandlung mit einem PI3K-Inhibitor getestet.

Jedoch konnte auch die kombinatorische Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 und den c-Met-Inhibitoren abschließend nur als ungenügend bewertet werden. Da eine dauerhafte Aktivierung von Akt, was grundsätzlich ein Marker für das Ansprechen der Zellen auf PI3K-Inhibitoren zu sein scheint, in den Zellen gegeben war, und die Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063 zudem noch eine Überexpression der PI3K aufwies, deutet dies daraufhin, dass der aktivierte PI3K-Signalweg nicht die einzige Ursache für den Resistenzerwerb ist oder aber Akt unabhängig von PI3K von einem anderem Protein aktiviert wird. Die PI3K-unabhängige Aktivierung kann z.B. über eine cAMP-abhängige Aktivierung der PKA oder über Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinasen vermittelt werden (New *et al.*, 2007).

Eine Kombination aus einem PI3K- und einem Mek-Inhibitor konnte jedoch einen deutlichen anti-proliferativen Effekt bewirken (siehe 3.3.4) und unterstreicht somit die Bedeutsamkeit, die dem PI3K- und dem MAPK-Signalweges beigemessen werden muss. Es scheinen demnach alle resistenten Zelllinien eine gewisse Abhängigkeit von beiden Signalwegen zu haben, da die Inhibierung nur eines Signalweges keinen signifikanten Effekt hatte. Diese Ergebnisse werden durch Publikationen von Haagensen *et al.* unterstützt, die nach der kombinierten Behandlung mit dem dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 und dem Mek-Inhibitor AZD6244 eine synergistische Wachstumsinhibierung erzielen konnten Haagensen *et al.*, 2012). Dieser Therapieansatz wird auch in einer derzeitig laufenden klinischen Studie nachgegangen, bei der die Kombination des PI3K-Inhibitor GDC-0941 in Kombination mit dem Mek-Inhibitor GDC-0973 bei soliden Tumoren getestet wird (ASCO 2010, Abstract #2541 von der Firma Roche).

Aufgrund einer Reihe von Veröffentlichungen, die besagen, dass die vermehrte Expression des IGF-1-Rezeptors mit einer Aktivierung des PI3K-Signalweges und einer gleichzeitigen Cisplatin-Resistenz korreliert, erschien eine kombinatorische Behandlung mit dem PI3K- und dem IGF-1R vielversprechend. Dabei konnte jedoch kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation ausgemacht werden. Dies untermauert weiter die Hypothese, dass die Auswahl des IGF-1R-Inhibitors noch einmal zu überdenken ist.

4.2.2 Kombinationsbehandlungen mit Zytostatika

Da keine der zuvor getesteten Inhibitoren alleine oder in Kombination einen durchschlagenden Effekt auf das Wachstum der resistenten Zellen auszuüben vermochte, und die Standardbehandlung von Magenkrebspatienten i.d.R. eine Chemotherapie beinhaltet, wurden die Zellen zunächst einzeln und später in Kombination mit Inhibitoren auf

ihre Sensitivität bezüglich etablierter Zytostatika getestet (Wagner *et al.*, 2006). Dabei sollte durch die direkte Inhibierung verschiedenen Signalwege und dem Eingreifen in den Stoffwechsel der Zellen eine vermehrte Apoptose in den Zellen induziert werden. Nach der zunächst erfolgten Behandlung mit den Substanzen Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU), verabreicht als Einzelsubstanz oder kombiniert, wurde deutlich, dass beide die Proliferation der Zellen nicht signifikant inhibieren konnten, wobei beim kombinierten Einsatz beider Zytostatika ein additiver Effekt beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung deckte sich mit der Aussage von Rougier, der im Rahmen einer klinischen Studie zeigte, dass lediglich 43-45% aller Magenkrebspatienten einen positiven Nutzen aus der Therapie ziehen können (Rougier *et al.*, 1994 und Park und Lenz, 2006). Viele Studien beschäftigen sich daher mit der Erprobung von Kombinationstherapien. So wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen beispielsweise ein gesteigerter antiproliferativer Effekt auf Kopf-Halskarzinomzellen nach der kombinatorischen Behandlung mit Cisplatin und dem Bcr-Abl-Inhibitor Imatinib beschrieben (Wang-Rodriguez *et al.*, 2006; Yerushalmi *et al.*, 2007). In Xenograft-Modellen, denen MKN-45-Zellen transplantiert wurden, konnte bei der kombinierten Behandlung von Cisplatin und dem COX-2-Inhibitor JTE-522, sowie bei einer Kombinationsbehandlung mit 5-FU und dem Angiogenese-Inhibitor TNP-470, ein antiproliferativer Effekt beobachtet werden (Sugiura *et al.*, 2003 und Nishimura *et al.*, 2008). Die kombinierte Behandlung mit Iressa und 5-FU von NSCLC-Zellen, die eine erworbene Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren haben und c-Met amplifiziert sind, konnte in Xenograft-Modellen positiv bewertet werden (Okabe *et al.*, 2009).

Erste Versuche lieferten jedoch Hinweise, dass der kombinierte Einsatz von Cisplatin bzw. 5-FU mit einem c-Met-Inhibitor keinen Vorteil gegenüber der Monotherapie ergibt. Dieses Ergebnis war auf den resistenten Zellen nicht überraschend, da die Einzeltherapie mit den Zytostatika bereits keine signifikanten Effekte erzielen konnten, und die Zellen bereits nicht mehr von c-Met abhängig sind. Beeindruckende dosisabhängige antiproliferative Effekte konnten jedoch nach der Kombinationsbehandlung mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 beobachtet werden. Sowohl die Kombination mit Cisplatin als auch mit 5-FU zeigte auf allen resistenten und auf der parentalen Zelllinie einen deutlichen additiven Effekt. Ein vergleichbar gutes Ansprechen konnte bei Kombination von Cisplatin und dem Mek-Inhibitor beobachtet werden, wenn auch nur auf der Zelllinie MKN-45 R8 EMD 1214063. Diese Ergebnisse korrelieren mit ersten Hinweisen, dass der eingesetzte PI3K-Inhibitor GDC-0941 eine vermehrte Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Platin- und Taxan-basierten Zytostatika auszulösen vermag. Einen Zellzyklusarrest und eine vermehrte Apoptose-Induktion konnte außerdem von Zou *et al.* nach der kombinierten Blockierung des PI3K- und MAPK-Signalweges durch die Inhibitoren GDC-0941 und dem Mek-Inhibitor U0126 beobachtet werden (Zou *et al.*, 2012). Als mögliche Ursache für diesen Effekt kann eine

veränderte Regulation des Zellzyklus oder die vermehrte Expression von pro-apoptischen Proteinen in Betracht gezogen werden. Ähnliche Effekte wurden bereits bei einer Kombinationsbehandlung mit dem PI3K/mTOR-Inhibitor Rapamycin und dem Pyrimidinanaloga Gemcitabin beschrieben (Okada *et al.*, 2007). Des Weiteren veröffentlichten Yoon *et al.* Ergebnisse, die besagten, dass die Inhibierung des PI3K/AKT- oder des MAPK-Signalweges bei gleichzeitiger Gabe von Cisplatin einen positiven Effekt auf Gallengangkrebszellen, die eine erworbene Resistenz gegenüber Cisplatin zeigen, ausübt (Yoon *et al.*, 2011). Auch in diesem Fall war eine Monotherapie mit einem PI3K- oder Mek-Inhibitor nicht ausreichend, um einen antiproliferativen Effekt induzieren zu können. Um abschließend die Ursache der Sensitivität gegenüber der kombinatorischen Behandlung von Cisplatin und dem PI3K-Inhibitor näher charakterisieren zu können, sollten die direkten Auswirkungen der Behandlung auf die Zellen untersucht werden. In Frage kommen dabei z.B. Zellzyklus- und Apoptoseanalysen. So könnten erste Hinweise gewonnen werden, ob sich die Zellen lediglich in einem Zellzyklusarrest befinden, in die Apoptose gegangen sind oder eventuell einen Apoptose-unabhängigen Zelltod, z.B. durch Autophagie, erfahren haben. Dies könnte helfen, die in dieser Arbeit dargestellten Daten besser verstehen zu können und somit einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung von Strategien zur Durchbrechung von Resistenzen gegenüber Therapien mit c-Met-Inhibitoren leisten zu können.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ursachen für die Entwicklung einer sekundären Resistenz gegenüber c-Met-Inhibitoren sehr vielfältig sein können. Es konnten mit drei verschiedenen c-Met-Inhibitoren resistente Zellen generiert werden, bei denen mindestens zwei verschiedene Mechanismen für die Resistenzbildung verantwortlich zu sein scheinen. Dabei war in der Zelllinie MKN-45 R30 PF-04217903 die Entstehung einer Mutation innerhalb der Kinasedomäne von c-Met (D1246N), die das Bindungsverhalten von c-Met-Inhibitoren der Klasse I verhindert, ausreichend, um der Zelle die Proliferation unter dem Druck des Inhibitors weiter gewährleisten zu können. Bei den Zelllinien MKN-45 R8 EMD 1214063 und MKN-45 R50 EMD 1204831 waren vermutlich mehrere Ereignisse an der Ausbildung der Resistenz beteiligt. Die wichtigste Rolle schienen dabei die Überexpression des KRAS-Wildtypproteins und die Amplifikation mit einhergehender Überexpression des IGF-1R zu spielen. Durch die Expression dieser Proteine konnte eine dauerhafte c-Met-unabhängige Aktivierung des PI3K- und des MAPK-Signalweges weiterhin gewährleistet werden. Unklar blieb zunächst, wodurch die starke Expression von KRAS verursacht wurde, da eine Mutation oder die Amplifikation des Gens bereits ausgeschlossen werden konnten. Gesichert scheint aber die Vermutung zu sein, dass die c-Met-unabhängige Aktivierung des PI3K- und des MAPK-Signalweges die beiden Hauptkomponenten bei der Resistenzentwicklung zu sein scheinen. Eine vollständige Durchbrechung der Resistenz mit einer Kombinationsbehandlung aus PI3K- und Mek-Inhibitoren konnte zwar nicht gezeigt werden, jedoch bestätigten erste zufriedenstellende Effekte die Relevanz dieser Signalwege in den resistenten Zelllinien und geben Hoffnung, dass sich diese Resultate langfristig optimieren und auf die Klinik übertragen lassen. Die Bestimmung des Mutationsstatus von KRAS im Vorfeld einer Behandlung erscheint zumindest in Patienten mit Magenkrebs sinnvoll. Da Biomarker jedoch häufig indikationsabhängig sind, und in dieser Arbeit nur eine Magenkarzinomzelllinie untersucht wurde, ist eine Voraussage für andere Tumore lediglich spekulativ. Ob KRAS der Status eines prädiktiven Biomarkers für die c-Met-Inhibitortherapie zugesprochen werden kann, muss sich deshalb im Laufe der Zeit erst noch erweisen. Das außergewöhnlich gute Ansprechen aller resistenten Zellen auf die Wirkstoffkombination Cisplatin bzw. 5-FU und dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 unterstreicht jedoch einmal mehr die Rolle, die dem PI3K-Signalweg zugesprochen werden muss, zeigt aber gleichzeitig auch, dass die gerichtete Blockierung einer Komponente innerhalb der Zelle oft nicht ausreichend ist, um einen optimalen Effekt erzielen zu können.

Ausgehend von den vielversprechenden experimentellen Ergebnissen der Kombinationsbehandlung stellte sich die Frage, ob die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Klinik

übertragen werden können. Da dies zum gegenwärtigen Zeitpunkt der Forschung nicht abschließend zu beantworten ist, empfehlen sich im nächsten Schritt *in vivo* Studien mit Xenograft-Modellen, bei denen nach Transplantation der generierten resistenten Zellen zunächst die Entstehung von resistenten Tumoren etabliert werden muss. Nach einer daraufhin folgenden Behandlung mit den Kombinationsansätzen und einer Analyse der Tiere hinsichtlich Tumorregression und Überleben sollte eine Evaluierung und Bestätigung der Befunde in weiteren Tumormodellen erfolgen. Mit diesem Vorgehen sollte es leichter fallen die klinische Relevanz der Kombinationstherapie, vor allem mit der Kombination Cisplatin bzw. 5-FU mit einem PI3K-Inhibitor, bewerten zu können.

Abschließend sollte jedoch bedacht werden, dass Tumore extrem heterogen, komplex und vielfältig in ihrer Biologie sind. In den drei während dieser Arbeit generierten Zelllinien konnten mindestens zwei verschiedene Mechanismen identifiziert werden, die für den Erwerb von Resistenzen gegen c-Met-Inhibitoren resistent sind. Auch wenn alle Zelllinien ähnlich gut auf die kombinatorische Behandlung mit Cisplatin bzw. 5-FU und dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 reagiert haben, ist es denkbar, dass in der Klinik entstehende Tumore kein vergleichbares Verhalten zeigen, da sie einen möglicherweise völlig anderen Mechanismus nutzen, um ihr Überleben zu sichern.

Literaturverzeichnis

An Y, Cai Y, Guan Y, Cai L, Yang Y, Feng X, Zheng J (2010). Inhibitory effect of small interfering RNA targeting insulin-like growth factor-I receptor in ovarian cancer OVCAR3 cells. *Cancer Biother Radiopharm.* (5):545-52.

Arteaga CL (2007). HER3 and mutant EGFR meet MET. *Nat Med.* (6):675-7.

Bachleitner-Hofmann T, Sun MY, Chen CT, Tang L, Song L, Zeng Z, Shah M, Christensen JG, Rosen N, Solit DB, Weiser MR (2008). HER kinase activation confers resistance to MET tyrosine kinase inhibition in MET oncogene-addicted gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther.* (11):3499-508.

Bardelli A, Longati P, Gramaglia D, Basilico C, Tamagnone L, Giordano S, Ballinari D, Michieli P, Comoglio PM (1998). Uncoupling signal transducers from oncogenic MET mutants abrogates cell transformation and inhibits invasive growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (24):14379-83.

Baserga R, Resnicoff M, Dews M (1997). The IGF-I receptor and cancer. *Endocrine.* (1):99-102.

Baserga, R (1995). The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth. *Cancer Res.* (55):249–252.

Bayascas JR, Alessi DR (2005). Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell.* (2):143-5.

Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC, Neuville A, Meyer N, Guerin E, Legrain M, Mennecier B, Wihlm JM, Massard G, Quoix E, Oudet P, Gaub MP (2008). MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort. *J Thorac Oncol.* (4):331-9.

Bellon SF, Kaplan-Lefko P, Yang Y, Zhang Y, Moriguchi J, Rex K, *et al.* (2008). c-Met inhibitors with novel binding mode show activity against several hereditary papillary renal cell carcinoma-related mutations. *J BiolChem.* (283):2675–83.

Benvenuti S, Frattini M, Arena S, Zanon C, Cappelletti V, Coradini D, Daidone MG, Pilotti S, Pierotti MA, Bardelli A (2008). PIK3CA cancer mutations display gender and tissue specificity patterns. *Hum Mutat.* (2):284-8.

Bianco,R., Shin,I., Ritter,C.A., Yakes,F.M., Basso,A., Rosen,N., Tsurutani,J., Dennis,P.A., Mills,G.B., and Arteaga,C.L (2003). Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* (22):2812-2822.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (12):915-25.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* (2):197-250.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* (6543):768-71.

- Boccaccio C, Comoglio PM (2006). Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer*. (8):637-45.
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P (2009). Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. (5):663-71.
- Browne BC, Crown J, Venkatesan N, Duffy MJ, Clynes M, Slamon D, O'Donovan N (2011). Inhibition of IGF1R activity enhances response to trastuzumab in HER-2-positive breast cancer cells. *Ann Oncol*. (1):68-73.
- Brugger W, Thomas M (2012). EGFR-TKI resistant non-small cell lung cancer (NSCLC): New developments and implications for future treatment. *Lung Cancer*.
- Cantley (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. (296):1655–1657.
- Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, Del Grammastro M, Sciarrotta MG, Buttitta F, Incarbone M, Toschi L, Finocchiaro G, Destro A, Terracciano L, Roncalli M, Alloisio M, Santoro A, Varella-Garcia M (2009). Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. (10):1667-74.
- Cepero V, Sierra JR, Corso S, Ghiso E, Casorzo L, Perera T, Comoglio PM, Giordano S. (2010). MET and KRAS gene amplification mediates acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res*. (19):7580-90.
- Chalhoub N, Zhu G, Zhu X, Baker SJ (2009). Cell type specificity of PI3K signaling in Pdk1- and Pten-deficient brains. *Genes Dev*. (14):1619-24.
- Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci USA*. (3):1091-6.
- Christensen JG, Burrows J, Salgia R (2005). c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett*. (1):1-26.
- Cioce V, Csaky KG, Chan AM, Bottaro DP, Taylor WG, Jensen R, Aaronson SA, Rubin JS (1996). Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity. *J Biol Chem*. (22):13110-5.
- Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L (2008). Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov*. (6):504-16.
- Cooper,C.S., Park,M., Blair,D.G., Tainsky,M.A., Huebner,K., Croce,C.M., and Vande Woude,G.F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*. (311):29-33.
- Corso S, Ghiso E, Cepero V, Sierra JR, Migliore C, Bertotti A, Trusolino L, Comoglio PM, Giordano S (2010). Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition. *Mol Cancer*. (9):121.
- Corso S, Migliore C, Ghiso E, De Rosa G, Comoglio PM, Giordano S (2008). Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. *Oncogene*. (5):684-93.

- Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM (2000). Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res.* (1):34-41.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G. J. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily (2001). *Lipid Res.* (7):1007-17.
- Desbois-Mouthon C, Baron A, Blivet-Van Eggelpoël MJ, Fartoux L, Venot C, Bladt F, Housset C, Rosmorduc O (2009). Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition induces a resistance mechanism via the epidermal growth factor receptor/HER3/AKT signaling pathway: rational basis for cotargeting insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* (17):5445-56.
- Dharmawardana PG, Giubellino A, Bottaro DP (2004). Hereditary papillary renal carcinoma type I. *Curr Mol Med.* (8):855-68.
- Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboué R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T (2007). Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer.* (8):1166-9.
- Di Renzo MF, Olivero M, Serini G, Orlandi F, Pilotti S, Belfiore A, Costantino A, Vigneri R, Angeli A, Pierotti MA, *et al* (1995). Overexpression of the c-MET/HGF receptor in human thyroid carcinomas derived from the follicular epithelium. *J Endocrinol Invest.* (2):134-9.
- Di Renzo MF, Poulson R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR (1995). Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* (5):1129-38.
- Diermeier S, Horváth G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szöllosi J, Brockhoff G (2005). Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res* (2):604-19.
- Eckstein N, Servan K, Hildebrandt B, Pölit A, von Jonquières G, Wolf-Kümmeth S, Napierski I, Hamacher A, Kassack MU, Budczies J, Beier M, Dietel M, Royer-Pokora B, Denkert C, Royer HD (2009). Hyperactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor I Signaling Pathway Is an Essential Event for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* (7):2996-3003.
- Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM (2009). Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* (7):2207-14.
- Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, Lifshits E, Borrás AM, Gale CM, Naumov GN, Yeap BY, Jarrell E, Sun J, Tracy S, Zhao X, Heymach JV, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA (2006). Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest.* (10):2695-706.
- Engelman JA, Settleman J (2008). Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev.* (1):73-9.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* (316):1039-43.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Janne PA (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* (316):1039-1043.

Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, Alix S, Baker SJ, Box G, Chuckowree IS, Clarke PA, Depledge P, Eccles SA, Friedman LS, Hayes A, Hancox TC, Kugendradas A, Lensun L, Moore P, Olivero AG, Pang J, Patel S, Pergl-Wilson GH, Raynaud FI, Robson A, Saghir N, Salphati L, Sohal S, Ultsch MH, Valenti M, Wallweber HJ, Wan NC, Wiesmann C, Workman P, Zhyvoloup A, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ (2008). The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem.* (18):5522-32.

Fry, A. M., T. Mayor, P. Meraldi, Y. D. Stierhof, K. Tanaka and E. A. Nigg (1998). CNap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycleregulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol.* (7):1563-74.

Gandino L, Munaron L, Naldini L, Ferracini R, Magni M, Comoglio PM (1991). Intracellular calcium regulates the tyrosine kinase receptor encoded by the MET oncogene. *J Biol Chem.* (24):16098-104.

Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM (2008). The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* (1):85-94.

Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Ofverstedt LG, Miguel RN, Blundell TL, Vande Woude GF, Skoglund U, Svergun DI (2006). Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci USA.* (11):4046-51.

Giamas G, Stebbing J, Vorgias CE, Knippschild U (2007). Protein kinases as targets for cancer treatment. *Pharmacogenomics.* (8):1005-16.

Giordano S, Maffe A, Williams TA, Artigiani S, Gual P, Bardelli A, Basilico C, Michieli P, Comoglio PM (2000). Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties. *FASEB J.* (2):399-406.

Gonzatti-Haces M, Park M, Dean M, Blair DG, Vande Woude GF (1988). The human met oncogene is a member of the tyrosine kinase family. *Princess Takamatsu Symp.* (17):221-32.

Gonzatti-Haces M, Seth A, Park M, Copeland T, Oroszlan S, Vande Woude GF (1988). Characterization of the TPR-MET oncogene p65 and the MET protooncogene p140 protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1):21-5.

Guillard S, Clarke PA, Te Poele R, Mohri Z, Bjerke L, Valenti M, Raynaud F, Eccles SA, Workman P (2009). Molecular pharmacology of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition in human glioma. *Cell Cycle.* 2009 Feb 1;8(3):443-53.

Haagensen EJ, Kyle S, Beale GS, Maxwell RJ, Newell DR (2012). The synergistic interaction of MEK and PI3K inhibitors is modulated by mTOR inhibition. *Br J Cancer.*

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* (5):646-74.

Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Trakhtenbrot L, Kerem B (2002). A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell.* (1):89-97.

Hill CS, Treisman R (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* (2):199-211.

Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M, Kelsen DP, Chaganti RS (1990). Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res.* (19):6417-22.

Huang E, Ishida S, Pittman J, Dressman H, Bild A, Kloos M, D'Amico M, Pestell RG, West M, Nevins JR (2003). Gene expression phenotypic models that predict the activity of oncogenic pathways. *Nat Genet.* (2):226-30.

Huh CG, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* (13):4477-82.

Imada T, Rino Y, Takahashi M, Amano T, Kusada O, Kitaura K (1997). *In vitro* combination effect of 5-fluorouracil and cisplatin on the proliferation, morphology and expression of Ki-67 antigen in human gastric cancer cells. *Anticancer Drugs.* (10):1000-6.

Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, Kan Z, Dbouk HA, Peters BA, Waring P, Dela Vega T, Kenski DM, Bowman KK, Lorenzo M, Li H, Wu J, Modrusan Z, Stinson J, Eby M, Yue P, Kaminker JS, de Sauvage FJ, Backer JM, Seshagiri S (2009). Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer Cell.* (6):463-74.

Jeffrey A. Engelman, Toru Mukohara, Kreshnik Zejnullahu, Eugene Lifshits, Ana M. Borrás, Christopher-Michael Gale, George N. Naumov, Beow Y. Yeap, Emily Jarrell, Jason Sun, Sean Tracy, Xiaojun Zhao, John V. Heymach, Bruce E. Johnson, Lewis C. Cantley, Pasi A. Jänne (2006). Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest.* (10):2695–2706.

Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC (2000). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *Biol Chem.* (12):8806-11.

Jo, M., Stolz, D.B., Esplen, J.E., Dorko, K., Michalopoulos, G.K., and Strom, S.C. (2000). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J. Biol. Chem.* (275):8806-8811.

Kakkar T, Ma M, Zhuang Y, Patton A, Hu Z, Mounho B (2007). Pharmacokinetics and safety of a fully human hepatocyte growth factor antibody, AMG 102, in cynomolgus monkeys. *Pharm Res* (24):1910–8.

Komada M, Hatsuzawa K, Shibamoto S, Ito F, Nakayama K, Kitamura N (1993). Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett.* (1-2):25-9.

Kantarjian HM, Baccarani M, Jabbour E, Saglio G, Cortes JE (2011). Second-generation tyrosine kinase inhibitors: the future of frontline CML therapy. *Clin Cancer Res.* (7):1674-83.

Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG (2009). Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors. *Lancet Oncol.* (7):709-17.

Kataoka H, Miyata S, Uchinokura S, Itoh H. (2003). Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer Metastasis Rev.* (22):223-36.

Knudsen BS, Vande Woude G (2008). Showering c-MET-dependent cancers with drugs. *Curr Opin Genet Dev.* (1):87-96.

Kondo N, Tsukuda M, Ishiguro Y, Kimura M, Fujita K, Sakakibara A, Takahashi H, Toth G, Matsuda H (2010). Antitumor effects of lapatinib (GW572016), a dual inhibitor of EGFR and

HER-2, in combination with cisplatin or paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* (4):957-63.

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouysségur J (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem.* (34):20608-16.

Liu X, Newton RC, Scherle PA (2009). Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges. *Trends Mol Med.* (1):37-45.

Lokker, N.A., M.R. Mark, E.A. Luis, G.L. Bennett, K.A. Robbins, J.B. Baker, and P.J. Godowski (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *Embo J.* (11): 2503-10.

Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM (1994). Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene.* (1):49-57.

Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M (2001). Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst.* (24):1852-7.

M Park, M Dean, K Kaul, M J Braun, M A Gonda, and G Vande Woude (1987). Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (84):6379-6383.

Ma PC, Tretiakova MS, Mackinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S, *et al.* (2008). Expression and muta-tional analysis of MET in human solid cancers. *Genes, Chrom Cancer* (47):1025-37.

Ma YY, Qi XF, Song SJ, Zhao ZY, Zhu ZD, Qi J, Zhang X, Xiao HS, Teng Y, Han ZG (2005). cDNA microarray reveals signaling pathways involved in hormones expression of human pituitary. *Gen Comp Endocrinol.* (2):184-92.

Ma,P.C., Maulik,G., Christensen,J., and Salgia,R. (2003). c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* (22):309-325.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science.* (5600):1912-34.

Maritano D, Accornero P, Bonifaci N, Ponzetto C (2000). Two mutations affecting conserved residues in the Met receptor operate via different mechanisms. *Oncogene.* (10):1354-61.

Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK (1993) Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol.* (143):949–958.

Martens T, Schmidt NO, Eckerich C *et al.*: A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth *in vivo* (2006). *Clin. Cancer Res.* (20):6144–6152.

Mazzone M, Comoglio PM (2006). The Met pathway: master switch and drug target in cancer progression. *FASEB J.* (10):1611-21.

Merchant M, Zhang Y-W, Su Y, *et al.* Combination efficacy with MetMAb and erlotinib in a NSCLC tumor model highlight therapeutic opportunities for c-Met inhibitors in combination with EGFR inhibitors. Presented at 99th AACR Annual Meeting; 2008 Apr 12–16; San Diego (CA): Abstr 1336.

Miller CT, Lin L, Casper AM, Lim J, Thomas DG, Orringer MB, Chang AC, Chambers AF, Giordano TJ, Glover TW, Beer DG (2006). Genomic amplification of MET with boundaries within fragile site FRA7G and upregulation of MET pathways in esophageal adenocarcinoma. *Oncogene*. (3):409-18.

Morandell S, Stasyk T, Skvortsov S, Ascher S, Huber LA (2008). Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics*. (21):4383-401.

Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells *Cancer Res*. (23):11118-28.

Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T (2000). Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest*. (12):1511-9.

Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K (2011). Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol*. (1):188-202.

Nakamura, T., K. Nawa, A. Ichihara, N. Kaise, and T. Nishino. 1987. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett*. (224):311-6.

Nakamura, T., K. Nawa, and A. Ichihara. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*. (122):1450-9.

Nakamura, T., T. Nishizawa, M. Hagiya, T. Seki, M. Shimonishi, A. Sugimura, K. Tashiro, and S. Shimizu (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*. (342):440-3.

Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, *et al* (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J*. 1991 Oct;10(10):2867-78.

Nam HJ, Chae S, Jang SH, Cho H, Lee JH (2010). The PI3K-Akt mediates oncogenic Met-induced centrosome amplification and chromosome instability. *Carcinogenesis*. (9):1531-40.

New D.C, Wu K, Kwok A.W, Wong Y.H (2007). G-protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis, *FEBS J*. (274):6025-6036

Nishimura K, Ohno M, Chung-Kang C, Kuroda Y (2008). Anti-tumor effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 and 5-FU combined therapy on human gastric cancer xenograft. *Hepatogastroenterology*. (82-83):774-8.

Okabe T, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Hatashita E, Yamada Y, Yoshida T, Nishio K, Fukuoka M, Jänne PA, Nakagawa K (2009). Addition of S-1 to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines with MET amplification. *Clin Cancer Res*. (3):907-13.

Okada T, Sawada T, Kubota K (2007). Rapamycin enhances the anti-tumor effect of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Hepatogastroenterology*. 2007 Oct-Nov;54(79):2129-33.

- Pan BS, Chan GK, Chenard M, Chi A, Davis LJ, Deshmukh SV, *et al.*(2010). MK-2461, a novel multitargeted kinase inhibitor, preferentially inhibits the activated c-Met receptor. *Cancer Res.* (70):1524–33.
- Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* (3):e73.
- Park DJ, Lenz HJ. Determinants of chemosensitivity in gastric cancer (2006). *Curr Opin Pharmacol.* (6):337–44.
- Park S, Jung HH, Park YH, Ahn JS, Im YH (2011). ERK/MAPK pathways play critical roles in EGFR ligands-induced MMP1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* (4):680-6.
- Pei D (2005). Matrix metalloproteinases target protease-activated receptors on the tumor cell surface. *Cancer Cell* 2005 (7):207–208.
- Pelicci, G., S. Giordano, Z. Zhen, A.E. Salcini, L. Lanfrancone, A. Bardelli, G. Panayotou, M.D. Waterfield, C. Ponzetto, P.G. Pelicci, and P.M. Comoglio (1995). The mitogenic and mitogenetic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene.* (10):1631–1638.
- Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature.* (6877):187-90.
- Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, Della Valle G, Abate ML, Vaula G, Comoglio PM (1991). c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene.* (4):553-9.
- Ponzetto C, Zhen Z, Audero E, Maina F, Bardelli A, Basile ML, Giordano S, Narsimhan R, Comoglio P (1996). Specific uncoupling of GRB2 from the Met receptor. Differential effects on transformation and motility. *J Biol Chem.* (24):14119-23.
- Ponzetto, C., A. Bardelli, Z. Zhen, F. Maina, Z.P. Dalla, S. Giordano, A. Graziani, G. Panayotou, and P.M. Comoglio (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell.* (77):261 271.
- Qi J, McTigue MA, Rogers A, Lifshits E, Christensen JG, Jänne PA, Engelman JA (2011). Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer Res.* 71(3):1081-91.
- Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Carozzi F, Giordano S, Ponzetto C, Comoglio PM, Saglio G (1992). Karyotypic analysis of gastric carcinoma cell lines carrying an amplified c-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet.* (2):170-3.
- Ricardo Perez-Tomas (2006). Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. *Curr Med Chem.* (16):1859-76.
- Riggins, R. B., Thomas, K. S., Ta, H. Q., Wen, J., Davis, R. J., Schuh, N. R., Donelan, S. S., Owen, K. A., Gibson, M. A., Shupnik, M. A., Silva, C. M., Parsons, S. J., Clarke, R. and Bouton, A. H (2006). Physical and functional interactions between Cas and c-Src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b. *Cancer Res* (14): 7007-15.

Rong S, Oskarsson M, Faletto D, Tsarfaty I, Resau JH, Nakamura T, Rosen E, Hopkins RF 3rd, Vande Woude GF (1993). Tumorigenesis induced by coexpression of human hepatocyte growth factor and the human met protooncogene leads to high levels of expression of the ligand and receptor. *Cell Growth Differ.* (7):563-9.

Rougier Ph, Ducreux M, Mahjoubi M, Pigmon JP, Bellefqih S, Oliveira J, *et al.*(1994). Efficacy of combined 5-fluorouracil and cisplatin in advanced gastric carcinomas. A phase II trial with prognostic factor analysis. *Eur J Cancer.* (30):1263–9.

Rubin BP, Duensing A (2006). Mechanisms of resistance to small molecule kinase inhibition in the treatment of solid tumors. *Lab Invest.* (10):981-6.

Ruoslahti E (1996). How cancer spreads. *Sci Am.* (3):72-7.

Sattler M, Reddy MM, Hasina R, Gangadhar T, Salgia R (2011). The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy. *Ther Adv Med Oncol.* (4):171-84.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* (3):183-232.

Santoro MM, Collesi C, Grisendi S, Gaudino G, Comoglio PM (1996). Constitutive activation of the RON gene promotes invasive growth but not transformation. *Mol Cell Biol.* (12):7072-83.

Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, Lubensky I, Neumann HP, Brauch H, Decker J, Vocke C, Brown JA, Jenkins R, Richard S, Bergerheim U, Gerrard B, Dean M, Linehan WM, Zbar B (1999). Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene.* (14):2343-50.

Shannon KM (2002). Resistance in the land of molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell.* (2):99-102.

Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL 3rd, Sweeney C (2008). Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res.* (5):1471-7.

Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, Bates SE, Shen T, Ashby CR Jr, Fu LW, Ambudkar SV, Chen ZS (2007). Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res.* (22):11012-20.

Shimomura T, Miyazawa K, Komiyama Y, Hiraoka H, Naka D, Morimoto Y, Kitamura N (1995). Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem.* (229):257–261.

Shu S, Li X, Yang Y, Zhang Y, Li T, Liang C, Wan J (2011). Inhibitory effect of siRNA targeting IGF-1R on endometrial carcinoma. *Int Immunopharmacol.* (2):244-9.

Sleijfer S, Wiemer E, Seynaeve C, Verweij J (2007). Improved insight into resistance mechanisms to imatinib in gastrointestinal stromal tumors: a basis for novel approaches and individualization of treatment. *Oncologist.* (6):719-26.

Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H *et al.* (2008). Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA- 665752. *Proc Natl Acad Sci USA.* (103):2316–21.

Soman NR, Wogan GN, Rhim JS (1990). TPR-MET oncogenic rearrangement: detection by polymerase chain reaction amplification of the transcript and expression in human tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2):738-42.

Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C (1993). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its recep-tor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* (123):223-35.

Spigel D. R, Ervin T. J, Ramlau R, Daniel D. B, J. H. Goldschmidt, G. R. Blumenschein, M. J. Krzakowski, G. Robinet, C. Clement-Duchene, F. Barlesi, R. Govindan, T. Patel, S. V. Orlov, M. S. Wertheim, J. Zha, A. Pandita, W. Yu, R. L. Yauch, P. H. Patel, A. C. Peterson; Sarah Cannon (2011). Final efficacy results from OAM4558g, a randomized phase II study evaluating MetMab or placebo in combination with erlotinib in advanced NSCLC. Meeting: ASCO Annual Meeting 2011. Abstract No:7505. *J Clin Oncol.* (29):2011

Sugiura T, Saikawa Y, Kubota T, Suganuma K, Otani Y, Watanabe M, Kumai K, Kitajima M (2003). Combination chemotherapy with JTE-522, a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and cisplatin against gastric cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *In vivo.* (3):229-33.

Sunaga N, Shames DS, Girard L, Peyton M, Larsen JE, Imai H, Soh J, Sato M, Yanagitani N, Kaira K, Xie Y, Gazdar AF, Mori M, Minna JD (2011). Knockdown of oncogenic KRAS in non-small cell lung cancers suppresses tumor growth and sensitizes tumor cells to targeted therapy. *Mol Cancer Ther.* (2):336-46.

Tanizaki J, Okamoto I, Sakai K, Nakagawa K (2011). Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification. *Br J Cancer.* (6):807-13.

Tannapfel A, Wittekind C (2002). Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Arch.* (4):345-52.

Tiedt R, Degenkolbe E, Furet P, Appleton BA, Wagner S, Schoepfer J, Buck E, Ruddy DA, Monahan JE, Jones MD, Blank J, Haasen D, Drueckes P, Wartmann M, McCarthy C, Sellers WR, Hofmann F (2011). A drug resistance screen using a selective MET inhibitor reveals a spectrum of mutations that partially overlap with activating mutations found in cancer patients. *Cancer Res.* (15):5255-64.

Timofeevski SL, McTigue MA, Ryan K, Cui J, Zou HY, Zhu JX, Chau F, Alton G, Karlicek S, Christensen JG, Murray BW (2009). Enzymatic characterization of c-Met receptor tyrosine kinase oncogenic mutants and kinetic studies with aminopyridine and triazolopyrazine inhibitors. *Biochemistry.* (23):5339-49.

Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (12):834-48.

Tsantoulis PK, Kotsinas A, Sfikakis PP, *et al.* (2008). Oncogene-induced replication stress preferentially targets common fragile sites in preneoplastic lesions. A genome-wide study. *Oncogene* (27):3256–64.

Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature.* (6516):702-5.

- Ueno H., H. Nakamura, M. Inoue, K. Imai, M. Noguchi, H. Sato, M. Seiki, Y. Okada (1997). Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas, *Cancer Res.* (57):2055–2060.
- Vigna E, Gramaglia D, Longati P, Bardelli A, Comoglio PM (1999). Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET. *Oncogene* (29):4275-81.
- Vigna E, Naldini L, Tamagnone L, Longati P, Bardelli A, Maina F, Ponzetto C, Comoglio PM (1994). Hepatocyte growth factor and its receptor, the tyrosine kinase encoded by the c-MET proto-oncogene. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. (5):597-604.
- von Wichert G, Jehle P, Hoeflich A *et al.* (2000). Insulin-like Growth Factor-I Is an Autocrine Regulator of Chromogranin A Secretion and Growth in Human Neuroendocrine Tumor Cells. *Cancer Res.* (60):4573-4581.
- Vizoso F.J, Gonzalez L.O, Corte M.D, Rodriguez J.C, Vazquez J, Lamelas M.L, Junquera S, Merino A.M, Garcia-Muniz J.L. (2007). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer, *Br. J. Cancer.* (96):903–911.
- Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE (2006). Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol.* (24):2903–9.
- Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ, Gibson KH (2002). ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res.* (20):5749-54.
- Wang-Rodriguez J, Lopez JP, Altuna X, Chu TS, Weisman RA, Ongkeko WM (2006). STI-571 (Gleevec) potentiates the effect of cisplatin in inhibiting the proliferation of head and neck squamous cell carcinoma *in vitro*. *Laryngoscope.* (8):1409-16.
- Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* (6605):173-6.
- Weisberg E, Manley P, Mestan J, *et al* (2006). AMN107 (nilotinib): A novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J. Cancer.* (94):1765–9.
- Wilkinson MG, Millar JB (2000). Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J.* (14):2147-57.
- Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ (2001). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* (27):3944–56.
- Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, Gondi V, Hsu KT, Harari PM (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene.* (28):3944-56.
- Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL (2002). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.* (14):4132-41.
- Yao Z, Okabayashi Y, Yutsudo Y, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M (2002). Role of Akt in growth and survival of PANC-1 pancreatic cancer cells. *Pancreas.* (1):42-6.

Yerushalmi R, Nordenberg J, Beery E, Uziel O, Lahav M, Luria D, Fenig E (2007). Combined antiproliferative activity of imatinib mesylate (STI-571) with radiation or cisplatin *in vitro*. *Exp Oncol.* (2):126-31.

Yoon H, Min JK, Lee JW, Kim DG, Hong HJ (2011). Acquisition of chemoresistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activation of AKT and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2. *Biochem Biophys Res Commun.* (3):333-7.

Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, Meyerson M, Eck MJ (2008). The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (6):2070-5. Epub 2008 Jan 28.

Zou HY, Li Q, Lee JH, Arango ME, McDonnell SR, Yamazaki S, Koudriakova TB, Alton G, Cui JJ, Kung PP, Nambu MD, Los G, Bender SL, Mroczkowski B, Christensen JG (2007). An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, Pf-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res.* (9):4408-17.

Zou HY, Li Q, Lee J, Arango M, Burgess K, Qiu M, Engstrom L, Yamazaki S, Parker M, Timofeevski S, Cui JJ, McTigue MA, Los G, Bender SL, Smeal T, Christensen JG (2012). Sensitivity of Selected Human Tumor Models to PF-04217903, a Novel Selective c-Met Kinase Inhibitor. *Mol Cancer Ther.*

Zou ZQ, Zhang LN, Wang F, Bellenger J, Shen YZ, Zhang XH (2012). The novel dual PI3K/mTOR inhibitor GDC-0941 synergizes with the MEK inhibitor U0126 in non-small cell lung cancer cells. *Mol Med Report.* (2):503-8.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Andreas Trumpp herzlich danken, dass er sich bereit erklärt hat, als Erstgutachter meine Doktorarbeit zu bewerten. Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Stefan Wiemann für sein Interesse an meiner Arbeit und die wissenschaftliche Unterstützung, sowie für die Übernahme des Zweitgutachters.

Ich danke der Firma Merck Serono in Darmstadt für die großzügige Unterstützung und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in einem tollen Umfeld anzufertigen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Andree Blaukat und Herrn Dr. Friedhelm Blatt für die gute wissenschaftliche Betreuung und die Bereitschaft mich jederzeit bei meinen Vorhaben zu unterstützen. Besonders danken möchte ich Ihnen für die Ermöglichung meines USA-Aufenthalts.

Janet Ogden und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme in ihr Labor in Boston und die Unterstützung bei den Kombinationsstudien. Für die gute Zusammenarbeit bei den Affymetrixstudien möchte ich Herrn Dr. Hans-Jürgen Grote und Melanie Kühnl danken. Dr. Tobias Haas und Sebastian Drehmann danke ich für die engagierte Durchführung der Sequenzierungen. Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Eike Staub und der Abteilung Bioinformatics, die die Auswertung der bioinformatischen Daten übernommen haben. Ebenso danke ich Frau Edith Dicks für die Unterstützung bei den HPLC-Analysen.

Der gesamten Abteilung *TA Oncology* danke ich für kollegiale Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft in allen Situationen. Ein besonders herzlicher Dank gilt hierbei Herrn Frank Jährling der mich immer unterstützt hat und mir mit vielen guten Ratschlägen geholfen hat.

Für die unvergesslich schöne Zeit in den letzten Jahren danke ich besonders meinen Kollgen des Doktorandenlabors: Elena Kilian, Felicity Rudge, Friederike Sander, Katharina Bergmann und Ralf Reiners, sowie meinen beiden Praktikanten Lisa Isernhinke und Anna Riemer, die mich tatkräftig unterstützt haben. Ihr alle habt mehr als nur mein tägliches Laborleben bereichert. Danke dafür!