

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie und
Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)

**Die Wirkung von Inhibitoren des EGFR- und mTOR-
Signalwegs auf kleinzellige Bronchialkarzinome und
Chordome in vitro.**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Simon Giertz
aus Fockbek

Hamburg, 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.12.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Heinz-Eckart Laack

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung	6
2 Einleitung	7
2.1 Das Bronchialkarzinom	7
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	7
2.1.2 Klassifikation.....	7
2.1.3 Staging und Stadieneinteilung.....	9
2.2 Das kleinzellige Bronchialkarzinom	13
2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	13
2.2.2 Diagnostik.....	13
2.2.3 Therapie.....	14
2.3 Das Chordom	18
2.3.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	18
2.3.2 Klassifikation.....	19
2.3.4 Diagnostik.....	19
2.3.5 Therapie.....	20
2.4 Erlotinib	22
2.5 Everolimus	23
3 Material und Methoden	26
3.1 Material	26
3.1.1 Zelllinien.....	26
3.1.2 Medikamente.....	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Zellkultur.....	27
3.2.2 Zellzahlbestimmung.....	27
3.2.3 XTT- Proliferationsassay.....	28
3.2.4 Erstellung der Eichkurven.....	28
3.2.5 Zellproliferationsassay mit Zusatz von Erlotinib und Everolimus.....	31
3.2.6 Statistische Analyse.....	31
3.2.7 Immunhistochemische Färbung.....	32
4 Ergebnisse	34
4.1 Übersicht	34

4.2 Proliferationsassay	34
4.2.1 Monotherapie	35
4.2.2 Kombinationstherapie.....	39
4.3 Immunhistochemische Färbung	43
5 Diskussion	45
6 Zusammenfassung	51
7 Literaturverzeichnis	52
8 Danksagungen	61
9 Lebenslauf	62
10 Eidesstattliche Erklärung	63

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
APUD	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
ATP	Adenosintriphosphat
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GHD	Gesamtherddosis
Gy	Gray
HER	Human epidermal growth factor receptor
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
IG	Immunglobulin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NOS	not otherwise specified
PBS	phosphat buffered saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PDGFR	Plateled-derived growth factor receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standard error of the mean
STAT3	Signal transducer and Activator of transcription 3
TBS	Tris-buffered saline
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TNB	Tetrazolium nitroblue
WHO	World Health Organisation
VALG	Veterans Administraion Lung Study Group
XTT	tetrazolium salt

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Bronchialkarzinom ist ein aggressiv wachsender, schnell metastasierender Tumor. Knapp anderthalb Millionen Menschen sterben jährlich an den Folgen dieses hoch malignen Tumors. Die heutigen Therapieformen sind nicht sehr erfolgsversprechend und die 5-Jahres-Überlebensrate ist unverändert schlecht. Diese beiden Tatsachen machen das Suchen nach neuen effektiveren Therapieformen notwendig.

Auch beim Chordom ist die Suche nach verbesserten (nicht-chirurgischen) Therapien sinnvoll, da operative Entfernungen an den typischen Erscheinungsorten des Chordoms im Bereich der Wirbelsäule schwerwiegende Folgen bei Schädigungen der Nachbarstrukturen haben können.

In vielen Studien wurde der stark antiproliferierende Effekt der beiden Medikamente Erlotinib und Everolimus beschrieben, deren Ansatzpunkte der EGF-Rezeptor bzw. mTOR ist. Im Vergleich zur Monotherapie zeigte die Kombination beider Medikamente eine noch effektivere Wachstumshemmung der untersuchten Zellen.

Aus diesem Grund galt es in dieser Arbeit folgende Fragen zu klären:

- Haben die Medikamente Erlotinib und Everolimus einen antiproliferatorischen Effekt auf kleinzellige Bronchialkarzinomzellen und Chordomzellen in vitro?
- Bei welchen Zelllinien ist dieser Effekt am höchsten bzw. welche Medikamentenkonzentrationen und -kombinationen sind am effektivsten?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Expression des EGR-Rezeptors bzw. mTORs und dem wachstumshemmenden Effekt?

2 Einleitung

2.1 Das Bronchialkarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Bronchialkarzinom ist weltweit der häufigste maligne Tumor des Mannes und der vierthäufigste der Frau. Als Krebstodesursache steht dieser Tumor bei Männern an Platz eins, bei Frauen an Platz zwei (Jemal et al., 2011).

Im Jahr 2008 machte das Bronchialkarzinom bezogen auf alle neu entdeckten Krebserkrankungen einen Anteil von 13% (1,6 Millionen) aus. 18% (1,4 Millionen) aller Todesfälle durch Krebserkrankungen gehen auf das Bronchialkarzinom zurück (Jemal et al., 2011). Mit einer durchschnittlichen Gesamt-5-Überlebensrate von ca. 10–15 % ist die Prognose seit vielen Jahren unverändert schlecht (Becker, 2010).

Haupttrisikofaktor für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms ist das inhalative Rauchen von Zigaretten (Ezzati et al., 2005). Dabei ist der kausale Zusammenhang zwischen Rauchen und Bronchialkarzinom durch eine Fülle epidemiologischen Studienmaterials fest etabliert (Becker, 2010). Die Dauer und Häufigkeit des Zigarettenkonsums korreliert mit der Häufigkeit des Auftretens eines Bronchialkarzinoms. Zur Risikoeinschätzung eines Patienten gibt es die sogenannten "Packungsjahre". Ein Packungsjahr entspricht dem Zigarettenkonsum von 20 Zigaretten pro Tag für ein Jahr. Bei mehr als 40 Packungsjahren liegt das Risiko an einem Bronchialkarzinom zu erkranken 60 bis 70 mal höher als bei einem Nichtraucher (Henne-Bruns et al., 2007). Mit einem Anteil von 1% sind berufliche Karzinogenexpositionen für die Bildung dieses Karzinoms verantwortlich. Insbesondere die Exposition mit Asbest, Radon und Quarzstäuben sind als berufliche Risikofaktoren anzuführen. Kommen die berufliche Exposition und das Rauchen zusammen, lässt sich durch synergistische Effekte ein noch höheres Risiko beobachten (Arasteh et al., 2009).

2.1.2 Klassifikation

Das Bronchialkarzinom lässt sich in verschiedene histomorphologische Subtypen unterteilen. Eine weltweit gültige Klassifikation hat die World Health Organisation (WHO) im Jahr 1999 veröffentlicht (Tab. 2.1).

Aufgrund der unterschiedlichen Prognose und Therapierbarkeit ist insbesondere die Unterscheidung zwischen kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC = small cell lung cancer) und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC = non small cell lung cancer) klinisch relevant. Die kleinzelligen Bronchialkarzinome werden aufgrund ihrer hohen Chemosensibilität primär mittels Chemotherapie behandelt, während die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome primär operativ entfernt werden.

Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom lässt das histologische Bild kleine, nacktkernig erscheinende, zytoplasmaarme Tumorzellen mit hyperchromatischen und runden bis spindelförmigen Zellkernen erkennen (Junker und Petersen, 2009). Die Tumorzellen gehen vermutlich aus Zellen des APUD Systems hervor, so dass das kleinzellige Bronchialkarzinom als neuroendokriner Tumor eingestuft wird (Onuki et al., 1999). Entsprechend ist das SCLC mit einer erhöhten Rate paraneoplastischer Endokrinopathien assoziiert. Um das kleinzellige Bronchialkarzinom von pulmonalen Lymphominfiltraten unterscheiden zu können, sind immunhistochemische Untersuchungen zur Expression neuroendokriner Marker wie Chromogranin A, Synaptophysin und CD56 (neural cell adhesion molecule, NCAM) geeignet (Junker und Petersen, 2009).

Die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome werden weiter in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzellige Karzinome eingeteilt (Tab. 2.1).

Typ	Subtyp	Anteil an allen Bronchialkarzinomen
Plattenepithelkarzinom	<ul style="list-style-type: none"> • papilläres Plattenepithelkarzinom • klarzelliges Plattenepithelkarzinom • kleinzelliges Plattenepithelkarzinom • basaloides Plattenepithelkarzinom 	30 - 40 %
Adenokarzinom	<ul style="list-style-type: none"> • tubuläres Adenokarzinom • papilläres Adenokarzinom • bronchio-alveoläres Adenokarzinom • solides Adenokarzinom (mit Muzinbildung) • weitere 	30 - 40 %
kleinzelliges Karzinom	<ul style="list-style-type: none"> • kombiniert kleinzelliges Karzinom 	20 - 30 %
großzelliges Karzinom	<ul style="list-style-type: none"> • großzelliges neuroendokrines Karzinom • basaloides Karzinom • lymphoepitheliales Karzinom • klarzelliges Karzinom • großzelliges Karzinom mit rhabdoidem Phänotyp 	10%

Tab 2.1 Histologische Klassifikation des Bronchialkarzinoms. Nach der Klassifikation der WHO 1999. Anteil an Bronchialkarzinomen (Aebert, 2008)

2.1.3 Staging und Stadieneinteilung

Ein international festgelegtes und reproduzierbares Staging soll zur prognostischen Abschätzung, zur exakten Therapieplanung und aus Gründen der Qualitätssicherung bei allen Tumorpatienten gemacht werden. Die anatomische Ausbreitung des Tumors wird mittels der TNM-Klassifikation festgelegt, welche 1946 von Denoix eingeführt wurde (Mountain, 1997). Bei der Einteilung des Tumorstadiums werden die drei folgenden Komponenten berücksichtigt:

T - Ausdehnung des Primärtumors

N - Fehlen, Vorhandensein und Ausdehnung von regionären Lymphknotenmetastasen

M - Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

Durch Hinzufügen von Ziffern zu diesen drei Komponenten wird das Ausmaß der malignen Erkrankung angezeigt: T1-4; N0-3; M0-1. In Tabelle 2.2 ist die Einteilung des Bronchialkarzinoms nach dem TNM7-Staging-System aufgeführt. Diese siebte Edition der TNM-Klassifikation basiert auf Daten von 81.015 Patienten, die zwischen 1990 und 2000 erhoben wurden (Rami-Porta et al., 2009).

T (Primärtumor)	Tx	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor kann nicht radiologisch oder bronchoskopisch bewertet oder erkannt werden, histopathologisch lassen sich maligne Zellen im Sputum nachweisen
	T0	<ul style="list-style-type: none"> • kein Anhalt für Primärtumor
	Tis	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma in situ
	T1	<ul style="list-style-type: none"> • Größe: $x \leq 3$ cm <ul style="list-style-type: none"> • T1a: $x \leq 2$ cm • T1b: $2 \text{ cm} \leq x \leq 3$ cm • Lokalisation: Lobärbronchus oder weiter distal • lokale Invasion: keine, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura
	T2	<ul style="list-style-type: none"> • Größe: $3 \text{ cm} < x \leq 7$ cm <ul style="list-style-type: none"> • T2a: $3 \text{ cm} < x \leq 5$ cm • T2b: $5 \text{ cm} < x \leq 7$ cm oder weist eines der folgenden Merkmale auf: <ul style="list-style-type: none"> • Lokalisation: Hauptbronchus mit einem Abstand ≥ 2 cm von der Carina • assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilius, aber nicht in der gesamten Lunge • lokale Invasion: Beteiligung der viszeralen Pleura
	T3	<ul style="list-style-type: none"> • Größe: $7 \text{ cm} < x$ oder weist eines der folgenden Merkmale auf: <ul style="list-style-type: none"> • Lokalisation: Hauptbronchus mit einem Abstand < 2 cm von der Carina • assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung der gesamten Lunge • lokale Invasion: direkte Infiltration der Brustwand (einschließlich Tumoren des Sulcus superior), des Zwerchfells, des Nervus phrenicus, des parietalen Perikards oder der mediastinalen Pleura • Satellitentumoren befinden sich im gleichen Lobus wie der Primärtumor

	T4	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor jeder Größe mit Invasion einer der folgenden Strukturen: <ul style="list-style-type: none"> • Mediastinum • Herz • große Gefäße • Trachea • Nervus laryngeus recurrens • Ösophagus • Wirbelkörper • Carina • Satellitentumoren befinden sich in einem ipsilateralen anderen Lobus als der Primärtumor
N (Lymphknoten)	Nx	• regionäre Lymphknoten können nicht bewertet werden
	N0	• kein Befall der regionären Lymphknoten
	N1	• Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten auch bei direkter Invasion in die Lymphknoten
	N2	• Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinalen Lymphknoten
	N3	• Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
M (Fernmetastasen)	M0	• Fernmetastasen nicht nachweisbar
	M1	<ul style="list-style-type: none"> • Fernmetastasen nachweisbar <ul style="list-style-type: none"> • M1a: Satellitentumoren im kontralateralen Lungenlobus, Tumoren mit malignen Pleura- oder Perikardergüssen • M1b: Fernmetastasen in extrapulmonalen Organen

Tab 2.2: TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms. Nach der Klassifikation des TNM7-Lungenkrebs-Staging-System (Lababede, 2011)

Unter Berücksichtigung dieser TNM-Einteilung führte Mountain 1997 eine klinische Stadieneinteilung ein, bei der jedes Stadium verschiedene Ausprägungen des Bronchialkarzinoms mit ähnlichen Prognosen und Therapiemöglichkeiten zusammenfasst (Mountain, 1997). Die hier aufgeführte Einteilung (Tab. 2.3) beruht auf der siebten Edition der TNM-Klassifikation für Bronchialkarzinome (Lababede et al., 2011). Die Werte zur 5-Jahres-Überlebensrate stammen von Rami-Porta et al. (2009) und sind an die neueste Stadieneinteilung adaptiert.

Stadium	TNM	5-Jahres-Überlebensrate	
		Klinische Klassifikation	Pathologische Klassifikation
Occult carcinoma	Tx N0 M0		
0	Tis N0 M0		
IA	T1a/b N0 M0	50%	73%
IB	T2a N0 M0	47%	58%
IIA	T1a/b N1 M0 T2a N1 M0 T2b N0 M0	36%	46%
IIB	T2b N1 M0 T3 N0 M0	26%	36%
IIIA	T(1-3) N2 M0 T3 N1 M0 T4 N0-1 M0	19%	24%
IIIB	T4 N2 M0 T1-4 N3 M0	7%	9%
IV	Jedes T, jedes N, M1	2%	13%

Tab 2.3: Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms. Stadieneinteilung nach Lababede et al. (2011), 5-Jahres-Überlebensrate nach Rami-Porta et al. (2009).

Statt der TNM-Stadieneinteilung wird beim SCLC in der klinischen Praxis die vereinfachte Klassifikation der Veterans Administration Lung Study Group (VALG) in limited disease und extensive disease angewendet (Micke et al., 2002) (Tab. 2.4). Grundlage dieser Einteilung ist die Tumorausbreitung, die der wesentliche Prognose bestimmende Faktor beim SCLC ist.

Klassifikation	Beschreibung
Limited disease	<ul style="list-style-type: none"> • Krankheit ist auf einen Hemithorax beschränkt • mit oder ohne Befall der mediastinalen, kontralateralen oder ipsilateralen supraklavikulären oder Skalenus-Lymphknoten
Extensive disease	<ul style="list-style-type: none"> • Alles, was über den Befall der limited disease hinaus geht

Tab. 2.4: Klassifikation des kleinzelligen Bronchialkarzinoms nach der VALG

2.2 Das kleinzellige Bronchialkarzinom

2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das kleinzellige Bronchialkarzinom macht einen Anteil von 15-20 % unter den Bronchialkarzinomen aus und gilt als rasch wachsender, sehr aggressiver Tumor (Simon und Wagner, 2003; Turrisi et al., 1999). Seine Entstehung ist ebenso wie die des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms eng mit Tabakkonsum assoziiert (Simon und Wagner, 2003).

Im Vergleich zum nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom neigt das kleinzellige Bronchialkarzinom zu früher Metastasenbildung und hat eine hohe Rezidivrate. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei zwei Dritteln der Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom eine extensive disease vor, bei der ein kurativer Therapieansatz nicht mehr möglich ist (De Ruyscher et al., 2006).

Entsprechend ist die Prognose beim SCLC mit einer sehr niedrigen mittleren 5-Jahres-Überlebensrate von 3,5% schlecht (5-Jahres-Überlebensrate limited disease: 4,8% und extensive disease: 2,3%). Unter Therapie beträgt die mediane Überlebenszeit 10 bis 16 Monate beim Vorliegen einer limited disease, bzw. 6 bis 12 Monate bei einer extensive disease (Von Pawel et al., 1999).

2.2.2 Diagnostik

Zu den diagnostischen Mitteln, die zur Erkennung eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms herangezogen werden, gehören Anamnese, klinische Untersuchungen, Labor- und Biopsiediagnostik sowie bildgebende und endoskopische Verfahren (Rivera und Metha, 2007). Effektive Methoden dieses Karzinom frühzeitig zu entdecken fehlen allerdings (Kazarian und Laird-Offringa, 2011).

Symptome treten beim kleinzelligen Bronchialkarzinom relativ spät auf und sind eher unspezifisch. Das intrapulmonale, lokale Wachstum führt zu nicht tumorspezifischen Symptomen wie Husten und Auswurf, chronischen, rezidivierenden Pneumonien und Dyspnoe. Lediglich Hämoptysen/Hämoptoe zeigen mit höherer Wahrscheinlichkeit das Vorliegen eines Bronchialkarzinoms an. Weitere wichtige Symptome sind Thoraxschmerzen, Heiserkeit, obere Einflusstauung, vergrößerte supraklavikuläre Lymphknoten, Knochenschmerzen und pathologische Frakturen, Horner-Syndrom, Fieber und Gewichtsverlust von mehr als 10% des Normalgewichts und paraneoplastische Syndrome (Karazian und Laird-

Offringa, 2011). Diese Symptome sind Folgen der mediastinalen Tumorausbreitung, der Entstehung von Metastasen und/oder der neuroendokrinen Aktivität des Tumors und weisen auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium hin.

Die Röntgen-Thoraxaufnahme in zwei Ebenen ist die Grundlage der Diagnostik, an die sich bei Tumorverdacht standardmäßig eine Computertomografie (CT) anschließt. In speziellen Fällen können weitere bildgebende Verfahren wie Kernspintomografie (MRT), Positronenemissionstomografie-Computertomografie (PET-CT), endobronchiale Sonografie etc. erforderlich sein. Die histopathologische Diagnose kann beim SCLC in der Regel mittels bioptischer oder zytologischer Untersuchungen im Rahmen einer Bronchoskopie gestellt werden, da die Tumoren aufgrund ihres zentralen, hilusnahen Wachstums gut zu erreichen sind. In Einzelfällen ist eine percutane oder endosonographische Feinnadelbiopsie der suspekten Lungenrundherde oder suspekter Lymphknoten notwendig.

Im Rahmen des weiteren Stagings sind ein CT des Thorax und Abdomens, ein CT oder MRT des Schädels, eine Knochenszintigrafie und/oder eine Knochenmarkspunktion obligat.

Weiterhin sind kardiopulmonale sowie laborchemische Untersuchungen als Vorbereitung für die invasive Diagnostik sowie für die Planung des therapeutischen Vorgehens unerlässlich. Die Bedeutung von labordiagnostischen spezifischen Tumormarkern (NSE) des SCLC ist umstritten und allenfalls in der Verlaufs- und Rezidivkontrolle von Bedeutung.

2.2.3 Therapie

Zentrale Therapiemaßnahme beim SCLC ist die Durchführung einer Kombinationschemotherapie, die stadienabhängig durch lokale Therapiemaßnahmen ergänzt wird. Generell wird bei Patienten mit einer limited disease ein kurativer, bei Patienten mit einer extensive disease ein palliativer Therapieansatz verfolgt (Micke et al., 2002).

Operative Eingriffe stellen lediglich im Stadium T1–2, N0–1, M0 eine Behandlungsoption dar, müssen aber immer durch eine Chemotherapie und gegebenenfalls Strahlentherapie ergänzt werden. Eine prophylaktische Schädelbestrahlung senkt dabei die intrazerebrale Rezidivrate und verlängert das Überleben. Eine Therapiealternative in diesen frühen Stadien ist die Durchführung einer Chemostrahlentherapie analog zum Vorgehen bei Patienten mit weiter fortgeschrittener, aber noch lokal begrenzter Erkrankung (Goeckenjan et al., 2010). Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt das SCLC allerdings meist in einem fortgeschrit-

tenen Stadium vor, so dass eine operative Therapie nur bei sehr wenigen Patienten durchgeführt werden kann (Cooper und Spiro, 2006).

Patienten mit bestrahlungsfähiger Tumorausdehnung in Stadien höher als T2 oder N1 sollen eine kombinierte Chemostrahlentherapie erhalten (Raez et al., 2005; Kurup und Hanna 2004; Aisner und Abrams, 1989; Goeckenjan et al., 2010). Als Therapie der ersten Wahl haben sich vier bis sechs Zyklen Cisplatin in Kombination mit Etoposid bewährt (Raez et al., 2005; Ohe, 2004; Kurup und Hanna, 2004; Mascaux et al., 2000; Aisner und Abrams, 1989). Ähnlich gute Ergebnisse liefert Carboplatin in Verbindung mit Etoposid. Bei dieser Therapievariante konnte man eine geringere Übelkeit, weniger Erbrechen und eine erniedrigte Nieren- und Neurotoxizität feststellen (Kosmidis et al., 1994). Bei einer extensive disease werden auch anthrazyklinhaltige Regimes oder Kombinationen aus Topoisomerase-I-Inhibitoren, Taxanen oder Gemcatibin plus Cisplatin bzw. Carboplatin eingesetzt. Die Wahl des jeweiligen Chemotherapieregimes hängt dabei auch vom Leistungsindex und den Vorerkrankungen des individuellen Patienten ab.

Ein neuer Therapieansatz mit Irinotecan und Cisplatin gibt Hoffnung für eine Verbesserung der Therapierbarkeit des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Dieser hatte im Vergleich zur Therapie mit Cisplatin und Etoposid eine mediane Überlebensrate von 12,8 statt 9,4 Monaten aufzuweisen. Die 2-Jahres-Überlebensrate lag bei der Therapie mit Irinotecan und Cisplatin bei 19,5% im Vergleich zu 5,2% bei der Etoposide-Cisplatin-Therapie (Noda et al., 2002).

Bei bestrahlungsfähiger Tumorausbreitung sollte die Bestrahlung mit dem ersten oder zweiten Zyklus der Chemotherapie beginnen und zweimal täglich für einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen durchgeführt werden bei einer GHD von 45Gy (Raez et al., 2005).

Bei allen Patienten mit Remission nach Induktionstherapie sollte zur Vorbeugung eine Bestrahlung im Kopfbereich stattfinden (prophylactic cranial irradiation) (Ohe, 2004; Raez et al., 2005; Kurup und Hanna, 2004). Bei Patienten mit Fernmetastasen muss geprüft werden, ob eine konsolidierende Primärtumorbestrahlung oder eine symptomorientierte palliative Bestrahlung erforderlich ist.

Die Behandlung des SCLC wird dadurch erschwert, dass der Tumor Resistenzen gegen die Chemotherapeutika entwickeln kann (Triller et al., 2006). Um dem entgegenzuwirken wurde mehreren Ansätzen nachgegangen wie z. B. Erhöhung der Dosis (Cohen et al., 1977), Verkürzung der Zeitintervalle zwischen den Medikamentengaben (Souhami et al., 1994), Schutz des Knochenmarks durch GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor), Therapien mit sehr hohen Dosen und anschließender Reinfusion von Knochenmark, welches vor der Behandlung entnommen wurde (Harper und Souhami,

1985). All diese Versuchsansätze zeigten keine signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate und konnten zudem aufgrund von hämatologischen Nebeneffekten der hoch dosierten Chemotherapeutika nicht immer ausgeführt werden (Sekine et al., 2003). Ohnehin vertragen Patienten mit einer extensive disease eine Erhöhung der Dosis nur sehr schlecht (Ihde et al., 1994).

In einer Studie wurde eine Gruppe von Patienten mit konventionellen Dosen von Cisplatin, Cyclophosphamid, Etoposid und Doxorubicin im Wechsel mit Bestrahlung des Thorax behandelt. Die andere Gruppe wurde in gleicher Weise behandelt mit dem Unterschied, dass die Konzentrationen von Cyclophosphamiden und Cisplatin im ersten Behandlungszyklus um 20% erhöht wurden. Die zweite Gruppe wies dabei eine 2-Jahres-Überlebensrate von 43% statt 26% wie bei der konventionell behandelten Gruppe auf (Arrigada et al., 1993).

Trotz der hohen Chemosensibilität der meisten Patienten mit SCLC in der Initialtherapie, der sogenannten First-Line Therapie, tritt bei ca. 80% der Patienten mit limited disease und nahezu allen Patienten mit extensive disease ein Rezidiv auf (Hurwitz et al., 2009; Kurup und Hanna, 2004).

In einer Studie zur Untersuchung der Rezidivhäufigkeit, wurde herausgefunden, dass der Zeitpunkt des Rezidivs abhängig von dem Ansprechen der Therapie war. Die Ergebnisse wurden in die Remissiongrade komplette Remission (cr), partielle Remission (pr) und no chance (nc) eingeteilt und mit den entsprechenden Neigungen zur Rezidivbildung aufgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Remissionsgrad	Kriterien	Rezidiv
Komplette Remission (cr)	<ul style="list-style-type: none"> • Alle extranodalen Herde verschwunden • Alle Lymphknoten sind im Durchmesser < 10 mm 	<ul style="list-style-type: none"> • Erste 6 Monate rezidivfrei • Zwischen dem 6. -8. Lag eine geringe Zunahme der Rezidive • Ab dem 9. Monat starke Zunahme
Partielle Remission (pr)	<ul style="list-style-type: none"> • Rückgang der Summe aller Herde um $\geq 30\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Erneute Progression innerhalb von 12 Monaten
No chance (nc)	<ul style="list-style-type: none"> • Oder auch stable disease (sd) • Rückgang um < 30% • Keine Zunahme > 20 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Erneute Progression innerhalb von 6 Monaten

Tab 2.5: Rezidivhäufigkeit des kleinzelligen Bronchialkarzinoms Kriterien nach (Eisenhauer et al., 2009), Rezidiv nach (Wolf et al., 1987)

Bei Progression oder Rezidiv des SCLC kommt eine Second-Line Therapie zum Einsatz. Sie ist in der Regel nicht so effektiv wie die First-Line Therapie, wobei der Therapieerfolg von den eingesetzten Medikamenten und ihrer Wirkung auf den Tumor im Rahmen der First-Line Therapie sowie der Länge des progressionsfreien Intervalls abhängt (Huisman et al., 1999). Nichtsdestotrotz wurde gezeigt, dass die Second Linie Therapie die mediane Überlebensdauer von 2,2 auf 5,3 Monate verbessert hat (Sundstrom et al., 2005)

2.3 Das Chordom

2.3.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Chordom ist ein langsam, aber lokal aggressiv und invasiv wachsender maligner Tumor, welcher im Bereich der Schädelbasis und des Kreuzbeins, seltener im Verlauf der Wirbelsäule, auftritt (Diaz und Cusimano, 2011; Pamir und Ozduman, 2008; Walcott et al., 2012). Es entsteht aus den Überresten der fetalen Chorda dorsalis (Notochord) (Pamir und Ozduman, 2008; Chugh et al., 2007).

60% aller Chordome werden am sakralen Ende der Wirbelsäule diagnostiziert, 25% an der Schädelbasis, 10% im zervikalen Bereich der Wirbelsäule und nur 5% im thorakolumbalen Bereich (Fletcher, 2002). Eine ähnliche anatomische Verteilung haben benigne Tumoren der Chorda dorsalis, die bei 20% der Erwachsenen gefunden werden (Yamaguchi et al., 2008). Diese Tatsache lässt vermuten, dass das Chordom aus benignen Tumoren der Chorda dorsalis entsteht (Yamaguchi et al., 2004; Deshpande et al., 2007).

Das Chordom tritt relativ selten auf. Bezogen auf alle malignen Knochentumoren macht es nur einen Anteil von 1-4% aus (McPherson et al., 2006; Boriani et al., 1996; Walcott et al., 2012), wobei die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr bei 0,51 bis 8 pro Millionen Einwohner liegt (Diaz und Cusimano, 2011; McMaster et al., 2001; Dorfman und Czerniak, 1995; Eriksson et al., 1981). Generell sind alle Altersgruppen von einem Chordom betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten mit sakralem Chordom liegt bei ca. 65 Jahren. Bei Chordomen an der Schädelbasis überwiegt der Anteil von Patienten zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (McMaster et al., 2001; Cho et al., 2008; Diaz und Cusimano, 2011). Bei den sakralen Chordomen sind Männer doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Hulen et al., 2006; Diaz und Cusimano, 2011).

Fernmetastasen treten relativ spät auf und betreffen zum Zeitpunkt der Diagnose 5-40% aller Patienten (Mc Pherson et al., 2006). Die Mortalität der Chordompatienten wird entscheidend davon beeinflusst, dass dieser Tumor dazu neigt, lokale Rezidive zu bilden (Walcott et al., 2012). Die mittlere Überlebenszeit liegt bei 56 Monaten (bei einer Streuung von 1 bis 171 Monaten), im Fall einer Fernmetastasierung sogar nur bei 11 Monaten (Bjornsson et al., 1993; Baratti et al., 2003). Die Langzeitprognose von Chordompatienten ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 47% und 80% und einer 10-Jahres-Überlebensrate von 16% bis 39% nach wie vor unbefriedigend (Diaz und Cusimano, 2011; Jian et al., 2011; Walcott et al., 2012).

Aufgrund des geringen Vorkommens existieren in der Literatur momentan wenige Studien über das Chordom (Mc Pherson et al., 2006).

2.3.2 Klassifikation

Das Chordom lässt sich nach der Internationalen Klassifikation der Krankheiten für die Onkologie (ICD-O) wie in Tabelle 2.6 dargestellt einteilen.

Subtyp	ICD-O Codes
Chordom NOS	9370/3
Chondroides Chordom	3971/3
Entdifferenziertes Chordom	9372/3

Tab 2.6: Einteilung des Chordoms nach ICD-O der WHO, DIMDI ICD-O 3 (Fletcher, 2002)

Der entdifferenzierte Subtyp hat eine schlechtere Prognose als der chondroide. Das chondroide Chordom ähnelt histologisch sowohl einem niedrig-malignen Chondrosarkom als auch einem Chordom und man findet es ausschließlich an der Schädelbasis. Der entdifferenzierte Typ hingegen kommt ausschließlich am Kreuzbein vor (Freyschmidt, 2010).

2.3.4 Diagnostik

Die klinische Manifestation von Chordomen variiert und hängt von der Lokalisation des Tumors ab. Die Dauer zwischen dem Auftreten der ersten Symptome bis zur Diagnosestellung liegt bei 14 bis 24 Monaten (Diaz und Cusimano, 2011).

Generell sind die häufigsten Beschwerden der Patienten mit Chordom Schmerzen und neurologische Ausfälle. Patienten, die ein Chordom an der Schädelbasis aufweisen, leiden am häufigsten unter Kopfschmerzen, Diplopie, herabgesetzter Sehschärfe und Lähmung des Nervus abducens, da diese Chordome häufig Richtung Clivus wachsen (Forsyth et al., 1993; Colli und Al-Mefty, 2001). Je nachdem welche Hirnnerven geschädigt sind, kommen andere Symptome hinzu.

Kranial oder zervikal gelegene Chordome können bei Ausbreitung gegen die Speicheldrüsen oder den Kiefer stoßen, so dass man fälschlicherweise annehmen könnte, dass der Tumor von diesen Strukturen ausgeht (Radner et al., 2001).

Patienten mit einem sakralen Chordom weisen Schmerzen im Bereich der Lendenwirbelsäule, des Iliosakralgelenks und des Gesäßes auf. Durch Irritationen der segmental austretenden Spinalnerven kann es neben Schmerzen zu sensiblen und motorischen Störungen im Bereich des Beckens und der unteren Extremitäten kommen. Je nach Größe und sakraler Lage des Chordoms können Blasen- und Mastdarmstörungen auftreten (Chandawarkar, 1996).

Folge der Kompression der Spinalnerven oder des Rückenmarks sind bei Patienten mit einem Chordom im Verlauf der Wirbelsäule lokale oder radikuläre Schmerzen und Dysästhesien sowie motorische Störungen, die bis zur Querschnittslähmung reichen können (Choi et al., 2010; Wippold et al., 1999). Große Gewebsvermehrungen im praevertebralen Bereich können auch Brustschmerzen, Dysphagie oder Dyspnoe hervorrufen (Diaz und Cusimano, 2011).

In der Diagnostik kommen insbesondere die Magnetresonanz- und Computertomographie als bildgebende diagnostische Verfahren zur Anwendung (Oot et al., 1988). Das radiologisch typische Bild eines Chordoms ist ein osteolytischer Tumor mit einzelnen Verkalkungen und einer extraossären Weichteilkomponente. Bestätigt wird die Diagnose durch Biopsie und histologische Untersuchung.

Übergroße Reste der Chorda dorsalis, Hamartome oder benigne Tumoren der Chorda dorsalis können auch histologisch nicht immer klar von einem Chordom abgegrenzt werden. Vorsicht ist bei der Entscheidung der einzusetzenden Therapie geboten, um einer Überbehandlung vorzubeugen (Riipel und Michot, 2007).

2.3.5 Therapie

Die Therapie der Wahl ist die radikale chirurgische Resektion mit einer weiten Ausräumung des Tumors im Gesunden, die mit einer besseren Überlebensrate assoziiert ist (Diaz und Cusimano, 2011; Walcott et al., 2012). Je nach der lokalen Ausbreitung können dabei aber neurologische Zentren geschädigt werden, was zu entsprechenden Funktionsausfällen und einer eingeschränkten Lebensqualität führt (Walcott et al., 2012). Weiterhin kann die anatomische Ausdehnung des Chordoms dazu führen, dass eine kurative en-bloc Resektion nicht durchgeführt werden kann (Walcott et al., 2012). 20% der chirurgisch behandelten Patienten entwickeln trotz radikaler Resektion nach einem Jahr ein Rezidiv

(Colli und Al-Mefty, 2001; Diaz und Cusimano, 2011). In der Regel wird eine Strahlentherapie an die chirurgische Behandlung angeschlossen, obwohl das Chordom aufgrund seines langsamen Wachstums eine geringe Strahlensensibilität aufweist und hohe Strahlendosen von über 60 Gy erforderlich sind (Noel et al., 2003). Die Nähe des Bestrahlungsfelds zu vital und funktionell wichtigen Zentren limitiert dabei den Einsatz der konventionellen Hochdosis-Strahlentherapie. Die Einführung der Protonen-Beam-Bestrahlung ermöglicht inzwischen eine optimierte Bestrahlung des Tumors bei weitgehender Schonung des umgebenden Gewebes und wird in vielen Zentren als adjuvante Standardtherapie beim Chordom eingesetzt (Noel et al., 2003; Diaz und Cusimano, 2011; Walcott et al., 2012).

Das Chordom ist nicht sensibel gegenüber konventionellen Chemotherapeutika (Chugh et al., 2007; Jawad und Scully, 2010; Walcott et al., 2012). Molekulare Analysen ergaben, dass Chordome bestimmte Wachstumsfaktoren wie z. B. PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) und EGFR (epidermal growth factor receptor) überexprimieren und mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3) assoziiert sind (Weinberger et al., 2005; Yang et al., 2009). Diese Ergebnisse bilden die Basis für die Entwicklung neuer molekularer Therapien des Chordoms. In einigen Studien konnte ein therapeutischer Effekt von Tyrosinkinase-Inhibitoren und spezifischen EGFR-Inhibitoren beim Chordom nachgewiesen werden (Diaz und Cusimano, 2011; Walcott et al., 2012). Weitere molekulare Therapeutika wie mTOR-Inhibitoren (mammalian target of rapamycin) oder STAT3-Inhibitoren sind Gegenstand laufender Studien und noch nicht abschließend untersucht (Schwab et al., 2009; Yang et al., 2009).

2.4 Erlotinib

Erlotinib ist ein selektiver Inhibitor des EGF (epidermal growth factor)-Rezeptors, einem transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor. Es hemmt die Bindung von Adenosin-Triphosphat (ATP) an die Tyrosinkinase Domäne des Rezeptors, wodurch alle nachgestellten Kaskaden unterbunden werden (Cataldo et al., 2011) (Abb. 2.1).

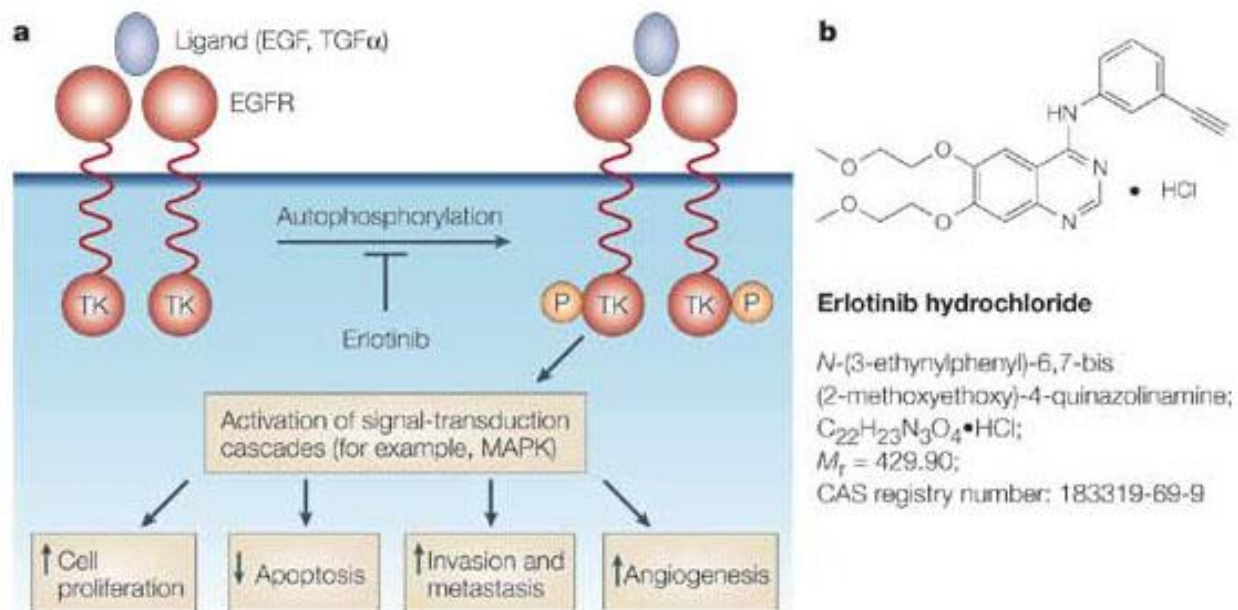


Abb 2.1.: a) Funktionsweise und b) Strukturformel von Erlotinib (modifiziert nach Dowell et al., 2005)

Der EGFR (auch ERBB1 oder HER1) gehört zur ERBB Rezeptorfamilie genauso wie ERBB2 (auch HER2/neu), ERBB3 (auch HER3) und ERBB4 (auch HER4). Die ERBB-Familie wiederum gehört zu der RTK (receptor tyrosine kinase)-Superfamilie (Reid et al., 2007).

Der EGF-Rezeptor findet sich auf nahezu allen Zellen von Säugetieren und reguliert Wachstum, Proliferation und Differenzierung der Zelle, apoptotische Vorgänge sowie Angiogenese (Oda et al., 2005).

Er wird stimuliert durch die endogenen Liganden EGF (epidermal growth factor) und TGF- α (transforming growth factor-alpha), die eine Dimerisation des Rezeptors bewirken. Nach dieser Stimulation wird die intrazelluläre Tyrosinkinase aktiviert, die wiederum den Zellzyklus (Zimmermann et al., 2006) und intrazelluläre Kaskaden wie den MAPK (mitogen-activated protein kinase) und den PI3K (phosphatidylinositol-3-Kinase) Signalwege in Gang setzt (Cataldo et al., 2011). Viele maligne Tumore wie die Karzinome der Lunge,

des Darms, der Ovarien, der Blase, des Kopfes und Halses zeigen eine erhöhte Expression des EGF-Rezeptors (Grandis und Sok, 2004).

Aus diesem Grund wird die Wirkung des selektiven EGFR-Inhibitors Erlotinib in der molekularen Therapie zahlreicher Tumoren untersucht.

Erlotinib ist in Deutschland seit einigen Jahren für die Therapie des fortgeschrittenen NSCLC und des Pankreaskarzinoms zugelassen. Beim NSCLC wird Erlotinib als Second-Line-Therapie nach Versagen der herkömmlichen Chemotherapie eingesetzt. Seit 2011 ist Erlotinib auch für die First-Line-Erhaltungstherapie bei fortgeschrittenem NSCLC zugelassen. Beim nicht resezierbaren Pankreaskarzinom wird Erlotinib mit Gemcitabin als First-Line-Therapie verwendet. Erlotinib wird einmal täglich oral eingenommen.

Als häufigste Nebenwirkung tritt ein schwerer Hautausschlag (rash) auf. Es wurde beobachtet, dass ein vermehrter und länger andauernder Hautausschlag auch zu einem besseren Behandlungsergebnis geführt hat (Wacker et al., 2007). Der genaue Zusammenhang ist allerdings noch nicht bekannt (Pérez-Soler et al., 2005). Weitere Nebenwirkungen sind Diarrhoe, Haarverlust und Mukositis (Herbst et al., 2005; Giaccone et al., 2006).

Der EGF-Rezeptor kann mutieren. Eine bestimmte Mutationsform ist die sogenannte T790M Mutation. Liegt diese vor, kann Erlotinib nicht an der Tyrosinkinase-Domäne des EGFR andocken und die nachgeschalteten Signalkaskaden werden in Gang gesetzt. Die Mutation wurde bei 50% der Patienten nachgewiesen, die während einer Tyrosinkinase-Inhibitorbehandlung einen Rückfall erlitten haben (Bean et al., 2007).

2.5 Everolimus

Everolimus (RAD001) ist ein synthetisches Derivat von Sirolimus (Rapamycin) und gehört zur Klasse der mTOR (mammalian target of rapamycin)-Inhibitoren (Formica et al., 2004) (Abb. 2.2).

MTOR, auch FKBP-Rapamycin-assoziiertes Protein, ist ein Enzym, das bei allen Säugetieren zu finden ist, und zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen gehört (Shaw und Cantley, 2006). MTOR ist ein Schlüsselenzym innerhalb einer der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden, dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg. Dieser Weg reguliert viele

wichtige zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Zellwachstum, Proteinbiosynthese, Apoptose und Angiogenese (Chan, 2004). Der mTOR-Signalweg wird von Faktoren wie Insulin, Wachstumsfaktoren und dem Ernährungsstatus reguliert, wobei ein niedriges Nährstoffangebot mTOR hemmt (Bianco et al., 2008). Die mTOR Überexpression bzw. Aktivierung dieses Signalwegs geht mit einer vermehrten Neoangiogenese und Tumorzellproliferation einher und ist oftmals mit einer Mutation des Tumorsuppressorgens PTEN assoziiert. Eine Überexpression oder Mutationen von Proteinen, die mit dem mTOR Signalweg assoziiert sind, wurde bei zahlreichen Tumoren nachgewiesen (Easton und Houghton, 2006). Daher ist die mTOR-Inhibition ein interessanter therapeutischer Ansatz bei einer Vielzahl von soliden Tumoren sowie auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen (Carew et al., 2011).

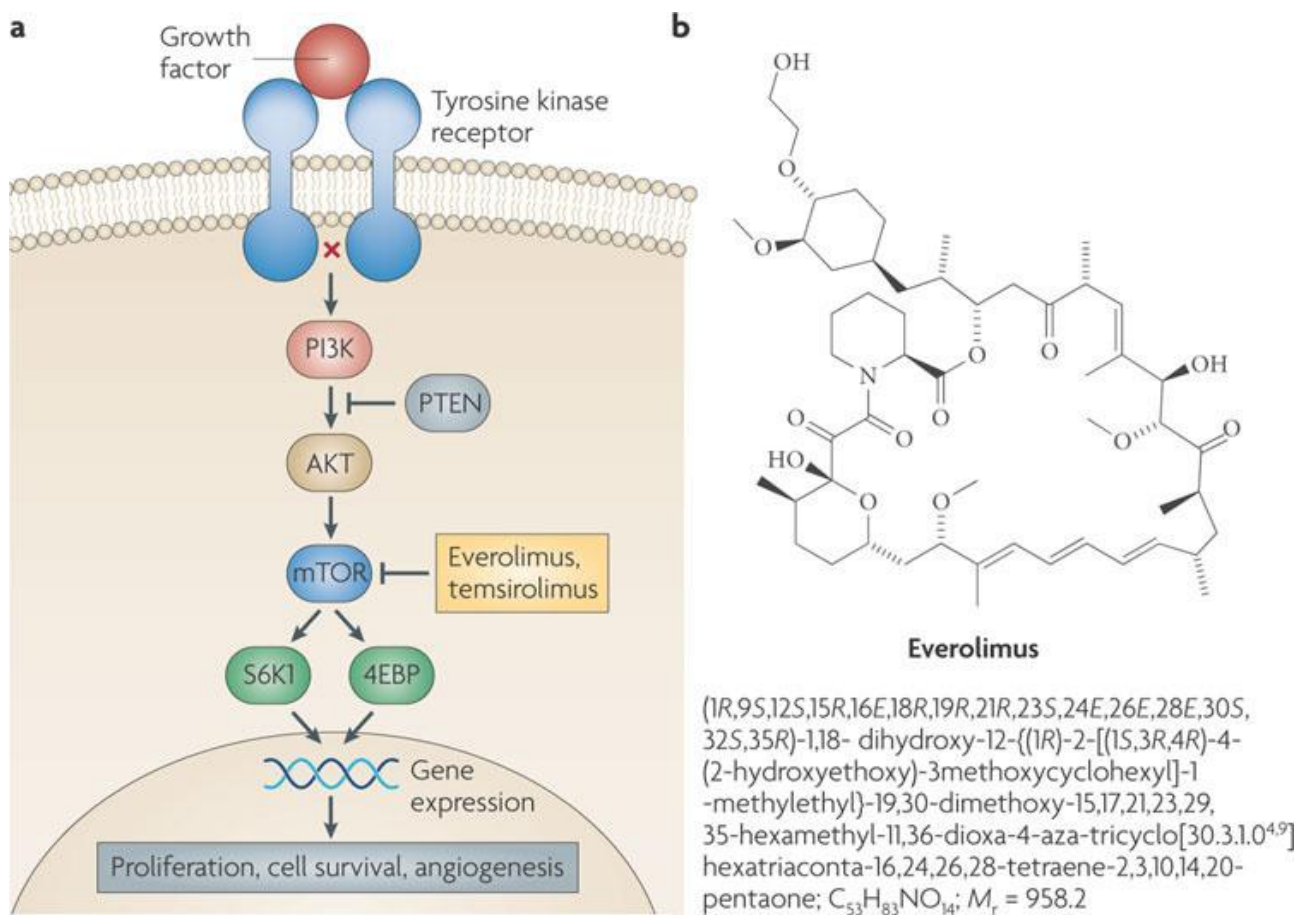


Abb. 2.2: a) Funktionsweise und b) Strukturformel von Everolimus (RAD001) (modifiziert nach Atkins et al., 2009)

Der mTOR-Inhibitor Everolimus bindet zunächst an das im Zytoplasma vorkommende FK506-Bindeprotein-12 (FKBP12). Der entstandene Komplex ist in der Lage den mTOR-Komplex-1 (mTORC1=Raptor) zu inhibieren, einer der Signalkomplexe neben mTOR-Komplex-2 (mTORC2=Rictor), die die mTOR-Kinase regulieren. Dadurch wird die von

mTOR ausgehende Signalkaskade unterbrochen und alle nachgeschalteten Funktionen werden unterbunden (Breuleux, 2009). T-Zellen, Blut- und Lymphgefäßzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen, sowie Tumorzellen reagieren besonders sensitiv auf die Hemmung von mTOR durch Everolimus (Blaser-Kiel, 2007).

Der orale mTOR-Inhibitor Everolimus (RAD001) wurde bereits bei vielen Tumorentitäten im Rahmen klinischer Studien geprüft (Boulay und Lane, 2007). Dabei konnte gezeigt werden, dass Everolimus als Monotherapie einen zytostatischen Effekt aufweist. In Verbindung mit einer Strahlentherapie konnten sogar synergistische Effekte auf das Tumorstadium nachgewiesen werden (Jiang und Liu, 2008). Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom wird Everolimus eingesetzt, wenn sich das Tumorstadium nach zwei Chemotherapien nicht einstellt, der Performance Status der ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) bei 0-2 liegt und eine angemessene Knochenmark-, Leber- und Nierenfunktion besteht (Tarhini et al., 2009). Everolimus ist in der Tumorthherapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms und der neuroendokrinen Tumoren pankreatischen Ursprungs seit 2009 bzw. 2011 als Arzneimittel zugelassen.

Primär wurde Everolimus als Immunsuppressivum bei Organtransplantationen eingesetzt. Es beugt einer Abstoßungsreaktion vor, indem es die Zytokinstimulation der T- und B-Zellaktivierung inhibiert, ein Fortschreiten des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase verhindert und so die Zellproliferation inhibiert. Die häufigsten Nebenwirkungen von Everolimus sind Anämie, Leukopenie, Thrombopenie, Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie, Wundheilungsstörungen, Stomatitis, Pneumonitis etc. (Albiges et al., 2012; Borders et al., 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Die Versuche wurden mit einer Chordom- und fünf kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien (H69, H82, OH1, OH3, SW2) durchgeführt. Die kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Uwe Zangemeister-Wittke von der Universität Bern zur Verfügung gestellt. Die Chordomzellen wurden im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf etabliert.

Bei allen diesen Zellen handelt es sich um Suspensionszellen, es liegt also ein nicht adhären-tes Wachstum vor.

3.1.2 Medikamente

Die oben genannten Zellen wurden im Rahmen der Proliferationsversuche mit den Medikamenten Erlotinib und Everolimus inkubiert.

Erlotinib ist ein selektiver Inhibitor des EGF-Rezeptors und wird von Roche unter dem Handelsnamen Tarceva® vertrieben. Gelöst wurde Erlotinib mit DMSO und PBS zu gleichen Teilen, sodass eine 2 mM Stammlösung mit einem DMSO Anteil von 50% vorlag.

Everolimus ist ein Inhibitor des Proteins mTOR und wird von der Novartis Pharma AG, Basel (CH) vertrieben. Gelöst wurde Everolimus in Ethanol zu einer 10 mM Lösung.

Gelagert wurden die Lösungen bei -20°C im Tiefkühlschrank.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Es wurde ausschließlich unter sterilen Bedingungen an einer Hera Safe Sicherheitsbank (Heraeus Instruments, Deutschland) mit den oben genannten Zellkulturen gearbeitet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei Standardbedingungen (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂-Luftgehalt) in 50 ml Zellkulturflaschen (Nunclon, Nunc, Roskilde, Dänemark) gehalten.

Bei dem Chordom und den Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms handelt es sich um Suspensionszellen. Beim Passagieren wurden die Zellen zunächst resuspendiert. Anschließend wurden 15 ml der Zellsuspension in ein 30 ml Weißkappenröhrchen gegeben und 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das verbrauchte Zellkulturmedium wurde abpipettiert und die Zellen mit frischem Medium aufgeschwemmt. 10 ml dieser Suspension wurden dann in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium gegeben. Als Grundlage des Zellkulturmediums diente RPMI, welches mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin und 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum versetzt wurde.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem CASY-Cell Counter Analyser System (CASY-Technology, Schärfe Systems GmbH, Reutlingen, Deutschland). Hiermit können die Konzentration und die Größenverteilung der vitalen Zellen gemessen werden.

Zunächst werden 100 µl Zellsuspension in 10 ml CASY-Ton gegeben, so dass man eine Verdünnung von 1:100 erhält. Diese Suspension wird von einer Präzisions-Messkanüle eingesogen. Das Gerät unterscheidet vitale von devitalen Zellen mithilfe von elektrischen Widerstandsmessungen. Devitale Zellen haben aufgrund ihrer nicht mehr intakten Zellmembran einen anderen elektrischen Widerstand als vitale Zellen. Mit den gemessenen Widerständen kann zusätzlich die Größe der Zellen bestimmt werden.

Wichtig bei allen Messungen ist, dass die Zellen einzeln durch die Messkanüle gelangen. Deshalb wurden die Zellen vor jeder Messung resuspendiert und durch ein Sieb gegeben.

3.2.3 XTT- Proliferationsassay

Die Vitalität und Proliferationsaktivität der Zellen wurden mittels des XTT-Proliferationsassay bestimmt. Bei diesem Test wird das gelbe Tetrazoliumsalz (XTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen in den orangefarbenen Farbstoff Formazan umgewandelt. Die Umsetzung des XTT ist proportional zu der Anzahl vitaler stoffwechselaktiver Zellen. Der dadurch entstandene Farbumschwung der Suspension konnte mittels ELISA-Reader (Dynatech MR 3.13 Mikroelisa Reader) gemessen werden.

Das Cell Proliferation Kit II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde für die Messungen verwendet. Es wurden 5,0 ml XTT labeling reagent mit 0,1 ml electron coupling reagent gemischt, was einer XTT Endkonzentration von 0,3 mg/ml entspricht. Jeweils 50 µl dieser Mischung wurden pro well in die 96-well-Platte gegeben. Nach 4 bzw. 6 Stunden Inkubation im Brutschrank und entsprechender Umsetzung des XTT konnte die Zellzahl und Vitalität fotometrisch bestimmt werden. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

3.2.4 Erstellung der Eichkurven

Um zu bestimmen, bei welcher Konzentration die Zellen ein optimales exponentielles Wachstumsverhalten aufweisen, wurden für jede Zellreihe (OH1, OH3, SW2, H69, H82, Chordom) Eichkurven erstellt (Abb. 3).

90 µl Zellsuspension unterschiedlicher Konzentrationen wurden jeweils in sechsfach-Ansätzen auf einer 96-well-Platte ausgesät. Zudem wurden sechs wells mit jeweils 90 µl Zellkulturmedium als Leerwert für den ELISA-Reader pipettiert. Dieser Wert wurde benutzt, um den Extinktionsgrad des Mediums zu bestimmen und von den Versuchswerten abzuziehen, so dass das Medium damit fotometrisch neutral war. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank für 24 Stunden unter den bereits beschriebenen Standardbedingungen. Danach wurde in jedes well einer 96-well-Mikrotiterplatte 10 µl DPBS pipettiert. Die Platten wurden für weitere drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Zelldichte mittels des Cell Proliferation Kit II ermittelt und Messungen mit dem ELISA-Reader nach 4 und 6 Stunden gemacht. Alle Daten wurden in ein Diagramm eingetragen, anhand dessen man ermitteln konnte, bei welcher Konzentration ein exponentielles

Wachstum vorliegt. So wurden für alle Zellen die optimale Konzentration und Zeit ermittelt, mit denen der Proliferationsassay durchgeführt werden konnte.

Für alle Zellen wurde die Inkubationszeit von 4 Stunden mit XTT verwendet. Es ergaben sich folgende Zellkonzentrationen:

OH1	80.000 Zellen/ml,
OH3	100.000 Zellen/ml,
H69	200.000 Zellen/ml,
H82	200.000 Zellen/ml,
SW2	120.000 Zellen/ml und
Chordom	50.000 Zellen/ml.

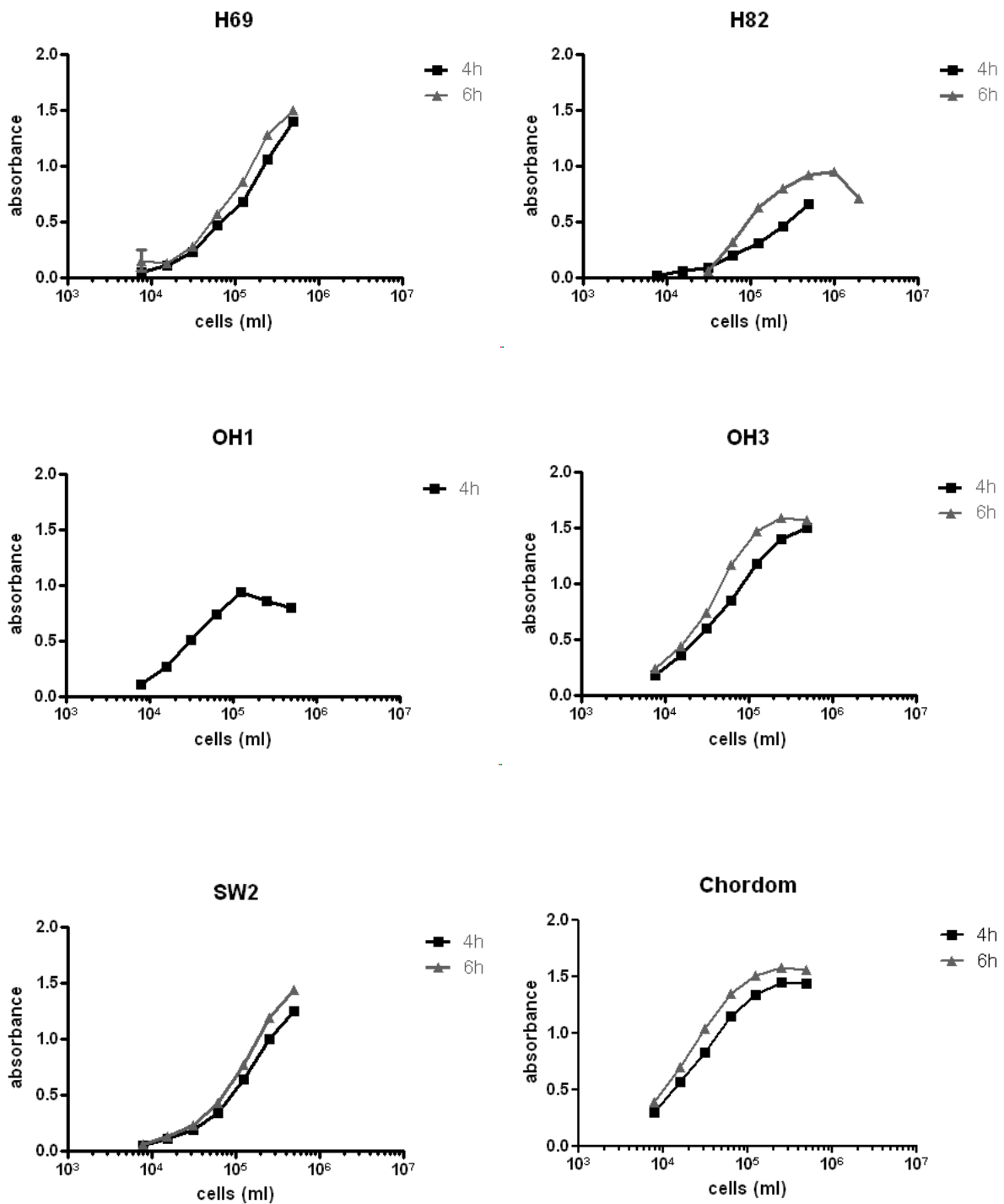


Abb.3: Eichkurven der Bronchialkarzinomzellen H69, H82, OH1, OH3 und SW2 und der Chordomzellen. Aufgeführt ist die Absorption der fotometrischen Messung in Abhängigkeit zur Zellzahlkonzentration.

3.2.5 Zellproliferationsassay mit Zusatz von Erlotinib und Everolimus

Die Zellen wurden auf den Mikrotiterplatten in einem Sechsfachansatz ausgesät. Alle Versuche wurden in mindestens drei unabhängigen Durchläufen wiederholt.

In die ersten sechs wells wurde 90 µl Kulturmedium und 10 µl DPBS als Leerwert gegeben. Die weiteren wells wurden jeweils mit 90 µl Zellsuspension befüllt mit der aus der Eichkurve ermittelten Konzentration. Die Platten wurden 24 Stunden in den Brutschrank gestellt, um bei Standardbedingungen zu proliferieren. Anschließend wurden 10 µl der Medikamente in die wells gegeben. Bei der Monotherapie mit Erlotinib wurden die Konzentrationen 0,5 µM, 1,0 µM, 5,0 µM und 10 µM verwendet. Bei der Monotherapie mit Everolimus 1 nM, 5 nM und 10 nM. Für die Kombinationsversuche, bei denen beide Medikamente verwendet wurden, wurden alle Konzentrationen von Erlotinib und Everolimus kombiniert, so dass man auf 12 Ansätze kam. Um einen möglichen Einfluss der Lösungsmittel auszuschließen wurden bei allen Versuchen Lösungsmittelkontrollen (90 µl Zellsuspension + 10 µl verdünntes Lösungsmittel) mitgeführt. Nach weiteren 72 Stunden wurde das Proliferation Kit II angewandt, um die Proliferation und Vitalität der mit den Medikamenten behandelten Zellen mithilfe des ELISA-Readers zu messen.

3.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der Software Graph Pad Prism 5 (Graph Pad TM, San Diego, USA) durchgeführt.

Die Ergebnisse der XTT-Tests sind als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Extinktion der Lösungsmittelkontrollzellen wurde dabei einer Zellzahl von 100% gleichgesetzt, die Extinktion der behandelten Zellen entsprach dem prozentualen Anteil der Kontrolle. Die Signifikanz der Werte wurde mittels des one-way ANOVA und dem Bonferroni Multiple Comparison Test festgestellt. Ein Wert wurde als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Bevor die Daten diese Tests durchliefen, wurden sie durch eine graphische Analyse auf „Ausreißer“ bewertet. Diese Werte resultierten aus Mess- und methodischen Fehlern und wurden für die Gesamtanalyse der Werte ausgeschlossen.

3.2.7 Immunhistochemische Färbung

Die fünf Bronchialkarzinomzelllinien und die Chordomzellen wurden hinsichtlich des EGF-Rezeptors und mTOR immunhistochemisch untersucht.

Als Analyseverfahren wurde bei der EGFR Immunhistochemie das CSA-System (catalyzed signal-amplification) angewandt. Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden zunächst in Xylol entparaffiniert und anschließend in Aqua dest. überführt. Für die EGFR Färbung wurden die Schnitte mit 0,1% Trypsin in TBS-Puffer für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C vorbehandelt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten in TBS-Puffer gespült. Um das endogene Biotin zu blockieren wurden die Präparate mit einem Avidin-Block (DAKO, Glostrup, Dänemark) und einem Biotin-Block behandelt (DAKO, Glostrup, Dänemark). Zunächst wurde der Avidin-Block auf die Präparate gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer gelagert. Nach erneuter 3 maliger Spülung mit TBS-Puffer wurde der Biotin-Block ebenfalls für 15 Minuten aufgetragen und wieder wie oben beschrieben gespült. Um eine Hintergrundfärbung bei der nachfolgenden Detektion zu verhindern wurde für 15 Minuten ein Proteinblock aus dem CSA-Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark) aufgetragen.

Zum Nachweis des EGF-Rezeptors wurde der Primärantikörper EGFR Dako (M7239) (DAKO, Glostrup, Dänemark) über Nacht bei 4°C in einer Verdünnung von 1:500 auf die Präparate gegeben. Als Isokontrolle wurde Mouse IgG1 (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:125 verwendet. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Schnitte wie oben beschrieben dreimal gespült. Parallel zum Spülen wurde der Streptavidin-Biotin-Komplex angesetzt, der sich aus 2 ml Streptavidin-Biotin-Complex Diluent (Verdünnungsmedium) (DAKO), zwei Tropfen Reagenz A und zwei Tropfen Reagenz B zusammensetzt (DAKO). Danach wurde der biotinylierte sekundäre anti-Maus-Antikörper (link AG, CSA Kit, DAKO) für 15 Minuten auf die Präparate gegeben. Ein dreimaliges Spülen folgte. Der schon angesetzte Streptavidin-Biotin-Komplex wurde nun ebenfalls für 15 Minuten auf die Schnitte gegeben. Parallel dazu wurde die TNB-Mischung bestehend aus 5 ml TBS und 25 µl Proteinblock (DAKO) angesetzt. Nach dreimaligem Spülen wurde die TNB-Mischung mit Amplification Reagenz im Verhältnis 1:10 verdünnt, wobei 1 Teil Amplification Reagenz und 9 Teile TNB-Mischung verwendet wurden, und für 15 Minuten inkubiert. Dreimal wurden die Präparate danach gespült. Zur Detektion wurde Streptavidin alkalische Phosphatase (DAKO K 5005) für 15 Minuten auf die Schnitte gegeben. Nach dreimaligem Spülen erfolgte die Entwicklung mit permanent red, welches für 5 Minuten auf den Präparaten blieb und anschließend unter fließendem Leitungswasser

gespült wurde. Für die Kernfärbung wurden die Objektträger für 5 Sekunden in Hämalaun getaucht und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Spülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte mit Aquatex (Microscopy Aquatex, Merck HCl 0985) eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet. Als Positivkontrolle wurde humane Tonsille verwendet.

Die immunhistochemische Färbung von mTOR unterschied sich in folgenden Punkten: Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgte mit Citratpuffer in einem Druckkochtopf bei 121°C für 10 Minuten, als Isotypenkontrolle wurde Kaninchen IgG 1:10000 verdünnt verwendet, der Primärantikörper war Phospho mTOR (Ser 2448) (Cell Signaling), der sekundäre Antikörper war Schwein-anti-Kaninchen 1:200 verdünnt und wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur angewandt. Zur Färbung wurde statt permanent red DAB benutzt und die Positivkontrolle war ein Mammakarzinom.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Versuche des Proliferationsassays und der immunhistochemischen Färbung dargestellt.

4.2 Proliferationsassay

Sowohl die kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen H69, H82, OH1, OH3 und SW2, als auch das Chordom wurden im Rahmen einer Monotherapie und Kombinationstherapie mit den Medikamenten Erlotinib und Everolimus inkubiert.

Die Zellen wurden in der Monotherapie mit Erlotinib in den Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM behandelt. Everolimus wurde in den Konzentrationen 1 nM, 5 nM und 10 nM angewandt.

In der Kombinationstherapie wurden alle Konzentrationen, die von Erlotinib und Everolimus in der Monotherapie verwendet wurden, kombiniert, so dass man auf zwölf Konzentrationskombinationen kommt.

Die Ergebnisse wurden in ein Säulendiagramm eingetragen, in dem der Anteil lebender Zellen gegen die Konzentration des jeweiligen Medikaments eingetragen wurde.

4.2.1 Monotherapie

4.2.1.1 Erlotinib

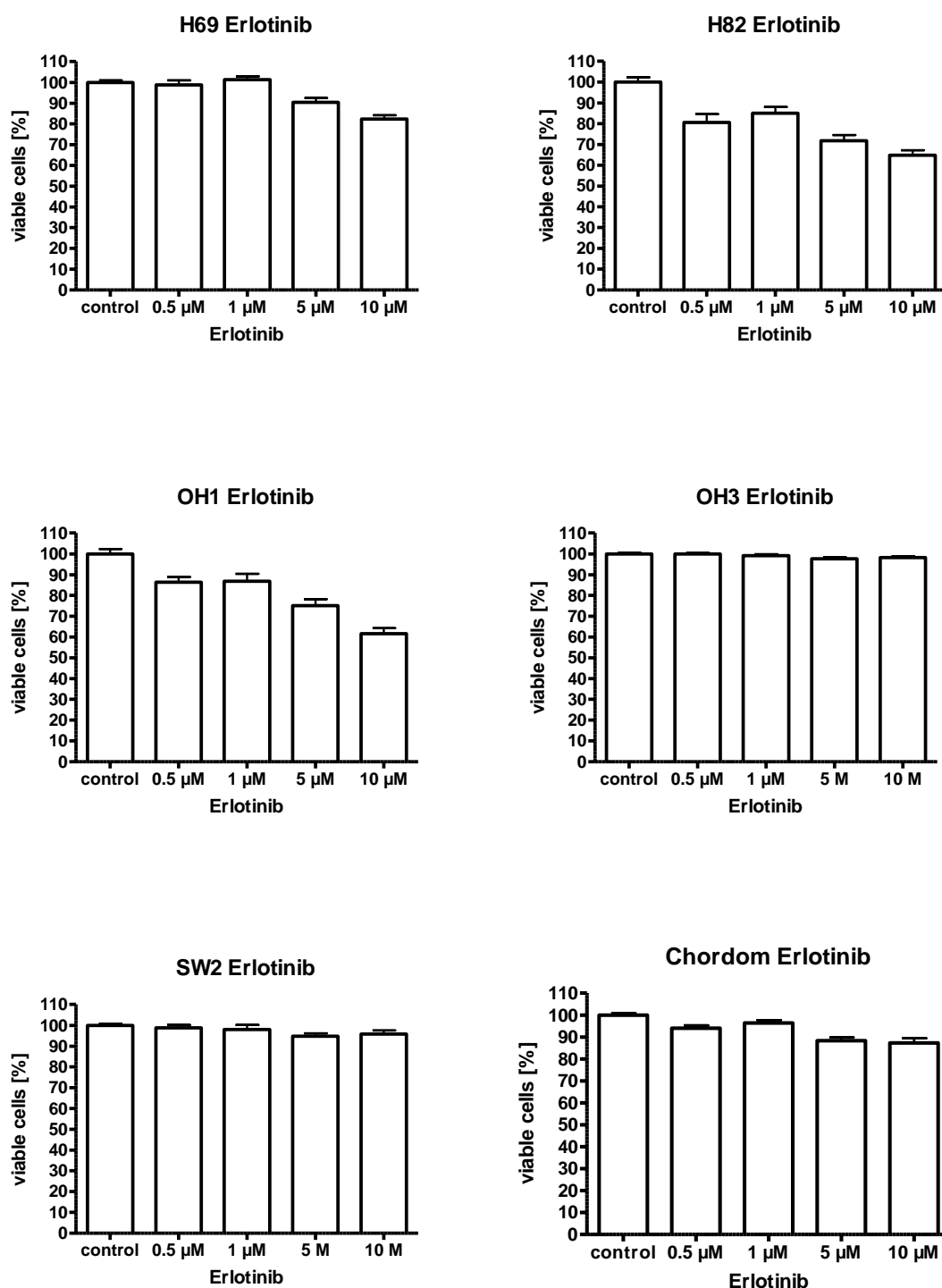


Abb. 4.1: Proliferationsverhalten von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und Chordomzellen unter Einfluss von Erlotinib: Die jeweiligen Zellen wurden mit 0,5 µM, 1 µM, 5 µM und 10 µM inkubiert. Aufgeführt ist der Anteil an vitalen Zellen in Abhängigkeit von den jeweiligen Medikamentkonzentrationen. Im Diagramm zu sehen ist der Mittelwert \pm SEM, One-Way ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test)

Bei OH3 und SW2 ließ sich in der Monotherapie mit Erlotinib keine signifikante Hemmung der Proliferation beobachten. H69 und das Chordom wiesen eine signifikante Hemmung auf:

• H69: 5 µM Erlotinib	90,48 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 10 µM Erlotinib	82,33 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 0,5 µM Erlotinib	93,97 % [*]	(vitale Zellen)
• Chordom: 5 µM Erlotinib	88,35 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 10 µM Erlotinib	87,33 % ^{***}	(vitale Zellen)

Die größte Hemmung der Proliferation lag bei den Zellen der Linien OH1 und H82:

• OH1: 0,5 µM Erlotinib	86,40 % [*]	(vitale Zellen)
• OH1: 1 µM Erlotinib	86,92 % [*]	(vitale Zellen)
• OH1: 5 µM Erlotinib	75,18 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 10 µM Erlotinib	61,64 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 0,5 µM Erlotinib	80,52 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 1 µM Erlotinib	84,98 % ^{**}	(vitale Zellen)
• H82: 5 µM Erlotinib	71,70 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 10 µM Erlotinib	64,76 % ^{***}	(vitale Zellen)

4.2.1.2 Everolimus

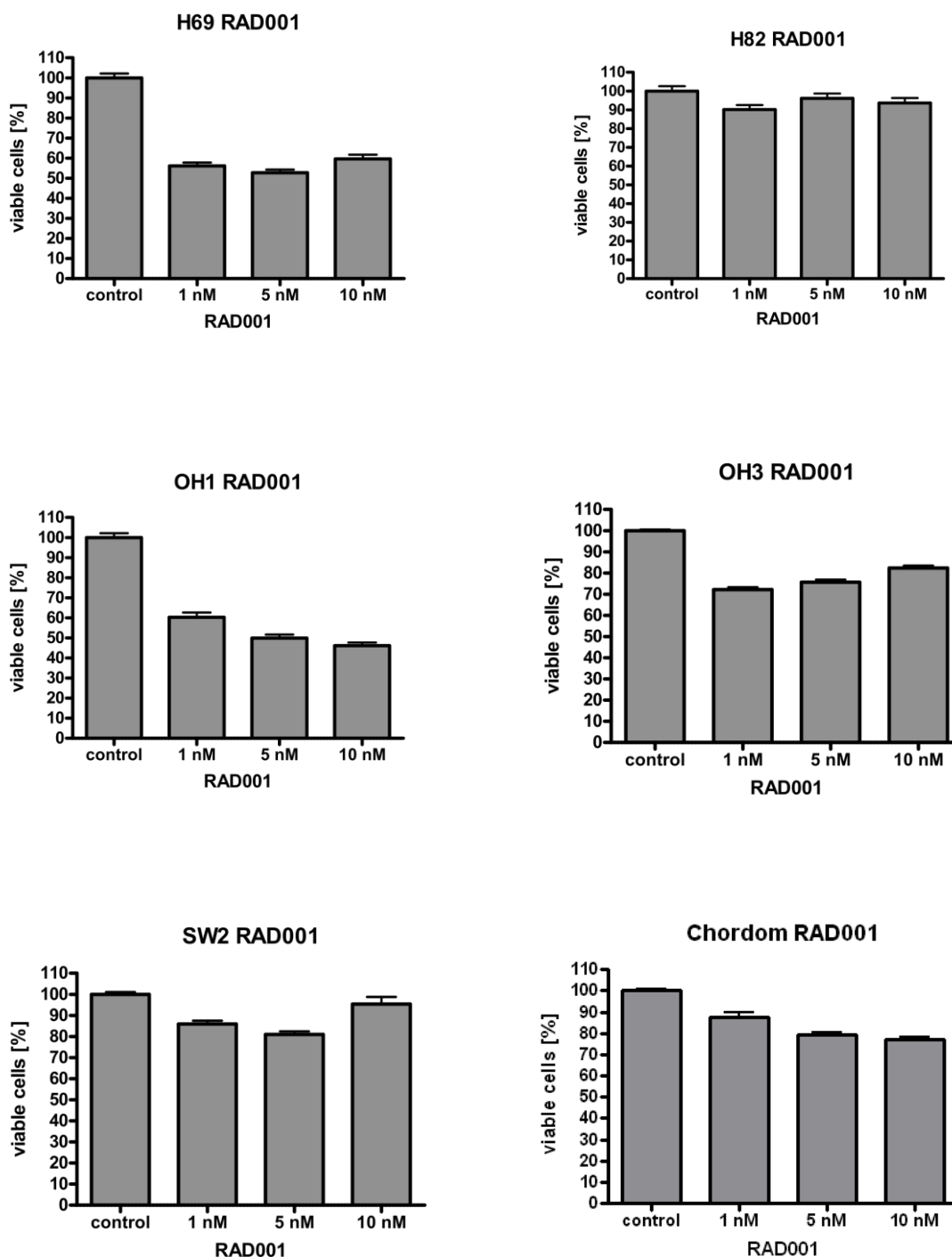


Abb. 4.2: Proliferationsverhalten von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und Chordomzellen unter Einfluss von Everolimus (RAD001): Die jeweiligen Zellen wurden mit 1 nM, 5 nM und 10 nM inkubiert. Aufgeführt ist der Anteil an vitalen Zellen in Abhängigkeit von den jeweiligen Medikamentkonzentrationen. Im Diagramm zu sehen ist der Mittelwert \pm SEM, One-Way ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test)

Im Vergleich zur Monotherapie mit Erlotinib hat Everolimus bei allen Zelllinien außer H82 einen größeren inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen:

• H69: 1 nM Everolimus	56,10 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 5 nM Everolimus	52,74 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 10 nM Everolimus	59,62 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 1 nM Everolimus	60,26 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 5 nM Everolimus	49,95 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 10 nM Everolimus	46,16 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 1 nM Everolimus	72,23 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 5 nM Everolimus	75,75 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 10 nM Everolimus	82,40 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 1 nM Everolimus	85,94 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 5 nM Everolimus	81,01 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 1 nM Everolimus	87,72 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 5 nM Everolimus	79,08 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 10 nM Everolimus	77,21 % ^{***}	(vitale Zellen)

4.2.2 Kombinationstherapie

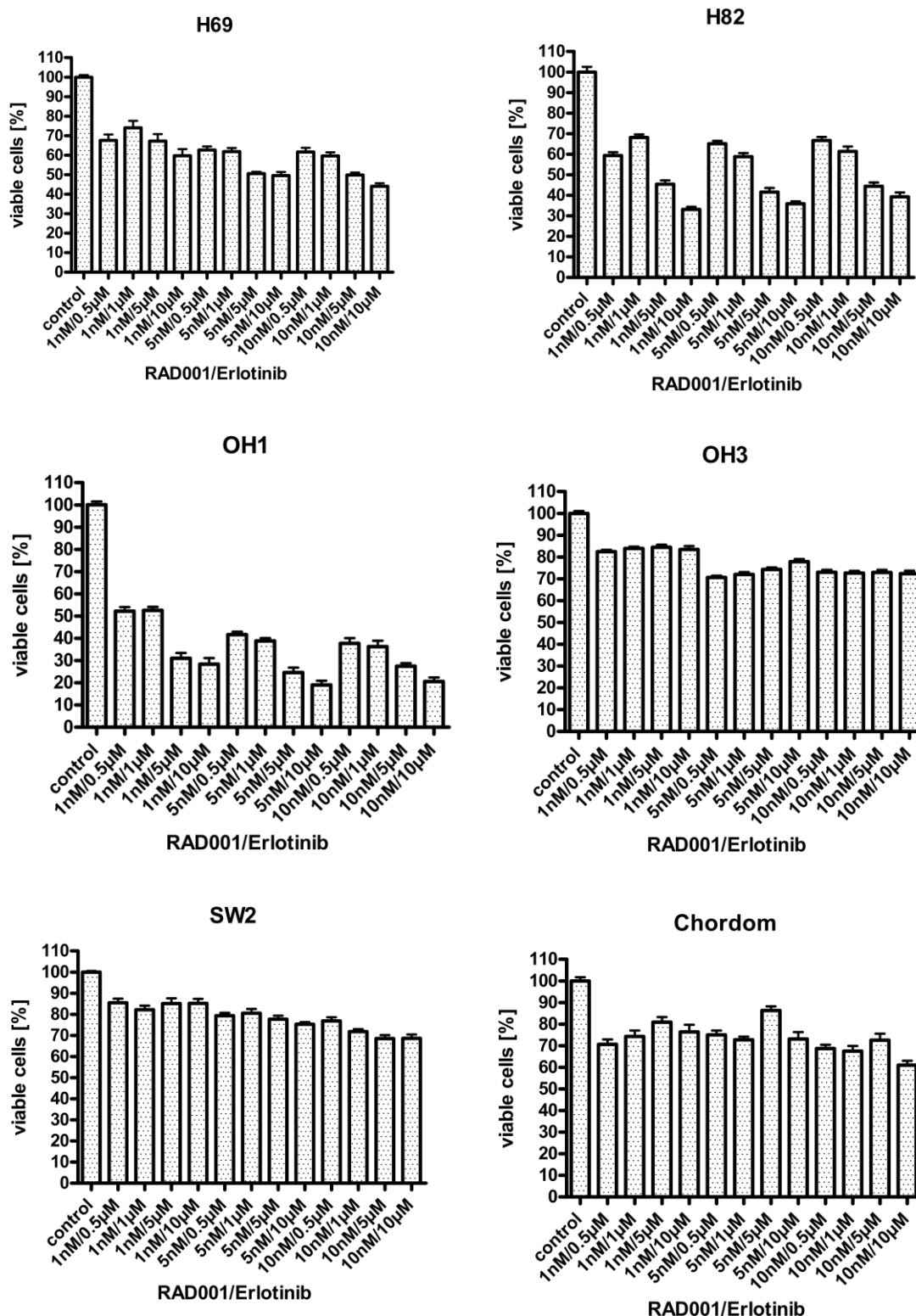


Abb. 4.3: Proliferationsverhalten von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und Chordomzellen unter Einfluss von Everolimus (RAD001) und Erlotinib:Die jeweiligen Zellen wurden mit 1 nM, 5 nM und 10 nM Everolimus und 0,5 µM, 1 µM, 5 µM und 10 µM Erlotinib in Kombination inkubiert. Aufgeführt ist der Anteil an vitalen Zellen in Abhängigkeit von den jeweiligen Medikamentenkonzentrationen. Im Diagramm zu sehen ist der Mittelwert ± SEM. One-Way ANOVA (Post-Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test)

Bei der Kombinationstherapie von Erlotinib und Everolimus wurde die Hemmung der Proliferation der kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und der Chordomzellen im Vergleich zur Monotherapie verstärkt. Dies ist besonders deutlich bei den OH1 Zellen zu sehen, bei denen alle Konzentrationskombinationen zu einer hoch signifikanten Hemmung der Zellproliferation führten. Mit steigender Konzentration der Medikamente erhöhte sich auch der antiproliferative Effekt, der dosisabhängig zwischen ca. 50% und 80% lag. Der hemmende Effekt auf die Zellproliferation war bei den H82 Zellen ähnlich hoch wie bei den OH1 Zellen. Auch hier konnte die stärkste Wirkung bei den beiden höchsten Erlotinib-Konzentrationen in Kombination beobachtet werden:

• H69: 1 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	67,60 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 1 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	74,01 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 1 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	67,25 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 1 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	59,74 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 5 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	62,65 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 5 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	61,87 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 5 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	50,60 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 5 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	49,51 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 10 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	61,63 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 10 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	59,64 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 10 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	49,79 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H69: 10 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	44,02 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 1 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	59,33 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 1 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	68,15 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 1 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	45,46 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 1 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	33,15 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 5 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	65,17 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 5 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	58,80 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 5 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	41,59 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 5 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	35,87 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 10 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	66,69 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 10 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	61,34 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 10 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	44,38 % ^{***}	(vitale Zellen)
• H82: 10 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	39,24 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 1 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	52,22 % ^{***}	(vitale Zellen)

• OH1: 1 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	52,56 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 1 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	31,02 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 1 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	28,31 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 5 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	41,63 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 5 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	38,83 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 5 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	24,60 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 5 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	19,05 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 10 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	37,69 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 10 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	36,24 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 10 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	27,47 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH1: 10 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	20,58 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 1 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	82,47 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 1 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	83,93 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 1 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	84,44 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 1 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	83,46 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 5 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	70,60 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 5 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	72,01 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 5 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	74,27 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 5 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	77,91 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 10 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	73,01 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 10 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	72,67 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 10 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	72,91 % ^{***}	(vitale Zellen)
• OH3: 10 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	72,39 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 1 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	85,52 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 1 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	82,20 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 1 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	85,13 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 1 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	85,16 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 5 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	79,34 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 5 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	80,53 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 5 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	77,73 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 5 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	75,26 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 10 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	76,87 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 10 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	71,78 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 10 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	68,48 % ^{***}	(vitale Zellen)
• SW2: 10 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	68,62 % ^{***}	(vitale Zellen)

• Chordom: 1 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	70,63 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 1 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	74,31 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 1 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	80,95 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 1 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	76,42 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 5 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	75,09 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 5 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	72,77 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 5 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	86,37 % ^{**}	(vitale Zellen)
• Chordom: 5 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	73,10 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 10 nM Everolimus/ 0,5 µM Erlotinib	68,68 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 10 nM Everolimus/ 1 µM Erlotinib	67,56 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 10 nM Everolimus/ 5 µM Erlotinib	72,57 % ^{***}	(vitale Zellen)
• Chordom: 10 nM Everolimus/ 10 µM Erlotinib	61,07 % ^{***}	(vitale Zellen)

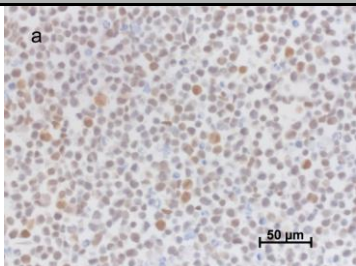
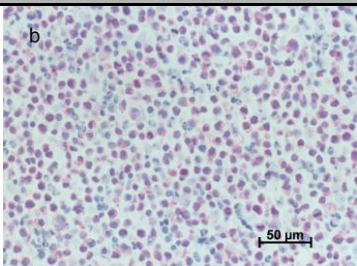
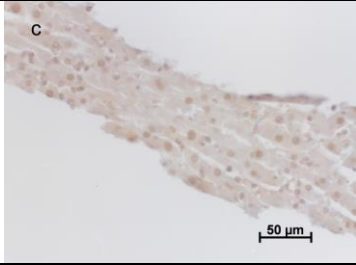
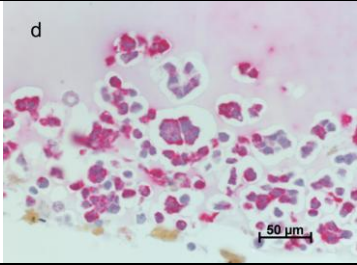
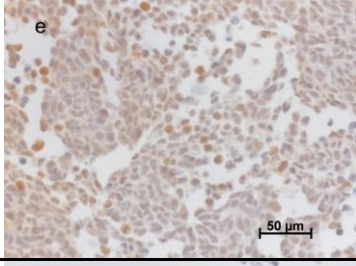
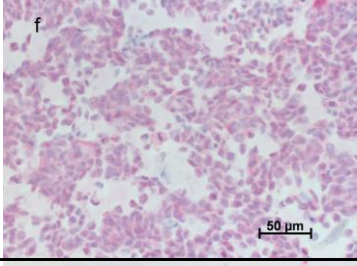
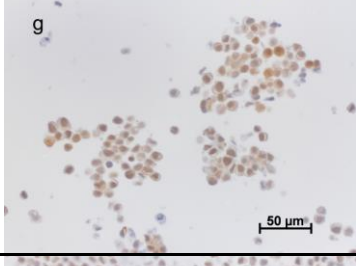
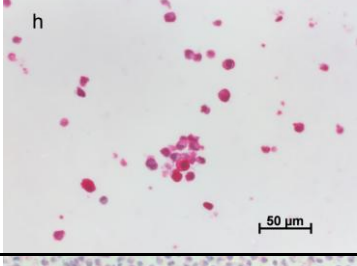
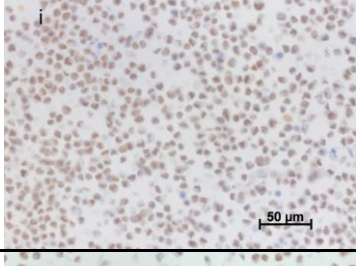
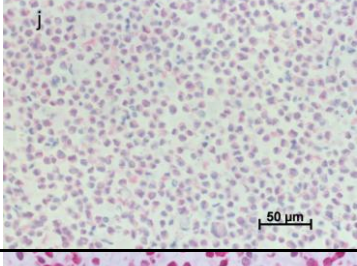
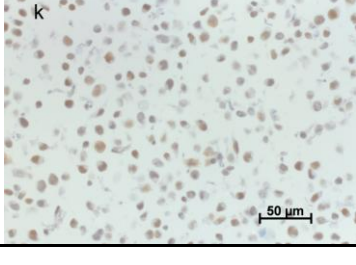
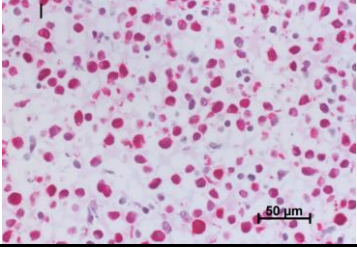
4.3 Immunhistochemische Färbung

Mithilfe der immunhistochemischen Färbung sollte der EGF-Rezeptor und mTOR nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind sowohl in Tabelle 4.1 als auch in den Abbildungen a-l der Tabelle 4.2 dargestellt. Die Färbungen wurden nach dem sogenannten immunoreactive score (IRS) ausgewertet. Der IRS ist das Produkt aus der Intensität der immunhistochemischen Färbung (keine Expression = 0, schwach = 1, moderat = 2, stark = 3) und dem Prozentsatz der positiv angefärbten Tumorzellen (< 5% = 0; 5 - 20% = 1; 20 - 50% = 2; 50 - 80% = 3; > 80% = 4). Ein Produkt von 0 wird als keine Expression angegeben, 1-4 als schwache, 5-8 als moderate und 9-12 als starke.

Bezogen auf den IRS wiesen alle Zelllinien bei der Färbung mit anti-mTOR die gleiche moderate Anfärbung auf. Die Ergebnisse beim immunhistochemischen Nachweis des EGF-Rezeptors fielen hingegen unterschiedlich aus. Eine fehlende Immunreaktivität ließ sich bei den Zelllinien H69 und SW2 erkennen. Das Ergebnis fiel bei diesen Schnitten nur schwach aus. Die Stärke der Anfärbung bei den Bronchialkarzinomzelllinien H82, OH1 und OH3 war moderat. Die Chordomzelllinie wies als einzige Zelllinie eine starke Färbung auf. Es konnten bei dieser Zelllinie also die meisten EGF-Rezeptoren nachgewiesen werden.

Zellen	EGFR	mTOR
H69	schwach	moderat
H82	moderat	moderat
SW2	schwach	moderat
OH1	moderat	moderat
OH3	moderat	moderat
Chordom	stark	moderat

Tab. 4.1: Auswertung der immunhistochemischen Färbung nach dem immunreactive score (IRS). Der IRS ist das Produkt aus der Intensität der immunhistochemischen Färbung (keine Expression = 0, schwach = 1, moderat = 2, stark = 3) und dem Prozentsatz der positiv angefärbten Tumorzellen (< 5% = 0; 5 - 20% = 1; 20 - 50% = 2; 50 - 80% = 3; > 80% = 4). Ein Produkt von 0 wird als keine Expression angegeben, 1-4 als schwach, 5-8 als moderat und 9-12 als stark.

Zelllinie	mTOR	EGFR
H69		
H82		
OH1		
OH3		
SW2		
Chordom		

Tab 4.2: Immunohistochemischer Nachweis von mTOR und des EGF-Rezeptors: immunhistochemische Schnitte mit anti-mTOR-Färbung (a (H69), c (H82), e (OH1), g (OH3), i (SW2) und k (Chordom)) und anti-EGFR-Färbung (b (H69), d (H82), f (OH1), h (OH3), j (SW2) und l (Chordom)).

5 Diskussion

Das kleinzellige Bronchialkarzinom macht einen Anteil von 15-18 % aller Bronchialkarzinome aus (Fischer und Arcaro, 2008; Planchard und Le Pechoux, 2011). Die frühe Metastasierung und die meist späte Diagnose des Tumors aufgrund eines meist lange symptomlosen Wachstums stellen hohe Anforderungen an die anzuwendende Therapie. Die Standardtherapie besteht in einer Polychemotherapie, auf die kleinzellige Bronchialkarzinome in der Regel primär gut ansprechen, und gegebenenfalls einer Radiotherapie. Allerdings entwickelt ein Großteil der Patienten lokoregionäre Rezidive und Resistenzen gegen die angewendeten Zytostatika. In den letzten 20 Jahren gab es keine wirkliche Verbesserung in Therapieansätzen (Fischer et al., 2007) und die 5-Jahres-Überlebensrate insgesamt liegt unverändert schlecht bei 5 % (Fischer und Arcaro, 2008) so dass die Suche nach neuen verbesserten Therapieansätzen notwendig ist.

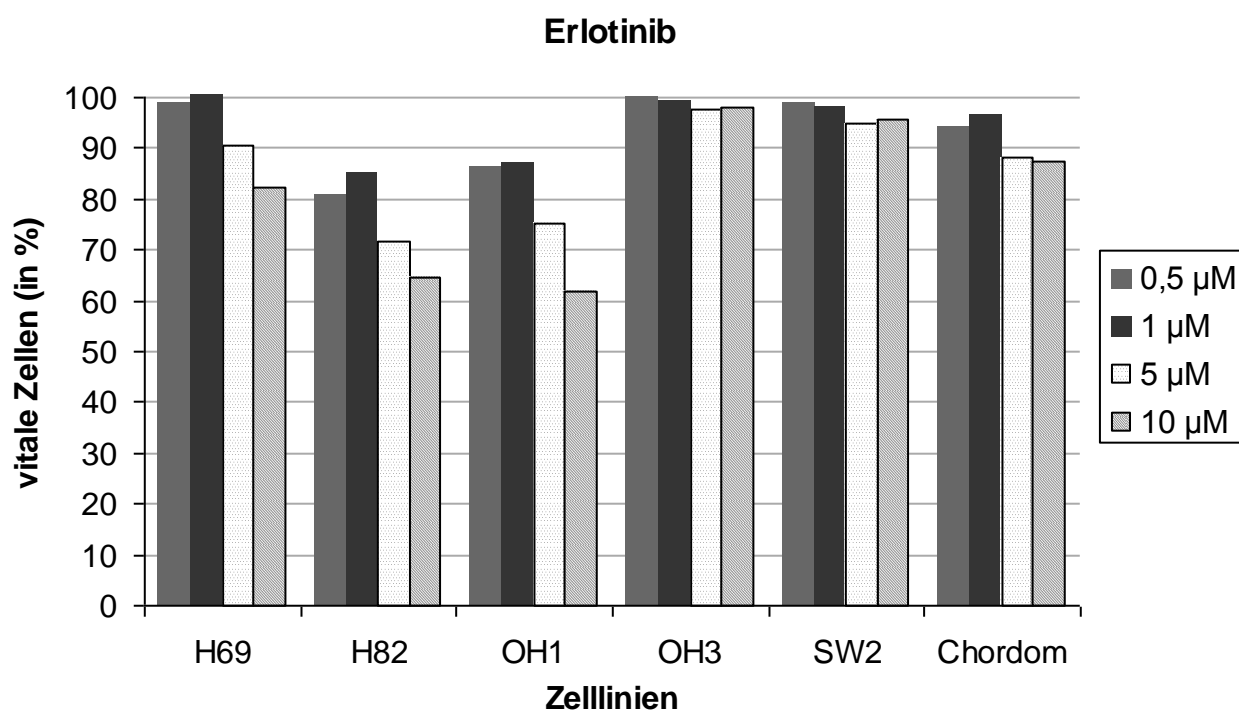
Das Chordom weist einen Anteil von 1-4 % aller Knochentumoren auf (McPherson et al., 2006; Boriani et al., 1996). Die Therapie der Wahl liegt in der chirurgischen Entfernung des Tumors mit anschließender Strahlentherapie. Eine Strahlentherapie ist in den Regionen, in denen das Chordom auftritt, sehr schwierig und es müssen sehr hohe Dosen angewandt werden (Casali et al., 2007). Da dieser Tumor in der Nähe des Rückenmarks verläuft, kann eine chirurgische Entfernung dieses Tumors neuronale Schädigungen großen Ausmaßes mit sich ziehen (Casali et al., 2007). Aufgrund dessen ist die Suche nach einer Chemotherapie, die im besten Fall einen chirurgischen Eingriff mit den daraus folgenden Risiken verhindert, sinnvoll.

Das in den Versuchen verwendete Medikament Erlotinib inhibiert die Anlagerung von Adenosin-Triphosphat an die Tyrosinkinase Domäne des EGF-Rezeptors. Da eine vermehrte Expression dieses Rezeptors auf vielen Tumoren unter anderem auch auf dem Bronchialkarzinom gefunden wurde (Grandis und Sok, 2004) und dieser Rezeptor maßgeblich an der Steuerung der Proliferation, Chemoresistenz und Metastasierung beteiligt ist (Fischer et al., 2007), ist ein Therapieansatz mit Erlotinib beim kleinzelligen Bronchialkarzinom prinzipiell sinnvoll.

Das Medikament wurde in einer Studie als first-line Medikation bei einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom angewandt. Es wies im Vergleich zu einer Therapie mit Carboplatin und Gemcitabin ein PFS (progression free survival) von 13,1 statt 4,6 Monaten auf (Felip et al., 2011).

Das Pankreaskarzinom weist ebenfalls eine erhöhte Expression des EGFR auf (Moore et al., 2007). Auch hier wurden Therapieansätze mit Erlotinib untersucht. Die Standardchemotherapie des Pankreaskarzinoms besteht in der Gabe von Gemcitabin. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Gemcitabin in Verbindung mit Erlotinib eine signifikant verbesserte Überlebensrate als Gemcitabin alleine hat (Van Cutsem et al, 2009). Die Arbeitsgruppe hat zwei Gruppen von Patienten herangezogen, die entweder einen inoperablen, lokal fortgeschrittenen oder schon metastasierten Pankreastumor hatten. Die eine Gruppe wurde mit Gemcitabin und Erlotinib, die andere mit Gemcitabin und einem Placebo behandelt. Die 1-Jahres-Überlebensrate lag bei der Gruppe mit Erlotinibgabe bei 23 %. Die andere Gruppe wies hier lediglich einen Anteil von 17 % auf.

In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Monotherapie das Medikament Erlotinib an den Bronchialkarzinomen und dem Chordom getestet. Lediglich bei zwei Zelllinien (OH1 und H82) konnte die Proliferation vitaler Zellen um mehr als 20 % inhibiert werden. Bei allen anderen Zelllinien war der hemmende Effekt kleiner (Tab. 5.1).



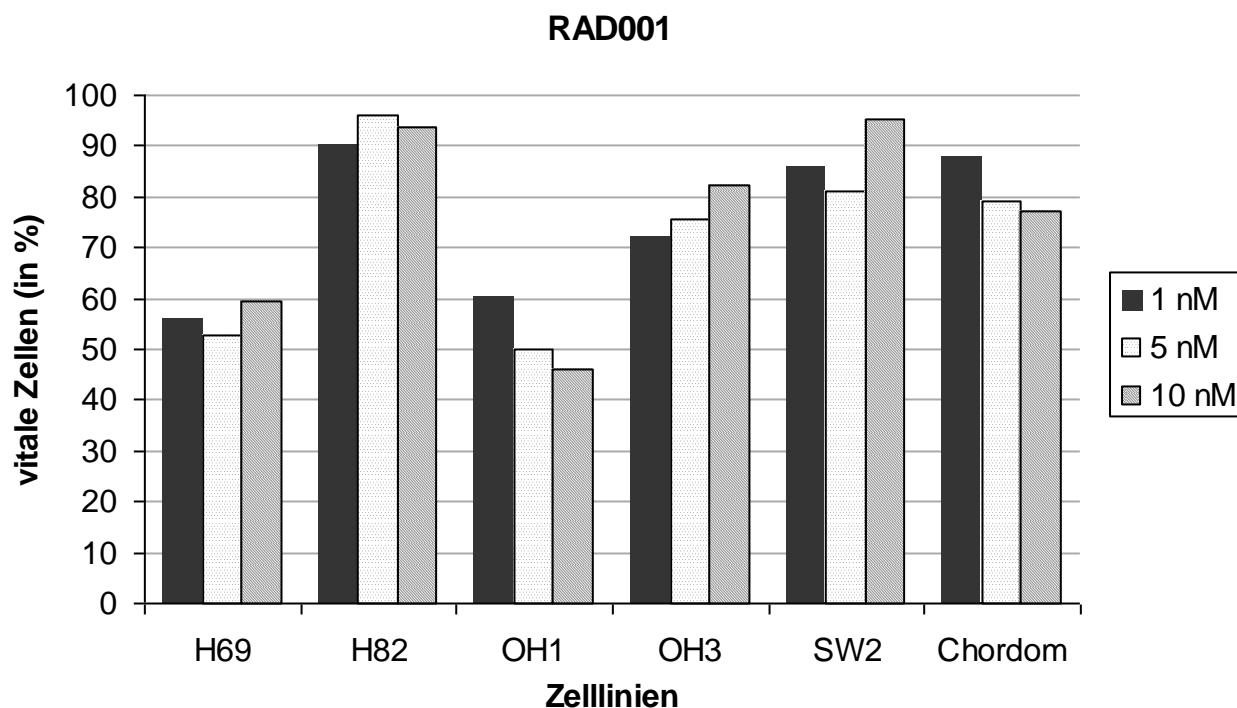
Tab. 5.1: Proliferationsverhalten von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und Chordomzellen unter Einfluss von Erlotinib: Dargestellt ist der Anteil von vitalen Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen Dosierungen von Erlotinib für die jeweiligen Zelllinien.

Bei der immunhistochemischen Färbung des EGF-Rezeptors der entsprechenden Zellen war nur eine schwache bis moderate Färbung zu erkennen. Lediglich beim Chordom fiel das Ergebnis der Färbung stark aus, wobei die Hemmung der Proliferation nur auf einem moderaten Level lag. OH1 und H82, bei denen nur eine moderate Färbung vorlag, wiesen hier eine höhere Inhibition auf. Das lässt vermuten, dass noch andere Pfade und Zellprozesse für das Wachstum der Karzinome verantwortlich sind und nicht nur der EGF-Rezeptor alleine.

In einer Studie konnte sogar gezeigt werden, dass Erlotinib auch bei Metastasen und Karzinomen der Lunge und Knochen wirkt, die kein EGFR exprimieren (Gabr et al., 2012), bei nicht EGFR-exprimierenden Karzinomen der Leber aber nicht (Gabr et al., 2012). Dies lässt eine zusätzliche Wirkungsweise von Erlotinib vermuten, die über einen anderen Weg als den des EGF-Rezeptors geht.

Das zweite Medikament, was an den kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und dem Chordom getestet wurde, ist Everolimus. Es inhibiert das Protein mTOR, welches Proliferation, Zellwachstum, Proteinbiosynthese, Apoptose und Angiogenese über den PI3K/Akt Signalweg steuert. Aufgrund dieser Funktionen hat mTOR eine zentrale Rolle in der Tumorthherapie, speziell beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Marinov et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Everolimus (RAD001) effektiv kleinzellige Bronchialkarzinomzellen bekämpfen kann (Marinov et al., 2009). Aus diesem Grund ist Everolimus ein neuer Ansatz in der Tumorthherapie des SCLC.

Die Monotherapie mit Everolimus hatte auf die entsprechenden Zellen einen erkennbaren größeren Effekt im Vergleich zu den Versuchen mit Erlotinib. H69, OH1, OH3, SW2 und das Chordom wiesen hochsignifikante Hemmungen auf. Die einzige Zelllinie, bei der keine signifikante Hemmung festgestellt werden konnte, war H82, welche bei der Monotherapie mit Erlotinib neben OH1 die größte Hemmung der Proliferation vorzuweisen hatte (Tab. 5.2).

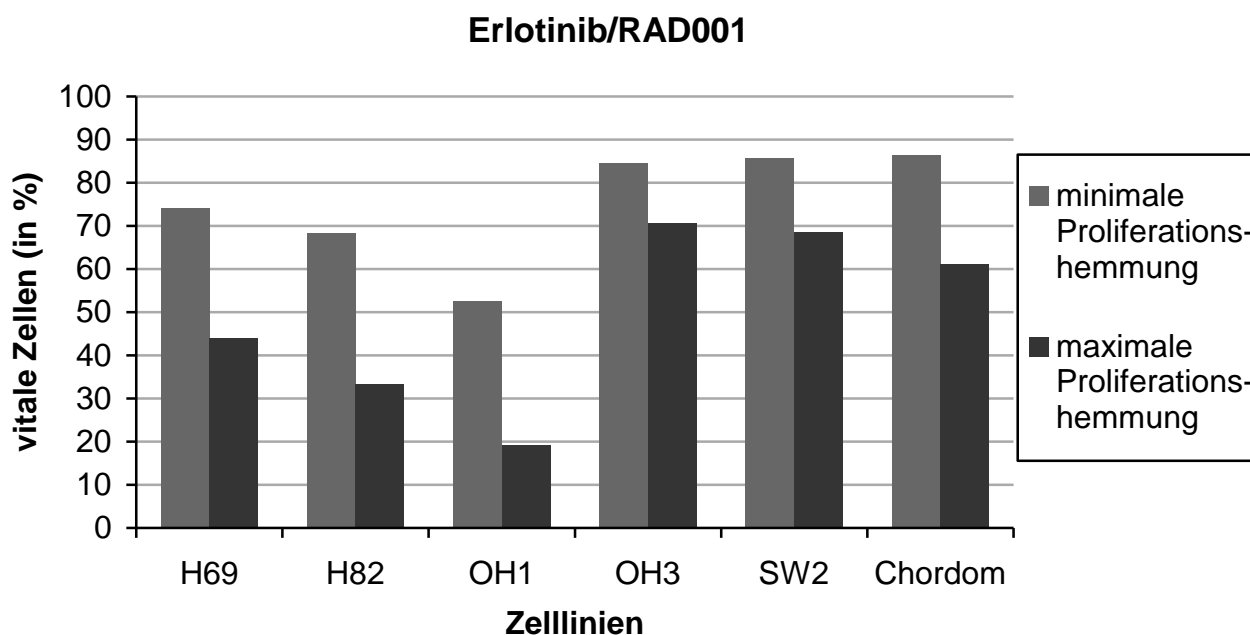


Tab. 5.2: Proliferationsverhalten von kleinzelligen Bronchiolkarzinomzellen und Chordomzellen unter Einfluss von RAD001: Dargestellt ist der Anteil von vitalen Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen Dosierungen von RAD001 für die jeweiligen Zelllinien.

Dies lässt vermuten, dass Wachstum und Teilung der H82 Zellen eher über den EGFR gesteuert werden als über den mTOR Signalweg.

Bei der immunhistochemischen Färbung der Zelllinien bezüglich des mTOR-Proteins wiesen alle Zellen die gleiche moderate Färbeintensität auf, woraus man schließen könnte, dass nicht unbedingt die Dichte von mTOR entscheidend für das Wachstum ist, sondern noch andere Faktoren hier mitverantwortlich sind.

Bei der Kombinationstherapie schließlich ließen sich die höchsten Hemmungen der Proliferation beobachten. OH1 konnte sogar bei der Konzentration von 5 nM Everolimus und 10 μ M Erlotinib auf einen Wert von 19,05 %, was die Konzentration der vitalen Zellen angeht, reduziert werden. Bei H82 konnten Werte bis 33,15 % gemessen werden. Der bei der Monotherapie eher geringe hemmende Effekt scheint in Kombination mit Erlotinib zu verstärkten inhibitorischen Effekten zu führen, was auf einen synergistischen Effekt schließen lässt (Tab. 5.3). Everolimus und Erlotinib scheinen sich nicht nur in der Hemmung der Proliferation gegenseitig zu beeinflussen. Bei Zellen, die gegen EGFR-Hemmer



Tab. 5.3: Proliferationsverhalten von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und Chordomzellen unter Einfluss von RAD001 und Erlotinib in Kombination: Dargestellt ist der Anteil von vitalen Zellen in Abhängigkeit der Dosierungsverhältnisse von Erlotinib und RAD001 in Kombination für die minimale und maximale Proliferationshemmung. Dosierungsverhältnis für die minimale Proliferationshemmung: H69: 1 nM RAD001/1 µM Erlotinib, H82: 1 nM RAD001/ 1 µM Erlotinib, OH1: 1 nM RAD001/ 1 µM Erlotinib, OH3: 1 nM RAD001/ 5 µM Erlotinib, SW2: 1 nM RAD001/ 0,5 µM Erlotinib, Chordom: 5 nM RAD001/ 5 µM Erlotinib. Dosierungsverhältnis für die maximale Proliferationshemmung: H69: 10 nM RAD001/ 10 µM Erlotinib, H82: 1 nM RAD001/ 10 µM Erlotinib, OH1: 5 nM RAD001/ 10 µM Erlotinib, OH3: 5 nM RAD001/ 0,5 µM Erlotinib, SW2: 10 nM RAD001/ 5 µM Erlotinib, Chordom: 10 nM RAD001/ 10 µM Erlotinib.

Resistenzen entwickelten, konnten durch Gabe von Everolimus diese sogar wieder sensibel gegen EGFR-Hemmer gemacht werden (Bianco et al., 2008).

In vielen Studien konnte bestätigt werden, dass Erlotinib in Verbindung mit Everolimus einen größeren inhibitorischen Effekt als alleine auf Krebszellen auslöst, was die Synergie dieser beiden Medikamente untermauert (Bago-Horvath et al., 2012; Porcelli et al., 2013). So konnte bereits bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen GLC-4 und VL-68 ein synergistischer Effekt beobachtet werden (Schmid et al., 2010). In dieser Studie wurden die Zelllinien GLC-4 und VL-68 auch zunächst im Rahmen einer Monotherapie mit Erlotinib und Everolimus einzeln inkubiert. Bei Everolimus ließ sich keine signifikante Hemmung der Proliferation beobachten. Bei der Versuchsreihe mit Erlotinib war lediglich eine geringe Reduktion der vitalen Zellen um 16 % (GLC-4) bzw. 26 % (VL-68) zu beobachten. In Kombination konnte klar gezeigt werden, dass die beiden Medikamente sich in ihrer Wirkung gegenseitig verstärken. Die Proliferation von GLC-4 wurde um 72 %, die von VL-68 um 86 % gehemmt. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Kombinationstherapie mit Everolimus und Erlotinib synergistische Effekte aufweist.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sowie beim Darm-, Pankreas- und Brustkarzinom beobachtet werden (Johnson et al., 2007; Buck et al., 2006). Beim atypischen Bronchialkarzinom und großzelligen neuroendokrinen Bronchialkarzinom wurden ebenfalls synergistische Effekte dieser beiden Medikamente festgestellt (Bago-Horvath et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein inhibitorischer Effekt von Everolimus und Erlotinib auf die Bronchialkarzinomzellen H69, H82, OH1, OH3, SW2 und Chordomzellen gezeigt werden. Die verschiedenen Konzentrationen bzw. Kombinationen der Medikamente ergaben recht unterschiedliche Ergebnisse. Die Kombinationstherapie mit Erlotinib und Everolimus zeigte sich als wesentlich wirkungsvoller als die Monotherapien der entsprechenden Medikamente, wobei die Intensität der Wirkung abhängig von Zelllinie und Konzentration war. Die Zelllinie OH1 hat im Rahmen der Kombinationstherapie die besten Ergebnisse vorzuweisen. Ähnlich vielversprechend sind die Ergebnisse von H69 und H82 ausgefallen. Bei der Monotherapie mit Erlotinib schnitten die Zellen H82 und OH1 am besten ab. Everolimus wirkte am besten bei den Zellen der Linie H69 und OH1. Allerdings blieb die Stärke der Proliferationshemmung bei der Monotherapie hinter der der Kombinationstherapie.

Aus diesem Grund wäre es sinnvoll die Kombination beider Medikamente weitergehend auch in in vivo Studien zu untersuchen.

Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass die beiden Medikamente nicht nur über deren entscheidende Angriffspunkte (EGFR bzw. mTOR) wirken. Anhand der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung lässt sich erkennen, dass die Dichte von EGFR und mTOR in keiner Proportionalität oder einem sichtbaren Zusammenhang zu dem hemmenden Effekt der Medikamente stehen. Andere Wirkungsmechanismen, die diese Medikamente möglicherweise aufweisen, gilt es weiter zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist ein hochmaligner Tumor, welcher ein schnelles und aggressives Wachstumsmuster aufweist. Es macht einen Anteil von 20% aller Bronchialkarzinome aus, welche insgesamt die häufigste Krebstodesursache bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen darstellen.

Die bestehenden Therapiemöglichkeiten sind begrenzt und die 5-Jahres-Überlebensrate ist mit 3,5% unverändert schlecht. Aus diesem Grund ist es dringend notwendig nach neuen Therapieansätzen zu suchen.

Das Chordom ist ein wenig erforschter Knochentumor, welcher im Bereich der Wirbelsäule auftritt. Die Therapie der Wahl besteht in der chirurgischen Resektion dieses Tumors. Aufgrund der möglichen Schädigung wichtiger umliegender Strukturen sind nicht invasive Therapiekonzepte anzustreben.

In dieser Arbeit wurden die beiden Medikamente Erlotinib und Everolimus an den kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen H69, H82, OH1, OH3, SW2 und einer Chordomzelllinie getestet. Dabei wurde das Proliferationsverhalten untersucht. Die Ansatzpunkte der Medikamente sind der EGF-Rezeptor und das Protein mTOR. In immunhistochemischen Verfahren wurden diese Strukturen an den jeweiligen Zelllinien untersucht.

Zunächst wurden die Zelllinien mit den beiden Medikamenten einzeln inkubiert. Bei den Versuchsreihen mit Erlotinib wurden alle Zelllinien bis auf OH3 und SW2 signifikant gehemmt. Bei der Monotherapie mit Everolimus wurden alle Zelllinien signifikant inhibiert, wobei das Ausmaß der Inhibition durchschnittlich höher lag als bei Erlotinib.

Bei der Kombination beider Medikamente fiel die Hemmung der Proliferation deutlich größer aus als im Vergleich zur Monotherapie. Bei der Zelllinie OH1 konnte bei der Kombination von 5nM Everolimus mit 10 µM Erlotinib eine Hemmung von über 80 % beobachtet werden. Diese deutlich intensivierte Wirkung der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie lässt auf synergistische Effekte dieser Substanzen schließen.

Die Stärke der Proliferationshemmung korrelierte allerdings nicht mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Auswertung. Bei erhöhten Hemmungen könnte man vermehrte EGF-Rezeptoren bzw. mTOR-Proteine vermuten. Diese Vermutung wurde nicht bestätigt, was auf andere Wirkungsmechanismen dieser Medikamente hinweisen könnte.

Die Kombinationstherapie der beiden Medikamente ist aufgrund der hochsignifikanten Hemmungen in den Proliferationsversuchen ein vielversprechender neuer Therapieansatz.

7 Literaturverzeichnis

- Aisner, J. and J. Abrams (1989). "Cisplatin for small-cell lung cancer." Semin Oncol **16**(4 Suppl 6): 2-9.
- Aebert (2008). "Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Bronchialkarzinom", 3. Auflage, Tübingen: Südwestdeutsches Tumorzentrum, Comprehensive Cancer Center Tübingen.
- Albiges, L., F. Chamma, et al. "Incidence and management of mTOR inhibitor-associated pneumonitis in patients with metastatic renal cell carcinoma." Ann Oncol **23**(8): 1943-53.
- Arasteh, Baenkler, Bieber (2009). "Duale Reihe Innere Medizin", 2. Auflage, Stuttgart: Thieme Georg Verlag. S. 1574.
- Arriagada, R., T. Le Chevalier, et al. (1993). "Initial chemotherapeutic doses and survival in patients with limited small-cell lung cancer." N Engl J Med **329**(25): 1848-52.
- Atkins, M. B., U. Yasothan, et al. (2009). "Everolimus." Nat Rev Drug Discov **8**(7): 535-6.
- Bago-Horvath, Z., W. Sieghart, et al. "Synergistic effects of erlotinib and everolimus on bronchial carcinoids and large-cell neuroendocrine carcinomas with activated EGFR/AKT/mTOR pathway." Neuroendocrinology **96**(3): 228-37.
- Baratti, D., A. Gronchi, et al. (2003). "Chordoma: natural history and results in 28 patients treated at a single institution." Ann Surg Oncol **10**(3): 291-6.
- Bean, J., C. Brennan, et al. (2007). "MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20932-7.
- Becker, N. "[Epidemiology of lung cancer]." Radiologe **50**(8): 654-61.
- Bianco, R., S. Garofalo, et al. (2008). "Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs." Br J Cancer **98**(5): 923-30.
- Bjornsson, J., L. E. Wold, et al. (1993). "Chordoma of the mobile spine. A clinicopathologic analysis of 40 patients." Cancer **71**(3): 735-40.

- Blaeser-Kiel (2007). "Sirolimus zum Transplantatschutz: Bessere Langzeitprognose durch geringere Tumorinzidenz". *Deutsches Ärzteblatt* 104 (18): A-1255
- Borders, E. B., C. Bivona, et al. "Mammalian target of rapamycin: biological function and target for novel anticancer agents." *Am J Health Syst Pharm* **67**(24): 2095-106.
- Boriani, S., F. Chevalley, et al. (1996). "Chordoma of the spine above the sacrum. Treatment and outcome in 21 cases." *Spine (Phila Pa 1976)* **21**(13): 1569-77.
- Boulay, A. and H. A. Lane (2007). "The mammalian target of rapamycin kinase and tumor growth inhibition." *Recent Results Cancer Res* **172**: 99-124.
- Breuleux, M., M. Klopfenstein, et al. (2009). "Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition." *Mol Cancer Ther* **8**(4): 742-53.
- Buck, E., A. Eyzaguirre, et al. (2006). "Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors." *Mol Cancer Ther* **5**(11): 2676-84.
- Carew, J. S., K. R. Kelly, et al. "Mechanisms of mTOR inhibitor resistance in cancer therapy." *Target Oncol* **6**(1): 17-27.
- Casali, P. G., S. Stacchiotti, et al. (2007). "Chordoma." *Curr Opin Oncol* **19**(4): 367-70.
- Cataldo, V. D., D. L. Gibbons, et al. "Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib." *N Engl J Med* **364**(10): 947-55.
- Chan, S. (2004). "Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer." *Br J Cancer* **91**(8): 1420-4.
- Chandawarkar, R. Y. (1996). "Sacrococcygeal chordoma: review of 50 consecutive patients." *World J Surg* **20**(6): 717-9.
- Cho, Y. H., J. H. Kim, et al. (2008). "Chordomas and chondrosarcomas of the skull base: comparative analysis of clinical results in 30 patients." *Neurosurg Rev* **31**(1): 35-43; discussion 43.
- Choi, D., R. Melcher, et al. "Outcome of 132 operations in 97 patients with chordomas of the craniocervical junction and upper cervical spine." *Neurosurgery* **66**(1): 59-65; discussion 65.
- Chugh, R., H. Tawbi, et al. (2007). "Chordoma: the nonsarcoma primary bone tumor." *Oncologist* **12**(11): 1344-50.

- Cohen, M. H., P. J. Creaven, et al. (1977). "Intensive chemotherapy of small cell bronchogenic carcinoma." Cancer Treat Rep **61**(3): 349-54.
- Colli, B. and O. Al-Mefty (2001). "Chordomas of the craniocervical junction: follow-up review and prognostic factors." J Neurosurg **95**(6): 933-43.
- Cooper, S. and S. G. Spiro (2006). "Small cell lung cancer: treatment review." Respirology **11**(3): 241-8.
- De Ruysscher, D., M. Pijls-Johannesma, et al. (2006). "Time between the first day of chemotherapy and the last day of chest radiation is the most important predictor of survival in limited-disease small-cell lung cancer." J Clin Oncol **24**(7): 1057-63.
- Deshpande, V., G. P. Nielsen, et al. (2007). "Intraosseous benign notochord cell tumors (BNCT): further evidence supporting a relationship to chordoma." Am J Surg Pathol **31**(10): 1573-7.
- Diaz, R. J. and M. D. Cusimano "The biological basis for modern treatment of chordoma." J Neurooncol.
- Dorfman, H. D. and B. Czerniak (1995). "Bone cancers." Cancer **75**(1 Suppl): 203-10.
- Dowell, J., J. D. Minna, et al. (2005). "Erlotinib hydrochloride." Nat Rev Drug Discov **4**(1): 13-4.
- Dutta, P. R. and A. Maity (2007). "Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy." Cancer Lett **254**(2): 165-77.
- Easton, J. B. and P. J. Houghton (2006). "mTOR and cancer therapy." Oncogene **25**(48): 6436-46.
- Eisenhauer, E. A., P. Therasse, et al. (2009). "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)." Eur J Cancer **45**(2): 228-47.
- Eriksson, B., B. Gunterberg, et al. (1981). "Chordoma. A clinicopathologic and prognostic study of a Swedish national series." Acta Orthop Scand **52**(1): 49-58.
- Ezzati, M., S. J. Henley, et al. (2005). "Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs." Int J Cancer **116**(6): 963-71.
- Felip, E., C. Gridelli, et al. "Metastatic non-small-cell lung cancer: consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano 2010." Ann Oncol **22**(7): 1507-19.

- Fischer, B., M. Marinov, et al. (2007). "Targeting receptor tyrosine kinase signalling in small cell lung cancer (SCLC): what have we learned so far?" Cancer Treat Rev **33**(4): 391-406.
- Fischer, B. and A. Arcaro (2008). "Current status of clinical trials for small cell lung cancer." Rev Recent Clin Trials **3**(1): 40-61.
- Fletcher (2002). "Pathology and Genetics of Tumors of Soft Tissue and Bone" URL: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb5/BB5.pdf> [Stand: 09.02.2014, 22:03 Uhr]
- Formica, R. N., Jr., K. M. Lorber, et al. (2004). "The evolving experience using everolimus in clinical transplantation." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 495S-499S.
- Forsyth, P. A., T. L. Cascino, et al. (1993). "Intracranial chordomas: a clinicopathological and prognostic study of 51 cases." J Neurosurg **78**(5): 741-7.
- Freyschmidt (2010). "Knochentumoren mit Kiefertumoren: Klinik – Radiologie - Pathologie", 3. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Gabr, A. G., H. Goto, et al. "Erlotinib prevents experimental metastases of human small cell lung cancer cells with no epidermal growth factor receptor expression." Clin Exp Metastasis **29**(3): 207-16.
- Giaccone, G., M. Gallegos Ruiz, et al. (2006). "Erlotinib for frontline treatment of advanced non-small cell lung cancer: a phase II study." Clin Cancer Res **12**(20 Pt 1): 6049-55.
- Goeckenjan G et al. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Pneumologie 2010; 64, Supplement 2: e1– e164.
- Grandis, J. R. and J. C. Sok (2004). "Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy." Pharmacol Ther **102**(1): 37-46.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2005). "An expanding role for mTOR in cancer." Trends Mol Med **11**(8): 353-61.
- Harper, P. G. and R. L. Souhami (1985). "Intensive chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in small cell carcinoma of the lung." Recent Results Cancer Res **97**: 146-56.
- Henderson, S. R., D. Guiliano, et al. (2005). "A molecular map of mesenchymal tumors." Genome Biol **6**(9): R76.
- Hennes-Bruns, Dürig, Kremer (2007). "Duale Reihe Chirurgie" 3. Auflage, Stuttgart: Thieme Georg Verlag. S. 994.

- Herbst, R. S., D. Prager, et al. (2005). "TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **23**(25): 5892-9.
- Higinbotham, N. L., R. F. Phillips, et al. (1967). "Chordoma. Thirty-five-year study at Memorial Hospital." Cancer **20**(11): 1841-50.
- Hurwitz, J. L., F. McCoy, et al. (2009). "New advances in the second-line treatment of small cell lung cancer." Oncologist **14**(10): 986-94.
- Hulen, C. A., H. T. Temple, et al. (2006). "Oncologic and functional outcome following sacrectomy for sacral chordoma." J Bone Joint Surg Am **88**(7): 1532-9.
- Huisman, C., P. E. Postmus, et al. (1999). "Second-line chemotherapy and its evaluation in small cell lung cancer." Cancer Treat Rev **25**(4): 199-206.
- Ihde, D. C., J. L. Mulshine, et al. (1994). "Prospective randomized comparison of high-dose and standard-dose etoposide and cisplatin chemotherapy in patients with extensive-stage small-cell lung cancer." J Clin Oncol **12**(10): 2022-34.
- Jawad, M. U. and S. P. Scully "Surgery significantly improves survival in patients with chordoma." Spine (Phila Pa 1976) **35**(1): 117-23.
- Jemal, A., F. Bray, et al. "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
- Jiang, B. H. and L. Z. Liu (2008). "Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment." Drug Resist Updat **11**(3): 63-76.
- Jian, B. J., O. G. Bloch, et al. "A comprehensive analysis of intracranial chordoma and survival: a systematic review." Br J Neurosurg **25**(4): 446-53.
- Johnson, B. E., D. Jackman, et al. (2007). "Rationale for a phase I trial of erlotinib and the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) for patients with relapsed non small cell lung cancer." Clin Cancer Res **13**(15 Pt 2): s4628-31.
- Junker, K. and I. Petersen (2009). "[Small cell lung cancer: pathology and molecular pathology]." Pathologe **30**(2): 131-40.
- Kazarian, M. and I. A. Laird-Offringa "Small-cell lung cancer-associated autoantibodies: potential applications to cancer diagnosis, early detection, and therapy." Mol Cancer **10**(1): 33.

- Kosmidis, P. A., E. Samantas, et al. (1994). "Cisplatin/etoposide versus carboplatin/etoposide chemotherapy and irradiation in small cell lung cancer: a randomized phase III study. Hellenic Cooperative Oncology Group for Lung Cancer Trials." Semin Oncol **21**(3 Suppl 6): 23-30.
- Kurup, A. and N. H. Hanna (2004). "Treatment of small cell lung cancer." Crit Rev Oncol Hematol **52**(2): 117-26.
- Lababede, O., M. Meziane, et al. "Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer: quick reference chart and diagrams." Chest **139**(1): 183-9.
- Lassen, U., K. Osterlind, et al. (1995). "Long-term survival in small-cell lung cancer: posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years--an analysis of 1,714 consecutive patients." J Clin Oncol **13**(5): 1215-20.
- Marinov, M., A. Ziogas, et al. (2009). "AKT/mTOR pathway activation and BCL-2 family proteins modulate the sensitivity of human small cell lung cancer cells to RAD001." Clin Cancer Res **15**(4): 1277-87.
- Martinez-Garcia, E., M. Irigoyen, et al. "Repetitive nicotine exposure leads to a more malignant and metastasis-prone phenotype of SCLC: a molecular insight into the importance of quitting smoking during treatment." Toxicol Sci **116**(2): 467-76.
- Mascaux, C., M. Paesmans, et al. (2000). "A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis." Lung Cancer **30**(1): 23-36.
- McMaster, M. L., A. M. Goldstein, et al. (2001). "Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995." Cancer Causes Control **12**(1): 1-11.
- McPherson, C. M., D. Suki, et al. (2006). "Metastatic disease from spinal chordoma: a 10-year experience." J Neurosurg Spine **5**(4): 277-80.
- Micke, P., A. Faldum, et al. (2002). "Staging small cell lung cancer: Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer--what limits limited disease?" Lung Cancer **37**(3): 271-6.
- Moore, M. J., D. Goldstein, et al. (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." J Clin Oncol **25**(15): 1960-6.
- Mountain, C. F. (1997). "Revisions in the International System for Staging Lung Cancer." Chest **111**(6): 1710-7.

- Noda, K., Y. Nishiwaki, et al. (2002). "Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer." N Engl J Med **346**(2): 85-91.
- Noel, G., J. L. Habrand, et al. (2003). "Radiation therapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base and the cervical spine. Prognostic factors and patterns of failure." Strahlenther Onkol **179**(4): 241-8.
- Oda, K., Y. Matsuoka, et al. (2005). "A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling." Mol Syst Biol **1**: 2005 0010.
- Ohe, Y. (2004). "Chemoradiotherapy for lung cancer: current status and perspectives." Int J Clin Oncol **9**(6): 435-43.
- Onuki, N., Wistuba, II, et al. (1999). "Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors." Cancer **85**(3): 600-7.
- Oot, R. F., G. E. Melville, et al. (1988). "The role of MR and CT in evaluating clival chordomas and chondrosarcomas." AJR Am J Roentgenol **151**(3): 567-75.
- Pamir, M. N. and K. Ozduman (2008). "Tumor-biology and current treatment of skull-base chordomas." Adv Tech Stand Neurosurg **33**: 35-129.
- Pao, W., V. Miller, et al. (2004). "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13306-11.
- Perez-Soler, R., J. P. Delord, et al. (2005). "HER1/EGFR inhibitor-associated rash: future directions for management and investigation outcomes from the HER1/EGFR inhibitor rash management forum." Oncologist **10**(5): 345-56.
- Planchard, D. and C. Le Pechoux "Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment." Eur J Cancer **47 Suppl 3**: S272-83.
- Porcelli, L., A. E. Quatrone, et al. "Synergistic antiproliferative and antiangiogenic effects of EGFR and mTOR inhibitors." Curr Pharm Des **19**(5): 918-26.
- Radner, H., D. Katenkamp, et al. (2001). "New developments in the pathology of skull base tumors." Virchows Arch **438**(4): 321-35.
- Raez, L., M. Samuels, et al. (2005). "Combined modality therapy for limited-disease small cell lung cancer." Curr Treat Options Oncol **6**(1): 69-74.
- Rami-Porta, R., J. J. Crowley, et al. (2009). "The revised TNM staging system for lung cancer." Ann Thorac Cardiovasc Surg **15**(1): 4-9.

- Reid, A., L. Vidal, et al. (2007). "Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu)." Eur J Cancer **43**(3): 481-9.
- Riopel, C. and C. Michot (2007). "[Chordomas]." Ann Pathol **27**(1): 6-15.
- Rivera, M. P. and A. C. Mehta (2007). "Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)." Chest **132**(3 Suppl): 131S-148S.
- Schmid, K., Z. Bago-Horvath, et al. "Dual inhibition of EGFR and mTOR pathways in small cell lung cancer." Br J Cancer **103**(5): 622-8.
- Schwab, J., C. Antonescu, et al. (2009). "Combination of PI3K/mTOR inhibition demonstrates efficacy in human chordoma." Anticancer Res **29**(6): 1867-71.
- Sekine, I., Y. Nishiwaki, et al. (2003). "Randomized phase II study of cisplatin, irinotecan and etoposide combinations administered weekly or every 4 weeks for extensive small-cell lung cancer (JCOG9902-DI)." Ann Oncol **14**(5): 709-14.
- Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature **441**(7092): 424-30.
- Simon, G. R. and H. Wagner (2003). "Small cell lung cancer." Chest **123**(1 Suppl): 259S-271S.
- Souhami, R. L., R. Rudd, et al. (1994). "Randomized trial comparing weekly versus 3-week chemotherapy in small-cell lung cancer: a Cancer Research Campaign trial." J Clin Oncol **12**(9): 1806-13.
- Sundstrom, S., R. M. Bremnes, et al. (2005). "Second-line chemotherapy in recurrent small cell lung cancer. Results from a crossover schedule after primary treatment with cisplatin and etoposide (EP-regimen) or cyclophosphamide, epirubicin, and vincristin (CEV-regimen)." Lung Cancer **48**(2): 251-61.
- Tarhini, A., A. Kotsakis, et al. "Phase II study of everolimus (RAD001) in previously treated small cell lung cancer." Clin Cancer Res **16**(23): 5900-7.
- Triller, N., P. Korosec, et al. (2006). "Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease." Lung Cancer **54**(2): 235-40.
- Turrisi, A. T., 3rd, K. Kim, et al. (1999). "Twice-daily compared with once-daily thoracic radiotherapy in limited small-cell lung cancer treated concurrently with cisplatin and etoposide." N Engl J Med **340**(4): 265-71.

- Van Cutsem, E., W. L. Vervenne, et al. (2009). "Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer." J Clin Oncol **27**(13): 2231-7.
- Von Pawel, J., J. H. Schiller, et al. (1999). "Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer." J Clin Oncol **17**(2): 658-67.
- Vujovic, S., S. Henderson, et al. (2006). "Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas." J Pathol **209**(2): 157-65.
- Wacker, B., T. Nagrani, et al. (2007). "Correlation between development of rash and efficacy in patients treated with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in two large phase III studies." Clin Cancer Res **13**(13): 3913-21.
- Walcott, B. P., B. V. Nahed, et al. "Chordoma: current concepts, management, and future directions." Lancet Oncol **13**(2): e69-76.
- Weinberger, P. M., Z. Yu, et al. (2005). "Differential expression of epidermal growth factor receptor, c-Met, and HER2/neu in chordoma compared with 17 other malignancies." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **131**(8): 707-11.
- Wippold, F. J., 2nd, K. K. Koeller, et al. (1999). "Clinical and imaging features of cervical chordoma." AJR Am J Roentgenol **172**(5): 1423-6.
- Wolf, M., K. Havemann, et al. (1987). "[Incidence of recurrence and long-term survival in small cell bronchial carcinoma]." Onkologie **10**(6): 357-66.
- Yamaguchi, T., J. Iwata, et al. (2008). "Distinguishing benign notochordal cell tumors from vertebral chordoma." Skeletal Radiol **37**(4): 291-9.
- Yamaguchi, T., S. Suzuki, et al. (2004). "Intraosseous benign notochordal cell tumours: overlooked precursors of classic chordomas?" Histopathology **44**(6): 597-602.
- Yang, C., J. H. Schwab, et al. (2009). "A novel target for treatment of chordoma: signal transducers and activators of transcription 3." Mol Cancer Ther **8**(9): 2597-605.
- Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S3-8.
- Zimmermann, M., A. Zouhair, et al. (2006). "The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications." Radiat Oncol **1**: 11.

8 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher für die freundliche Bereitstellung des Themas, die Erlaubnis die labortechnischen Einrichtungen des Anatomischen Instituts II benutzt haben zu dürfen sowie für die Ideen und Anregungen, die diese Arbeit entstehen ließen.

Frau Dr. Ursula Valentiner für die hervorragende Betreuung, die stets schnellen und kompetenten Beantwortungen meiner Fragen und den sehr netten und freundlichen Umgang.

Dem gesamten Laborteam für die liebevolle Umgangsart und die für diese Arbeit notwendige Einarbeitung ins labortechnische Arbeiten im Allgemeinen und die Erklärung der Zellkultur und Immunhistologie im Speziellen. Hier ist besonders das Engagement von Renate Gehrke und Maike Märker hervorzuheben.

Herrn Prof. Dr. Uwe Zangemeister-Wittke von der Universität Bern für die Bereitstellung der kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen.

Meinen Großeltern und Michael Fischer für die vielen Motivationsschübe.

Für die stetige Unterstützung danke ich meiner Freundin Franziska und meinen Brüdern Fabian und Johann. Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Marita und Karsten, die immer an mich geglaubt haben und ohne die diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen wäre.

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen gestrichen

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.