

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin,
Institut für Biochemie und Signaltransduktion
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. Georg W. Mayr
Leitung: Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Weber

Analyse löslicher EGF-Rezeptoren in Humanserum: Tumormarker bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle?

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Moqaddassa Naderi (geboren Ghulam)
aus Kabul

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.06.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. W. Weber

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. R. Smeets

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Orales Plattenepithelkarzinom.....	1
1.2 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	5
1.3 Lösliche EGF-Rezeptoren	7
2 Material und Methode	11
2.1 Chemikalien und Reagenzien	11
2.2 Optimierung und Validierung des EGFR-ELISA	15
2.3 Anwendung des EGFR-ELISA auf Serumproben.....	16
2.4 Spezifischer Test auf sezerniertes EGFR (sEGFR_17).....	17
2.5 Immunaффinitätschromatographie von Humanserum.....	19
3 Ergebnisse	23
3.1 Optimierung und Validierung des ELISA-Tests	23
3.2 EGFR-ELISA auf Serumproben und Berechnungsmethode.....	27
3.3 Anwendung des Tests auf Serumproben von gesunden Spendern und Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle.....	30
3.4 Spezifischer Test auf sezerniertes EGFR (sEGFR_17).....	33
3.5 Immunaффinitätschromatographie von Humanserum.....	39
3.6 Massenspektroskopische Analyse des aus Humanserum isolierten EGFR- Proteins	46
4 Diskussion.....	49
4.1 EGFR-ELISA und seine Anwendung auf Serum	50

4.2	Diskriminierung von löslichen EGF-Rezeptoren	55
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Danksagung.....	71
8	Lebenslauf	72
9	Ehrenwörtliche Erklärung.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM-System für orales Plattenepithelkarzinom nach UICC 2009.....	3
Tabelle 2	Stadieneinteilung des oralen Plattenepithelkarzinoms	4
Tabelle 3	Agenzien und Hersteller	11
Tabelle 4	Arbeitslösungen und ihre Zusammensetzungen	12
Tabelle 5	Wertetabelle EGFR-Standard und Serum	28
Tabelle 6	Serum-EGFR-Gehalte gesunder Spender	31
Tabelle 7	Serum-EGFR-Gehalte von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen	31
Tabelle 8	Gruppenstatistik der EGFR-Serumkonzentrationen <i>gesund vs.krank</i>	33
Tabelle 9	Klassifikationstabelle	54
Tabelle 10	Serum-EGFR-Gehaltsmessungen gesunde Spender vs. Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. Eine Übersicht verschiedener Arbeitsgruppen.	55
Tabelle 11	EGFR-Gehaltsmessungen gesunde Spender vs. Tumorpatienten. Eine Übersicht verschiedener Arbeitsgruppen.....	55

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Struktur des EGF-Rezeptors.....	6
Abb. 2	Übersicht der Signalkaskaden des EGF-Rezeptors	7
Abb. 3	EGFR-Kalibrierungskurve.....	24
Abb. 4	Ak2/Ak3-Verdünnungen.	25
Abb. 5	Anwendung eines anderen Detektionssystems.....	26
Abb. 6	Kompetitions-ELISA.....	27
Abb. 7	EGFR-Standardkurve und Auswertung der Serumprobe.....	29
Abb. 8	Überprüfung der Assay-Spezifität.....	30
Abb. 9	Scatterplot der Ergebnisse der EGFR-Bestimmung.....	32
Abb. 10	Boxplot der EGFR-Gehalte <i>gesund</i> vs. <i>krank</i>	33
Abb. 11	Standardkurvenvergleich im EGFR- und sEGFR-ELISA.....	35
Abb. 12	Kontrolleversuch mit ausschliesslich Gesamtrezeptor.....	35
Abb. 13	Anwendung des sEGFR-ELISA auf Serumproben.	36
Abb. 14	Mehrfachmessung von Serumpools (Tumorpool vs. Normalserumpool). ...	37
Abb. 15	Quantifizierung von EGFR im Tumorpool	38
Abb. 16	SDS-Gelelektrophorese von affinitätschromatographisch gewonnenem EGFR.....	41
Abb. 17	EGFR-ELISA - Säulen-Eluat-Konzentrat..	43
Abb. 18	Immunoblot des Eluat-Konzentrates.	45
Abb. 19	Massenspektrometrie von tryptischen Peptiden des sEGFR (Referenz- protein aus A431 Zellen).	47
Abb. 20	Massenspektrometrie von tryptischen Peptiden von EGFR aus Human- serum	47
Abb. 21	SDS-Gelelektrophorese mit Coomassie-Blue-Färbung von affinitätschro- matographisch gewonnener Fraktion	48
Abb. 22	95 % Konfidenzintervall der EGFR-Gehalte gesund und krank.....	52
Abb. 23	Erkrankungswahrscheinlichkeit.....	53
Abb. 24	ROC-Kurve.....	54

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Area under the curve
A431 Zellen	Zelllinie Epidermoides Karzinom
BSA	Bovines Serumalbumin
CT	Computertomographie
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR-Protein)
ELISA	Enzym linked Immunosorbent Assay
Ig	Immunglobuline
JAK/STAT	Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription
LK	Lymphknoten
mAB	Maus antibody (Mausantikörper)
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektroskopie
OD	Extinktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEC	Plattenepithelkarzinom
PI3/AKT	Phosphatidylinosit 3 Kinase/Proteinkinase B
RAS/ERK	Ras sarcoma/Extrazellulär regulierte Kinase
ROC	Receiver Operating Characteristics
SDS	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgel
sEGFR	lösliche (soluble) Epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren
sEGFR_17	sezernierter Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung Tween
Tis	Tumor in situ
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World health organization

1 Einleitung

1.1 Orales Plattenepithelkarzinom

In Deutschland wurden im Jahr 2012 477950 Tumorneuerkrankungen (C00-C97 ohne C44) diagnostiziert; davon 12940 Fälle im Bereich des Mund- und Rachenraumes. Dies entspricht einem Anteil von 2,7 %. Auf der Rangliste der häufigsten Tumorlokalisationen liegen sie hierzulande bei Männern an 7. und bei Frauen an 15. Stelle (Krebs in Deutschland 2011/12. Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015). Über 90 % der Tumore des Mund- und Rachenraumes sind Plattenepithelkarzinome. Bei den restlichen 5 bis 10 % handelt es sich unter anderen um die von den Speicheldrüsen ausgehenden Adenokarzinome. Diese weisen wie das Plattenepithelkarzinom der Lippen eine günstigere 5-Jahres-Überlebensrate auf. Das Plattenepithelkarzinom, welches im Bereich des Mundbodens, der Zunge und des Hypopharynx lokalisiert ist, hat dagegen eine schlechtere Überlebensprognose. Für das Jahr 2011/12 lag die durchschnittliche relative 5-Jahres-Überlebensrate für betroffene Männer bei 48 % und für Frauen bei 61 % (Krebs in Deutschland 2011/12. Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015).

Zu den Risikofaktoren des oralen Plattenepithelkarzinoms gehört vor allem ein dauerhafter Tabakkonsum im Synergismus mit Alkohol. Die im Tabak enthaltenen N-Nitrosamine und aromatischen Kohlenwasserstoffe besitzen karzinogene und toxische Eigenschaften. Der Konsum von Alkohol alleine hat noch keine karzinogene Wirkung. Er steigert aber die Epitheldurchlässigkeit der Schleimhaut für karzinogene Stoffe, wie z.B. für N-Nitrosamine, die in Zigaretten und Kautabak enthalten sind. (Ernest et al. 1957, Rothmann und Keller 1972, Wiltfang 2002). Auch der Genuss von Betelnüssen, welche in vielen Regionen Asiens und bevorzugt in Indien verzehrt werden, haben ähnliche Auswirkungen (Kwan 1976, Stich et al. 1982, Ko et al. 1995). Positiv auf die Ausbildung des Mundhöhlenkarzinoms wirken sich dann auch eine vitaminarme Ernährung (Vitamin A-Mangel, Eisenmangel), eine schlechte Mundhygiene und schlecht sitzender Zahnersatz aus (Watts 1961). Auch virale Infektionen werden als mögliche Risikofaktoren diskutiert: Balaram et al. konnten DNA von verschiedenen Humanen Papilloma Virus-Typen in 74 % in oralen Schleimhautläsionen feststellen. Insbesondere die Subtypen 16 und 18, welche hoch maligne Charakter haben, wurden

mit über 40 % nachgewiesen (Balaram et al. 1995). Solche Veränderungen der Mundschleimhaut können oralen Plattenepithelkarzinomen vorausgehen: Die orale Leukoplakie ist die häufigste präkanzeröse Form (Johnson et al. 1993). Sie ist definiert als weissliche Schleimhautveränderungen, die auf keine andere Schleimhauterkrankung zurück-zuführen ist (Kramer et al. WHO 1978). Waldron und Shafer untersuchten 1975 3256 Leukoplakie-Fälle und stellten fest, dass 20 % dieser Läsionen eine dysplastische Transformation durchliefen.

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist mit 40 % am häufigsten im Bereich der hinteren lateralen und vorderen Zunge lokalisiert. Am zweithäufigsten findet es sich in der Mundbodenregion. Gingiva, bukkale Mukosa und harter Gaumen sind seltener betroffen (Neville and Day 2002). Zusammen mit weichem Gaumen formieren laterale Zunge und Mundboden eine Region, die hoch anfällig für die Entstehung eines Karzinoms ist. Zwei mögliche Erklärungen sind hierfür denkbar: (1) Karzinogene Stoffe werden mit dem Speichel der Mundhöhle vermischt, im Mundboden gesammelt und benetzen konstant diese betroffenen Areale. (2) Eine dünnere nicht-keratinisierte Mukosa kleidet diese Regionen der Mundhöhle aus und begünstigt das Eindringen für karzinogene Stoffe (Jovanovic et al. 1993, Neville and Day 2002).

Das frühe orale Plattenepithelkarzinom ist zunächst unscheinbar. Erst mit fortschreitendem Wachstum ändert sich auch das klinische Erscheinungsbild: Es wächst sowohl endophytisch, die umliegende Mukosa ulzerierend, als auch exophytisch in das umgebende Gewebe. Schmerzen treten erst dann auf, wenn umliegende Strukturen, wie z.B. Nervengewebe, durch die Tumorexpansion komprimiert werden, Schluck- und Kaubeschwerden auftreten oder wenn eine Superinfektion des Tumors vorliegt. Dies ist meist im fortgeschrittenen Stadium der Fall. Metastasierungen betreffen in etwa 30 % der Karzinomfälle primär die regionären Lymphknoten und ipsilateralen Halslymphknoten (Shah et al. 1990). Ho et al. haben bei Karzinomen der Zunge in 42 % zervikale Lymphknotenmetastasen festgestellt. Gründe hierfür sind eine gute Gefäß- und Lymphversorgung der Zunge (Ho et al. 1992). Fernmetastasen sind selten und treten auch eher bei Karzinomen der Zunge auf. Betroffenes Organ ist dann häufig die Lunge.

Maßgeblich für die Prognose, sowie die Therapie des Mundhöhlenkarzinoms ist eine frühe Diagnose der Erkrankung. Aufgrund der Lokalisation, dem klinischen

Erscheinungsbild und der spärlichen Symptomatik im Anfangsstadium erfolgt diese aber meist spät. Neben der klinischen Untersuchung der Mundhöhle, sowie Inspektion und Palpation der Kopf-Hals-Region ist die Anamnese des Patienten zu erheben, wodurch karzinogene Stoffe als mögliche Ursache identifizierbar sind. Besteht eine verdächtige Schleimhautläsion länger als 2 Wochen, sollte eine Biopsie mit anschließender histologischer Gewebeuntersuchung erfolgen. Weiterführende diagnostische Maßnahmen sind Orthopantomogramm und Digitale Volumentomographie, Computertomographie (Thorax-CT), Magnetresonanztomographie (MRT), sowie Sonographie der Halsweichteile. Die klinische Einteilung des oralen Plattenepithelkarzinoms erfolgt anhand des TNM-Systems: Eine einheitliche und allgemeingültige Klassifikation für Tumore wurde erstmals in den 1950er Jahren durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) vorgenommen und seither aktualisiert. Sie beurteilt das Vorhandensein und die Ausdehnung des Primärtumors in cm (T), eine Lymphknotenbeteiligung (N von Nodus) und die Existenz bzw. Abwesenheit von Fernmetastasen (M). Die Klassifikation dient als Grundlage für die Stadieneinteilung. Tabelle 1 zeigt das TNM-System für das orale Plattenepithelkarzinom und Tabelle 2 die Stadieneinteilung nach 7. Auflage UICC 2009.

Tabelle 1 TNM-System für orales Plattenepithelkarzinom nach UICC 2009 (Sobin et al. 2009)

Tumorgröße (T)	
T0	kein Hinweis auf einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	< 2 cm
T2	>2 bis 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	Knocheninfiltration, Beteiligung der intrinsischen Zungenmuskulatur, Kieferhöhle, Gesichtshaut
T4b	Kaumuskulatur, Pterygoid, Schädelbasis, A. carotis interna
Lymphknotenbeteiligung (N)	
N0	Kein Hinweis auf Lymphknotenmetastasen
N1	ein ipsilateraler Lk < 3 cm
N2	
a	ein ipsilateraler Lk 3-6 cm
b	zwei oder mehr ipsilaterale Lk bis 6 cm
c	ein oder mehr kontralaterale oder bilaterale Lk bis 6 cm
N3	ein oder mehrere Lk > 6 cm
NX	Lk-Befund nicht beurteilbar
Metastasenbildungen (M)	
M0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar

Tabelle 2 Stadieneinteilung des oralen Plattenepithelkarzinoms nach UICC 2009

Stadium	TNM-Klassifikation
0	Tis N0 M0
1	T1 N0 M0
2	T2 N0 M0
3	T3 N0 M0, T1/2/3 N1 M0
4a	T4 N0 M0, T4 N1 M0, T1-4 N2 M0
4b	T1-4, N3 M0
4c	T1-4, N0-3, M1

Die Therapie des Mundhöhlenkarzinoms ist abhängig von Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors, vom Lymphknotenstatus und der Existenz von Fernmetastasen. Grundsätzlich ist die operative Behandlung Therapie der Wahl. Soweit es die Ausdehnung des Tumors zulässt, wird die vollständige Entfernung des Tumors mit einem Sicherheitsabstand von 1-2 cm im gesunden Gewebe sowie die Ausräumung der regionalen Halslymphknoten angestrebt. Bei ausgedehnten Tumoren ist eine Strahlentherapie in Verbindung mit Chemotherapeutika präoperativ zur Reduzierung des Tumors und Schaffung operabler Bedingungen indiziert (Forastiere et al. 1998, Hullman und Reichert 2016). Auch immuntherapeutische Ansätze mit monoklonalen Antikörpern werden seit einiger Zeit bei Rezidiven und Metastasierungen in Kombination mit Chemo- und Radiotherapie angewendet (Vega-Villegas et al. 2003, Chan et al 2015). Sie greifen an den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) an, welcher an der Zellmembran epithelialer Zellen sitzt und als Schlüsselprotein bei der natürlichen Zellproliferation sowie bei der Entstehung von Tumoren eine bedeutende Rolle einnimmt. Für Tumore der Kopf-Hals-Region wurde eine Überexpression dieses Rezeptors in über 90 % der Fälle beobachtet (Grandis und Tweardy 1993). Unter dem Handelsnamen Erbitux® (Merck KGaA Darmstadt) wurde im Jahr 2004 erstmals ein monoklonaler Antikörper zur Therapie des EGFR-exprimierenden Kolorektalkarzinoms zugelassen und fand in den Folgejahren auch bei der Behandlung von fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren Anwendung (Robert et al. 2001). Erbitux® konkurriert mit einer 5- bis 10fach höheren Affinität als die endogenen EGFR-Liganden um die EGFR-Bindungsstelle und blockiert mit seiner Komplexbildung diese für die natürlichen Liganden. Dadurch wird die von den endogenen Liganden induzierte Signalkaskade mit dem Ziel der Zellproliferation inhibiert, und es kommt zur Hemmung des Tumorstwachstums und der Metastasenbildungen (Fan et al. 1994, Waksal 1999).

1.2 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ist ein Membranrezeptor mit intrazellulärer Tyrosinkinasefunktion. Er steuert über eine Signalkaskade zelluläre Prozesse wie Zelldifferenzierung und Zellproliferation in normalen Zellen und Tumorzellen und nimmt als Protoonkogen eine Schlüsselfunktion im Entstehungsprozess von Tumoren ein. Als genverwandtes Produkt zu dem des viralen v-erbB-Protoonkogens ist er Teil der ErbB-Rezeptorfamilie und wird daher auch als ErbB1 bezeichnet (Downward et al. 1984). Vier zu einander verwandte Rezeptortyrosinkinasen gehören zur ErbB-Rezeptorfamilie: ErbB1 (EGF-Rezeptor), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) (King et al. 1985, Bargmann et al. 1986, Kraus et al. 1989, Plowman et al. 1990). Ihr struktureller Aufbau gliedert sich in eine extrazelluläre, eine intrazelluläre und eine Transmembrandomäne. Der EGF-Rezeptor ist der bisher am genauesten untersuchte Rezeptor unter den ErbB-Rezeptoren:

Er hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und besteht aus insgesamt 1186 Aminosäuren. Die extrazelluläre, glykolysierte Domäne enthält 621 Aminosäuren und besteht selbst wiederum aus vier Subdomänen. Die Subdomänen zwei und vier sind cysteinreich und vermitteln die Rezeptordimerisierung. Die leucinreichen Subdomänen eins, welche die N-terminale Domäne enthält und drei sind an der Ligandenbindungsstelle für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) beteiligt (Gullick et al. 1985a, Carpenter 1987, Lax et al. 1989 und 1991a). Die lipophile Transmembrandomäne, besteht aus 23 Aminosäuren und bildet den Übergang zur intrazellulären, zytoplasmatischen Domäne. Sie dient der Verankerung des Rezeptors an der Zellmembran sowie der Weiterleitung des Signals ins Zellinnere (Carpenter 1987). Die intrazelluläre Domäne ist aus 542 Aminosäuren aufgebaut und in drei Abschnitte unterteilt: die Juxtamembrandomäne, welche die Ligandenbindungsaffinität reduziert und die Tyrosinkinaseaktivität herabsetzt, die Tyrosinkinase Domäne und die carboxyterminale Regulatordomäne, welche Tyrosinreste enthält, die bei der Signalkaskade phosphoryliert werden. (Thiel und Carpenter 2007). Hierzu gehören die Tyrosinreste 1173, 1148, 1068, 1086, 1045 und 992. (Downward et al. 1985, Hsuan et al. 1989, Gil et al. 1999, Guo et al. 2003). Neben der Autophosphorylierung von Tyrosinresten durch den EGF-Rezeptor selbst, gibt es auch weitere Phosphorylierungsstellen, die durch andere Kinasen phosphoryliert werden. Hierzu gehören unter anderen Threonin 654, welche vor der Proteinkinasedomäne des

Rezeptors liegt und durch Proteinkinase C phosphoryliert wird, sowie Tyrosin 1101 innerhalb der carboxyterminalen Regulatordomäne und Tyrosin 845 innerhalb der katalytischen Domäne für welche eine c-Src-vermittelte Phosphorylierung beobachtet wurde (Hunter et al. 1984, 47. Biscardi et al. 1999).

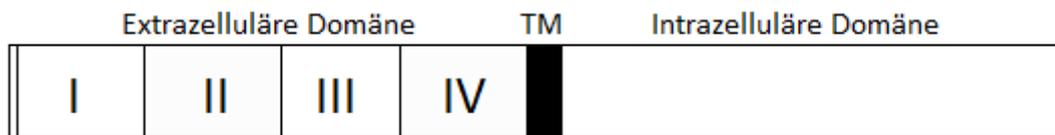


Abb. 1 Schematische Darstellung der Struktur des EGF-Gesamtrezeptors. 170 kDa EGF-Rezeptor bestehend aus extrazellulärer Domäne (Subdomänen I bis IV) mit Ligandenbindungsstelle, Transmembrandomäne (TM) und intrazellulärer Domäne mit Tyrosinkinasefunktion.

Als spezifische Liganden für den EGF-Rezeptor sind der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierte Wachstumsfaktor α (TGF- α) und Amphiregulin (AR) bekannt. Weiter binden Heparin-bindendes EGF (HB-EGF), Betacellulin (β -cell) und Epiregulin (EPI) sowohl an EGFR, als auch an ErbB-4. Die Gruppe der Neureguline binden an ErbB-3 und 4. Für ErbB-2 ist bisher noch kein spezifischer Ligand identifiziert worden (Carpenter 1987 und 2004). Nach liganden-induzierter Dimerisierung und Konformitätsänderung des EGF-Rezeptors kommt es zur Weiterleitung des Signals ins Zellinnere. Hierbei rekrutiert die Tyrosinkinase der intrazellulären Domäne ATP in ihre Bindungstaschen und phosphoryliert Tyrosinreste der carboxyterminalen Region. Die phosphorylierten Tyrosinreste können mit verschiedenen Effektorproteinen über deren SH2- (src homology 2) und PTB-Motive (phosphotyrosine binding) reagieren (Lowenstein et al. 1992, Moran et al. 1990, Matsuda et al. 1990). Zu den Effektorproteinen mit SH2-Motiv gehören einerseits die Enzyme Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), Ras-GTPase aktivierende Proteine (GAPs), syp Phosphotyrosinphosphatasen und Src-Kinasen, sowie andererseits die nicht-katalytischen Adaptermoleküle Growth factor receptor-binding protein 2 (Grb2), p85 subunit Phosphatidylinositol 3 Kinase, Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein) und Src Homolgy/Collagen (SHC) (Margolis et al. 1989, 60. Meisenhelder et al. 1989, Kholondenko et al. 1999, Rude et al. 1997). Über die Interaktion der verschiedenen Effektorproteine können unterschiedliche Signalkaskaden eingeleitet werden, die das Zellwachstum steuern: Die RAS/ERK-Signalkaskade (Ras sarcoma/Extrazellulär regulierte Kinase), der PI3/AKT-Weg (Phosphatidylinosit 3

Kinase/Proteinkinase B) und der JAK/STAT-Weg (Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription (Abbildung 2).

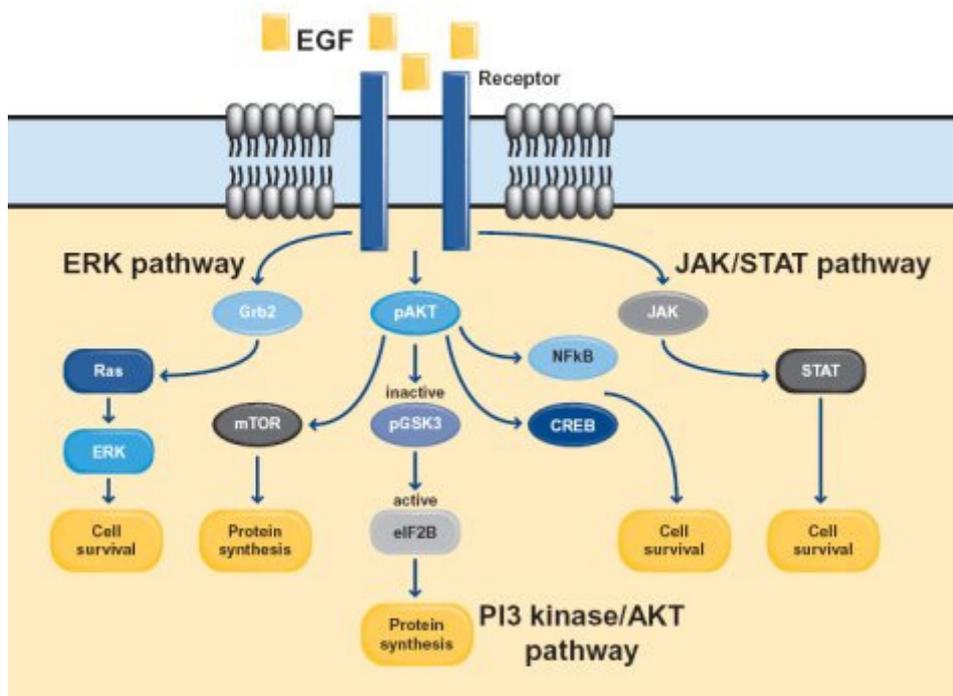


Abb. 2 Übersicht der Signalkaskaden des EGF-Rezeptors.

(Quelle: Epidermal Growth Factors and Cancer. EGFR interactions, roles and cancer therapy options by Claudie Hooper. London)

1.3 Lösliche EGF-Rezeptoren

Der EGF-Rezeptor als membranständiger Rezeptor findet sich auf der Zelloberfläche von Zellen vorwiegend epithelialen Ursprungs. 40000 bis 100000 Rezeptoren pro normaler Zelle werden angegeben (Carpenter and Cohen 1979). Bei Tumorzellen wie den epidermoiden Karzinomzellen A431 kann sich die Anzahl der EGF-Rezeptoren auf etwa 2 Mill. erhöhen (Kawamoto et al. 1983, Haigler et al. 1978). 1984 entdeckten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass diese Zellen zusätzlich zum EGF-Gesamtrezeptor eine weitere, kürzere Form des EGF-Rezeptors freisetzt (Weber et al. 1984, Ullrich et al. 1984). Dieses ca. 100 kDa große lösliche Protein besitzt im Gegensatz zum Gesamtrezeptor keine Tyrosinkinaseaktivität. Da man in A431-Zellen eine zusätzliche, aberrante, durch alternatives Spleißen entstehende mRNA fand, deren Sequenz mit der extrazellulären Domäne des Rezeptors übereinstimmt, ließ sich folgern, dass dieses 3 kb-Transkript für das von A431-Zellen sezernierte EGFR-Protein kodiert. Bemerkenswert ist allerdings, dass die mRNA für das C-terminale Ende dieses Proteins

eine Sequenz von 17 Aminosäuren voraussagt, die in dem Voll-Längen-Rezeptor nicht vorkommt; wie später gefunden wurde, resultiert sie aus einer chromosomalen Translokation, die eine Intron-Sequenz des EGFR-Gens zu einem neuen C-terminalen Exon werden lässt (Reiter et al. 2001). Dieses 633 Aminosäuren lange Protein wurde anfangs als *EGF receptor related protein* und seit 1990 als sEGFR (secreted EGF receptor) bezeichnet. In Abgrenzung zu anderen löslichen EGFR-Formen, die in der Literatur ebenfalls als sEGFR beschrieben werden (siehe weiter unten), sei das hier erwähnte Sekretionsprodukt in dieser Arbeit als sEGFR_17 benannt.

Da man derzeit Rezeptoren als membranständige Proteine kannte, welche extrazelluläre Signale in das Zellinnere übertragen, stellte sich die Frage nach der Funktion dieser sezernierten Form des EGF-Rezeptors, dessen intrazelluläre Aktivität zwar fehlte, dessen hochaffine Liganden-Bindungsfähigkeit aber erhalten war (Weber et al. 1984). Welche Auswirkung hat das Auftreten dieses EGF-Bindungsproteins im Blutkreislauf eines Patienten, der von einem dieses Phänomen zeigenden Tumor befallen ist? Man könnte spekulieren, dass der in der Umgebung des Tumors zirkulierende Ligand, also der Epidermale Wachstumsfaktor EGF, dort durch das Bindungsprotein sEGFR_17 abgefangen („sequestriert“) und damit in seiner Funktion neutralisiert wird. Diese Spekulation wurde durch eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft unterstützt, die man an den sEGFR_17 produzierenden A431-Zellen beobachtet hatte: Im Gegensatz zur bekannten mitogenen Funktion von EGF und im Gegensatz zu allen anderen derzeit untersuchten Zellen wurde das Wachstum von A431-Zellen durch EGF nicht stimuliert, sondern bereits durch niedrige Konzentrationen stark gehemmt. Offenbar genügte diesen Tumorzellen mit ihrem bis zu 100-fach gesteigerten Besitz von membranständigen EGF-Rezeptoren bereits deren basale Aktivität zur vollen Ausrichtung auf Wachstum, so dass eine noch hinzukommende Stimulierung von außen zu einem überschießenden und schädigenden Signal führen würde. Durch die gleichzeitige Produktion des sEGFR_17-Bindungsproteins würden sich die A431-Zellen also vor diesem Signal schützen. Andererseits würde den normalen Zellen in der Umgebung des Tumors das notwendige Mitogen EGF durch Sequestrierung entzogen. Die Spekulation wäre also, dass derartige Tumoren sich durch die gleichzeitige Überproduktion von membranständigem und sezerniertem Rezeptor einen Wachstumsvorteil gegenüber dem umgebenden Normalgewebe verschaffen. Die Hoffnung, hier ein tumor-spezifisches Phänomen aufgedeckt zu haben, wurde allerdings enttäuscht, da man derzeit keine weiteren kultivierten Tumorzellen mit sEGFR_17-

Produktion fand, so dass man dies als „Exotikum“ von A431-Zellen annehmen musste. Das Thema löslicher EGF-Rezeptoren erfuhr dann allerdings später mit dem Auffinden weiterer EGFR-Isoformen eine Wiederbelebung: In verschiedenen Geweben (Hühner-Leber, Mäuse-Leber, humane Plazenta) wurden kleinere Transkripte des EGFR-Gens beschrieben, deren Sequenzen weitgehend der extrazellulären Domäne entsprachen, während - wie bei dem oben beschriebenen sEGFR₁₇ - Transmembran- und intrazelluläre Domäne fehlten. Die Expression entsprechender cDNAs in Wirtszellen resultierte erwartungsgemäß in der Sekretion von EGFR-Fragmenten (Flickinger et al. 1992, Reiter und Maihle 1996, Reiter et al 2003). Und tatsächlich ließen sich mit anti-EGFR-Antikörpern auch in menschlichen Seren immunresponsive Komponenten aufdecken, wenn auch in sehr geringer Konzentration. Solche löslichen Rezeptor-Formen müssen aber nicht zwangsläufig als Folge der Expression eigener Transkripte ins Serum sezerniert werden; einige Autoren beschrieben, dass Rezeptorfragmente durch proteolytische Spaltung von membranständigen EGFR-Rezeptoren an der Zelloberfläche (Zabrecky et al. 1991, Pupa et al. 1993, Codony-Servat et al. 1999, Liu et al. 2006) oder in Exosomen entstehen können (Sanderson et al. 2008). Dieses als „shedding“ bezeichnete Phänomen wurde mit der Aktivität von Metalloproteinasen erklärt, die möglicherweise durch Serum-Komponenten reguliert werden (Perez-Torres et al. 2008). Beide Entstehungswege, also Produktion aufgrund eigener mRNA sowie shedding eines membranständigen Vorläuferproteins, scheinen für ein Protein zuzutreffen, welches die Autoren (unglücklicherweise) ebenfalls als sEGFR bezeichnen; dieses weist am C-Terminus – ähnlich wie das von Weber et al. zuvor beschriebene sEGFR₁₇ - eine im Voll-Längen-Rezeptor nicht vorkommende Sequenz auf, allerdings mit einer Länge von 78 Aminosäuren, von denen einige möglicherweise eine Membranassoziation vermitteln, aus welcher das Protein durch Metalloproteinasen freigesetzt wird (Wilken et al. 2013). Um diese EGF-Rezeptorisoform von sEGFR₁₇ zu unterscheiden, sei im Folgenden dieses als sEGFR₇₈ bezeichnet.

Alle diese Arbeiten zeigten, dass in menschlichem Serum möglicherweise verschiedene lösliche EGFR-Isoformen unterschiedlicher Herkunft vorkommen können. Vor dem Hintergrund der Überexpression des EGF-Rezeptors in vielen Tumoren war es folglich naheliegend, nach Korrelationen zwischen Tumor-Typ bzw. –Status und dem Auftreten solcher Rezeptorformen zu suchen. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden dann mit anti-EGF-Antikörpern responsives Material (im Folgenden als EGFR-Protein bezeichnet) im Serum von Tumor-Patienten: Ovar, (Baron et al. 2001 und 2009), Brust, (Müller et al.

2006), Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren (Lemoz-González et al. 2007) – erstaunlicherweise aber auch im Serum von Gesunden. Bei der Gesamtbetrachtung dieser verschiedenen Arbeiten zeigte sich allerdings im Vergleich von Tumor- und Normal-Patienten kein einheitliches Bild: Die gefundenen EGFR-Protein-Konzentrationen lagen bei Tumor-Patienten sowohl höher als auch niedriger im Vergleich zu Gesunden. Und: Bereits die Werte für Gesunde unterscheiden sich in den Arbeiten um mehr als das 100-fache (!), was auf methodische Unterschiede hinweist.

In jenen Arbeiten kommen kommerzielle Test-Kits zur Anwendung, bei denen das jeweils erkannte Antigen möglicherweise nicht eindeutig ist; denn wie oben beschrieben, muss mit dem Vorliegen unterschiedlicher Produkte löslicher EGFR-Formen im Serum gerechnet werden. Auf diese Problematik gehen die publizierten Arbeiten bei ihrer Korrelation mit klinischen Daten nicht ein. Das mag akzeptabel sein, wenn man mit diesem pragmatischen Vorgehen eindeutige Ergebnisse findet und mit dem jeweiligen Test einen Parameter von diagnostischem Wert definieren kann. Aus den bisherigen Veröffentlichungen ergibt sich jedoch, wie oben dargestellt, kein einheitliches Bild. In der vorliegenden Arbeit sollte also zunächst ein klar definierter und standardisierter immunologischer Assay zur Erfassung von löslichem EGFR-Protein entwickelt und an Serumproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Mundhöhlen-PEC) getestet werden. Darüber hinaus wurde ein neuer Antikörper hergestellt, mit dem es möglich sein sollte, eine der sEGFR-Formen, nämlich den oben erwähnten sEGFR₁₇, selektiv zu erfassen und die Frage zu beantworten, ob dieses als Sekretionsprodukt einer Tumorzelllinie beschriebene Protein auch im gesunden Patienten nachweisbar ist.

2 Material und Methode

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Grundchemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von der Firma Merck Darmstadt bezogen. Im Folgenden sind in Tabelle 2 die verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte aufgelistet und in Tabelle 3 die Herstellung der Arbeitslösungen und Puffer. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm Microsoft Excel 2003 und SPSS 20.0.

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte

Tabelle 3 Agenzien und Hersteller

Agenzien	Hersteller
Antikörper	
1. Ak1 (Erbix®)	Merck Darmstadt
2. Ak2 (anti EGFR-Serum erzeugt im Kaninchen mit sEGFR_17 als Antigen)	Weber UKE
3. Ak3 (anti Rabbit IgG whole molecule Peroxidase produced in Goat affinity isolated Antibody, A6154)	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri
4. Ak3b (Biotin SP-conjugated affini-pure donkey anti rabbit IgG)	Jackson ImmunoResearch Laboratories West Grove
5. Ak4 (Streptavidin Peroxidase S5512)	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri
6. Ak5 (anti κ light chain IgG Peroxidase gekoppelt)	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri
7. Ak6 (anti rabbit IgG/HRP P0448)	Dako Eching
8. AkC (anti C-Terminus sEGFR_17 IgG produced in rabbit)	Genosphere Biotechnologies Paris
Antigen und Ligand	
9. Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor löslicher sEGFR	Weber UKE

10. Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, E4127) Sigma Aldrich St. Louis Missouri

Humanserum/Plasma

11. 20 Humane Serumproben gesunder Spender Transfusionsmedizin UKE

12. 20 Humane Serumproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle Blessmann UKE

13. Humanplasma A 3,7 l Transfusionsmedizin UKE

14. Humanplasma B 20 ml Transfusionsmedizin UKE

Verbrauchsmaterialien

15. Filter glasfibre 13400 47 Q Sartorius Göttingen

16. Immuno Module Mikrotiterplatten 469914 ThermoFisher Scientific Bremen
Maxisorp F16 loose, Nunc

Geräte

17. Fotometer Tecan reader Tecan Crailsheim

18. Imager Quant LAS 4000 GE Healthcare Liefesciences
Freiburg

19. Massenspektrometer Orbitrap Fusion ThermoScientific Bremen
Tribrid

20. Schüttler Vibrax VXR IKA Werke Staufen

21. Tischzentrifuge 5415D Eppendorf Hamburg

Arbeitslösungen und Puffer

Tabelle 4 Arbeitslösungen und ihre Zusammensetzungen

Arbeitslösungen	Zusammensetzung
Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	
1. 10 x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
2. BSA/PBS-Puffer	1xPBS; 0,1 µg/µl Bovine Albumin Fraction V
3. Waschlösung I	1x PBS; 0,05 % Tween 20

4. Blockierlösung I	1x PBS; 30 µg/ml BSA; 0,5 µl/ml Tween 20
5. Detektionslösung I	dest. H ₂ O; 0,7 mg/ml 1,2 o-Phenyldiamindihydrochlorid (OPD); 0,4 µl/ml 30 % H ₂ O ₂
6. Stopplösung	1N Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)

Affinitätschromatographie

7. Säulen-Waschlösung I	1x PBS
8. Säulen-Waschlösung II	0,85 M NaCl
9. Säulen-Waschlösung III	1M Harnstoff
10. Säulen-Waschlösung IV	0,9 % Natriumchlorid (NaCl)
11. Eluierlösung	0,1 M Essigsäure
12. zur Neutralisation:	0,5 M Na-/K-Phosphat pH 7,4 TrisBase (Festsubstanz), Tri-Natriumphosphat (Festsubstanz)
13. zur Konservierung:	0,005 % Thiomerzol/PBS

SDS-Gelelektrophorese

14. Elektrodenpuffer 1x	25 mM Tris-HCl; 200 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; H ₂ O
15. Probenpuffer 5x	0,2 M Tris-HCl pH 6.8; 10 % SDS; 20 % (v/v) Glycerol; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
16. Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6.8; 50 µl 10 % (w/v) SDS; Acrylamid/Bis-Acrylamid (30 % / 0,8% w/v); 50 µl 10 % ig Ammoniumpersulfat (APS); 5 µl TEMED, H ₂ O
17. Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8.8; 100 µl 10 % (w/v) SDS; Acrylamid/Bis-Acrylamid (30 % / 0,8 % w/v); 100 µl 10 %ig APS; 10 µl TEMED; H ₂ O
18. Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie blue; 40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; H ₂ O
19. Fixierlösung	50 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure, H ₂ O
20. Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; H ₂ O

Immunoblot

21. Transferpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS, 20 % Methanol
22. Färbelösung II	0,2 % Ponceau-S; 3 % Essigsäure
23. TBS- und TBST-Puffer	10 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.8 ; 0,05 % Tween 20
24. Blockierlösung II	5 % Magermilchpulver; 1x TBS
25. Antikörper-Arbeitslösung	2,5 % Magermilchpulver; 1x TBST
26. Waschlösung II	1x TBST
27. Detektionslösung II	Super Signal West Pico/Dura 34077/34075 (1:1) ThermoScientific

Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

28. Proteinreduktion I	10 mM Dithiothreitol
29. Proteinreduktion II	55 mM Jodacetamid
30. Proteinverdau I	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 5 ng/l Trypsin (Promega)
31. Proteinverdau II	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 5 ng/l Chymotrypsin (Promega)
32. Extraktionslösung	50 % Acetonitril; 5 % Ameisensäure

2.2 Optimierung und Validierung des EGFR-ELISA

Zur Verdünnung von Standard, Proben, und der Antikörper wurde, falls nicht anders angegeben, BSA/PBS-Puffer eingesetzt. Zwischen den Inkubationen erfolgte dreimaliges Waschen mit 250 µl Waschlösung I. Inkubationen wurden, falls nicht anders beschrieben, auf dem Schüttler Ika Vibrax VXR bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit Detektionslösung I und das Abstoppen der Reaktion mit 1N H₂SO₄. Die Extinktionsmessungen wurden bei einer Wellenlänge von 490 nm im Photometer der Firma Tecan Crailsheim durchgeführt und die erhobenen Messdaten mit dem Programm Windows Excel 2003 ausgewertet.

sEGFR₁₇ Protein als Kalibratorprotein

Aus dem Kulturmedium von A431-Tumorzellen durch Immunaффinitätschromatographie gereinigtes sEGFR₁₇ (Weber et al. 1984) war photometrisch auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt worden. Für die Verwendung im ELISA wurden Aliquots zu je 0,8 µg/ml in BSA/PBS hergestellt und bei -20 °C eingefroren. Im ELISA wurde sEGFR₁₇ als Standard in einer 1:2 Verdünnungsreihe eingesetzt (8ng bis 0,125 ng sEGFR₁₇ und 0 ng (Leerwert)).

Festlegung der Beschichtungs-Konzentration von Ak1

Der monoklonale Beschichtungsantikörper Ak1 (Erbix® von Merck) wurde auf 3 µg/ml, 5 µg/ml und 8 µg/ml mit 1x PBS verdünnt. Mikrotiterplatte A wurde mit 3µg/ml Ak1, Mikrotiterplatte B mit 5 µg/ml Ak1 und Mikrotiterplatte C mit 8 µg/ml Ak1 beschichtet, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und danach luftdicht über Nacht bei 7 °C inkubiert. Die Blockierung erfolgte mit je 250 µl Blockierlösung I für 20 Minuten auf dem Schüttler. Anschließend wurde mit Waschlösung I gewaschen und die Platten in 100 µl/well Waschlösung I in Folie luftdicht bei 7 °C gelagert. Die oben beschriebene sEGFR₁₇-Verdünnungsreihe wurde je in Mikrotiterplatte A, B und C pipettiert und für 1,5 Stunden inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation mit Ak2 1:2000 für 1 Stunde und danach mit Ak3 1:6000 wieder für eine Stunde. Detektion erfolgte mit Detektionslösung I. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 N H₂SO₄ abgestoppt und die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch gemessen.

Für die weiteren Experimente wurden, falls nicht anders aufgeführt, 5 µg/ml Ak1 beschichtete Mikrotiterplatten verwendet.

Vergleich verschiedener Verdünnungen von Ak2 und Ak3

Folgende Ak2/Ak3 Verdünnungen wurden vorbereitet: A) Ak2 1:6000 und Ak3 1:2000, B) Ak2 1:2000 und Ak3 1:6000, sowie C) Ak2 1:3000 und Ak3 1:3000. Der sEGFR₁₇-Standard wurde je in die ELISA-Platten a, b, und c aufgetragen und für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der jeweiligen Ak2-Verdünnung für eine Stunde und danach ebenfalls für eine Stunde mit der jeweiligen Ak3-Verdünnung. Detektion und photometrische Messung der Wellenlängen bei 490 nm erfolgen im Anschluss, wie oben beschrieben.

Variation des Detektionssystems

Es kamen zwei Antikörperkombination zur Anwendung: A) Ak2 1:2000 und Ak3 1:6000, sowie B) Ak2 1:2000 und Ak3b 1:2000 und Ak4 1:2000. Die sEGFR₁₇ Standardverdünnungsreihe wurde je in ELISA-Platte a und b aufgetragen und für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgten nacheinander die Inkubationen mit den jeweiligen Antikörperkombinationen A) bzw. B) für je eine Stunde. Detektion und photometrische Messung bei einer Wellenlängen von 490 nm erfolgten im Anschluss, wie oben beschrieben.

Variation mit Umkehrung des Testaufbaus (Kompetitionselisa)

Für den Test wurde eine mit 5 µg/ml sEGFR₁₇ beschichtete Mikrotiterplatte verwendet. Eine sEGFR₁₇ Standardverdünnungsreihe (200 ng bis 1,56 ng mit Leerwert) wurde aufgetragen und für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit Ak2 1:2000 für eine Stunde und danach mit Ak3 1:6000 ebenfalls für eine Stunde. Detektion und photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 490 nm wurden im Anschluss durchgeführt.

2.3 Anwendung des EGFR-ELISA auf Serumproben

Serumgewinnung

20 humane Blutproben gesunder Spender zu je etwa 1 ml wurden vom Institut für Transfusionsmedizin UKE bereitgestellt. Diese wurden für drei Minuten bei 13,2 rpm zentrifugiert und die Überstände abpipettiert. Nach dreimaligem Wiederholen des Prozesses wurden die so gewonnenen Serumproben bei -20 °C gelagert.

Aus der Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf wurden von Prof. Blessmann 20 Serumproben tumorerkrankter Patienten bereitgestellt. Sie stammten von Patienten, bei welchen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle diagnostiziert wurden. Die Serumproben zu je etwa 1,5 ml wurden ebenfalls bei -20 °C gelagert.

EGFR-ELISA

Die Untersuchung der oben erwähnten Serumproben auf ihren EGFR-Protein-Gehalt erfolgte mit 5 µg/ml beschichteten Mikrotiterplatten. Als Kalibratorprotein wurde sEGFR_17 in der Verdünnungsreihe (8 ng bis 0,125 ng und Leerwert) aufgetragen. Die aufgetauten Serumproben wurden jeweils zweimal 1:2 verdünnt und in einem Volumen von 12,5 µl bis 1,56 µl aufgetragen und 1,5 Stunden geschüttelt. Dann erfolgten nacheinander je einstündige Inkubation mit Ak2 1:2000 und Ak3 1:6000. Detektion und photometrische Messung folgten im Anschluss wie oben dargestellt. Die Auswertung der erhobenen Extinktionen wurde mit dem Programm Microsoft Excel 2003 vorgenommen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS 20.0 unter Verwendung des Welch-Tests.

Überprüfung der Assay-Spezifität

Eine beliebige Serumprobe wurde in einer 1:2 Verdünnung (12,5 µl bis 1,56 µl) und sEGFR_17 als Standard auf eine zuvor mit 5 µg/ml Ak1 beschichteten Mikrotiterplatte A aufgetragen. Für eine andere ebenso beschichtete Mikrotiterplatte B wurde zunächst dasselbe Serum und sEGFR_17-Standard mit 50 µl 50 µM EGF-Lösung versetzt und danach wie oben dargestellt verdünnt und aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden erfolgten Inkubationen mit Ak2 1:2000 und danach Ak3 1:6000 für je eine Stunde. Detektion und photometrische Messung der Extinktionen bei 490 nm folgten.

2.4 Spezifischer Test auf sezerniertes EGFR (sEGFR_17)

Herkunft und Herstellung von AkC

Über die Firma Genosphere Biotechnologies Paris wurde ein spezifischer Antikörper, gegen das C-terminale Ende von sEGFR_17 (AkC) hergestellt. Die zugehörige 16 Aminosäuren lange Sequenz lautete: CIVSHFPRSFYKMSVH. Der Hersteller lieferte

lyophilisiertes Antiserum von zwei unterschiedlichen Kaninchen (Rabbit 1 und Rabbit 2) mit einem Gehalt von 4,47 g (Antiserum 1) und 3,52 g (Antiserum 2) aus jeweils 50 ml. 90 mg Antiserum 1 und 70 mg Antiserum 2 wurden zur Rekonstitution in 2 ml destilliertem H₂O gelöst. Anschließend wurde zu 1,8 ml BSA/PBS-Puffer 200 µl des rekonstituierten Antiserums pipettiert und durchmischt. AkC-Aliquots in einer Verdünnung von 1:10 zu jeweils 70 µl wurden bei -20 °C eingefroren.

sEGFR-ELISA

Das Kalibratorprotein sEGFR₁₇ wurde in eine mit 5 µg/ml Ak1 beschichtete Mikrotiterplatte a von 8 bis 0,125 ng mit Leerwert und für Mikrotiterplatte b von 16 bis 0,25 ng mit Leerwert aufgetragen und für 1,5 Stunden inkubiert. Nach Waschen mit Waschlösung I erfolgte für Mikrotiterplatte a die Inkubation mit Ak2 1:2000 und für Mikrotiterplatte b mit AkC 1:1000 für eine Stunde. Danach wurden beide Platten mit Ak2 1:6000 inkubiert. Detektion und photometrische Extinktionsmessungen bei einer Wellenlänge von 490 nm folgten.

Kontrolle mit ausschließlich Gesamtrezeptor

sEGFR₁₇ wurde in der Verdünnungsreihe 8 bis 0,125 ng mit Leerwert in Mikrotiterplatte a und EGFR-Gesamtprotein (gewonnen aus A431 Zellmembran) von 16 bis 0,25 ng mit Leerwert in Mikrotiterplatte b aufgetragen. Beide Platten wurden für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte für Mikrotiterplatte a die Inkubation mit Ak2 1:2000 und für Mikrotiterplatte B mit AkC 1:1000 für eine Stunde. Danach wurden beide Platten mit Ak2 1:6000 inkubiert. Detektion und photometrische Extinktionsmessungen bei einer Wellenlänge von 490 nm folgten.

Anwendung von sEGFR-ELISA auf Serum

Die sEGFR₁₇ Verdünnungsreihe (16 bis 0,25 ng mit Leerwert) wurde auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Eine Serumprobe eines gesunden Spenders und die eines Tumorpatienten wurden 1:2 verdünnt und in einem Volumen von 100 µl bis 12,5µl aufgetragen. Jede Probe wurde dabei zweimal getestet. Nach 1,5-stündiger Inkubation von Standard und Proben erfolgte die Inkubation mit AkC 1:1000 und danach mit Ak3 1:6000. Detektion und photometrische Messung der Extinktionen bei einer Wellenlänge

von 490 nm folgten. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2003.

Anwendung von sEGFR-ELISA auf Serumpool

Je 15 µl Serum der 20 gesunden Spender, sowie Serum der 20 Tumorpatienten wurden in zwei separate Serenpools pipettiert und wie oben im sEGFR-ELISA getestet. Der Test wurde fünfmal durchgeführt.

2.5 Immunaффinitätschromatographie von Humanserum

Gewinnung und Vorbereitung des Humanplasmas

3,7 l humanes Plasma wurde aus dem Zentrum für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf beschafft. Das gleiche Volumen 1x PBS, 1,85 g Natriumazid, sowie 14,8 ml 0,5M EDTA-Lösung wurden dazugegeben und auf dem Magnetrührer bei 7 °C über Nacht durchmischt. In der Zentrifuge Savall Superspeed wurde das verdünnte Plasma bei einer Umdrehungszahl von 8000 U/min und bei einer Temperatur von 5 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Glasfaserfilter der Firma Sartorius unter Vakuum filtriert und bei 7°C gelagert.

Vorversuch-Aффinitätschromatographie

Ak1 gekoppelte Affinitätssäule mit einem Säulenvolumen von 7 ml wurde verwendet. Alle Reaktionsschritte wurden bei 7 °C durchgeführt. Die Säulenmatrix wurde nacheinander mit je 20 ml Waschlösung I, II, III, IV gespült, mit 5 ml 0,5 M Na-/K-Phosphat neutralisiert und dann durch Zugabe von 35 ml gefiltertem 1x PBS equilibriert. Das verdünnte, filtrierte und zentrifugierte Plasma wurde durch die Säule gepumpt. Der Durchlauf wurde in einem Gefäß abgefangen und bei 7°C gelagert. Zum Abfließen der Lipide wurde 14 ml 1x PBS pipettiert. Dann folgte 7 ml 0,85 M NaCl/PBS, welches mit einem Glasstab umgerührt und für 10 Minuten zur Sedimentierung ruhen gelassen wurde. Anschließend wurde das halbe Säulenvolumen wieder abpipettiert. Zum Waschen der Säule wurden der Reihe nach erst 5 ml 0,85 M NaCl/PBS, 5 ml 1x PBS gefiltert, 25 ml 1M Harnstofflösung, sowie 0,9 %iges NaCl pipettiert und verworfen.

Die Elution erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml 0,1 M Essigsäure/50 mM NaCl. Der erste Durchlauf wurde verworfen. Weitere sechs Durchläufe wurden gesammelt, so dass ein Volumen von 16,5 ml zusammen kam. Dieser wurde dann mit Trinatriumphosphat auf einem pH-Wert von 7 neutralisiert. Eine Messung im Photometer wurde durchgeführt und die desorbierte Fraktion bei -20 °C eingefroren. Die Säule wurde durch Zugabe von 2,5 ml 0,5 M Na-K-Phosphatlösung regeneriert, sowie mit 25 ml 0,005 %iges Thiomerzal/PBS konserviert.

Die desorbierte Fraktion wurde im EGFR-ELISA entsprechend wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben und im sEGFR-ELISA wie unter Abschnitt 2.4 beschrieben, quantifiziert. Im Anschluss erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung im 12 % -SDS-Gel nach Laemmli (Laemmli 1970) und Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blue.

Hauptexperiment – Affinitätschromatographie

20 ml humanes Serum wurde aus dem Zentrum für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf bereitgestellt. Das Serum und die 1 ml HiTrap-Ak1 gekoppelte-Säule wurden, wie zuvor beim Vorversuch beschrieben, vorbereitet und der Lauf ausgeführt. Parallel wurde eine ebensolche Affinitätschromatographie mit 20 ml Serum + 1 µg A431 Zellkulturmedium durchgeführt. Die gewonnenen Fraktionen beider Affinitätschromatographien wurde im EGFR-ELISA und sEGFR-ELISA quantifiziert.

Test auf Ak1-Ausblutung der HiTrap-Säule

Die letzte Waschlösung vor Durchpumpen des Serums wurde im ELISA untersucht: Auf eine mit 5 µg/ml sEGFR₁₇ beschichteten Mikrotiterplatte wurde eine Ak1-Verdünnungsreihe 1:2 in 1x PBS (110 ng bis 0 ng Ak1) und die letzte Waschlösung 1:3,5 (100 µl bis 2,33 µl) aufgetragen und für 1,5 Stunden inkubiert. Nach Waschen mit Waschlösung I wurde mit Ak5 1:7000 für 1 Stunde inkubiert. Detektion und photometrische Messung der Extinktionen bei einer Wellenlänge von 490 nm erfolgten im Anschluss. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2003.

Immunoblot von affinitätschromatographisch gewonnener Fraktion

Verwendung eines 10 % igen Midi-PAGE Gels zur gelelektrophoretischen Auftrennung der desorbierten Fraktion und als Referenzprotein sEGFR₁₇. Die Proben wurden

jeweils doppelt aufgetragen und nach Auftrennung eine Hälfte mit kolloidalen Commassie Blue gefärbt. Die andere Hälfte wurde auf eine Nitrocellulosemembran für 2 Stunden bei 7°C geblottet. Anschließend erfolgte mit Blockierlösung II die Blockierung für 1 Stunde. Danach wurde mit 1x TBST gewaschen und mit Ak2 1:3000 in 2,5 % Magermilchpulver in 1x TBST für 24 Stunden bei 7 °C inkubiert. Dann wurde wieder mit 2,5 % Magermilchpulver in 1x TBST gewaschen (dreimal). Es wurde mit Antikörper Ak6 1:2500 für 1 Stunde inkubiert und dann sechsmal mit 1x TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte nach Inkubation für 5 Minuten mit Detektionslösung II im Imager LAS4000. Im Anschluss wurde derselbe Blot mit Ak5 1:7000 in 2,5 % Magermilchpulver/TBST für eine Stunde inkubiert dann wieder, wie oben beschrieben, detektiert.

Massenspektroskopische Analyse der desorbierten Fraktion

Die massenspektrometrische Analyse (MS-Analyse) von SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden wurde von Priv.-Doz. Dr. Friedrich Buck aus dem Institut für Klinische Chemie (UKE) durchgeführt: Nach der Gelfärbung mit kolloidalem Coomassie-Blue wurde die zu untersuchende Bande ausgeschnitten, das Gelstück zerkleinert, das darin enthaltene Protein mit 10 mM Dithiothreitol (56°C 30 Min.) reduziert und mit 55 mM Jodacetamid zur Modifikation der Cystein-Seitenketten versetzt (Raumtemperatur, 20 Min. im Dunkeln). Es folgte die Inkubation der Gelstücke mit Trypsin bzw. Chymotrypsin (Bedingungen: 5 ng/l Protease (sequencing grade modified trypsin bzw. sequencing grade chymotrypsin, Promega, Madison, USA) in 50mM NH₄HCO₃, (37°C, 16h). Nach dem Verdau wurden die Geldstücke dreimal mit 50% Acetonitril/5% Ameisensäure extrahiert, die vereinigten Extrakte in einem Vakuumkonzentrator eingedampft und in 20 µl 0,1%iger Ameisensäure aufgenommen. Die massenspektrometrischen Signale wurden auf einem Orbitrap-Tribrid-Massenspektrometer (Orbitrap Fusion, Thermo Scientific, Bremen) aufgenommen, das mit einer Kapillarsäule-HPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific, Bremen) gekoppelt war (Bedingungen: Fluß: 250 µl/Min., Laufmittel A: H₂O/0.1% Ameisensäure, B: Acetonitril/0.1% Ameisensäure, Gradient: 2% - 30% B in 30 Min.). Die Precursor-Masse der Peptide wurde im Orbitrap-Detektor mit einem maximalen Fehler von 10 ppm gemessen, die Fragmentmassen nach Stoßfragmentierung im Ionenfallen-Detektor (max. Fehler: 0.2 Da). Die Daten wurden mit dem Programm Proteome Discoverer 2.0 (Thermo Scientific, Bremen) durchsucht (benutzte Datenbank:

Uniprot release Okt. 2014, Spezies: homo sapiens sowie zusätzlich die publizierten sEGFR-Sequenzen (Lin et al. 1984, Baron et al. 2003) zugelassene Modifikationen: Cys: Carbamidomethylierung (obligatorisch), Met: Oxidation (fakultativ), AsN und Gln: Deamidierung (fakultativ).

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung und Validierung des ELISA-Tests

Alle Aussagen dieser Arbeit basieren auf Messungen von löslichem EGFR-Protein in menschlichem Serum. Die physiologische Funktion eines Signale weiterleitenden Rezeptors sowie Angaben aus der Literatur ließen sehr niedrige Konzentrationen - im pico- oder niedrigen nanomolaren Bereich – erwarten. Derartige Spuren von Zielprotein in Gegenwart eines millionenfachen Überschusses an Serum-Proteinen lassen sich am ehesten unter Anwendung spezifischer Antikörper erfassen. Die verbreitetste Methode ist der Enzym-gekoppelte Immunosorbent Assay (ELISA), welcher zwei verschiedene spezifische, gegen das Zielprotein gerichtete Antikörper sowie ein die photometrische Messung ermöglichendes Detektionssystem verwendet. Die Auswahl und die Charakteristika dieser spezifischen Antikörper sowie deren Kombination miteinander bestimmen maßgeblich die Empfindlichkeit der Messung, aber auch die Selektion von erfassten Zielprotein(en). Zu Beginn dieser Arbeit galt es also, ein geeignetes ELISA-Verfahren zu etablieren und zu validieren. Zwar gibt es eine Reihe kommerzieller Assays; aber mehrere Argumente sprachen für die Entwicklung eines eigenen Tests: (1) In der Arbeitsgruppe waren mehrere Antikörper vorhanden, deren Eigenschaften – im Gegensatz zu den in käuflichen Kits Enthaltenen – bekannt waren. (2) In Anbetracht des Umfangs der durchgeführten Arbeiten ergab sich bei Einsatz der eigenen Werkzeuge ein erheblicher Kostenvorteil. (3) Der Hauptgrund war jedoch die Verfügbarkeit gereinigten EGFR-Proteins in Milligramm-Mengen, welches photometrisch quantifiziert werden konnte und damit eine exakte Kalibrierung des Tests ermöglichte. Nach einer Reihe von Vorversuchen wurde eine geeignete Antikörper-Kombination zur Messung von löslichem EGFR gefunden: Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde ein monoklonaler Antikörper (Ak1) verwendet, welcher in der Nähe der Liganden-Bindungsstelle des sEGF-Rezeptors bindet (Li et al. 2005); da er die korrekte Faltung der EGFR-Ektodomäne verlangt, wird denaturiertes Zielprotein nicht erfasst. Als zweiten Antikörper (Ak2) wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, welcher in der Arbeitsgruppe durch Immunisieren von Kaninchen mit gereinigtem sEGFR_17 hergestellt worden war. Für die Beurteilung der Testbedingungen sind wichtig: die niedrigste zuverlässig erfassbare Konzentration des Zielproteins (Empfindlichkeit), das Ausmaß der unspezifischen Bindung sowie der Messbereich des Tests. Um einen in

dieser Hinsicht geeigneten Test zu etablieren, wurden die maßgeblichen Parameter variiert. Als Zielprotein diente dabei jeweils gereinigtes EGFR-Protein, welches in Verdünnungsreihen über einen definierten Bereich eingesetzt wurde.

Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Ak1. — Das Plastikmaterial der Mikrotiterplatten hat eine bestimmte aber natürlich begrenzte Adsorptionskapazität für Proteine. Mit steigender Antikörperkonzentration bei der Beschichtung lässt sich eine zunehmende Sättigung erzielen. Dies sollte vorteilhaft sein, da es die Funktion dieses „catcher“-Antikörpers ist, möglichst viel Zielprotein aus den Proben zu erfassen. Einer hohen Beschichtungskonzentration stehen allerdings oft die Verfügbarkeit (oder Preis) des gereinigten Proteins sowie ein Anstieg der unspezifischen Bindung entgegen. In vielen Protokollen findet man eine Protein-Konzentration von 1,5 bis 2 $\mu\text{g/ml}$ zur Beschichtung. Im Experiment (Abb. 3) wurden die Beschichtungskonzentrationen von 3, 5 und 8 $\mu\text{g/ml}$ verglichen. Bei der Darstellung des Messwertes (Extinktion=OD) in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Zielproteins zeigte sich, dass die höheren Beschichtungskonzentrationen nur eine unwesentliche Steigerung des Signals bei nur geringfügig zunehmendem Leerwert brachte (Abb. 3). Da in der Arbeitsgruppe ausreichend Ak1-Protein zur Verfügung stand, wurde für die weiteren Tests eine Beschichtungskonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ festgelegt.

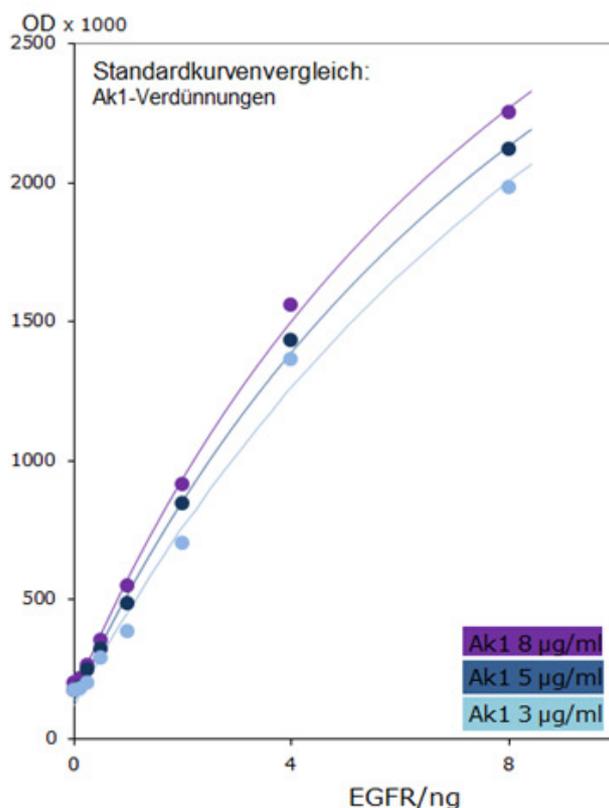


Abb. 3 EGFR-Kalibrierungskurve Die ELISA-Platte wurde mit 3 (hellblau), 5 (blau) und 8 $\mu\text{g/ml}$ (violett) AK1 beschichtet. Mit steigender Ak1-Konzentration zeigt sich nur eine unwesentliche Erhöhung der OD-Werte, so dass sich keine maßgebliche Empfindlichkeitssteigerung des Tests ergibt und für 5 $\mu\text{g/ml}$ Ak1 entschieden wurde. (OD= Extinktion).

In dieser wie auch den folgenden Darstellungen zeigt sich ein nicht-linearer Kurvenverlauf (Sättigungskurve); dies ist nicht anders zu erwarten, da mit steigender Konzentration von Zielprotein der immobilisierte Ak1 zunehmend gesättigt wird. Diese Nichtlinearität des Tests muss bei der zukünftigen Auswertung berücksichtigt werden.

Verdünnungen der weiteren Antikörper Ak2 und Ak3. — Üblicherweise gibt man als Maß für die im Test eingesetzten Antikörper deren Verdünnung aus den jeweiligen Stammlösungen an. Beim zweiten spezifischen, d.h. gegen das Zielprotein gerichteten Antikörpers, handelt es sich um Serum (Ak2) von immunisierten Versuchstieren (rabbit). Der Detektionsantikörper (Ak3) ist ein kommerzielles Konjugat aus einem Antikörper gegen rabbit-IgG und dem Enzym Peroxidase. Aus Vorversuchen (Ak2), bzw. der Packungsbeilage (Ak3) war der ungefähre für ELISA geeignete Verdünnungsbereich bekannt; damit konnte die Anzahl von Versuchen zur Optimierung klein gehalten werden. Es wurden 3 Kombinationen von relevanten Verdünnungen der beiden Reagenzien getestet. Die Abbildung 4 zeigt, dass die Kombination Ak2 1:2000 und Ak3 1:6000 das beste Ergebnis brachte: Bei niedrigem Leerwert (unspezifische Bindung) ergab sich ein vergleichsweise hohes Signal. Diese Kombination kam bei den weiteren Messungen zur Anwendung.

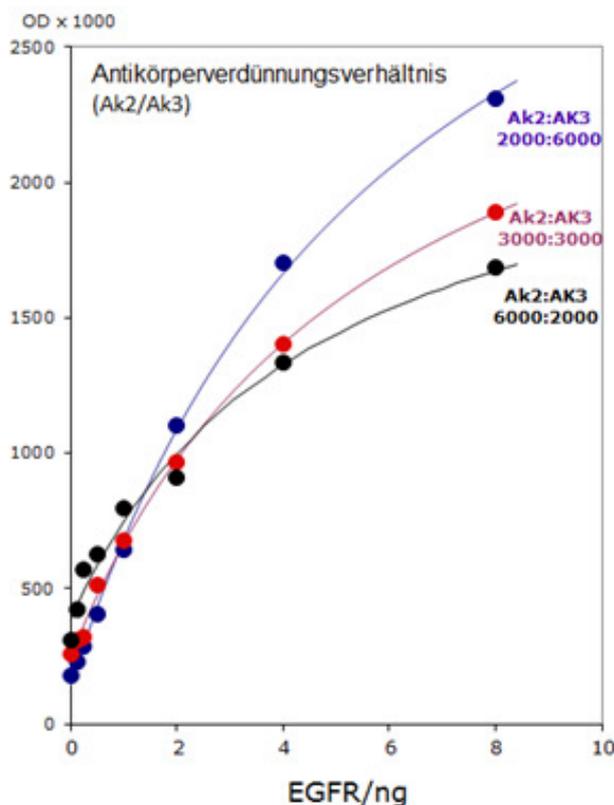


Abb. 4 Ak2/Ak3-Verdünnungen. Getestet wurden drei verschiedene Verdünnungen von Ak2 und Ak3: Mit einem Verdünnungsverhältnis von Ak2 1:2000 und Ak3 1:6000 konnte die Empfindlichkeit des ELISA deutlich verbessert werden. Gleichzeitig brachte diese Antikörperkombination den niedrigsten Leerwert, so dass unspezifische Bindungen möglichst reduziert wurden. (OD=Extinktion)

Variation des Detektionssystems. — Da die Empfindlichkeit des ELISA nicht nur von der Affinität und Konzentration der Antikörper sondern auch von der Wahl des Detektionssystems abhängt, wurde überprüft, ob durch eine weitere Komponente in einem zusätzlichen Inkubationsschritt eine Verbesserung erzielt werden kann. Dazu wurde als Detektionsantikörper ein Konjugat mit Biotin eingesetzt, um letzteres dann mit einem Konjugat aus Streptavidin-Peroxidase zu detektieren. Aufgrund einer möglicherweise mehrfachen Biotinylierung des Antikörpers (herstellungsbedingt) und aufgrund der hohen Affinität der Biotin/Streptavidin-Bindung könnte man eine Verstärkung des Signals erwarten. Wie Abbildung 5 zeigt, ergibt sich tatsächlich ein etwas steilerer Kurvenverlauf. Allerdings erschien der Effekt nicht in dem Ausmaße, welches den durch den zusätzlichen Reaktionsschritt erhöhten Zeitaufwand rechtfertigt. Für die späteren Messungen wurde folglich der zuvor beschriebene Versuchsaufbau beibehalten.

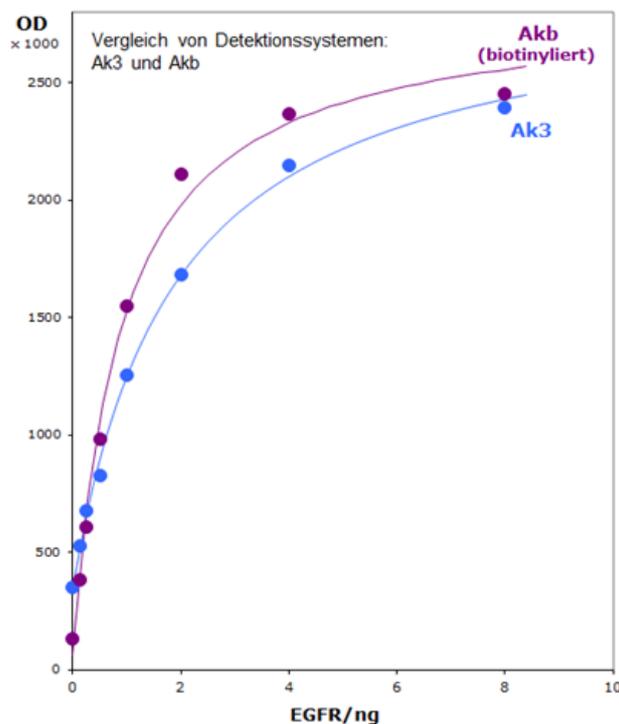


Abb. 5 Anwendung eines anderen Detektionssystems. Der Standardkurvenvergleich im ELISA mit Ak3 (blaue Kurve) und im ELISA mit einem mit Biotin gekoppelten Antikörper Akb, welche durch Streptavidin-Peroxidase detektiert wurde (violette Kurve) zeigt dass zwar eine Steigerung der Extinktionen erzielt wird; diese aber nicht in dem Ausmaße ist, welche einen zusätzlichen Inkubationsschritt rechtfertigt würde. (OD=Extinktion)

Variation mit Umkehrung des Testaufbaus. — Die Verfügbarkeit ausreichender Mengen des gereinigten Antigens (sEGFR_17) ermöglicht auch einen sogenannten Kompetitions-ELISA durchzuführen: Hier wird nicht Antikörper sondern Antigen an die Mikrotiterplatte adsorbiert. Bei der Durchführung des Tests kompetieren dann dieses immobilisierte mit dem mobilen Antigen aus Probe bzw. Standard um die Bindung von unterschüssig zugesetztem spezifischen Antikörper. Immobilisierte

Antigen-/Antikörper-Komplexe werden dann, nach dem Entfernen der mobilen Komplexe durch Waschen, mit dem Detektionssystem wie oben (Ak3 mit Substrat) gemessen. So ergeben sich mit steigender Menge Proben-Antigen abfallende Kurvenverläufe. Vorteil dieses Testaufbaus wäre Zeitersparnis durch Einsparung eines Inkubationsschritts, allerdings unter Inkaufnahme von möglichen Problemen durch Unspezifität (nur 1 spezifischer Antikörper) und Störung. Wie Abbildung 6 zeigt, funktioniert dieser Testaufbau im Prinzip. Allerdings erwies sich der Test als vergleichsweise unempfindlich; erst 10 ng Antigen (etwa 10 mal mehr als oben) zeigen eine deutliche Veränderung des Signals. Und – noch problematischer – das Signal lässt sich auch mit sehr hohen Antigenmengen nicht vollständig verdrängen, was auf unspezifische Bindung schließen lässt. Deshalb wurde dieses Testverfahren nicht weiter berücksichtigt.

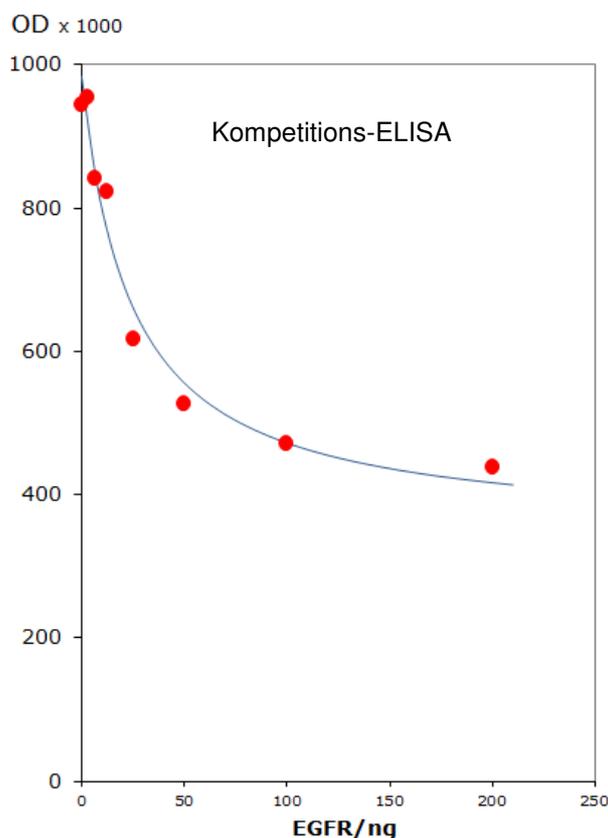


Abb. 6 Kompetitions-ELISA. Die Umkehrung des Testaufbaus basiert auf eine Plattenbeschichtung mit Antigen (EGFR) und anschließendem Auftragen von Probenantigen. Das Signal lässt sich mit steigendem Probenantigen immer mehr verdrängen, da die mobilen EGFR-Antikörper-Komplexe durch den Waschprozess wieder vom Reaktionsgefäß ausgewaschen werden (absteigender Kurvenverlauf). Allerdings ist dieser Test unempfindlicher als der bisher angewandte ELISA. (OD=Extinktion)

3.2 EGFR-ELISA auf Serumproben und Berechnungsmethode

Unter den zuvor aufgeführten optimierten Bedingungen wurde eine (beliebige) Serumprobe im Vergleich zu gereinigtem sEGFR-Protein als Standard getestet, um die

Anwendbarkeit des Tests und das Quantifizierungsverfahren zu demonstrieren. Standardprotein und Serum wurden beide in Verdünnungsreihen eingesetzt, um EGFR-Gehalte und Messbereich des Tests aneinander anpassen zu können (Tabelle 5).

Tabelle 5 Wertetabelle EGFR-Standard und Serum (OD=Extinktion)

Standardprotein EGFR/ng	OD x 10 ³	Serum- Volumen/μl	OD x 10 ³
8,00	2312	12,5	408
4,00	1701	6,25	268
2,00	1101	3,13	212
1,00	642	1,56	168
0,50	406		
0,25	287		
0,13	230		
0,00	177		

Die Standardkurve (Abb. 7) ist wiederum leicht gekrümmt. Das ist auch nicht anders zu erwarten; denn mit zunehmender Antigen-Menge (hier sEGFR) werden die auf der ELISA-Platte immobilisierten Antikörper allmählich abgesättigt, so dass man sich letztlich einem Maximalwert nähern würde. Wenn man eine derartige Sättigungskurve als Standardkurve für die Auswertung unbekannter Proben verwenden will, könnte man den unteren, annähernd linearen Bereich der Kurve für eine einfache Rechnung (Proben OD durch Steigungswert dividieren) heranziehen; so dürfen aber nur Proben mit OD-Werten aus diesem niedrigen Bereich ausgewertet werden. Einen größeren Messbereich erhält man, wenn man auf die Standardkurve die Sättigungsfunktion gemäß

$$OD = a * sEGFR / (b + sEGFR) + c$$

angewendet und durch Regression (Ermittlung der Konstanten a, b und c) eine Kurve erzeugt, welche optimal an die Messpunkte angepasst ist. Mit der so erzeugten Funktion werden dann die Messwerte der Proben ausgewertet (s. Tabelle 5 rechte Spalte). Trägt man die so berechneten Protein-Werte gegen das Probevolumen auf, zeigt sich eine lineare Abhängigkeit (Abb. 6), die – bei Abwesenheit von Störfaktoren – auch so zu erwarten ist. Allerdings: Wurden höhere Serumvolumina in den Test eingesetzt (nicht gezeigt), ist diese Linearität nicht mehr gegeben; die berechnete Menge stieg nicht mehr entsprechend des eingesetzten Probevolumens an, vermutlich aufgrund von Interferenzen durch die dann sehr hohe Proteinkonzentration (Interaktion mit Assay-Komponenten). Das mag nicht verwundern, wenn man die hohe Konzentration von

Immunglobulinen im Serum bedenkt; bereits bei 10 µl Serumprobe ist der darin enthaltene Immunglobulin-Gehalt auf molarer Ebene mehr als 3 Zehnerpotenzen höher als der Gehalt von EGFR-gebundenen spezifischen Antikörpern; möglicherweise ergeben sich Störungen durch Kreuzreaktionen. Deshalb wurden für die spätere Untersuchung der Seren nur solche Messwerte einbezogen, die in der Darstellung nach Abb. 6 eine klare lineare Abhängigkeit vom eingesetzten Probevolumen zeigten. Die Berechnung der Serumgehalte erfolgt dann über eine lineare Regression der 4 Messwerte (im obigen Beispiel wäre das Ergebnis 0,0369 ng/µl = Steigung der Regressionsgerade = 36,9 ng/ml). Für jede unbekannte Serumprobe werden nach dem dargestellten Verfahren 2 Verdünnungsreihen gemessen, so dass das Ergebnis jeder Probe letztlich auf 8 Einzelmessungen basiert und somit verlässlich erscheint.

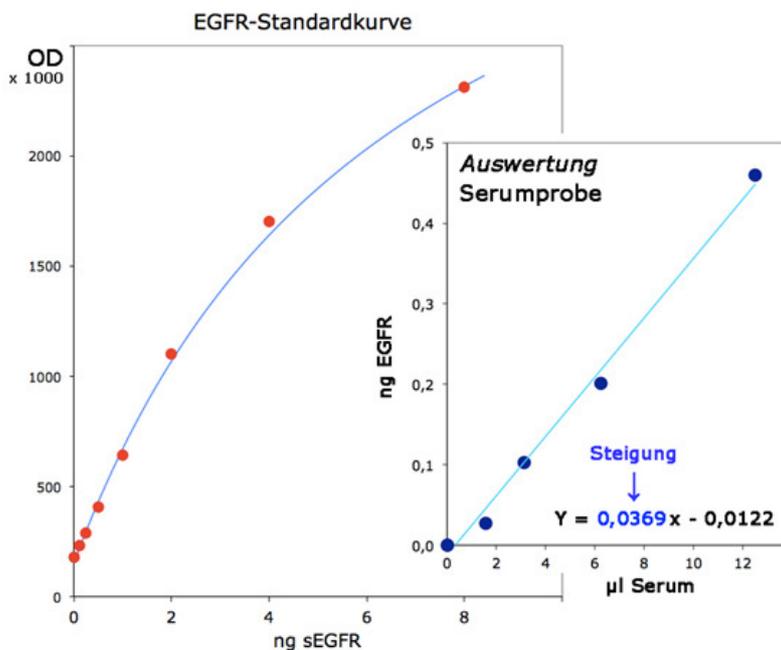


Abb. 7 EGFR – Standard - kurve und Auswertung der Serumprobe. Der EGFR-Gehalt der untersuchten Serumprobe entspricht der Steigung der Regressionsgeraden. Hier: 36,9 ng/ml. (OD=Extinktion)

Überprüfung der Assay-Spezifität. — Im obigen Beispiel wurde ein beliebiges Serum eines gesunden Patienten gemessen. Aus dem gefundenen Gehalt von 36,9 ng/ml folgt eine molare Konzentration von etwa 0,5 nmol/l. Vor dem Hintergrund, dass man lange Zeit davon ausging, dass der EGFR als Membranprotein überhaupt nicht im Serum vorkommt, ist dies ein recht hoher Wert. Um unspezifische Effekte des Testes auszuschließen, wurde daher der folgende Test durchgeführt: Eine Serumprobe wurde mit EGF versetzt, welches vorhandenes EGFR-Protein besetzen sollte. Da der „catcher“-Antikörper des ELISA an die EGF-Bindungsstelle bindet, sollte aufgrund einer Konkurrenz weniger EGFR-Protein gebunden und erfasst werden. Abb. 8 zeigt,

dass in Gegenwart von EGF deutlich weniger Antigen erfasst wird. Die fast vollständige Auslöschung des Signals bei der Serumprobe durch den physiologischen Liganden zeigt, dass das gemessene Signal in Abwesenheit von zugesetztem EGF ausschließlich durch die vorhandenen EGFR-Bindungsstellen erzeugt wurde.

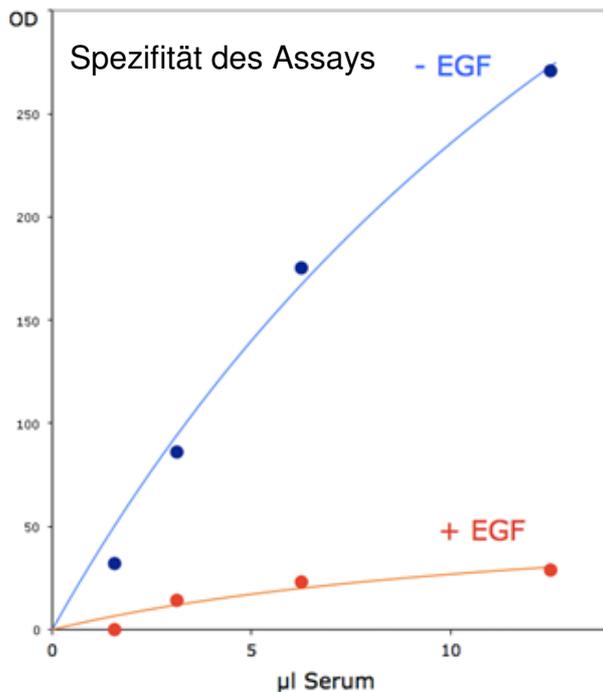


Abb. 8 Überprüfung der Assay-Spezifität. Im ELISA wurde eine Serumprobe einmal mit EGF (50 µM; rote Kurve) und einmal nicht mit EGF versetzt (blaue Kurve). Die mit EGF vorbehandelte Probe zeigt, dass der Ligand EGF spezifisch an die Bindungsstelle seines Rezeptors bindet und damit die Bindung für Ak1 blockiert, so dass hier praktisch kein Signal entsteht. Das gemessene Signal bei der unbehandelten Probe (blau) ist auf die spezifische Bindung von Ak1 zurückzuführen. (OD=Extinktion)

3.3 Anwendung des Tests auf Serumproben von gesunden Spendern und Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle

Nachdem der beschriebene ELISA (monoklonaler antiEGFR Ak1 als „catcher“, polyclonaler anti-EGFR Ak2) hinreichend für die Anwendungen an Patientenserum validiert war, sollte nun untersucht werden, ob Unterschiede zwischen gesunden und Tumorpatienten messbar sind. Dazu wurden je 20 Serumproben von gesunden Blutspendern und von Patienten mit PEC der Mundhöhle beschafft, analysiert und wie oben beschrieben ausgewertet; dabei wurde jedes Serum zwei mal in 4 Konzentrationen gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS 20.0. Die erhobenen Daten aus erster und zweiter ELISA-Messung, sowie die hieraus berechneten Mittelwerte, die zur statistischen Analyse herangezogen wurden, sind in Tabelle 6 und 7 dargestellt.

Tabelle 6 Serum-EGFR-Gehalte gesunder Spender (SA=Standardabweichung)

Serumproben gesunde Spen- der	EGFR-Gehalt Messung 1 (ng/ml)	EGFR-Gehalt Messung 2 (ng/ml)	Mittelwert EGFR (ng/ml)	SA (ng/ml)
G1	11,7	13,2	12,5	± 1,1
G2	13,7	13,0	13,4	± 0,5
G3	13,1	14,5	13,8	± 1,0
G4	15,8	16,1	16	± 0,2
G5	15,6	17,6	16,6	± 1,4
G6	16,3	18,1	17,2	± 1,3
G7	18,8	18,3	18,6	± 0,4
G8	19,7	22,7	20,9	± 2,5
G9	23,6	27,7	25,7	± 2,9
G10	29,3	31,2	30,3	± 1,3
G11	33	31,2	32,1	± 1,3
G12	32,8	37,8	35,3	± 3,0
G13	33,1	37,4	35,3	± 3,5
G14	28,6	43,6	36,1	± 10,6
G15	32,3	40,8	36,6	± 6,0
G16	27,9	46,3	37,1	± 13
G17	35,6	41,8	38,7	± 4,4
G18	42,5	44,3	43,4	± 1,3
G19	54	56,2	55,1	± 1,6
G20	60,9	68,4	64,7	± 5,3

Tabelle 7 Serum-EGFR-Gehalte von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen (SA= Stanadardabweichung)

Serumproben von Patienten mit oralen PEC	EGFR-Gehalt Messung 1 (ng/ml)	EGFR-Gehalt Messung 2 (ng/ml)	Mittelwert EGFR (ng/ml)	SA (ng/ml)
T1	31,8	23,1	27,5	± 6,2
T2	29,9	32,4	31,2	± 1,8
T3	32,0	30,3	31,2	± 1,2
T4	36,0	32,5	34,3	± 2,5
T5	36,4	39,9	38,2	± 2,5
T6	40,8	45,6	43,2	± 3,4
T7	45,9	44,7	45,3	± 0,8
T8	47,1	45,1	46,1	± 1,4
T9	54,6	47	50,8	± 5,4
T10	58,5	52,9	55,7	± 4

T11	60,3	59	59,7	± 0,9
T12	62,2	63,1	62,7	± 0,6
T13	67,6	59,3	63,5	± 5,9
T14	75	68,4	71,7	± 4,7
T15	78	70,5	74,3	± 5,3
T16	76,9	71,8	74,4	± 3,6
T17	84,1	78,2	81,2	± 4,2
T18	84,2	85,3	84,8	± 0,8
T19	84,7	88,8	86,8	± 2,9
T20	100,4	99,4	99,9	± 0,7

Die EGFR-Gehalte aus erster und zweiter Messung bei gesunden Spendern sowie auch bei Tumorpatienten streuen nur geringfügig: Das Streudiagramm in Abb. 9, in welchem die Ergebnisse der ersten gegen die der Messung aufgetragen wurden, demonstriert eine lineare Abhängigkeit. Diese lässt sich durch Varianzanalyse (im gemischten Modell der ANOVA) verifizieren; es ergeben sich Werte für das Bestimmtheitsmaß R^2 von $> 0,9$ ($R^2_{Tumorpatienten} = 0,959$ und $R^2_{Gesunde} = 0,901$), was eine hohe Reliabilität der Untersuchung zeigt.

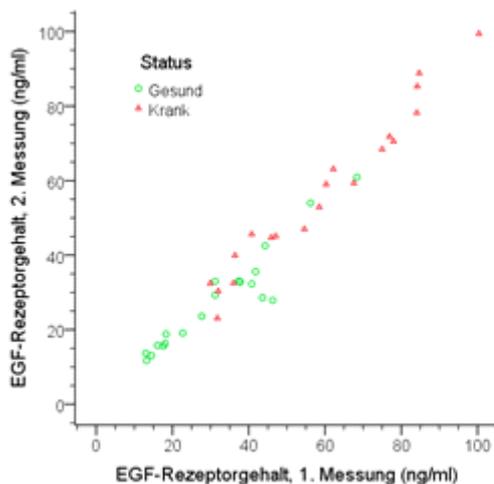


Abb. 9 Scatterplot der Ergebnisse der EGFR-Bestimmung: Erste Messung vs. zweite Messung.

Die in den Tabellen 5 und 6 berechneten Serum-EGFR-Werte von gesunden Spendern und Mundhöhlen-PEC-Patienten (entsprechend auch die Verteilung grüner versus roter Symbole in Abb. 9) lassen eine Tendenz zu höheren Serum-EGFR-Werten bei Tumorpatienten vermuten. Dieser Befund sollte statistisch abgesichert werden:

Tabelle 8 Gruppenstatistik der EGFR-Serumkonzentrationen *gesund vs .krank*
(n = Anzahl der Proben, p-Wert < 0,001 Welch)

Serum	n	Mittelwert EGFR ± Stabw	Median	Range
		(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)
gesunde Spender (G1-G20)	20	30,0 ± 14,3	31,2	12,5 – 64,7
PEC-Patienten (T1-T20)	20	58,1 ± 21,2	57,7	27,5 – 99,9

Der mittlere Serum-EGFR-Gehalt von Tumorpatienten ist fast doppelt so hoch wie der von gesunden Spendern (*58,1 ng/ml ± 21,2 bei Tumorpatienten vs. 30,0 ng/ml 0 ± 14,3 bei gesunden Spendern*). Der Boxplot (Abb. 10) veranschaulicht, dass sich die Median-Werte deutlich unterscheiden, die Einzelwerte in ihrer Gesamtheit zwar überlappen, nicht aber die Bereiche, in denen die Hälfte der jeweiligen Werte liegen (graue Boxen).

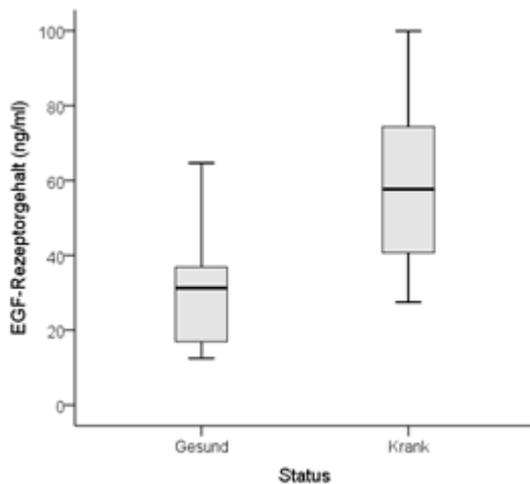


Abb. 10 Boxplot der EGFR-Gehalte *gesund vs. krank*. Dargestellt wird die jeweilige Spannweite der Daten (Mittelwerte aus Messung 1 und 2), der Bereich der mittleren 50% dieser Werte (graue Boxen) sowie der Medianwert (horizontale Linie in den Boxen).

3.4 Spezifischer Test auf sezerniertes EGFR (sEGFR₁₇)

Der bisher durchgeführte EGFR-ELISA erfasst aufgrund der Spezifität des immobilisierten Antikörpers alle Proteine mit intakter EGF-Bindungsstelle, welche zumindest einen beträchtlichen Teil der EGFR-Ektodomäne besitzen, gegen welche der eingesetzte zweite Antikörper (Ak2) gerichtet ist. Folglich diskriminiert der Test nicht zwischen EGFR-Ektodomänen, welche möglicherweise durch Proteolyse von Zellober-

flächen abgetrennt wurden (shedding) und solchen EGFR-Formen, die von Zellen als sekretorische Proteine produziert werden. Zumindest für eine EGFR-Form, nämlich dem von Weber et al. beschriebenen sEGFR₁₇, konnte klar gezeigt werden, dass es sich dabei um ein sekretorisches Produkt handelt. Allerdings wurde es bisher nur bei einer einzigen Tumorzell-Linie gefunden; ob es auch im Serum von Gesunden vorkommt, ist nicht bekannt. Möglicherweise sind solche sekretorischen EGFR-Formen als aberrante Gen-Produkte tumorspezifisch und würden damit maßgeblicher für die Verwendung als Tumormarker sein.

Es war nun das Ziel, einen Test zur selektiven Erfassung des sekretorischen sEGFR zu entwickeln. Dazu wurde das Vorhandensein einer 17 Reste langen Aminosäure-Sequenz genutzt, welche im sEGFR₁₇ aber nicht im membranständigen EGFR vorkommt (s. Einleitung). Eine BLAST-Recherche hatte ergeben, dass diese Sequenz einzigartig ist und sich bei keinem anderen humanen Protein finden lässt. Daher wurde gemäß dieser Sequenz ein synthetisches Peptid zur Immunisierung von Kaninchen hergestellt und das erhaltene Immuneserum (AkC) anstelle des Ak2 in den beschriebenen ELISA eingesetzt. Abbildung 11 demonstriert, dass mit sEGFR₁₇ als Standardprotein und AkC als zweitem spezifischen Antikörper ebenfalls eine Sättigungskurve (rot) erhalten wird. Allerdings ist der Gehalt dieses neuen Antiserums an spezifischen, gegen sEGFR₁₇ gerichteten Antikörpern deutlich geringer als bei dem zuvor eingesetzten Antiserum Ak2 (blaue Kurve); denn die Kurve ist trotz niedrigerer Verdünnung des Antiserums im Test flacher. Das entspricht durchaus der Erwartung, denn AkC kann nur mit Antikörper-Populationen gegen den kurzen 17-Reste C-Terminus des sEGFRs das Signal weiterleiten, während Ak2 auch die Epitope des übrigen, 616 Reste grossen Rezeptorproteins nutzen kann. Vor diesem Hintergrund ist eine geringere Empfindlichkeit des Tests als unter Verwendung von Ak2 zu erwarten. Das lässt sich quantitativ ausdrücken, wenn man als Maß für die Empfindlichkeit eine signifikante Differenz des Messwertes vom Leerwert annimmt und eine Reihe von Standardkurven darauf überprüft: Danach lässt sich mit dem AkC-ELISA knapp 1 ng sEGFR verlässlich nachweisen; beim Ak2-ELISA sind es etwa 0,3 ng (Abbildung 11).

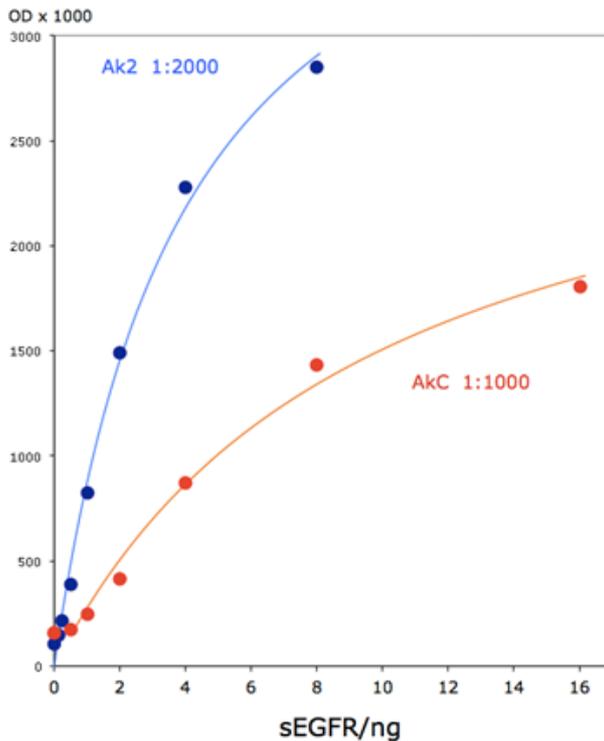


Abb. 11 Standardkurvenvergleich im EGFR- und sEGFR-ELISA. Der flache Kurvenverlauf der roten Kurve demonstriert die geringere Empfindlichkeit des sEGFR-ELISA. (OD=Extinktion)

Die Empfindlichkeit des sEGFR-ELISA ließ sich nicht durch Erhöhung der AkC-Konzentration verbessern, da dann zunehmende Probleme mit unspezifischen Bindungen auftraten (nicht gezeigt); deshalb wurden alle weiteren Messungen mit einer AkC-Verdünnung von 1:1000 durchgeführt. Und immerhin: Der Test sollte spezifisch für das sezernierte sEGFR₁₇ sein und dementsprechend den membranständigen („normalen“) EGF-Rezeptor oder Fragmente desselben nicht erfassen. Dies wird im Kontroll-Experiment demonstriert (Abb. 12):

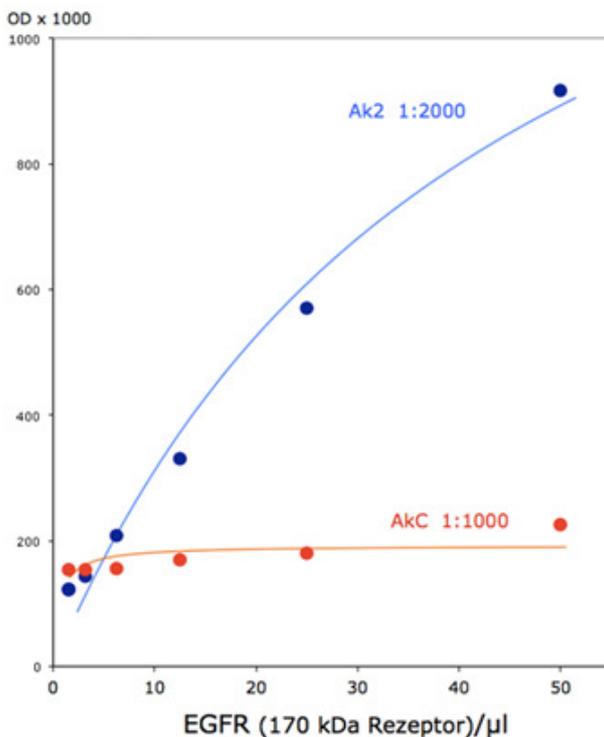


Abb. 12 Kontrollversuch mit ausschließlich Gesamtrezeptor. Aus A431-Zellen isolierte EGF-Rezeptoren werden im ELISA mit Ak2 erfaßt (blaue Kurve), während der sEGFR-ELISA mit AkC praktisch kein konzentrationsabhängiges Signal liefert (rote Kurve). (OD=Extinktion)

Nachdem die Spezifität des sEGFR/AkC-ELISA demonstriert war, wurde er auf die Untersuchung zweier beliebiger Serumproben angewendet, die eines Gesunden sowie die eines Tumor-Patienten. Die Auswertung dieses Experiments zeigt (Abb. 13), dass der Test in humanem Normalserum wenig antikörper-responsives Protein erkennt, wohl aber in der Probe des Tumorpatienten. Es ist fraglich, ob das geringe Signal bei der Normalserum-Probe signifikant ist; denn in Anbetracht des hohen Probeneinsatzes (hier 20-100 μl statt 2-13 μl im EGFR-ELISA) können unspezifische Effekte wohl nicht ausgeschlossen werden; d.h. das Vorkommen von sEGFR₁₇ in dieser Probe erscheint nicht sicher, während das deutliche Signal des Tumorpatientenserums eher einen tatsächlichen sEGFR₁₇-Gehalt des Serums repräsentiert. Dieser Befund müsste nun an weiteren Fällen überprüft werden. Allerdings standen zu geringe Serum-Volumina für Einzelmessungen der ausgesuchten Tumor-Patienten zur Verfügung. Deshalb wurden zwei Pools aus je 20 Einzelseren der Tumor-Patienten sowie der gesunden Probanden (je 15 μl) hergestellt und im sEGFR-ELISA analysiert und verglichen (Abb. 14). Da die erhaltenen Signale an der Nachweisgrenze lagen, wurden 5 separate Tests an unterschiedlichen Tagen durchgeführt, um das Ergebnis statistisch abzusichern.

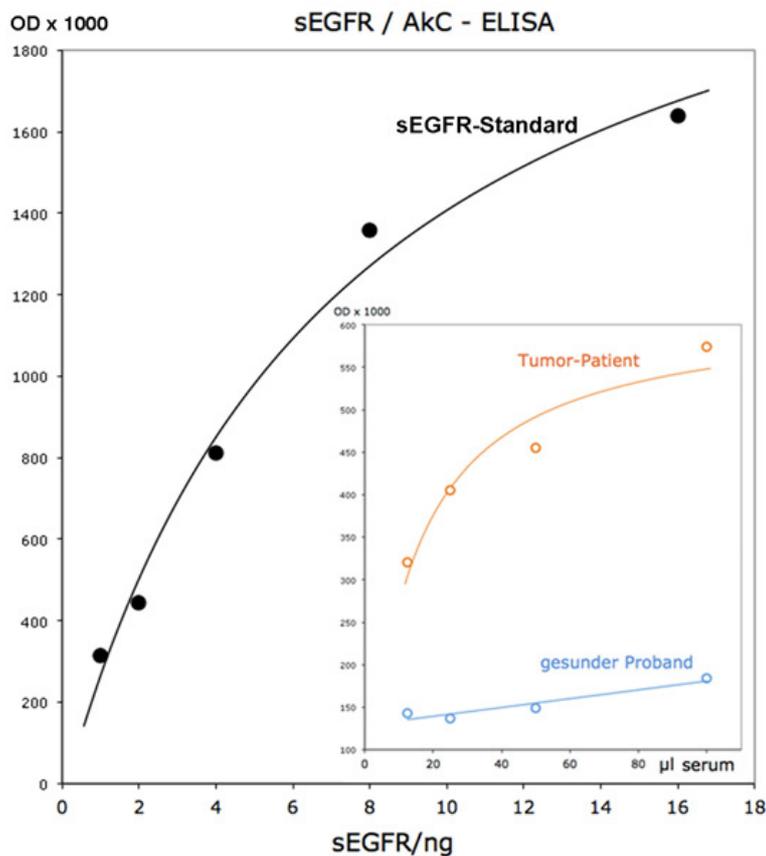


Abb. 13 Anwendung des sEGFR-ELISA auf Serumproben. Dargestellt sind die Auswertungen je einer Serumprobe eines gesunden Spenders und die eines Tumorpatienten (Inset) sowie der zugehörige sEGFR-Standard. Während im Normalserum praktisch kein antikörper-responsives Protein erkannt wird, zeigt das Patientenserum deutliche Extinktionen. (OD=Extinktion)

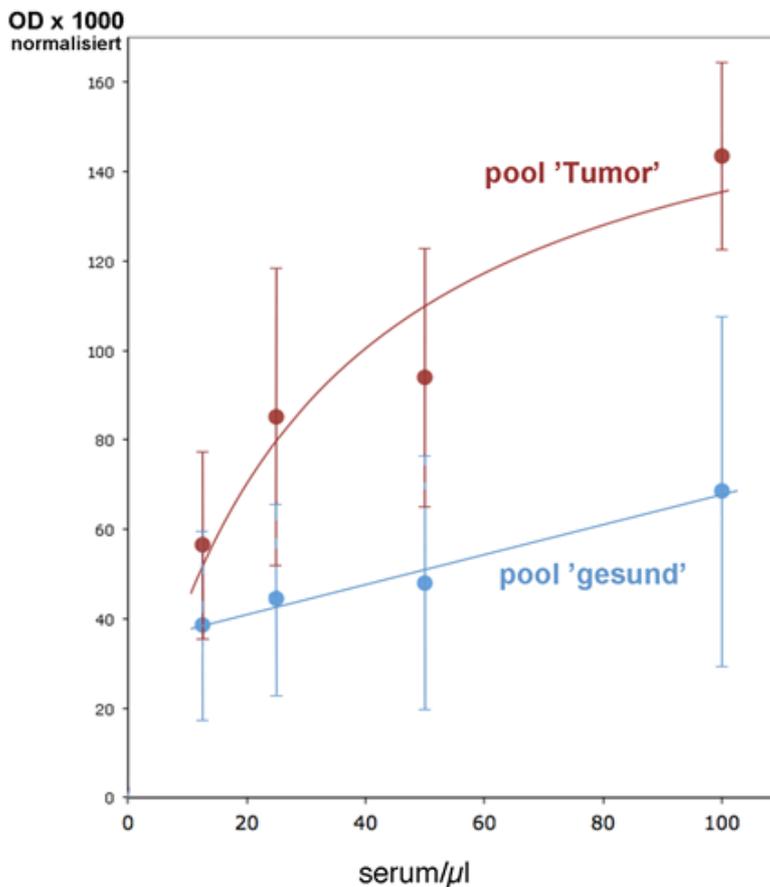


Abb. 14 Mehrfachmessung von Serumpools (Tumorpool vs. Normalserumpool) Der Tumorpool zeigt im Vergleich zum Normalserumpool deutliche Extinktionen und bestätigt damit das bisherige Ergebnis der Einzelmessung. (OD=Extinktion)

Trotz beträchtlicher Streuungen bei den 5 durchgeführten Tests wird der Befund erhöhter sEGFR-Protein-Konzentrationen bei Tumorpatienten bestätigt. Und auch bei dem pool der 20 gesunden Probanden scheint es einen nachweisbaren Gehalt zu geben; zumindest lässt sich aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit des erhaltenen Signals darauf schließen. Man erkennt allerdings auch, dass die durch lineare Regression ermittelte Gerade nicht auf den Koordinaten-Nullpunkt extrapoliert, so dass eine seriöse Quantifizierung im gesunden Serum-pool nicht möglich ist (deshalb auch keine Standardkurve in Abb. 14).

Dagegen lagen die Signale bei dem Tumor-pool deutlich höher, so dass eine Quantifizierung der Serum-EGFR-Konzentration durch ELISA unter Einbeziehung einer sEGFR-Standkurve möglich scheint (Abb. 15 B):

Quantifizierung von EGFR im Tumorpool:

A. EGFR-ELISA (→ gesamt EGFR) *versus* B. sEGFR-ELISA (→ nur sekretorisches sEGFR)

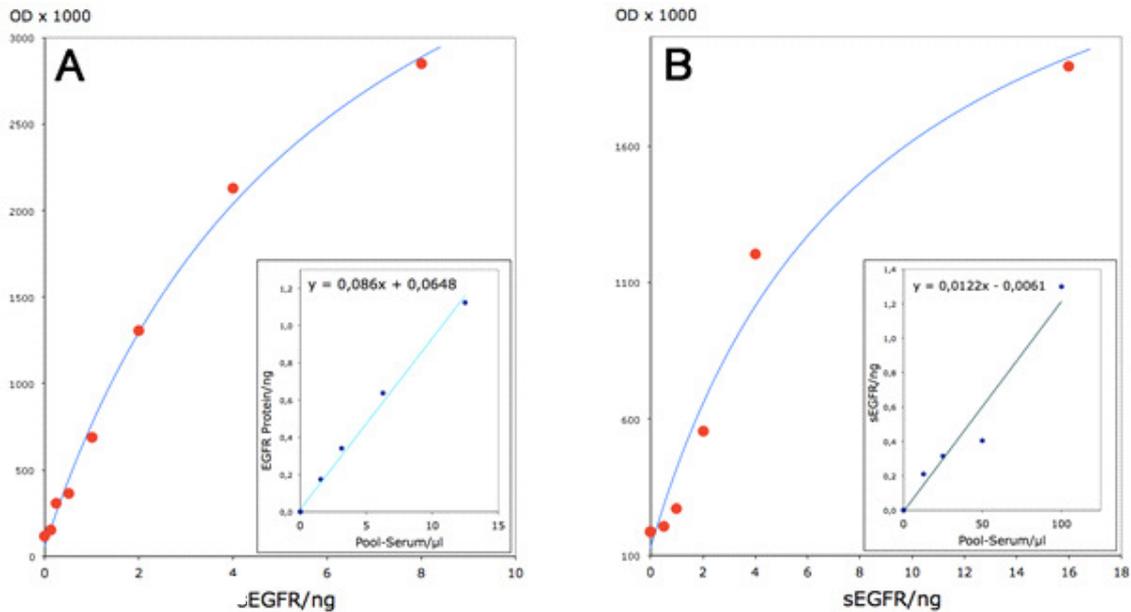


Abb. 15 Quantifizierung von EGFR im Tumorpool. Das Ergebnis der Untersuchung vom Tumorpool im EGFR-ELISA (A) und sEGFR-ELISA (B) ist im Inset dargestellt. Die berechnete Regressionsgerade ergibt sich aus der jeweils zugehörigen Standardkurve. Die Steigung der Geraden entspricht dem EGFR- bzw. sEGFR-Gehalt der untersuchten Probe: 86 ng/ml EGFR bzw. 12 ng/ml sEGFR. (OD=Extinktion)

Der Gehalt an sEGFR-Protein, gemessen mit dem Antiserum gegen den 17-Reste-C-Terminus beträgt im Serumpool der Tumorpatienten etwa 12 ng/ml (sEGFR-ELISA; Insertion). Wenn man dieselbe Probe mit dem Antiserum gegen das gesamte EGFR-Protein analysiert (EGFR-ELISA) erhält man einen Gehalt von 86 ng/ml. Die naheliegende Erklärung dieser Diskrepanz ist das Vorliegen sowohl von EGFR-Protein, welches nicht mit dem sekretorischen sEGFR identisch ist (z.B. proteolytisch abgespalten) sowie einem kleineren Anteil von sekretorischem sEGFR.

Dieses Experiment zeigt, dass der sEGFR-ELISA im Prinzip auf Humanserum anwendbar ist. Es bestätigt den höheren Gehalt von Antigen im *pool* der Tumorpatienten. Möglicherweise erscheint damit sEGFR₁₇ aussagekräftiger als Gesamt-EGFR für die Unterscheidung von Normal- und Tumorpatientenseren. Allerdings können an der Validität der Ergebnisse auch Zweifel aufkommen; denn mit den hohen Probevolumina werden bis zu ca. 6 mg Serumprotein pro Messpunkt eingesetzt, entsprechend einem etwa sechs millionenfachen Überschuss gegenüber dem gefundenen Antigen. Auch wenn die eingesetzten Antikörper spezifisch sein sollten, sind unspezifische Effekte nicht ausgeschlossen; die erhaltenen nicht-linearen Kurven

der Signale sind dafür ein Anzeichen. Außerdem liegen die Signale in der Nähe der Nachweisgrenze, was sich in den erhaltenen Streuungen zeigt. So lässt sich zumindest für Normalserum nicht eindeutig das Vorkommen von sEGFR₁₇ belegen oder ausschließen. Dieser Frage sollte durch die folgenden Experimente nachgegangen werden.

3.5 Immunaффinitätschromatographie von Humanserum

Anders als bei einem ELISA kann bei der Chromatographie ein (fast beliebig) großes Probevolumen eingesetzt werden. Die Immunaффinitätschromatographie eines größeren Serumvolumens sollte eine EGFR-angereicherte, von Fremdprotein befreite Fraktion liefern. In dieser ließe sich das isolierte EGFR-Protein durch mehrere Verfahren analysieren. In einem Vorversuch mit Normalserum sollte geklärt werden, ob dies mit den vorhandenen Werkzeugen im Prinzip möglich ist.

Vorversuch zur Etablierung der Methode. — Es kam eine Sepharose-basierte Matrix zur Anwendung, in welcher der auch für den ELISA verwendete Antikörper (Ak1) kovalent gekoppelt worden war. Diese Matrix hatte sich bereits bei der Reinigung von sEGFR aus Tumorzell-Kulturen bewährt; nach den jeweiligen Experimenten ließ sich die Affinitätsmatrix zur vollen Aktivität regenerieren. Eine derartige Chromatographie-Säule wurde für das folgende Experiment eingesetzt: Mehrere Serum-Konserven von gesunden Spendern wurden zu 3,7 Litern gepoolt, mit demselben Volumen PBS verdünnt, zentrifugiert, filtriert und während mehrerer Tage durch eine 7 ml-Ak1-Säule gepumpt. Nach der im Material- und Methodenteil beschriebenen Methode, welche intensive Waschschrirte umfasst, wurde letztlich ein Eluat von 16,5 ml von der Matrix desorbiert; dieses wurde im Vergleich zum Ausgangsserum im EGFR-ELISA analysiert. Während für das Serum dabei wie zuvor nur niedrige Signale erhalten wurden (OD bis 0.25), reagierte das angereicherte Konzentrat intensiv und musste für den Test sogar verdünnt werden. Es ergab sich:

Ausgangsserum	3700 ml	57,8 ng/ml EGFR	214 µg EGFR eingesetzt
Eluat	16,5 ml	11 µg/ml EGFR	181 µg EGFR isoliert

Damit wurde eine signifikante Menge EGFR-Protein aus dem Serum isoliert, sogar mit einer erstaunlich hohen Ausbeute. Es stellt sich nun die Frage, ob in der isolierten

Proteinfraktion auch das sekretorische sEGFR₁₇ enthalten ist: Im sEGFR-ELISA ergab sich für das Eluat eine Konzentration von 0,92 µg/ml sEGFR, entsprechend einer anscheinend isolierten Menge von etwa 15 µg (also deutlich mehr von den ELISA-Daten erwarten). Dabei lagen die gemessenen Extinktionen weit über der Nachweisgrenze (OD bis 0.9), so dass das Ergebnis zwar aus messtechnischer Sicht verlässlich erscheint; jedoch kamen aus zwei Gründen Zweifel an diesem Befund:

- Die verwendete Affinitätssäule war zuvor in der Arbeitsgruppe zur Isolierung großer Mengen (Milligramm-Bereich) von sEGFR-Protein aus Zellkulturmedien benutzt worden. Obwohl die Matrix vor der Beladung gründlich einer Reihe von Waschschritten unterworfen worden war, ist eine Kontamination des Eluats mit „altem“ EGFR-Protein nicht völlig auszuschließen; denn die hier nachzuweisenden Mengen liegen in einem um mehrere Zehnerpotenzen niedrigeren Bereich. Die oben gezeigte, erstaunlich hohe Ausbeute von 181/214 könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein Teil des im Eluat gefundenen EGFR-Proteins vielleicht aus Resten vorausgegangener Chromatographien stammte. Dieser Aspekt wird später mit einem Experiment unter Verwendung einer neu hergestellten Affinitätsmatrix bearbeitet werden.
- Bereits bei der Gewinnung des EGFR-haltigen Eluats war eine auffällig hohe Proteinkonzentration beobachtet worden (Schäumen, gekrümmter Meniskus), viel höher als der Konzentration der im ELISA gemessenen EGFR-Konzentration entsprechen konnte. Die Messung einer OD von 1,437 bei 280 nm bestätigte den Verdacht. Würde es sich um EGFR handeln, entspräche das einer Konzentration von 1,8 mg/ml; gemessen wurde mit ELISA aber nur ein Gehalt von 11 µg/ml. Eine darauf hin durchgeführte SDS-Gelelektrophorese brachte Klarheit: Nur 10 µl des Eluats zeigten deutliche Banden – keine davon im Bereich des sEGFR (ca. 110 kDa, siehe auch Abb. 16 a); bei einer aufgetragenen Proteinmenge von ca. 0,1 µg (mit ELISA in 10 µl gemessen) war das auch nicht zu erwarten. Das Bandenmuster lässt an Immunglobuline denken (schwere und leichte Ketten, bzw. nicht-reduzierte Komplexe). Das bestätigte sich durch massenspektroskopische Untersuchung der drei Hauptbanden des Gels (F. Buck, Institut für Klinische Chemie, UKE): Alle identifizierbaren Peptidfragmente entstammten Immunglobulinen. Es erscheint schwer erklärbar, weshalb diese Serumbestandteile in großer Menge auf einer sich sonst als hoch-spezifisch erwiesenen Affinitätssäule ko-purifiziert wurden. Zwar wurden mit 3,7 L Serum ca. 220 Gramm Protein durch die Säule gepumpt, so dass die im Eluat gefundenen Immunglobuline mit 20 mg nur knapp 0,1 Promille davon ausmachen; jedoch kann es sich nicht um eine

unspezifische Verschleppung handeln, denn das Hauptprotein des Serums, Albumin, kommt im Eluat praktisch nicht vor (s. Abb. 16 Position bei 66 kDa), wurde also vollständig ausgeschlossen. Auch ein „Ausbluten“ (Hydrolyse) von gekoppeltem Antikörper in dieser Menge ist unwahrscheinlich.

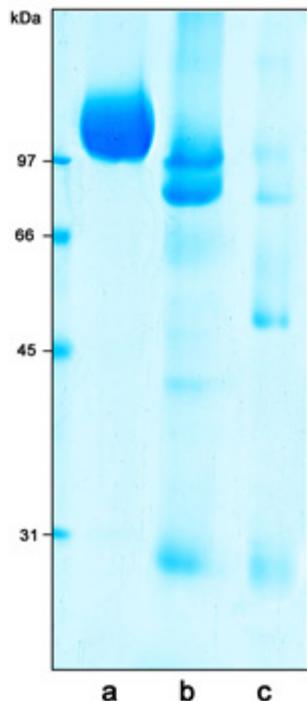


Abb. 16 SDS-Gelelektrophorese von affinitätschromatographisch gewonnenem EGFR. Die gelelektrophoretische Auftrennung der aus der Affinitätschromatographie gewonnenen Fraktion (b) zeigt, dass keine Bande im kDa-Bereich der Kontrollprobe (a) liegt. Das Bandenmuster erinnert eher an das von Immunglobulinen (Ig). Eine unspezifische Verschleppung von Ig kann ausgeschlossen werden, da das im Serum enthaltene Albumin (c) in der gewonnenen Fraktion (b) nicht vorkommt. (a= sEGFR als Kontrolle, b= Fraktion aus der Affinitätschromatographie, c= Serum, linker Rand= Markerprotein)

Dass es sich bei der beobachteten Ko-Purifikation von Immunglobulinen nicht um einen unspezifischen Verschleppungseffekt handelte, zeigte auch eine Rechromatographie des Eluats über die gewaschene Affinitätssäule: Nicht nur das EGFR-Protein sondern auch die Immunglobuline wurden zum größeren Teil wieder adsorbiert und mit dem Eluat desorbiert. Die Ursache für diesen Effekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden – und damit auch nicht, ob sich im EGFR-ELISA, der ja für die Beschichtung der Mikrotiterplatte den gleichen Antikörper verwendet, ähnliche Effekte, also Akkumulationen von Immunglobulinen, einstellen und diese vielleicht durch Kreuzreaktionen die Ergebnisse beeinflussen.

Dieser Vorversuch hatte also ergeben, dass eine Immunaffinitätschromatographie von Humanserum im Prinzip möglich erscheint, zukünftig auch mit deutlich weniger Serum-Einsatz, dass jedoch mit einer unerklärten Ko-Purifikation von Immunglobulinen gerechnet werden und bei der weiteren Charakterisierung des isolierten EGFR-Proteins berücksichtigt werden muss. Außerdem erscheint die Verwendung von neuen, bisher

unbenutzten Affinitätsmatrices unumgänglich, um die Verschleppung von Antigen über das Recyclen der Matrix hinaus sicher auszuschließen.

Hauptexperiment: Isolierung von EGFR aus Humanserum. — Eine Affinitätsmatrix wurde neu hergestellt (Ak1-Antikörper gekoppelt an 1ml-HiTrap-Säule) und vor der ersten Verwendung ausgiebig gewaschen. Die Chromatographie wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, diesmal allerdings nur mit einer dem kleineren Säulenvolumen angepassten, geringeren Serummenge (20 ml; neuer Proband). Die letztlich von der Chromatographie-Säule desorbierte Fraktion wurde durch Lyophilisation und Dialyse zu einem Volumen von 1 ml konzentriert (Eluat-Konzentrat). Im EGFR-ELISA analysiert wurden dieses Konzentrat sowie das Ausgangsserum und der Durchlauf der Säule bei der Beladung. Somit war eine Bilanzierung der Chromatographie möglich:

Ausgangsserum	20 ml	19 ng/ml EGFR	380 ng EGFR eingesetzt
(Nach Säulenpassage konnte kein EGFR im Durchlauf nachgewiesen werden)			
Eluat	5,5 ml	9,7 ng/ml EGFR	53 ng EGFR isoliert
– daraus Konzentrat	1,0 ml	49 ng/ml EGFR	49 ng

Daraus folgt:

- Das Vorkommen von löslichem EGF-Rezeptorprotein im Humanserum ist eindeutig gezeigt; es konnte aus Serum in gut messbarer Menge isoliert werden. Wegen der Wichtigkeit dieser Aussage werden hier die Rohdaten des ELISA-Ergebnisses gezeigt. Die Linearität der berechneten Menge vom eingesetzten Probenvolumen spricht für die Verlässlichkeit der Messung (hier nur gezeigt für das Eluat-Konzentrat Abb. 17; die Messungen des nicht-konzentrierten Eluats sowie des Serums waren ebenfalls linear, allerdings bei niedrigeren OD-Werten). Bei den höheren OD-Werten des Konzentrats (> 1,0) kann man unspezifische Störungen des Assays ausschließen.

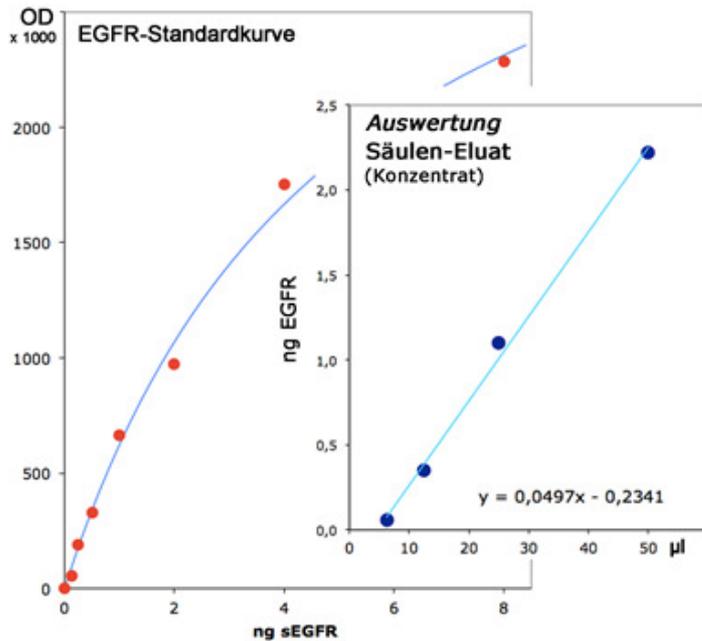


Abb. 17 EGFR-ELISA - Säulen-Eluat-Konzentrat. Anhand der EGFR-Standardkurve wurde ein EGFR-Gehalt von 49 ng/ml für das Konzentrat berechnet (Inset). (OD=Extinktion)

- Die Ausbeute von 49 ng an isoliertem EGFR-Protein war mit ca. 15% unerwartet niedrig. Eine unzureichende Bindung an die Matrix war unwahrscheinlich, da im Durchlauf nach Säulenpassage kein Protein mit ELISA detektiert werden konnte. Aber eine andere Erklärung der niedrigen Ausbeute bietet sich an: Wenn man bedenkt, dass bei der Synthese der Affinitätsmatrix Milligramm-Mengen von Antikörper gekoppelt wurden (in diesem Fall vermutlich 3 bis 5 mg), kann man wohl nicht ausschließen, dass geringe Mengen des Proteins – obwohl als Hydroxysuccinimid-Ester kovalent gebunden – hydrolytisch abgespalten werden und aus der Säule „ausbluten“. Um dies zu überprüfen, wurde ein für den Ak1-Immunglobulin-Typ spezifischer Detektionsantikörper zur Durchführung eines ELISA (auf mit EGFR beschichteten Platten; s. Material und Methode Abschnitt 2.5) verwendet, der die Quantifizierung von Ak1 ermöglicht. Die letzte Waschlösung der Immunaffinitätssäule vor dem Durchpumpen des Serums wurde diesem Test unterzogen und ergab einen Gehalt von 6,4 ng/ml Antikörper. Das „Ausbluten“ findet also tatsächlich statt. Dieser Wert ist zwar gering im Vergleich zur Menge des an die Matrix gekoppelten Antikörpers: In einem Volumen von 5,5 ml (entsprechend dem Säure-Eluat) wären unter Annahme gleichbleibender Hydrolyse-Rate ca. 35 ng Antikörper enthalten, also etwa 0,001% des gekoppelten Proteins. Der Wert ist jedoch hoch, nämlich in der gleichen Größenordnung, im Vergleich zur EGFR-Menge und -Konzentration in Serum und Säulen-Eluat. Folglich kann man nicht ausschließen, dass bereits bei der Beladung der Matrix mit Serum ein Teil des enthaltenen EGFR-Proteins an löslichen, abgespaltenen Antikörper bindet, nicht immobilisiert und im Eluat nicht erfasst wird. Vor allem muss

man annehmen, dass auch das Eluat nicht nur EGFR sondern auch Antikörper in ähnlicher Menge enthält, welcher vermutlich nicht durch ELISA erfassbare Komplexe mit seinem Antigen bildet. Aus all dem folgt, dass die im EGFR-ELISA gefunden Gehalte wahrscheinlich zu niedrig gemessen wurden und sich so die geringe Ausbeute der Chromatographie erklärt. Trotz dieses Störeffekts kann man aber festhalten, dass das hier beschriebene Chromatographie-Experiment die ELISA-Ergebnisse und damit den Befund des Vorkommens von löslichem EGFR in Humanserum unterstützt. Immerhin bewirkte sie eine Anreicherung des EGFR um den Faktor von etwa 1000 und damit eine entsprechende Reduktion potentieller Störfaktoren des Serums. Diesen Wert erhält man durch Vergleich der EGFR-Konzentration in Serum (19 ng/ml bei 60 mg/ml Gesamtprotein) mit der im Eluat (49 ng/ml bei 166 µg/ml Gesamtprotein). Letzteres enthielt also – wie oben bei dem vorausgegangenen Chromatographie-Experiment beschrieben – nicht nur das erwartete EGFR-Protein sondern wiederum eine beträchtliche Menge von zusätzlichem Protein, vermutlich von Immunglobulinen. Dessen Isolierung durch die Anti-EGFR-Säule ist, wie oben bereits dargestellt, derzeit nicht zu erklären.

Um so wichtiger erschien es, den ELISA-Befund des Vorkommens von EGFR-Protein in Humanserum durch eine weitergehende Analytik zu bestätigen: Elektrophorese plus Immunoblot der affinitätschromatographisch angereicherten Fraktion (Eluat-Konzentrat) sollte nicht nur das Vorkommen von immunresponsiven Komponenten (wie durch ELISA) sondern darüber hinaus auch deren molekulare Größe darstellen. Abb. 18 zeigt in Spur A als Referenzprotein gereinigtes sEGFR aus A431-Zellen. Spur B stellt den Immunoblot des auf demselben Elektrophorese-Gel aufgetrennten Eluat-Konzentrats dar; detektiert wurde mit anti-EGFR Ak2: Nur 1 Bande entsprechend der molekularen Größe des sEGFR wird angefärbt. Dadurch wird der eindeutige Nachweis erbracht, dass EGFR-Protein entsprechend der Größe der extrazellulären Domäne des Rezeptors im menschlichen Serum vorkommt. Allerdings erlaubt dieses Experiment noch immer keine Diskriminierung zwischen proteolytisch und sekretorisch produzierten Formen; es könnte sich auch um eine heterogene Mischung mehrerer Komponenten ähnlicher Molekülgröße handeln. Aber in jedem Fall unterstützt dieses Ergebnis die ELISA-Ergebnisse: EGFR-Protein ist direkt im Serum messbar – auch in Gegenwart von Immunglobulinen, welche möglicherweise zusätzlich zu EGFR an den *catcher*-Antikörper binden, dann nämlich, wenn dasselbe geschieht wie bei der

Affinitätschromatographie. Das wird in Spur C (Abb. 18) noch einmal demonstriert; hier wurde der Blot aus Spur B zusätzlich mit einem anti-IgG-Antikörper inkubiert, welcher eine ganze Reihe weiterer Banden detektiert.

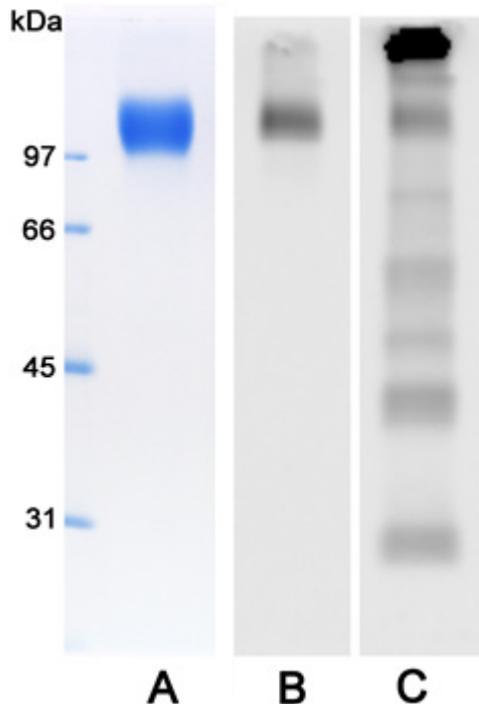


Abb. 18 Immunoblot des Eluat-Konzentrates.

Der Immunoblot des affinitätschromatographisch gewonnenen Eluates zeigt, eine deutliche Bande im Bereich der Größenordnung von sEGFR (Vergleich A und B). Es konnte also eindeutig nachgewiesen werden, dass durch die Affinitätschromatographie lösliches EGFR-Protein isoliert wurde. Es zeigt sich aber, dass wie im Vorversuch auch wieder eine Kopurifikation von Immunglobulinen stattgefunden hat (C). (A = sEGFR als Kontrolle inkubiert mit Ak2, B = Eluat-Konzentrat aus Affinitätschromatographie inkubiert mit Ak2, C = Eluat-Konzentrat inkubiert mit anti-IgG-Antikörper, linker Rand= Markerprotein)

Es stellte sich nun die Frage, ob in dieser Fraktion des angereicherten EGFR-Proteins auch die sekretorische Form sEGFR₁₇ vorkommt, wie es in der ersten Chromatographie oben (15 µg aus 3,7 l Serum) den Anschein hatte. Wenn man ähnliche Gehalte auch für das Serum der letzten Chromatographie mit neuer Matrix annimmt, sollte der spezifische sEGFR-ELISA das sekretorische sEGFR im Eluat-Konzentrat erfassen können. Der Test wurde durchgeführt, brachte jedoch kein eindeutiges Signal. Alle vier Konzentrationen der Eluat-Probe zeigten Signale im Bereich des Leerwertes. In einem Kontrollexperiment war eine ebensolche Chromatographie mit 20 ml Serum durchgeführt worden, dem eine kleine Menge von sEGFR-haltigem A431-Zell-Kulturmedium zugesetzt war: In diesem Fall zeigte der sEGFR-ELISA für das Eluat der Chromatographie-Säule die erwarteten konzentrationsabhängigen Signale.

Also: Entweder ist die sekretorische Komponente im Serum – zumindest von Gesunden – *nicht* enthalten, oder bestenfalls in Spuren, die dann aber von ausblutendem Antikörper maskiert werden. Damit bestätigt sich der Verdacht, dass es sich bei dem in der ersten Chromatographie gefundenen sEGFR₁₇ um Reste von verschlepptem

Protein gehandelt hatte. Man muss aber auch konstatieren, dass es mit immunologischen Tests offenbar nicht gelang, eine klare Aussage zum Vorkommen des sekretorischen sEGFR₁₇ in normalem Serum zu machen.

3.6 Massenspektroskopische Analyse des aus Humanserum isolierten EGFR-Proteins

Die bisherigen Untersuchungen zu sEGFR₁₇ basierten auf der Spezifität eines Antikörpers gegen seinen 17 Aminosäure langen C-Terminus. Da diese Sequenz nur in diesem sekretorischen Protein gefunden wurde, könnte alternativ auch der Nachweis eines solchen Peptids durch Massenspektroskopie versucht werden.

Die Massenspektroskopie wurde von F. Buck (Institut für Klinische Chemie, UKE) durchgeführt. Zunächst sollte geklärt werden, ob diese aufwendige Technik überhaupt auf die beschriebene Fragestellung anwendbar ist. Theoretisch - entsprechend sEGFR-Sequenz und Protease-Spezifität - sollte der dieser Technik vorausgehende tryptische oder chymotryptische Verdauung des Zielproteins Peptide liefern, welche eindeutig dem sEGFR-eigenen C-Terminus zuzuordnen wären. Allerdings sollte in einem Vorversuch mit dem aus A431-Zellkulturüberstand isolierten sEGFR als Referenzprotein zunächst geklärt werden, ob solche Peptide tatsächlich entstehen und mit MS detektierbar sind: Dazu wurde aus dem Gel Abb. 21 Spur A das der sEGFR-Bande entsprechende Gelstück ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Die MS-Analyse der aus dem Gel extrahierten Peptide wurde wie im Material und Methodenteil unter Abschnitt 2.5 beschrieben durchgeführt und brachte folgendes Ergebnis:

In der MS-Analyse konnten eine Reihe von Fragmenten identifiziert werden, welche erwartungsgemäß ausschliesslich der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors zuzuordnen sind. Hervorzuheben ist, dass eines davon, das am weitesten C-terminal liegende Fragment YADA ... FPR, in den Bereich hinein ragt, welcher nur in dem sekretorischen sEGFR, nicht aber im „normalen“ EGF-Rezeptor und seinen potentiellen shedding-Produkten vorkommt. Dies demonstriert, dass die Methode im Grundsatz in der Lage sein sollte, sEGFR₁₇ zu identifizieren (Abb. 19).

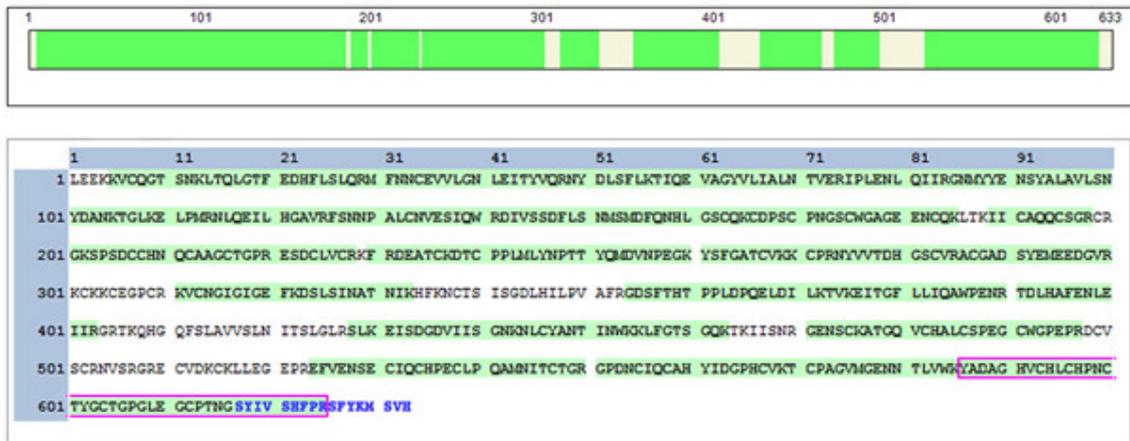


Abb. 19 Massenspektrometrie von tryptischen Peptiden des sEGFR (Referenzprotein aus A431-Zellen). Die grün unterlegten Bereiche wurden durch identifizierte Fragmente abgedeckt, welche sich der sEGFR-Sequenz zuordnen ließen. Die sEGFR-spezifische C-terminale Sequenz SYIVSHFPRSFYKMSVH ist blau dargestellt. Die magenta-farbene Box verdeutlicht das Fragment YADA...FPR, welches einen Teil dieser Sequenz beinhaltet.

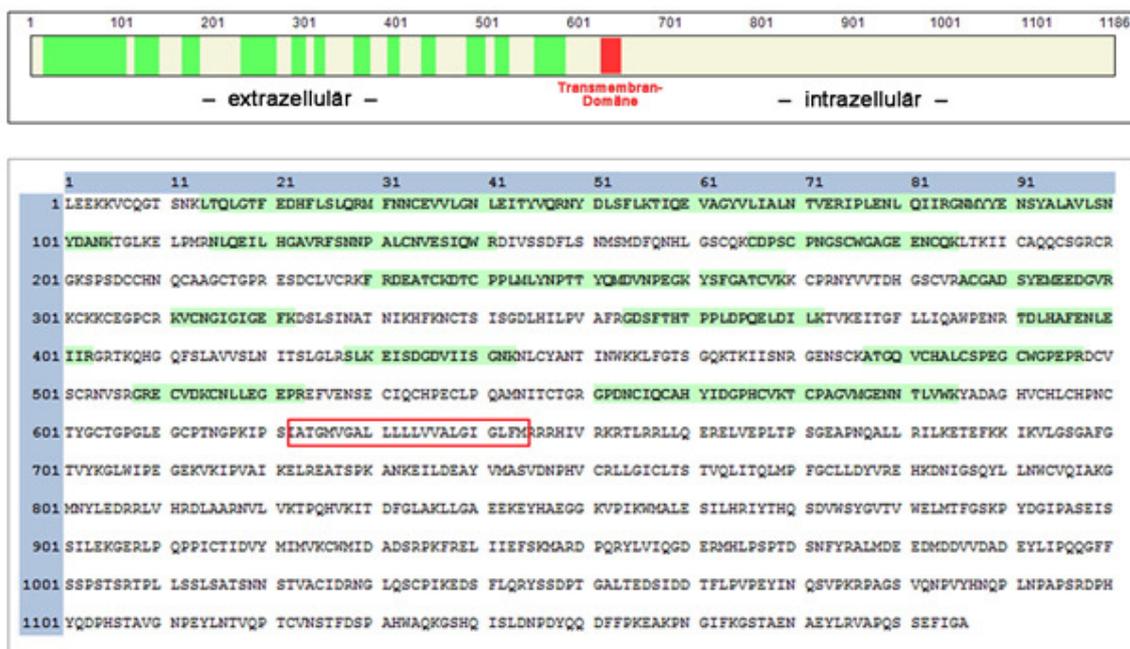


Abb. 20 Massenspektrometrie von tryptischen Peptiden von EGFR aus Humanserum. Die identifizierten Peptide wurden an der Sequenz des Volllängen-EGF-Rezeptors ausgerichtet. Die rote Box kennzeichnet die Transmembran-Domäne.

Dieser Vorversuch zeigt, dass

- durch Trypsin-Verdau von sEGFR ein Peptid entsteht, welches sich prinzipiell durch MS nachweisen lässt;
- das aus dem Kulturüberstand von A431-Tumorzellen isolierte lösliche EGFR-Protein neben dem erwarteten sekretorischen sEGFR zusätzlich auch Protein mit der „normalen“ Sequenz des EGF-Rezeptors enthält, welches vermutlich durch shedding entsteht.

Nach diesem Vorversuch folgte die Analyse der eigentlichen Probe, der affinitätschromatographisch gereinigten Fraktion aus Humanserum. Dazu wurde aus dem Gel der Bereich um 100 kDa ausgeschnitten und untersucht, welcher der Position des sEGFR_17 entspricht (Abb. 21 Spur B rotes Oval).

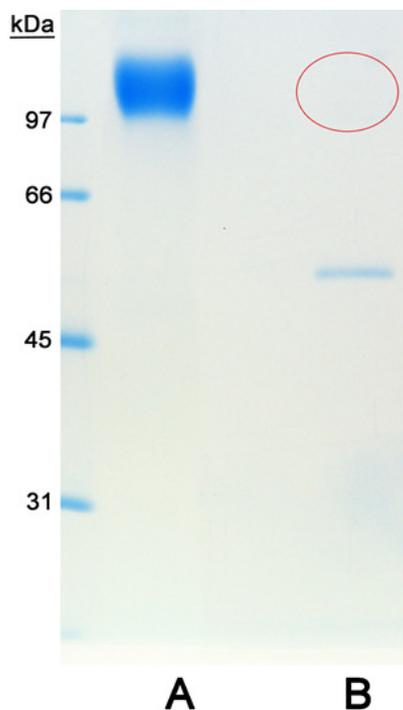


Abb. 21 SDS-Gelelektrophorese mit Coomassie-Blue-Färbung von affinitätschromatographisch gewonnener Fraktion. In Spur A wurden 10 µg sEGFR aus A431-Zellen als Referenzprotein und in Spur B die aus der Affinitätschromatographie gewonnene und mit ProteinG-Sepharose gereinigte Fraktion (entsprechend ca. 5 ml) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das rote Oval kennzeichnet den Bereich, der für die Massenspektroskopischen Analyse ausgeschnitten wurde. (linker Rand= Markerprotein).

Ergebnis (Abb. 20): Der Nachweis von Peptiden mit Sequenzen aus der EGFR-Ektodomäne bestätigt eindeutig, dass lösliches EGF-Rezeptorprotein in menschlichem Serum vorkommt. Allerdings wurde nicht das Peptid mit dem sEGFR-spezifischen C-Terminus gefunden. Dies könnte an unzureichender Empfindlichkeit der Nachweismethode liegen; wahrscheinlicher ist aber: Bei diesem Experiment handelte es sich um das Serum eines gesunden Patienten. Wenn man bisher sEGFR_17 als ein aberrantes Tumor-spezifisches Genprodukt betrachtete, sollte man es bei diesem Spender nicht erwarten. An dieser Stelle sollte die beschriebene Technik - MS-Analyse von affinitätschromatographisch angereichertem EGFR-Protein aus Serum – auf einen Pool von PEC-Serumproben angewendet werden. Die Durchführung war allerdings aufgrund der Schwierigkeit einer zeitnahen Probenbeschaffung im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich und steht noch aus.

4 Diskussion

Die Entdeckung des EGF-Rezeptors in den 1980er Jahren als membranständiges Protein auf der Zelloberfläche von Zellen epithelialen Ursprungs sowie die Erkenntnis seiner bedeutenden Funktion im Regulationsprozess von Zellen lieferten den Anstoß für weitergehende Untersuchungen in den Folgejahren: EGFR wird nicht nur von „normalen“ Zellen exprimiert sondern auch von vielen Tumorzellen überexprimiert (Grandis und Tweardy 1993). Lange Zeit wurde für EGFR, wie für andere Membranrezeptoren auch, angenommen, dass sie ausschliesslich fest verankert auf der Zellmembran vorkommen, bis 1984 Weber et al. eine erstaunliche Beobachtung machte: A431 Vulva-Karzinomzellen sezernieren neben dem membranständigen EGF-Rezeptor zusätzlich eine kürzere Form, welche nur die extrazelluläre EGF-Bindungs-Domäne, nicht aber die Transmembran- und intrazelluläre Tyrosinkinase-Domänen enthält.

Diese lösliche Form des EGF-Rezeptors wurde als secreted EGF-Rezeptor (sEGFR₁₇) bezeichnet. Zunächst nahm man an, es handele sich um ein einzigartiges Phänomen dieser einen Tumorzell-Linie. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden dann aber mit immunologischen Tests lösliche EGFR-Formen auch im Serum von Patienten - erstaunlicherweise sogar bei gesunden Probanden. Allerdings divergierten die publizierten Ergebnisse erheblich (angegeben werden im Folgenden nur die gerundeten Mittelwerte für Normalserum in der Einheit fmol/ml = pM): 34 (Schneider et al. 1999), 54 (Hoffmann et al. 2001), 66 (Oh et al. 2000), 440 (Choi et al. 1997), 491 (Maramotti et al. 2012), 512 (Lemos-Gonzalez 2007), 1016 (Tas et al. 2015), 7000 bis 26000 (Baron et al. 1998 und 2001). Die entsprechenden Untersuchungen bei Tumorpatienten zeigten, wie nicht anders erwartet, ein ähnlich uneinheitliches Bild (siehe Tabelle 11). Eine derartige Streubreite über mehrere Zehnerpotenzen lässt sich nicht mit Besonderheiten der Probanden (die Probenzahl war in jedem Fall >12, meist >20) sondern nur durch methodische Unterschiede erklären. Es stellt sich die Frage nach den Ursachen für diese Problematik. Diese könnten in Eigenschaft und Spezifität der eingesetzten Antikörper, in der Kalibrierung des Assays oder auch in störenden Einflüssen durch Serumbestandteile liegen. Für das Ziel dieser Arbeit, Serum-EGFR bei Gesunden und Tumorpatienten verlässlich zu messen, war es also zunächst wichtig, einen geeigneten Test zu entwickeln und zu validieren.

4.1 EGFR-ELISA und seine Anwendung auf Serum

Das ELISA-Sandwich-Verfahren basiert auf der Bindung zweier spezifischer Antikörper an das zu untersuchende Antigen. Die Eigenschaften dieser beiden Antikörper bestimmen die Spezifität und die Empfindlichkeit des Assays. Der erste in dieser Arbeit eingesetzte Antikörper (Ak1) ist monoklonal und bindet an den EGF-Rezeptor im Bereich der EGF-Bindungsstelle. Es wurde gezeigt, dass diese Bindung durch EGF verdrängt werden kann – ein Beleg für die Spezifität der Interaktion. Da andererseits aber eine hohe EGF-Konzentration zur Verdrängung notwendig war, kann man annehmen, dass auch solche Rezeptormoleküle in Serumproben erfasst werden, welche möglicherweise durch Serum-EGF besetzt sind.

Beim zweiten hier eingesetzten Antikörper (Ak2) handelt es sich um eine Antikörper-Präparation, die durch Immunisieren von Kaninchen mit gereinigtem sEGFR hergestellt worden war. Aufgrund ihrer polyklonalen Eigenschaft sollten darin enthaltene Antikörper an mehrere Epitope der durch Ak1 immobilisierten Rezeptoren binden und somit das Signal verstärken.

Die kommerziell verfügbaren EGFR-Assays sind prinzipiell ebenso aufgebaut, wenn auch unter Verwendung anderer Antikörper und möglicherweise anderer Detektionssysteme (hier Peroxidase-Antikörper-Konjugat). Eigentlich sollten aber alle Assays bei der Untersuchung von biologischen Proben zu den gleichen Ergebnissen kommen. Wie erklären sich dann bis zu 30-fache Unterschiede in den publizierten EGFR-Gehalten von Normalserum?

Unspezifität von Antikörpern kann man als Erklärung sicherlich ausschließen, denn die Spezifität ergibt sich weitgehend aus der Herstellungsweise. Und vor allem die Kombination von zwei unterschiedlichen Antikörpern mit ihren „überlappenden“ Spezifitäten beim Sandwich-ELISA lässt praktisch keine Unspezifität zu.

Essentiell für korrekte Quantifizierung ist jedoch die Kalibrierung des Assays; denn ein ELISA liefert ja kein absolutes Ergebnis sondern immer nur ein Signal relativ zu einem Vergleichsantigen. Das Ergebnis hängt damit direkt von der Standardisierung bzw. „Standardisierbarkeit“ dieser Vergleichsproteinpräparation ab. Wenn deren Gehalt durch andere Assays eingestellt wurde, verlagert man die Frage der Kalibrierung lediglich auf diese Teste mit ähnlichen Problemen. Für die vorliegende Arbeit hingegen standen aus vorausgegangenen EGF-Rezeptor-Reinigungen (Günther et al. 1990, Betzel et al. 1994) Milligramm-Mengen an hoch-gereinigtem sEGFR-Protein zur Verfügung, welches u. a. für die Proteinkristallographie verwendet worden war. Konzentrierte

Lösungen dieser Präparationen ermöglichten photometrische Extinktionsmessungen, so dass sich zusammen mit dem aus der Aminosäuresequenz errechneten Extinktionskoeffizienten die Proteingehalte präzise quantifizieren ließen. Unter Verwendung von Verdünnungen solcher Konzentrate als Standards war damit eine exakte Kalibrierung des Tests gewährleistet.

Ein weiterer Aspekt, in dem sich das hier beschriebene Testverfahren hervorhebt und von anderen Studien unterscheidet, betrifft die Art der Auswertung: Es wurden nicht – wie oft üblich – Einzelpunktmessungen durchgeführt, d.h. Messungen eines einzigen, in den Test eingesetzten Probevolumens; vielmehr wurden von jeder Serumprobe Verdünnungsreihen hergestellt, die in unterschiedlichen Probevolumina resultierten. Die Auswertung erfolgte aus dem linearen Bereich der Korrelation von Signal und Probevolumen. Es hatte sich nämlich gezeigt, dass bei hohem Probeneinsatz der Test unlinear wird, vermutlich aufgrund der dann sehr hohen Proteinkonzentration und daraus resultierenden störenden Einflüssen.

Trotz dieser Maßnahmen zur Steigerung des Vertrauens in die Test-Ergebnisse könnten letzte Zweifel bleiben. Denn mit z.B. 10 µl Humanserum als Probe werden in den ELISA ca. 150 µg Immunglobuline eingesetzt; das bedeutet einen mehr als hunderttausendfachen Überschuss über die verwendete Menge an spezifischen Antikörpern und eine entsprechend hohe Erwartung an deren Spezifität. Und tatsächlich zeigte sich ja bei den Immunaffinitätschromatographien von Humanserum, dass große Mengen von Serumimmunglobulinen aus unerklärten Gründen mitgeschleppt wurden, möglicherweise aufgrund von unspezifischen Effekten der verschiedenen Antikörper untereinander. Da zudem die erhaltenen ELISA-Signale oft nahe der Nachweisbarkeitsgrenze lagen, erschien es wichtig, den Befund des Vorkommens von löslichem EGF-Rezeptor in Humanserum durch zwei weitere Methoden abzusichern:

- Das war einerseits der Immunoblot, welcher nicht nur das Antigen in seinem Vorkommen anzeigt sondern dieses auch über die dann erkennbare Molekülgröße zusätzlich identifiziert. Dazu waren allerdings aufwendige Vorarbeiten notwendig; denn dem Immunoblot geht die elektrophoretische Auftrennung der Probe voraus, bei welcher das maximal einsetzbare Serumvolumen nicht ausreichend EGFR-Antigen für den immunologischen Nachweis enthielte. Deshalb wurden Immunaffinitätschromatographien zur Anreicherung des Antigens aus Humanserum durchgeführt. In einem solchen Konzentrat gelang der Nachweis einer anti-EGFR-responsiven

Proteinbande mit der Molekülgröße von ca. 100 kDa, vergleichbar der des aus A431-Kulturmedium isolierten sEGFR_17. Diese affinitätschromatographisch angereicherte Proteinfraction erlaubte einen noch direkteren Nachweis von EGFR-Protein in Humanserum:

- Aus der besagten Proteinfraction konnten durch limitiert-proteolytischem Verdau Peptide erzeugt werden, die sich durch Massenspektrometrie eindeutig der extrazellulären Domäne des EGFR zuordnen ließen. Damit kann es als gesichert gelten, dass Humanserum löslichen EGF-Rezeptor enthält – und dieser durch ELISA-Messungen erfasst werden kann: Der in dieser Arbeit gefundene Wert für den mittleren sEGFR-Gehalt in Normalserum von 30 ng/ml erscheint damit verlässlich. Er entspricht einer molaren Konzentration von 427 pM (± 204). Der Wert liegt auch innerhalb des oben dargestellten Streubereichs von Messungen anderer Arbeitsgruppen.

Die wesentliche in dieser Arbeit adressierte Frage war nun, ob sich mit dem hier beschriebenen Assay Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Mundhöhlen-Karzinom messen lassen. Die statistische Auswertung der Messungen ergab in der Tat einen deutlich höheren Serum-EGFR-Spiegel bei den Tumorpatienten: 829 pM (± 302).

Auch die 95% Konfidenzintervalle bestätigen einen deutlichen Unterschied zwischen den Messwerten gesunder und kranker Spender: Die Intervalle für Gesunde erstrecken sich von 338 bis 516 pM und von 696 bis 961 pM für Erkrankte. Sie überlappen nicht, was für eine hohe Signifikanz spricht (Abb. 22).

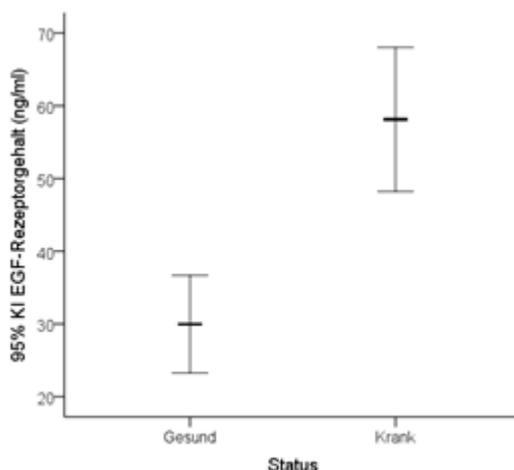


Abb. 22 95 % Konfidenzintervall der EGFR-Gehalte gesund und krank. Dargestellt ist jeweils der Bereich um den ermittelten Wert, der den tatsächlichen Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% enthält.

Die Überprüfung der Daten nach Shapiro und Anwendung des Welch-Tests ergab einen p-Wert $<0,05$ und demonstriert damit einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Um zu prüfen, ob die Bestimmung des Serum-EGFR-Gehalts eine Voraussage über die Gruppenzugehörigkeit *gesund* oder *krank* erlaubt, wurde mit den Daten ein logistisches Regressionsmodell erstellt (Abb. 23).

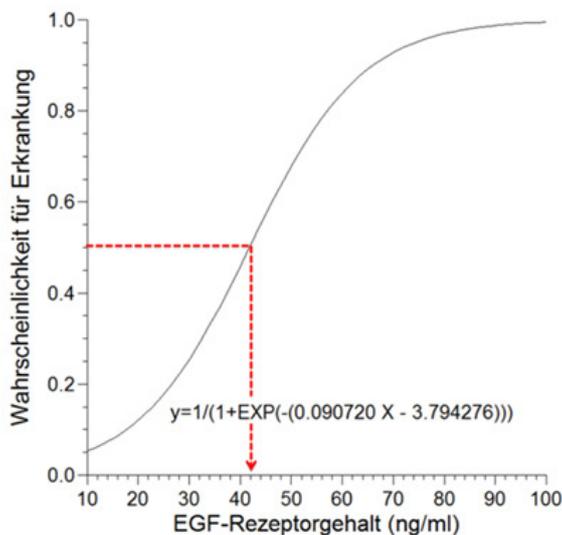


Abb. 23 Erkrankungswahrscheinlichkeit. Berechnet als Funktion des EGFR-Gehaltes via logistische Regression

Aus dieser Regressionsgleichung folgt, dass der EGFR-Serumspiegel (so wie er in dieser Arbeit gemessen wurde) einen signifikanten Einfluss auf die Zugehörigkeit in die Gruppe *gesund* oder *krank* hat. So beträgt die Erkrankungswahrscheinlichkeit z. B. bei einem EGFR-Gehalt von 596 pM ng/ml 50% (rote Linie in Abb. 23; Wendepunkt der Regressionskurve), bei 768 pM 75% oder 90% bei 941 pM.

Für die folgende Klassifikationstabelle wurde ein Trennwert von 596pM angenommen, um die untersuchten Proben den Kategorien *gesund* oder *krank* zuzuordnen. Dabei werden 17 von 20 Gesunden richtig und 3 als falsch-positiv erkannt. Das entspricht einer Spezifität von 85%. Andererseits kennzeichnete der Test aus der Gruppe der 20 Tumor-Patienten 5 fälschlich als gesund, was einer Sensitivität von 75% entspricht.

Tabelle 9 Klassifikationstabelle

		Vorhersagewert		
		Status		Prozentsatz
Beobachtet	Status	gesund	krank	richtig
		gesund	17	3
krank	5	15	75,0	

Diese Zusammenhänge lassen sich anschaulich in der sogenannten ROC-Kurve (receiver operating characteristics) darstellen, einem Plot der Werte für Sensitivität gegen die Werte von 1-Spezifität, welche sich bei unterschiedlich angenommenen Trennwerten ergeben (Abb. 24).

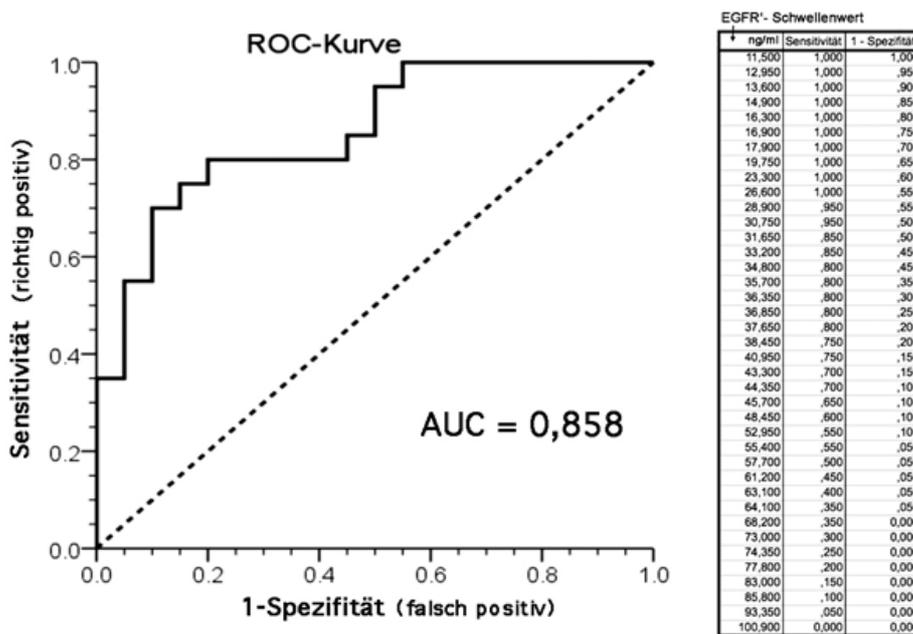


Abb. 24 ROC-Kurve. Plot Sensitivität gegen 1-Spezifität liefert einen AUC-Wert von 0,858.

Die Fläche unter der Treppenkurve (AUC = area under the curve) stellt dann ein Maß für die Güte des Tests dar: AUC =1 bedeutet, dass alle Proben korrekt eingeordnet werden, bei AUC = 0,5 besitzt der Test keinerlei Entscheidungskraft. Der hier beschriebene EGFR-ELISA lieferte bei der Untersuchung der 40 Proben ein AUC von 0,86.

4.2 Diskriminierung von löslichen EGF-Rezeptoren

Die hier präsentierten Daten erscheinen in sich konsistent und überzeugend. Daher ist es erstaunlich, dass andere Arbeitsgruppen bei der Untersuchung von Kopf-/Hals-Tumoren zu anderen Ergebnissen kamen (siehe Tabelle 10):

Tabelle 10 Serum-EGFR-Gehaltsmessungen gesunde Spender vs. Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (HNC, Head and neck cancer). Eine Übersicht verschiedener Arbeitsgruppen. SA= Standardabweichung

Arbeitsgruppe Serum Kontrollgruppe Serum von HNC-Patienten	EGFR-Gehalt \pm SA fmol/ml	Test	Standard
<i>Hoffmann et al. 2001</i> Kontrolle (n= 49) Patienten (n=49)	54,0 \pm 1,5 54,8 \pm 1,6	Oncogene Science Kit	A431-Lysat
<i>Gokhale et al. 2005</i> Kontrolle (n=5) Patienten (n= 15)	214 \pm 21 217	Oncogene Research Products	
<i>Lemos-Gonzalez et al. 2007</i> Kontrolle (n=50) Patienten (n=50) Patienten mit orale PEC	512 \pm 74 302 \pm 88 319	EGFR Duoset kit DY231; R&D Systems	Recombinat

Zwei Studien finden praktisch keinen Unterschied zwischen *gesund* und *krank*, und bei einer anderen liegen die Tumor-Werte sogar unter denen der gesunden. Auch wenn man andere untersuchte Tumor-Arten einbezieht, ergibt sich ein ähnlich uneinheitliches Bild (Tabelle 11):

Tabelle 11 EGFR-Gehaltsmessungen gesunde Spender vs. Tumorpationen. Eine Übersicht verschiedener Arbeitsgruppen. SA= Standardabweichung

Arbeitsgruppe Serum-Kontrollgruppe Patientenserum	EGFR-Gehalt \pm SA fmol/ml
<i>Choi et al. 1997</i> Gesunde Probanden (n= 29) Patienten mit Magenkarzinom (n=40)	440 \pm 46 681 \pm 226
<i>Schneider et al. 1999</i> Gesunde Probanden (n=23) Patienten mit Lungenkarzinom (n= 88)	34 37

<i>Baron et al. 1999(ALISA; p110)</i>	
Gesunde Frauen (n=73)	8298
Frauen mit Ovarialkarzinom präoperativ (n= 21)	409
Frauen mit Ovarialkarzinom postoperativ (n=73)	2695
<i>Oh et al. 2000 (Calbiochem)</i>	
Gesunde Probanden (n=38)	66 ± 17
ZervikalCarcinom (n=38)	165 ± 60
<i>Hoffmann et al. 2001 (Oncogene Science Kit)</i>	
Gesunde Probanden (n= 49)	54,8 ± 1,6
Patienten mit SCCHNC (n= 49)	54 ± 1,5
- Oral cavity	46,9 ± 2,0
-Oropharynx	53,4 ± 2,0
- Hypopharynx	55,5 ± 3,6
- Larynx	59,8 ± 3,6
<i>Baron 2003 (ALISA; p110 gemessen)</i>	
Gesunde Frauen (n=144)	7177
EOC (Ovar) (n=225)	463
<i>Müller et al. 2006 (Oncogene Science Bayer Cambridge)</i>	
Gesunde Probanden (n=30)	>642
Patienten mit Mammakarzinom (n=101)	<642
<i>Souder et al. 2006 (Oncogene Science Bayer Cambridge)</i>	
Gesunde Frauen (n=117)	914 ± 190
Patienten mit Mammakarzinom (n=53 von 535)	< 629
<i>Lemos-González et al. 2007(EGFR DuoSet R &D)</i>	
Gesunde Probanden (n=50)	511,79 ± 74,13
Patienten mit Kopf-Hals-Tumor (n=50)	302,23 ± 88,39
- davon Patienten mit oralen Tumore	319,33
<i>Quaranta et al. 2007</i>	
Gesunde Probanden (n=50)	622 ± 157
Patienten mit Gliomen (n=47 von 65)	1198 ± 257
<i>Maramotti et al. 2012 (Ray Biotech, R&D)</i>	
Gesunde Probanden (n=12)	491,40 ± 80,12
Patienten mit NSCLC (n=12)	663,19 ± 59,10
<i>Tas et al. 2015(R&D Kit)</i>	
Gesunde Probanden (n=30)	1016,45
Patienten mit Breast Cancer (n=96)	1475,50

Wie ist diese Uneinheitlichkeit der Daten zu erklären? Zunächst wird man wiederum an methodische Einflüsse denken; denn wenn die Werte schon bei Normalseren um mehrere Größenordnungen streuen, erscheint die Verlässlichkeit auch aller anderen Ergebnisse fraglich. Zwar könnten unterschiedliche Tumorspezifitäten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen; jedoch lassen die Unterschiede in den Ergebnissen von Serum-EGFR-Konzentrationen gleicher Tumore verschiedener Arbeitsgruppen eher auf methodische Differenzen schließen (im Vergleich zur

Kontrollgruppe teils erhöht und teils erniedrigt). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist ein anderer Aspekt zu bedenken: Wie oben dargestellt gibt es verschiedene lösliche EGFR-Proteine, so dass auch im Serum ein Pool von löslichen EGFR-Protein zu erwarten ist. Die verwendeten immunologischen Tests erfassen also, abhängig von ihren spezifischen Antikörpern verschiedene EGFR-Präparationen. Aber: Die gängigen ELISA-Messungen, auch der in dieser Arbeit beschriebene EGFR-ELISA, diskriminieren allerdings nicht zwischen den unterschiedlichen Formen von löslichem EGFR, welche in der Literatur beschrieben wurden; denn alle beinhalten die extrazelluläre Domäne des EGFR, welche von den Antikörpern erkannt wird. Unterschiede liegen ausschließlich in den C-terminalen Sequenzen dieser Proteine. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Entstehung lassen sie sich in zwei Gruppen aufteilen: (1.) jene Proteine, welche als Produkte alternativ gespleißter oder rearrangierter Gene sezerniert werden und (2.) solche, die durch proteolytisches Prozessieren des Voll-Längen-Rezeptors entstehen.

In der 1. Gruppe finden sich hauptsächlich das bei A431-Tumorzellen beschriebene sEGFR mit 17 speziellen C-terminalen Aminosäuren (Weber et al. 1984) sowie das im Humanserum detektierbare p110-sEGFR mit 78 speziellen C-terminalen Aminosäuren (Reiter et al. 2001, Baron et al. 2003). Darüber hinaus wurden weitere alternative Transkripte beschrieben, die trunkierte EGFR-Formen bei bestimmten Zell-Linien und species kodieren (Flickinger et al. 1992, Reiter und Maihle 1996a und 2003b).

Die 2. Gruppe betrifft mögliche Produkte des sogenannten „ectodomain shedding“, welches an ausgewählten Zellen in Kultur demonstriert wurde: CHO-Zellen, welche mit dem oben erwähnten p110-sEGFR transfiziert wurden, entließen ein durch Metalloproteinasen aus der ursprünglichen Membranbindung befreites Protein ins Kulturmedium (Wilken et al 2013). Als ein weiteres, von der Zellmembran durch Proteolyse des Voll-Längen-Rezeptors entstandenes Protein wurde das 110 kDa große PIsEGFR beschrieben; es wurde im Zellkulturmedium von MDA-MB-468 Tumorzellen nachgewiesen und ließ sich ebenfalls durch die Aktivität von Metalloproteasen in seiner Produktion beeinflussen (Perez-Torres et al. 2008). Ein anderer Mechanismus wurde an EGFR-überexprimierenden Pankreas-Tumorzell-Linien beschrieben: Exosomen, d.h. aus intrazellulären *multivesicular bodies* entstandene und nach Fusion mit der Plasmamembran exportierte Vesikel, enthielten neben dem Voll-Längen-EGFR auch seine extra- und intrazelluläre Domänen (Adamczyk et al. 2011). Ein ähnliches Phänomen wurde bei einer humanen Keratinozyten-Zell-Linie gefunden (Sanderson et

al. 2008): Auch hier enthielten Exosomen sowohl den 150 kDa Voll-Längen-EGFR wie auch 100 kDa trunkierte lösliche Ectodomänen; und das shedding war ebenfalls abhängig von der Aktivität von zellulärer Metalloproteasen.

Es offenbart sich also eine unerwartete Komplexität für die Entstehung von löslichen EGF-Rezeptorformen. Ganz sicher handelt es sich nicht um Artefakte; denn sowohl die Existenz spezifischer Transkripte wie auch die Beobachtung der Abhängigkeit des shedding von physiologischen Faktoren (Integrine, Proteinkinasen) lassen auf gesteuerte Prozesse bei der Entstehung der Isoformen schließen. Und natürlich stellt sich die Frage nach deren physiologischer Relevanz. Die hier bereits in der Einleitung formulierte Hypothese (> Tumore verschaffen sich durch Produktion löslicher Rezeptorformen einen Wachstumsvorteil) basiert darauf, dass diese EGFR-Isoformen intakte Ligandenbindungsstellen besitzen und so die EGF-Serumspiegel beeinflussen sollten – vorausgesetzt die Konzentrationsverhältnisse lassen das zu: Wenn man die in dieser Arbeit gemessene EGFR-Konzentration im Normalserum von durchschnittlich 31,2 ng/ml molar ausdrückt, ergibt sich (unter Annahme eines Molekulargewichts von 70145 für den glycan-freien Proteinanteil) mit 0,44 nM eine Konzentration, die in der gleichen Größenordnung und tendenziell sogar höher ist als die Konzentration des Liganden EGF (0,05 bis 0,18 nM). In Anbetracht der hohen Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich ist es also durchaus denkbar, dass membranständige und lösliche EGF-Rezeptoren in vivo um den im Blut zirkulierenden Liganden konkurrieren und damit als physiologische Steuermechanismen für Zelldifferenzierung und Proliferation fungieren könnten. Gemäß dieser Hypothese wäre das Vorkommen löslicher Rezeptorformen ein Kennzeichen des Tumorstatus. Man sollte hier also im Vergleich zu Normalserum erhöhte EGFR-Serumspiegel erwarten – was allerdings nur teilweise durch die oben dargestellten Daten unterstützt wird.

Möglicherweise sind aber auch nicht alle der bisher beschriebenen löslichen Rezeptorformen in gleicher Weise aussagekräftig für die Tumordiagnostik. Der in dieser Arbeit gefundene Unterschied zwischen Tumor- und Normal-Proben basiert auf einem Assay, welcher *alle* löslichen Rezeptorformen mit wesentlichen Teilen der extrazellulären Domäne erfasst. Die statistische Auswertung ließ damit immerhin eine recht hohe Signifikanz erkennen. Die Frage, ob sich diese durch Fokussierung auf eine bestimmte Rezeptorform steigern lässt, sollte im zweiten Teil der Arbeit adressiert werden.

Ist sEGFR_17 ein besserer Tumormarker?

Aus dem Spektrum der trunkierten Rezeptorformen wurde hier das sEGFR_17 für die Überprüfung der Eignung als Tumormarker ausgewählt; denn es war als Produkt eines Plattenepithelkarzinoms gefunden worden, also einer Tumorspezies, der auch die hier untersuchten Mundhöhlenkarzinome angehören. Außerdem war es hochgereinigt in großen Mengen für vergleichende Untersuchungen verfügbar. Entsprechend der ausschließlich in diesem Protein vorkommenden Sequenz der 17 C-terminalen Aminosäuren wurde ein synthetisches Peptid hergestellt und zur Produktion eines Antiserums genutzt, mit welchem sich ein ELISA aufbauen ließ, der selektiv das sEGFR_17 erfasst, nicht aber den normalen Rezeptor und etwaige von ihm proteolytisch abgeleitete Fragmente. Allerdings erwies sich dieser sEGFR-ELISA als weniger empfindlich, was aufgrund der geringen Größe der antigenen Determinante (nur 17 Aminosäuren gegenüber 621 Aminosäuren der Ektodomäne) nicht unerwartet war. Es bedurfte also einen größeren Probeneinsatzes. Allerdings stieg damit das Risiko unspezifischer Effekte durch die damit verbundenen hohen Serumproteinkonzentrationen im Test. Vor allem aber waren im Rahmen dieser Arbeit nicht die erforderlichen Probevolumina von Tumor-Patienten verfügbar, um – was naheliegend gewesen wäre – dieselben, zuvor mit dem EGFR-ELISA untersuchten Patienten-Proben mit dem sEGFR_17-spezifischen Assay nachzumessen. Da das nicht möglich war, wurden diese Proben ersatzweise zu jeweils einer Gesunden- und einer Tumor-Erkrankten-Fraktion gepoolt und diese vergleichend gemessen:

Der Serumpool von gesunden Spendern zeigte schwache, nicht quantifizierbare Extinktionen; der Serumpool der Tumorproben lieferte dagegen deutliche Signale, welche sich anhand der zugehörigen sEGFR_17-Referenzkurve auswerten ließen. Es ergab sich für den Serumpool der Tumorproben ein sEGFR_17-Gehalt von 12 ng/ml (0,2 nM) – ein bemerkenswerter Befund. Denn dies ist der erste Hinweis, dass das bei A431-Zellen als aberrantes Genprodukt entdeckte sEGFR_17 auch von anderen Tumoren produziert wird. Da es sich bei der untersuchten Probe um einen Serumpool von 20 Patienten handelte, ist natürlich nicht sicher, welche oder ob gar alle der betreffenden Plattenepithel-Karzinome das sEGFR_17 sezernieren. Dass der gefundene Gehalt von 0,2 nM gegenüber dem Wert von 1,2 nM, gemessen im EGFR-ELISA, deutlich geringer ist, könnte ausdrücken, dass nur ein Teil der Tumore sEGFR_17 produziert. Ebenso könnten aber auch mehrere EGFR-Isoformen, auch Proteolyse-Produkte, nebeneinander vorliegen. Selbst größere unspezifische Störeffekte in einem

der Assays können nicht ausgeschlossen werden. Aber ungeachtet dessen: Das Auftreten von sEGFR₁₇ könnte – anders als EGFR – tumorspezifisch sein. Wie oben dargestellt (s. S. 47) lieferte die massenspektroskopische Analyse von Normal-Serum den eindeutigen Beleg für das Vorkommen von Protein aus der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors. Bei diesen Untersuchungen wurde selbstverständlich auch nach tryptischen und chymotryptischen Peptiden gesucht, welche die sEGFR₁₇-spezifischen C-terminalen Aminosäuren umfassen. Diese wurden jedoch in diesem Serum gesunder Patienten nicht gefunden. Das schließt zwar nicht völlig deren Vorkommen aus, wäre aber kompatibel mit der Annahme von sEGFR₁₇ als Marker für Plattenepithelkarzinome. Um diese Annahme zu erhärten, müsste nun die massenspektroskopische Analyse wiederholt werden, dann aber mit einer aus Tumorpatienten-Serum affinitätschromatographisch angereicherten Fraktion von EGFR-Protein. Im Rahmen dieser Arbeit war das aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich. Erst diese zukünftigen Untersuchungen werden zeigen, ob dem aberranten Genprodukt sEGFR₁₇ eine besondere Rolle als Tumormarker zukommt.

Die hier dargestellten Ergebnisse über erhöhte Serumkonzentrationen von löslichem EGFR-Protein bei 20 Patienten sollten durch weitere Untersuchungen mit größeren Probandenzahlen ergänzt werden. Dann können auch Einflüsse von Alter, Geschlecht und Tumorstadium in die Fragestellung einbezogen werden. In einem weiteren Schritt kann geprüft werden, ob die an Mundhöhlenkarzinomen gewonnenen Befunde auch für andere Plattenepithelkarzinome (z.B. Lunge, Ovar) zutreffen. Der wichtigste Punkt hingegen wird sein, die hier präsentierten Hinweise auf sEGFR₁₇ als tumorspezifischen Marker zu erhärten. Dazu müssen entsprechende Probandenserum in der notwendigen Menge beschafft und mit den hier etablierten Methoden analysiert werden. Wenn sich die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse dann bestätigen lassen, hätte man mit sEGFR₁₇ einen Tumormarker zur Verfügung, mit dem nicht graduelle Unterschiede von Serumspiegel sondern dessen Auftreten *per se* auf das Vorliegen einer bestimmten Tumorart schließen lassen.

5 Zusammenfassung

Der Rezeptor für den Wachstumsfaktor EGF findet sich als membranständiges Protein auf Zellen vorwiegend epithelialen Ursprungs. Zahlreiche Tumore überexprimieren den EGF-Rezeptor oder produzieren aberrante Produkte des EGFR-Gens. So beschrieb W. Weber bereits 1984 eine lösliche Form (sEGFR₁₇), welche von bestimmten epithelialen Tumorzellen in großen Mengen sezerniert wird (Science 224, 294-7). Zwischenzeitlich erschienen zahlreiche Berichte über das Vorkommen löslicher EGF-Rezeptoren auch im menschlichen Serum. Publikationen mehrerer Arbeitsgruppen zeigen Vergleiche von Serum-EGFR-Konzentrationen bei Gesunden und Tumorpatienten, allerdings mit sehr unterschiedlichen und widersprüchlichen Ergebnissen. Hier etablierten wir deshalb einen eigenen immunologischen Assay (ELISA), der die Verfügbarkeit von reinem sEGFR-Protein zur Kalibrierung nutzte. Damit zeigen wir leicht aber signifikant erhöhte Serum-Spiegel von löslichem EGFR bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Zwar ist die Herkunft der so erfassten EGFR-Formen nicht eindeutig (sekretorisch oder *shedding*), aber der so gemessene Parameter mag durchaus als statistisch abgesicherter Marker dienen.– Um später testen zu können, ob das nachweislich von bestimmten Tumorzellen sezernierte Genprodukt sEGFR-17 auch bei diesen Patienten vorkommt, wurde ein weiterer Assay entwickelt, welcher mit einem neuen Antikörper ausschließlich sEGFR-17 erfasst – allerdings mit geringerer Empfindlichkeit. Daher wurden alle EGF-bindenden Proteine aus Serum durch Immunaffinitätschromatographie angereichert, durch ELISA gemessen, durch Immunoblot und vor allem Massenspektroskopie identifiziert. Dieses aufwendige Verfahren wurde hier zunächst mit Normalserum etabliert. Sequenzspezifisch konnte so eindeutig das Vorkommen von EGFR-Protein im Serum nachgewiesen werden, nicht aber das von sEGFR-17 – was aber auch nicht zu erwarten war, wenn man für dieses Protein eine tumor-spezifische Rolle annimmt. Diese Frage wird sich erst beantworten lassen, wenn eine ausreichende Menge von Tumor-Patientenserum zur Verfügung steht, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Dann wird sich testen lassen, ob allein der Nachweis von sEGFR₁₇ mit der hier entwickelten Methode auf das Vorliegen eines Tumors hinweist. Bis dahin sollte aber auch das hier vorgestellte einfache Testverfahren zur Erfassung von löslichem EGFR auf andere Tumore ausgeweitet werden. Die Verfügbarkeit von reinem sEGFR-Protein als Kalibrator wird dabei verlässliche und vergleichbare Ergebnisse gewährleisten.

5 Summary

The Receptor of epidermal growth factor is a cell-surface protein and predominantly located on epithelial cells. Numerous tumours overexpress the EGF-receptor or produce aberrant forms of the EGFR-gene. In 1984 W. Weber discovered a soluble isoform which is secreted in high amounts by a epidermoid carcinoma cell line (Science 224, 294-7). Since then numerous studies have reported the presence of soluble forms of EGF receptors in human sera. Comparing samples of healthy and tumor patients, inconsistent and even contradictory results have been published, possibly due to experimental differences. Therefore, we established a new immunological assay (ELISA) which involves an own antibody and, most importantly, takes advantage of the availability of pure sEGFR-protein for calibration. After having validated this assay we show small but significantly higher serum-levels of EGFR in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. Although the origin of EGFR protein detected in serum is not clear (secretion or shedding), the parameter measured by this assay may serve as a statistically verified marker.- To address the question whether the particular secretory product sEGFR-17 may be specific for tumor patients we developed another assay using a new antibody directed against the unique C-terminus of this protein. The reduced sensitivity of this assay required higher technical effort: Immune affinity chromatography was used for the separation of EGF binding proteins from serum which then were identified by immunoblot and mass spectroscopy. This complex procedure was established with normal human serum where it provided sequence-specific evidence for the presence of soluble EGFR-protein. sEGFR-17 was not found in these experiments with normal serum – not unexpectedly if a tumor specific role of this isoform hypothesized. This issue can be resolved when adequate amounts of tumor patient sera will be available (which was not the case within the bounds of this study). Then our procedure will allow to test whether the mere detection of sEGFR-17 in serum may indicate the presence of a tumor. Until then the simple ELISA assay of soluble EGFR presented here should be expanded to other tumors. The availability of pure sEGFR as a calibrator protein will ensure reliable and comparable results.

6 Literaturverzeichnis

Adamczyk KA, Klein-Scory S, Moradian Tehrani M, Warnken U, Schmiegel W, Schnölzer M, Schwarte-Waldhoff I (2011). Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells *Life Sciences* 89 (2011) 304–312.

Balaram P, Nalinakumari KR, Abraham E, Balan A, Hareendran NK, Bernard HU, Chan SY (1995). Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers: High prevalence and multiplicity of infections. *Int J Cancer* 61:450-454.

Bargmann CI, Hung MC and Weinberg RA (1986). The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319, 226-230.

Baron AT, Lafky JM, Connolly DC, Peoples J, O Kane DJ, Suman VJ, Boardman CH, Podratz KC and Maihle NJ (1998). A sandwich type acridinium-linked immunosorbent assay (ALISA) detects soluble ErbB1 (sErbB1) in normal human sera. *J. Immunol. Methods* 219: 23-43.

Baron AT, Lafky JM, Boardman CH, Balasubramaniam S, Suman VJ, Podratz KC and Maihle NJ (1999). Serum sErbB1 and EGF levels as tumor biomarkers in women with stage III or IV epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 8: 129-137.

Baron AT, Lafky JM, Suman VJ, Hillman DW, Buenafe MC, et al. (2001). A preliminary study of serum concentrations of soluble epidermal growth factor receptor (sErbB1), gonadotropins, and steroid hormones in healthy men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 1175–1185.

Baron AT, Cora EM, Lafky JM, Boardman CH, Buenafe MC, Rademaker A, Liu D, Fishman DA, Podratz KC, Maihle NJ (2003). Soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR/sErbB1) as a potential risk, screening, and diagnostic serum biomarker of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(2):103-13.

Baron AT, Lafky JM, Boardman CH, Cora EM, Buenafe MC, et al. (2009). Soluble epidermal growth factor receptor: a biomarker of epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 149: 189–202.

Basu A, Raghunath M, Bishayee S and Das M (1989). Inhibition of Tyrosine Kinase Activity of the Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor by a Truncated Receptor Form That Binds to EGF: Role for Interreceptor Interaction in Kinase Regulation. *Molecular and Cellular Biology* Vol 9 No 2 Feb. 1989: 671-677.

Betzl C, Günther N, Poll S, Moore K, DeLucas LJ, Bugg CE & Weber W (1994) Crystallization of the EGF receptor ectodomain on US Space Mission STS 47. *Microgravity Science and Technology* 7, 242-5.

Biscardi J, Ming-Chei M, Tice DA, Cox ME, Tzeng-Horne L and Parsons SJ (1999). c-Src-mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr⁸⁴⁵ and Tyr¹¹⁰¹ Is Associated with Modulation of Receptor Function. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 8335-8343.

Carpenter G (1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914.

Carpenter G (2004). *The EGF-Receptor Family Biologic Mechanism and role in cancer.* Elsevier Academic Press.

Carpenter G and Cohen S (1979). Epidermal Growth factor. *Annu Rev Biochem* 48: 193-216.

Chan et al (2015). Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: targeted therapy and immunotherapy. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 12, S. CD010341.

Choi JH, Oh JY, Ryu SK, Kim SJ, Lee NY, Kim YS, Yi SY, Shim KS, Han WS (1997). Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of gastric carcinoma patients. *Cancer* 79(10): 1879-83.

Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J and Baselga J. (1999). Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 59, 1196–1201.

Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger, J and Waterfield, MD (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences *Nature* 307: 521-527.

Downward J, Waterfield MD, Parker PJ (1985). Autophosphorylation and protein kinase C phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Effect on tyrosine kinase activity and ligand binding affinity. *J Biol Chem.* 25;260(27):14538-46.

Ernest L, Wynder MD, Irwin J, Bross PHD and Rivkah and Feldman BA (1957), A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer Nov-Dez No 6 Vol 10:* 1300-1323.

Fan Z, Lu Y, Wu X, Mendelsohn J (1994) Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 269: 27595-27602

Fedi P, Pierce JH, di Fiore PP, Kraus MH (1994). Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol Cell Biol.* 14(1):492-500.

Flickinger TW, Maihle NJ, Kung HJ (1992). An alternatively processed mRNA from the avian c-erbB gene encodes a soluble, truncated form of the receptor that can block ligand-dependent transformation. *Mol Cell Biol* 12: 883–893.

Forastiere A, Goepfert H, Goffinet D et al. (1998). NCCN practice guidelines for head and neck cancer. *National Comprehensive Cancer Network Proceedings.* *Oncology* 12: 39-247.

Gil Levkowitz, Hadassa Waterman, Seth A. Ettenberg, Menachem Katz, Alexander Y. Tsygankov, Iris Alroy, Sara Lavi, Kazuhiro Iwai, Yuval Reiss, Aaron Ciechanover, Stanley Lipkowitz and Yosef Yarden (1999). Ubiquitin Ligase Activity and Tyrosine Phosphorylation Underlie Suppression of Growth Factor Signaling by c-Cbl/Sli-1. *Molecular Cell*, Vol. 4, 1029–1040.

Gokhale AS, Haddad RI, Cavacini LA, Wirth L, Weeks L, Hallar M, Faucher J, Posner MR (2005). Serum concentrations of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Oral Oncology* 41: 70–76.

Grandis JR, Tweardy DJ (1993). Elevated levels of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Research* 53:3579-3584.

Günther N, Betzel C & Weber W (1990) The secreted form of the epidermal growth factor receptor: characterization and crystallization of the receptor-ligand complex. *J Biol Chem* 265, 22082-5.

Gullick WJ, Downward J, Parker PJ, Whittle N, Kris R, Schlessinger J, Ullrich A and Waterfield MD (1985a). The Structure and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor Studied by Using Antisynthetic Peptide Antibodies. *Proc. R. Soc. Lond. B* 226.

Guo L, Carl J. Kozlosky, Lowell H. Ericsson, Thomas O. Daniel, Douglas P. Cerretti, and Richard S. Johnson (2003). Studies of Ligand-Induced Site-Specific Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* Volume 14, Issue 9: 1022–1031.

Haigler H, Ash JF, Singer SJ and Cohen S (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75: 3317-3321.

Ho CM, Lam KH, Wei WI et al. (1992). Occult lymph node metastasis in small oral tongue cancers. *Head Neck* 14: 359-363.

Hoffmann TK, Balló H, Braunstein S, Van Lierop A, Wagenmann M, Bier H (2001). Serum level and tissue expression of c-erbB-1 and c-erbB-2 proto-oncogene products in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 37(1): 50-6.

Hsuan J, Nick Totty and Michael D. Waterfield (1989). Identification of a novel autophosphorylation site (P4) on the epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* 262: 659-663.

Hullmann M, Reichert TE (2016). Aktuelle Konzepte für Früherkennung und Management des Mundhöhlenkarzinoms 21. Onkologisches Symposium. <http://tumorzentrum-regensburg.de>.

Hunter T, Ling N and Cooper JA (1984). Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature* 311: 480 – 483.

Johnson NW, Ranasinghe AW, Warnakulasuriya KA (1993). Potentially malignant lesions and conditions of the mouth and oropharynx: natural history--cellular and molecular markers of risk. *Eur J Cancer Prev. Suppl 2*: 31-51.

Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ et al. (1993). Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 22: 459-462.

Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, et al. (1983). Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *1989 Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1337-1341.

Kholodenko BN, Demin OV, Moehren G and Hoek JB (1999). Quantification of Short Term Signaling by the Epidermal Growth Factor Receptor. *The journal of biological chemistry* Vol. 274, No. 42: 30169–30181.

King CR, Kraus MH, Aaronson SA (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 6 Vol. 229 no. 4717: 974-976.

Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM and Tsai CC (1995). Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan *Journal of Oral Pathology and Medicine* Volume 24, Issue 10: 450–453.

Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ et al. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. (1978). Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46: 518-539.

Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC and Aaronson SA. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9193-9197.

Kwan HW (1976). A statistical study on oral carcinomas in Taiwan with emphasis on the relationship with betel nut chewing: a preliminary report. *Journal of the Formosan Medical Association* Vol. 75 No. 9: 497-505.

Lax I, Bellot F, Howk R, Ullrich A, Givol D and Schlessinger J (1989). Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *The EMBO Journal* vol.8 no.2: 421 -427.

Lax I, Fischer R, Segre CNJ, Ullrich A, Givol D and Schlessinger J (1991a). Noncontiguous regions in the extracellular domain of EGF receptor define ligand-binding specificity *Cell Regulation*, Vol. 2: 337-345.

Lax I, Mitra AK, Ravera C, Hurwitz DR, Rubinstein M, Ullrich A, Stroud RM, and Schlessinger J (1991b). Epidermal Growth Factor (EGF) Induces Oligomerization of Soluble, Extracellular, Ligand-binding Domain of EGF Receptor, A low resolution projection structure of the ligand-binding domain. *the journal of biological chemistry*

The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol. 266, No. 21: 13828-13833.

Lemos-González Y, Rodriguez-Berrocal FJ, Cordero OJ, Gomez C, and M Páez de la Cadena (2007). Alteration of the serum levels of the epidermal growth factor receptor and its ligands in patients with non-small cell lung cancer and head and neck carcinoma. *British Journal of cancer* 96: 1569-1578.

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7 (4):301-11.

Lin CR, Chen WS, Kruijer W, Stolarsky LS, Weber W, Evans RM, Verma IM, Gill GN, Rosenfeld MG (1984). Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA: Gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells. *Science* 224, 843-8.

Liu PC, Liu X, Li Y, Covington M, Wynn R, Huber R, Hillman M, Yang G, Ellis D, Marando C, Katiyar K, Bradley J, Abremski K, Stow M, Rupa M, Zhuo J, Li YL, Lin Q, Burns D, Xu M, Zhang C, Qian DQ, He C, Sharief V, Weng L, Agrios C, Shi E, Metcalf B, Newton R, Friedman S, Yao W, Scherle P, Hollis G and Burn TC (2006). Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 5: 657– 664.

Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D and Schlessinger J (1992). The SH2 and SH3 Domain-Containing Protein GRB2 Links Receptor Tyrosine Kinases to ras Signaling. *Cell*, Vol. 70: 431-442.

Maramotti S, Paci M, Miccichè F, Ciarrocchi A, Cavazza A, De Bortoli M, Vaghi E, Formisano D, Canovi L, Sgarbi G, Bongarzone I (2012). Soluble epidermal growth factor receptor isoforms in non-small cell lung cancer tissue and in blood. *Lung Cancer* 76(3):332-8.

Margolis B, Rhee SG, Felder S, Mervic M, Lyall R, Levitzki A, Ullrich A, Zilberstein A and Schlessinger J (1989). EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: A potential mechanism for EGF receptor signalling. *Cell*, Volume 57, Issue 7: 1101-1107.

Matsuda M, Mayer BJ, Fukui Y and Hanafusa H (1990). Binding of transforming protein, p47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* 248: 1537–1539.

Meisenhelder J, Suh PG, Rhee SG and Hunter T (1989). Phospholipase C- γ is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* 57, 1109–1122.

Moran MF et al (1990). Src homology region 2 domains direct protein–protein interactions in signal transduction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87: 8622–8626.

Müller V, Witzel I, Pantel K, Krenkel S, Luck HJ, et al. (2006). Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 26: 1479–1487.

Neville BW, Day TA (2002) Oral Cancer and Precancerous Lesions. *Facs CA Cancer J Clin* 52: 195-215.

Oh MJ, Choi JH, Kim IH, Lee YH, Huh JY, Park YK, Lee KW, Chough SY, Joo KS, Ku BS, Saw HS. (2000). Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res.* 6(12): 4760-3.

Perez-Torres M, Valle BL, Maihle NJ, Negron-Vega L, Nieves-Alicea R, et al. (2008). Shedding of epidermal growth factor receptor is a regulated process that occurs with overexpression in malignant cells. *Exp Cell Res* 314: 2907–2918.

Plowman, GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ and Shoyab M. (1990). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4905-4909.

Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (5): 1746-50.

Pupa SM, Menard S, Morelli D, Pozzi B, De Palo G and Colnaghi MI (1993). The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene* 8: 2917–2923.

Quaranta M, Divella R, Daniele A, Di Tardo S, Venneri MT, Lolli I, Troccoli G (2007). Epidermal growth factor receptor serum levels and prognostic value in malignant gliomas. *Tumori* 93(3):275-80.

Reiter JL, Maihle NJ (1996). A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res* 24: 4050–4056.

Reiter JL and Maihle NJ (2003). Characterization and expression of novel 60-kDa and 110-kDa EGFR isoforms in human placenta. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 995: 39-47.

Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, et al. (2001) Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 71: 1–20.

Robert Koch Institut Hrsg und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Hrs (2015). *Krebs in Deutschland 2011/12*. 10. Ausgabe. S. 26-29.

Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, Meredith RF, Bonner JA, et al. (2001) Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 19: 3234-3243.

Rothmann K and Keller A (1972). The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *Journal of Chronic Diseases* Vol. 25 (12): 711-716.

Rude Voldborg B, Damstrup L, Spang-Thomsen M and Skovgaard Poulsen H (1997). Review Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology* 8: 1197-1206.

Sanderson MP, Keller S, Alonso A, Riedle S, Dempsey PJ et al. (2008). Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *J Cell Biochem* 103: 1783–1797.

Schneider J, Presek P, Braun A, Woitowitz HJ (1999). Serum levels of pantropic p53 protein and EGF-receptor, and detection of anti-p53 antibodies in former uraniumminers (SDAG Wismut). *Am J Ind Med.* 36(6):602-9.

Shah JP, Candela FC, Poddar AK (1990). The patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 66: 109-113.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2009). *TNM Classification of Malignant Tumors*. 7th edition. Wiley-Blackwell. Union for international cancer control.

Souder C, Leitzel K, Ali SM, Demers L, Evans DB, Chaudri-Ross HA, Hackl W, Hamer P, Carney W, Lipton A (2006). Serum epidermal growth factor receptor/HER-2 predicts poor survival in patients with metastatic breast cancer. *Cancer* 107(10): 2337-45.

Stich HF, Stich W and Parida WW (1982). Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Letters* Volume 17, Issue 2: 125–134.

Tas F, Bilgin E, Karabulut S, Duranyildiz D (2015). Clinical significance of serum epidermal growth factor receptor (EGFR) levels in patients with breast cancer. *Cytokine* 71(1): 66-70.

Thiel KW and Carpenter G (2007) Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation. *PNAS* vol. 104 no. 49: 19238–19243.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfield MD and Seeburg PH (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418 – 425.

Vega-Villegas E, Awada R, Mesia L et al. (2003). A phase I study of cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and 5-FU in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 22: 2020.

Waldron CA, Shafer WG (1975). Leukoplakia revisited: A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer* 36: 1386-1392.

Waksal HW (1999) Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18: 427-436.

Watts JM (1961). The importance of the Plummer-Vinson syndrome in the etiology of carcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Postgrad Med J* 1961; 37: 523–533.

Weber W, Gill GN, Spiess J (1984). Production of an Epidermal Growth Factor Receptor-Related Protein. *Science, New Series*, Vol. 224, No. 4646: 294-297. American Association for the Advancement of Science.

Wilken JA, Perez-Torres M, Nieves-Alicea R, Cora EM, Christensen TA, Baron AT and Maihle NJ (2013). Shedding of Soluble Epidermal Growth Factor Receptor (sEGFR) Is Mediated by a Metalloprotease/Fibronectin/Integrin Axis and Inhibited by Cetuximab. *Biochemistry* 52 (26):4531-40.

Wiltfang J (2002). Maligne Tumoren der Mundhöhle. In: Reichart PA, Hausamen JE, Becker J, Neukam FW, Schliephake H, Schmelzeisen R. *Curriculum Zahn- Mund- und Kieferkrankheiten Chirurgie Band 2*. Quintessenz Verlag-GmbH. S. 411-448.

Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ and Carney W (1991). The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J. Biol. Chem.* 266: 1716–1720.

7 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Weber vom Institut für Biochemie und Signaltransduktion für die Bereitstellung dieses interessanten Promotionsthemas, bei welchem er mich durch seine gute Betreuung bis zuletzt unterstützt hat und mir durch seine Diskussionsbereitschaft stets zur Seite stand. Dies ist für mich nicht selbstverständlich. Unsere gemeinsamen Sitzungen werden mir in guter Erinnerung bleiben. Vielen Dank.

Ich danke dem Institutsdirektor Prof. Dr. G. Mayr für die Zuverfügungstellung des Laborplatzes.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Marco Blessmann aus dem Institut für Plastische und Rekonstruktionschirurgie für die unproblematische Bereitstellung des Patientenserums, sowie an das Team der Transfusionsmedizin für die Bereitstellung von Serum.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Friedrich Buck aus dem Institut für Klinische Chemie für die Unterstützung bei den Massenspektroskopischen Analysen.

Herzlicher Dank geht an Susanne Giehler für ihre technische Assistenz im Labor.

Ich bedanke mich bei Dr. Hans Pinnschmidt vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie für die Unterstützung bei der statistischen Analyse.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie. Meinen Eltern danke ich für ihren immerwährenden Beistand und selbstlosen Rückhalt, besonders in Zeiten in denen es mal nicht so rund lief. Herzlicher Dank geht auch an meine Schwestern, Jasamin und Oranos, die sich Zeit für die Durchsicht dieser Arbeit genommen haben. Ich danke meinem Mann, Ahmad, dass er mir bei meinen Vorhaben als guter Ratgeber immer zur Seite steht und mir bei fehlender Motivation den richtigen Impuls gibt. Danke.

8 Lebenslauf

9 Ehrenwörtliche 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.

Unterschrift: