

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen und
Ohrenkrankheiten – Großhadern –
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

Bedeutung des FGFR4 Polymorphismus in der Pathogenese und Progression von Tumorerkrankungen

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

vorgelegt von

Christoph Bergmann

aus Alzenau

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W.J. Issing

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Rupp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Müller-Höcker

Mitbetreuung durch
die promovierte
Mitarbeiterin: Dr. med. Eva Hilgert

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen
Prüfung: 11.01.2007

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4
der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Issing betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine
anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

München, den 25. April 2006

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Christoph Bergmann', with a long horizontal line extending to the right.

Christoph Bergmann

meiner Familie gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in einer Kooperation der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen und Ohrenkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München (stellvertretend Prof. Dr. med. Wolfgang Issing) mit dem Max-Planck-Institut (MPI) für Biochemie in Martinsried im Zeitraum von Mai 2002 bis September 2003 in der Abteilung für Molekularbiologie des MPI (Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Axel Ullrich) erarbeitet.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Vermittlung extrazellulärer Signale in die Zelle durch transiente Tyrosinphosphorylierung	6
2.1.1 Signalweiterleitung durch Rezeptortyrosinkinasen	6
2.1.2 Rezeptoraktivierung und Signalübertragung der RTKn	9
2.1.3 Cytosolische Substrate von Rezeptortyrosinkinase	11
2.1.4 MAP Kinase Kaskaden und mitogene Signalübertragung	15
2.1.5 Die Liganden der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptorfamilie	17
2.1.6 Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 4	20
2.2 Fehlregulation von Signalwegen und Tumorentstehung	23
2.2.1 Die Rolle der unkontrollierten Expression von Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden in der Tumorentwicklung	24
2.2.2 Die Rolle von Mutationen der RTKn bei der Entstehung von Krankheiten	26
2.2.3 Die Relevanz von Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene für die Karzinogenese	28
2.3 Plattenepithelkarzinome im Oropharynx	29
2.3.1 Histopathologie und klinische Stadieneinteilung	31
2.4 Aufgabenstellung	34

3. Material und Methoden	35
3.1 Bezugsquellennachweis	35
3.1.1 Chemikalien	35
3.1.2 Enzyme	35
3.1.3 „Kits“ und sonstige Materialien	35
3.2 Medien und Puffer	36
3.3 Antikörper	36
3.4 Genotypisierung von Plattenepithelkarzinomen	37
3.4.1 Präparation der Gewebeschnitte	37
3.4.2 Entparaffinieren	37
3.4.3 Verdau mit Proteinase K	37
3.4.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	38
3.4.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden	40
3.4.5.1 Enzymatische Behandlung von DNA	40
3.4.5.2 Gelelektrophorese von DNA	41
3.5 Immunhistochemie an Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen	42
3.5.1 Schneiden von Geweben	42
3.5.2 Färbung der Paraffinschnitte	42
3.6 Statistische Auswertung der Daten	44

4. Ergebnisse	45
4.1 Charakterisierung der Patienten	45
4.2 Genotypisierung der Plattenepithelkarzinome mittels PCR-RFLP	47
4.2.1 Verteilung des FGFR4 Allels in Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Oropharynx	47
4.3 Immunhistochemische Untersuchung der Tumorgewebeprobe	52
4.4 Einfluss von FGFR4 Gly388 und Arg388 auf die Tumorexpression	56
4.4.1 Deskriptive Darstellung	56
4.4.2 Analyse der Überlebensdaten	61
4.4.2.1 Überlebenszeitanalyse als Funktion des Genotyps	61
4.4.2.2 Multivariate Cox-Regression des FGFR4 Genotyps	65
4.4.3 Rezeptorexpression	67
4.4.3.1 Multivariate Cox-Regression der FGFR4 Expression	69
4.5 Assoziation der Mutation mit anderen klinischen Charakteristika	70
5. Diskussion	74
5.1 FGFR4 Rezeptorexpression	75
5.2 FGFR4 und seine Bedeutung in der Pathogenese	76
5.3 Der FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus und seine Bedeutung in der Tumorpathogenese	79
5.4 Ausblick	85
6. Literaturverzeichnis	86
7. Abkürzungen	103
Lebenslauf	106
Nachwort	107

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des kürzlich identifizierten Polymorphismus im Gen der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 (fibroblast growth factor receptor 4) im besonderen Hinblick auf seine Zusammenhänge mit der humanen Tumorphogenese näher untersucht. Es handelt sich dabei um eine Keimbahnmutation, die zu einem Austausch der hydrophoben Aminosäure Glycin gegen die hydrophile, stark geladene Aminosäure Arginin an Position 388 (Arg³⁸⁸) und somit zu einer veränderten Proteinstruktur in der Transmembrandomäne des Rezeptors führt. Zuvor publizierte Studien, die Tumore verschiedener Organsysteme mit Fokus auf den FGFR4 Polymorphismus untersuchten, postulieren einen Zusammenhang zwischen der Rezeptormutation und seinem Einfluss auf die Tumorprogression und das Metastasierungspotential. Um diesen Einfluss der Mutation in unserem Tumorkollektiv zu untersuchen, führten wir bei Tumorproben von 301 Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom aus dem Bereich des Oropharynx litten, eine Genotypisierung mittels RFLP-PCR sowie immunhistochemische Untersuchungen durch, um die Expressionsstärke des FGFR4 feststellen zu können. Dabei zeigte sich, dass der FGFR4 in 34% der Fälle in heterozygoter oder homozygoter mutierter Form im Kollektiv vorliegt. Das entspricht einer Allelfrequenz für das Arg³⁸⁸ von 0.2. Die Verteilung der Rezeptorexpression im Kollektiv war weitgehend gleichmäßig verteilt. Um die Auswirkungen der durch die Untersuchungen gewonnenen Parameter auf die Tumorphogenese festzustellen, wurden sie mit einem umfassenden Datensatz, der aus den Patientenakten gewonnen wurde, korreliert.

Statistische Untersuchungen wiesen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem FGFR4 Genotyp und der Tumorprogression oder einem gesteigertem Metastasierungspotential nach. Auch die in anderen Organsystemen zuvor festgestellte verringerte rezidivfreie Überlebenszeit bei Vorliegen des Arg³⁸⁸ Allels konnte in dem Kollektiv dieser Studie nicht reproduziert werden. Bezüglich der Rezeptorexpression ergaben unsere Untersuchungen Hinweise auf einen Überlebensvorteil bei starker FGFR4 Expression. Signifikante Zusammenhänge zwischen Rezeptorexpression und Tumorgröße oder Tumorprogression konnten jedoch nicht nachgewiesen werden und decken sich mit den Ergebnissen von Streit *et al.* Somit können wir die bereits mehrfach postulierte Perspektive nicht stärken, den FGFR4 als Prädiktor oder prognostischen Parameter bei Krebserkrankungen zu deklarieren.

2 Einleitung

Ein multizellulärer Organismus besteht aus einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, im Falle des menschlichen aus mehr als 200 verschiedener diskreter Zelltypen. Diese bilden in ihrer Gesamtmenge ein Zellkonglomerat von bis hin zu mehreren Billionen Zellen. Um eine regelrechte zelluläre Homeostase dieser unterschiedlich differenzierten Zellen in solch einem Organismus aufrecht zu erhalten, bedient er sich verschiedener Mechanismen, die letzten Endes alle dem Ziel dienen, die Lebenserhaltung des Organismus in einer Umgebung, in der er verschiedensten Einflussfaktoren und Wechselwirkungen ausgesetzt ist, zu gewährleisten.

Zu diesen Mechanismen gehören in erster Linie die Regelmechanismen der interzellulären Kommunikation, welche die funktionale Integrität der Zelle im Organismus sicherstellt. Diese Mechanismen ermöglichen der Zelle auf ihre mittelbare und unmittelbare Zellumgebung zu reagieren. Zellen bedienen sich im Rahmen dieser Kommunikation u.a. der Signalübertragung, die in den Zielzellen wiederum entsprechende intrazelluläre Programme initiieren, um ihren verschiedenen Anforderungen und Aufgaben gerecht zu werden. Diese intrazellulären Programme sind gewebespezifische Programmierungen, die die Genexpression der Zelle regulieren. Diese Programme sind ein Produkt, welches aus Interaktion mit umgebenden Faktoren wie Zell-zu-Zell-Kontakt, Interaktionen mit extrazellulärer Matrix, endokrinen Hormonen, parakrinen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren resultieren, so dass entscheidende Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose gesteuert werden können (Ullrich und Schlessinger *et al.*, 1990; Gutkind *et al.*, 1998). Weitere Einflussfaktoren sind Zellstress wie Hitze, Oxidation, Bestrahlung und weitere physikalische Beeinflussungen.

Die Vermittlung von extrazellulären Signalen zu zellulärer Antwort geschieht durch verschiedene Rezeptor- und Signalgebungssysteme. Dabei lassen sich grundlegend lösliche, diffundierende Liganden von membranständigen Liganden unterscheiden, die spezifische Oberflächenrezeptoren aktivieren. Durch diese Rezeptoraktivierung werden beispielsweise Ionenflüsse, Phosphorylisierung- oder Fettstoffwechselfvorgänge und Produktion von second messengers in Gang gesetzt. Eine solche Signalinformation hat meist den Zellkern als Ziel, um die Genexpression der Zelle zu regulieren.

Man kennt drei verschiedene Familien von Zelloberflächenrezeptoren: Ionen-Kanal abhängige Rezeptoren, G-Protein verknüpfte Rezeptoren und Enzym-verknüpfte Rezeptoren.

Weiterhin unterteilt man Enzym-abhängigen Rezeptoren in mindestens fünf Klassen:

- Rezeptor-Guanyl-Zyklasen
- Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
- Tyrosin-Kinase assoziierte Rezeptoren
- Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen
- Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen

Diese Enzymklassen liegen entweder als Transmembran- oder als zytosolische Proteine vor. Von den genannten enzymabhängigen Kinasen sind die Serin/Threonin (S/T)-spezifischen und die Tyrosin (Y)-spezifischen Enzyme am besten charakterisiert. Grundsätzlich biochemisch gesehen verestern S/T-spezifischen Kinasen einen Phosphatrest mit der alkoholischen Gruppe von S- und T-Resten. Die Y-spezifischen Proteinkinasen dagegen erzeugen einen Phosphatester mit der phenolischen OH-Gruppe von Y-Resten.

Molekulargenetisch fungieren S/T wie auch die Tyrosin-Kinase assoziierten Rezeptoren und ihre Liganden regulierend als Checkpoint innerhalb des Zellzyklus (Mitose). Sie stellen sicher, dass die Zelle in der Lage ist sich zu teilen und die Fehler im Replikationsprozess auf ein Minimum reduziert sind. Der Zusammenhang zwischen beiden Proteinkinase-Gruppen ergibt hierbei, dass die Serin/Threonin Protein Kinase abhängig von dem Phosphorylierungsstatus des Cyclins (Cyclin gehört in die Gruppe der Kinase-assozierten Proteine) ist. Daraus ergibt sich deren Bezeichnung cyclin-dependent kinases (cdk). Es gibt mindestens sieben cdk-Familienmitglieder, und mindestens ebenso viele Angehörige der Cyclin-Gruppe, die zusammen cdk/cyclin-Komplexe erstellen, die unterschiedliche Substratspezifisierungen und unterschiedliche Einsatzzeiten während des Zellzyklus haben. Beispielsweise der cyclinB/cdc2-Komplex, auch *mitosis promoting factor* (MPF) genannt, ist die primäre Regulationsstelle des Eintritts des Zellzyklus von der G₂- in die M-Phase. Er wird von einer cdk-activating kinase (CAK) und einer Phosphatase (cdc25c), die hemmende Phosphatasen entfernt, aktiviert.

Tyrosinphosphatasen sind noch nicht sehr gut charakterisiert und Gegenstand aktueller molekularbiologischer und zellbiologischer Forschung. Sie entfernen Phosphat von Tyrosinresten (Sun, 1994; Streuli, 1996) und greifen dadurch in die Regulation der Funktion von Genen ein.

Daneben gibt es noch weitere Mechanismen, die maßgeblich für die Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase eines multizellulären Organismus sind. Kurz zu nennen sind dabei wichtige Regelkreisläufe, die zum einen die programmierte Lebensdauer einer Zelle überwachen, wie der p53-Regelkreislauf (Blons *et al.*, 2003, Prives *et al.*, 1999, Vogelstein *et al.*, 2000, Ichimura *et al.*, 2000). p53 ist ein Transkriptionsfaktor und überwacht die DNA-Replikation der Zelle. Kommt es in der DNA zu Schäden, die eine Replikation oder eine Mitose fehlerhaft ablaufen lassen würden, wird p53 aktiviert und akkumuliert in der Zelle. Es werden einerseits DNA-Reparatur-Mechanismen in Gang gesetzt und andererseits der Zellzyklus gestoppt. Dieses Regelwerk ist ausgestattet mit komplexen Kontrollstufen, die in der Lage sind, intra- und extrazelluläre Signale zur Genexpression weiterzuleiten, Genexpressionsprodukte zu aktivieren, oder die Genexpression von gewissen Signalen oder deren Produkte zu hemmen. p53 ist somit in hohem Maße an der Entscheidung beteiligt, ob sich eine Zelle teilen, differenzieren oder sterben (Apoptose) wird. Deswegen wird das p53-Protein auch als Wächter des Genoms bezeichnet. Daneben sind Stabilitätsgene wie z.B. *BRCA 1*, *BLM* und *ATM* zu nennen (Scully *et al.*, 2000), die ebenso die mitotische Rekombination und die chromosomale Segregation überwachen und somit beispielsweise genetische Alterationen auf ein Minimum reduzieren. Weitere Regelkreisläufe werden im Verlauf dieser Einleitung erläutert, die enger mit dem Regelwerk der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen verflochten sind. Grundlegend ist bei Betrachtung der Zellbiologie zu beachten, dass es sich um ein äußerst komplexes Regelsystem handelt, in dem sich mehrere Regelkreise überschneiden und somit eine optimale Voraussetzung für eine integrale Leistung der Zelle im Zellverbund bietet (Hunter, 2000, Bunz *et al.* 1999).

In der vorliegenden Arbeit sollen die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) näher betrachtet werden. Sie werden zu den transmembranären Proteinen gerechnet (van der Geer *et al.*, 1994), und stellen einen Hauptvertreter der Zelloberflächenrezeptoren dar. RTK besitzen intrinsische Tyrosinkinaseaktivität und können sowohl transmembranär als auch zytoplasmatisch eine Vielzahl zellulärer Substrate erkennen und leiten durch reversible Tyrosinphosphorylierungen

von diesen Adapterproteinen oder zytoplasmatischen Tyrosinkinase extrazelluläre Signale in die Zelle bis zum Zellkern weiter.

An Tyrosin-Kinase-Rezeptoren aktivierenden Wachstumsfaktoren kennt man bislang Platelet-derived Wachstumsfaktor (PDGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Endothelwachstumsfaktor (EGF), Insulin, Insulin-like Wachstumsfaktoren I und II (IGFs), Nervenwachstumsfaktor (NGF), Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF), Stammzellfaktor, Transforming growth factor (TGF), Makrophagenkolonie-stimulierender-Wachstumsfaktor (CSF), Heregulin und andere. Durch die Bindung ihres Liganden wird die tyrosinspezifische Proteinkinaseaktivität des Rezeptors stimuliert und damit eine Kaskade von Signalen ausgelöst, die schließlich eine Änderung der physiologischen Aktivitäten der Zelle und/oder des Genexpressionsmusters bewirken (Hunter *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1994; Streuli, 1996; Weiss und Schlessinger, 1998). Sie stellen somit ein wichtiges regulatorisches Prinzip für die Steuerung wichtiger Vorgänge in der interzellulären Signalweiterleitung dar, das eine Balance zwischen den Zellen zur Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase gewährleistet.

Störungen im Ablauf der Signalübertragung durch Änderung dieses Gleichgewichts, wie beispielsweise durch UV-Strahlung oder Chemikalien, können drastische Veränderungen im feinen Regelwerk der Zelle bewirken und möglicherweise zu pathophysiologischen Veränderungen, wie z.B. Krebs, führen (Laird *et al.*, 1997; Alroy *et al.*, 1997).

2.1 Vermittlung extrazellulärer Signale in die Zelle durch transiente Tyrosinphosphorylierung

Die Weiterleitung extrazellulärer Signale wird durch Oberflächenrezeptoren vermittelt, von denen Rezeptortyrosinkinasen (RTK) die Hauptvertreter darstellen. RTK setzen diese Signale durch reversible Tyrosinphosphorylierung in intrazelluläre Signalwege um. Diese transiente Phosphorylierung findet neben Serin und Threonin v.a. an Tyrosinresten statt. Obgleich dieser Vorgang einen Anteil von nur 0,05% bis 0,1% an der Gesamtphosphorylierung in der Zelle hat, stellt sie einen der wichtigsten Vorgänge bei der Signalübertragung dar (Hunter und Sefton *et al.*, 1980; Hunter *et al.*, 1995). Neben der Klasse der RTK ist auch die Klasse der antagonistisch wirkenden Proteintyrosinphosphatasen (PTP) wichtig, um die genau regulierten Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge zu kontrollieren. In beiden Proteinklassen gibt es sowohl membranständige als auch zytosolische Vertreter (Sun, 1994; Streuli, 1996).

2.1.1 Signalweiterleitung durch Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen sind eine Familie von Oberflächenrezeptoren, die sich im Allgemeinen aus drei Komponenten zusammensetzen (s. Abb. 1): einer amino-terminal glykosylierten, extrazellulären Domäne mit der Ligandenbindungsstelle, einer einzigen hydrophoben Transmembran- α -Helix, die einspännig in der Membran verankert ist, sowie einer zytosolischen Domäne mit der enzymatischen Aktivität einer tyrosinspezifischen Proteinkinase.

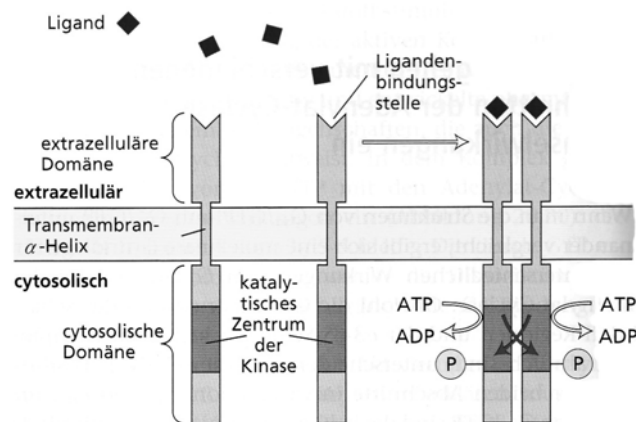


Abb. 1 Allgemeine Strukturmerkmale und die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK)

In der extrazellulären Domäne zeigen sich die überwiegenden Unterschiede innerhalb der Familie der RTK. Sie zeichnet sich durch eine Vielfalt an unterschiedlichen Sequenzmotiven aus, die zur Einteilung der 50 bekannten RTK in 20 verschiedene Unterfamilien dient (van der Geer *et al.*, 1994; Plowman *et al.*, 1994; Blume-Jensen *et al.*, 2001) (Abb. 2). So verfügen beispielsweise die Fibroblasten-Growth-Factor-Rezeptoren (FGFR) über drei Immunglobulin-ähnliche Bereiche und die Epidermal-Growth-Factor-Rezeptoren (EGFR) dagegen über Cystin-reiche Domänen.

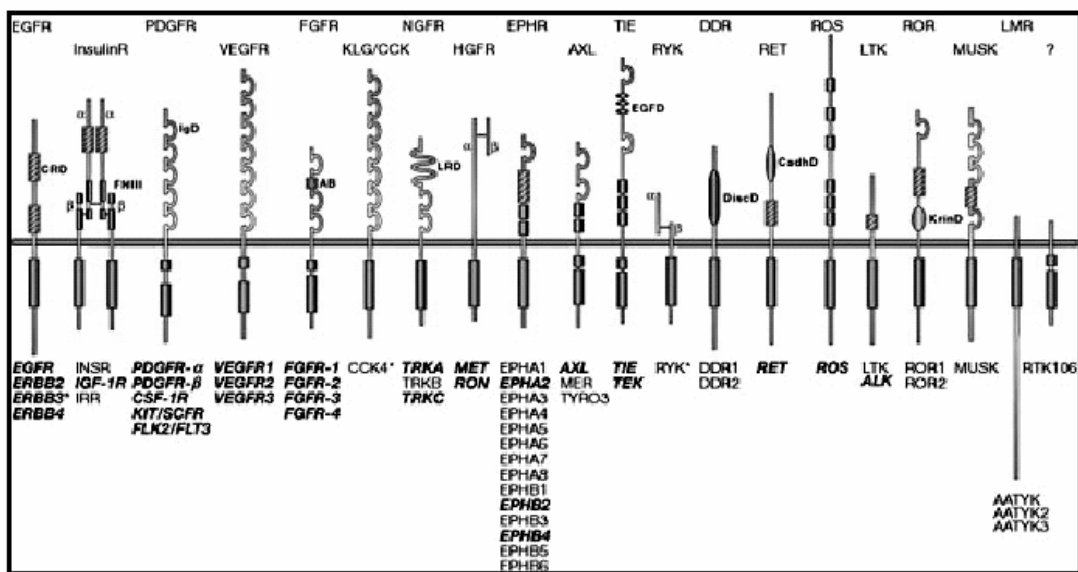


Abb.2 Die verschiedenen Rezeptortyrosinkinasefamilien

Die Abbildung zeigt die 20 Subklassen, in welche RTK aufgrund von Sequenzvergleichen in der extrazellulären Domäne eingeteilt wurden (modifiziert nach Wallasch, 1996)

Der zytoplasmatische Anteil der RTK zeigt wesentlich weniger Unterschiede zwischen den Transmembranrezeptoren als die extrazellulären Domänen und setzt sich aus der Juxtamembranregion, der hochkonservierten Kinasedomäne, die eine ATP-Bindungsstelle und über ca. 250-300 Aminosäuren beinhaltet, sowie dem carboxyterminalen Bereich zusammen (Ullrich und Schlessing *et al.*, 1990). Diese Kinasedomäne mit ihrer ATP-Bindungsstelle katalysiert sowohl die Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste des Rezeptors, als auch die Tyrosinphosphorylierung von zellulären Substraten (Yarden und Ullrich *et al.*, 1988). Der carboxyterminale Bereich von RTK enthält mehrere Autophosphorylierungsstellen, die nach Ligandenstimulation und Rezeptordimerisierung hochspezifische Bindungsstellen für andere Proteine darstellen (Heldin *et al.*, 1995)

Diese Kinasedomäne kann in verschiedenen Variationen vorliegen. So weisen beispielsweise Mitglieder der FGF- und PDGF- Rezeptorfamilie eine Modifikation durch eine Insertionssequenz mit mehreren Autophosphorylierungs- und hochspezifischen Substratbindungsmotiven auf, die diese Kinasedomäne unterbricht. (Malarky *et al.*, 1995). Diese Motive finden sich auch im carboxyterminalen Bereich, der dagegen nur wenig konserviert ist zwischen den einzelnen Rezeptoren. Auch hierüber lassen sich die verschiedenen Funktionen der RTK definieren.

Die EGFR Familie besteht aus vier Mitgliedern, dem EGFR (HERc, ErbB1; Ullrich *et al.*, 1984), HER2 (ErbB2/neu; (Coussens *et al.*, 1985), HER3 (ErbB3; Kraus *et al.*, 1989) und HER 4 (ErbB4; Plowman *et al.*, 1993). Mitglieder dieser RTK Familie konnten schon mit verschiedenen Formen von Krebs in Verbindung gebracht werden (Ullrich *et al.*, 1984; Pierce *et al.*, 1991) und dienen entweder als prognostischer Marker oder als therapeutischer Angriffspunkt (Voldborg *et al.*, 1997; Prenzel *et al.*, 2001). Eine erhöhte Genaktivität der EGFR wurde v.a. bei Brust-, Blasen-, Magen- und Lungenkarzinomen gefunden (Lemoine *et al.*, 1992). HER3 nimmt innerhalb dieser Familie eine Sonderstellung ein, da dieser Rezeptor aufgrund von Punktmutationen innerhalb der katalytischen Domäne nur eine eingeschränkte enzymatische Aktivität aufweist (Guy *et al.*, 1994). Die Genamplifikation und/oder erhöhte Aktivität des *HER2* Gens wird insbesondere mit der Entstehung und Progression von Brust- und Ovarialkarzinomen in Zusammenhang gebracht und deutet auf eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit und beschleunigter Tumorprogression mit erhöhter Metastasierungswahrscheinlichkeit in den betroffenen Patienten hin (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989)

In der Familie der FGF-Rezeptorfamilie sind bisher 4 Mitglieder identifiziert worden (Dionne *et al.*, 1990; Keegan *et al.*, 1991; Partanen *et al.*, 1991). Die Homologie der primären Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Rezeptoren liegt zwischen 55-72%. Durch alternatives Spleissen der mRNA der FGFR1, 2 und 3 sind zusätzliche strukturelle Unterschiede möglich. So sind sowohl lösliche als auch membrangebundene FGF-Rezeptoren mit einer, zwei oder drei Immunoglobulin (Ig)-Domänen oder einer veränderten C-terminalen Hälfte der dritten Ig-Domäne beschrieben worden (Johnson und Williams *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu existieren vom FGFR4 nur intrazelluläre Spleiss-Varianten ohne Transmembrandomäne oder mit einem verkürzten Carboxy-Terminus (van Heumen *et al.*, 1999).

2.1.2 Rezeptoraktivierung und Signalübertragung der RTK

Die RTK binden als Liganden lösliche oder membrangebundene Peptid- oder Polypeptidhormone, wie den Nervenwachstumsfaktor (NGF), den platelet-derived growth factor (PDGF), den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) oder Insulin. Durch die Bindung ihres Liganden wird die tyrosinspezifische Proteinkinaseaktivität des Rezeptors stimuliert und damit eine Kaskade von Signalen ausgelöst, die schließlich eine Änderung der physiologischen Aktivitäten der Zelle und/oder des Genexpressionsmusters bewirken.

Ligandenbindung an den extrazellulären Teil des Rezeptors führt zur Dimerisierung von Rezeptormonomeren, die sich anschliessend gegenseitig an spezifischen Tyrosinresten phosphorylieren. In den meisten Fällen dimerisiert das RTK-Molekül nach der Bindung des Liganden. Daraufhin phosphoryliert jede der auf den Monomeren befindlichen Proteinkinasen bestimmte Tyrosinreste innerhalb der cytosolischen Rezeptordomäne des jeweils anderen Partners im Dimer. Dieser als Autophosphorylierung bezeichnete Vorgang erfolgt in zwei Stufen. Zunächst werden Tyrosinreste der Phosphorylierungslippe in der Nähe des katalytischen Zentrums phosphoryliert. Dadurch wird ein Konformationswechsel ausgelöst, der bei einigen Rezeptoren die ATP-Bindung erleichtert. Bei anderen Rezeptoren (beispielsweise beim Fibroblast-Growth-Factor-Rezeptor) wird durch die Konformationsänderung die Bindung von Proteinsubstraten begünstigt. In der zweiten Stufe werden weitere Aminosäurereste in der zytosolischen Domäne phosphoryliert, wobei die entstehenden Phosphotyrosinreste als Bindungsstellen für weitere Proteine dienen, die an der Signalübertragung beteiligt sind. Die Bindung zytosolischer Proteine an tyrosinphosphorylierte Proteinmotive ist schliesslich der erste Schritt intrazellulärer Signalkaskaden (Songyang *et al.*, 1995). Diese Hormon-Rezeptor Interaktionen werden durch das Bivalenz-Modell der Liganden-induzierten Konformationsänderung erklärt und sind bisher das wichtigste beschriebene Beispiel (Greenfield *et al.*, 1989). Liganden verfügen über einen hoch- und einen niedrig-affinen Bereich, mit denen sie zwei monomere Rezeptoren binden und einen ternären Komplex bilden können (Barbacci *et al.*, 1995; Tzahar *et al.*, 1997). Extrazelluläre Stimuli können auf diese Art und Weise nicht nur Homo- sondern auch Heterodimere zwischen verschiedenen Rezeptoren einer Familie ermöglichen. Diese, vom stimulierenden Liganden abhängige Heterodimerisierung erweitert das Spektrum an aktivierten intrazellulären Signalwegen beträchtlich.

PDGF oder EGF sind Beispiele für dieses Modell und bilden so Rezeptorkomplexe über Bindung von zwei Rezeptormolekülen (Gullick *et al.*, 1994). Im Allgemeinen führt die Rezeptor-Dimerisierung zur *trans*-Phosphorylierung der Rezeptoren (Ullrich und Schlessinger *et al.*, 1990). Eine Vielzahl von Studien konnte zeigen, dass die Mitglieder der EGFR Familie alle möglichen funktionellen Homo- bzw. Heterodimerkombinationen zur Signalübertragung nutzen. Insbesondere Heterodimerkombinationen, die den EGFR bzw. HER2 enthalten, sind für sehr starke biologische Antworten verantwortlich (Riese *et al.*, 1995; Wallasch *et al.*, 1995; Alroy und Yarden *et al.*, 1997). HER2, für den bisher kein direkter Ligand beschrieben wurde (Rubin und Yarden, 2001), ist somit auf Heterodimerisierung mit den anderen Familienmitgliedern angewiesen und wird von den anderen Rezeptoren als Dimerisierungspartner bevorzugt (Graus-Porta *et al.*, 1997). HER2, dessen Überexpression allein schon transformierend wirkt (Hudziak *et al.*, 1987), wird durch den EGFR nach EGF Stimulation transphosphoryliert (Stern *et al.*, 1988) oder kooperiert mit HER3 bei der Transformation von NIH3T3 Zellen (Alimandi *et al.*, 1995). Zusätzliche Variabilität erfährt das Rezeptornetzwerk aus den vier RTK der EGFR Familie durch eine Vielzahl von Liganden, die spezifisch bestimmte Rezeptordimere und nachgeschaltete Signalwege aktivieren können.

Die Gruppe der FGF-Liganden können nur jeweils ein Rezeptor-Molekül binden und gehören somit zu einer Klasse von monovalenten Molekülen (Schlessinger *et al.*, 1995). Eine weitere Voraussetzung für die Aktivierung eines FGF Rezeptors ist das Vorhandensein von löslichem oder membrangebundenem Heparin (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994). Heparin kann FGF-Moleküle binden und auf diese Weise eine Brücke zwischen zwei FGF-Rezeptoren bilden (Plotnikov *et al.*, 1999)

Neben der ligandeninduzierten Aktivierung können RTK auch ligandenunabhängig aktiviert werden. In den letzten Jahren wurde diese Transaktivierung von Transmembranproteinen, wie z.B. dem EGF Rezeptor (Daub *et al.*, 1996) und dem PDGF Rezeptor (Linseman *et al.*, 1995) nach Aktivierung G Protein-gekoppelter Rezeptoren nachgewiesen. Außerdem kann z.B. die Inaktivierung von PTPasen ausreichen, um die Tyrosinphosphorylierung von RTK einzuleiten (Jallal *et al.*, 1992).

2.1.3 Cytosolische Substrate von Rezeptortyrosinkinase

Im Allgemeinen gehen Proteinkinasen nach der Übertragung des extrazellulären Signals in den aktiven Zustand über. Die katalytischen Aktivitäten von Proteinkinasen verändern sich nach Phosphorylierung durch direkte Bindung weiterer Proteine sowie durch Änderungen im Gehalt verschiedener second messenger-Moleküle. An diesen Signalübertragungswegen sind grosse, aus vielen Proteinen zusammengesetzte Signalkomplexe beteiligt, die häufig durch Adapterproteine zusammengehalten werden. Adapterproteine entfalten keine katalytischen Aktivitäten und aktivieren Effektorproteine nur indirekt. Vielmehr bestehen sie aus verschiedenartig kombinierten Domänen, die als Bindungsstellen für weitere Proteine fungieren (Mochly-Rosen *et al.*, 1995). Die Bindung dieser interagierenden Proteine erfolgt dabei vielfach an spezifische Phosphotyrosinreste durch SH2 (src-homology2)-Domänen (Mayer und Baltimore *et al.*, 1993) oder auch durch PTB (phosphotyrosine binding)-Bindungsmotive (Kavanaugh *et al.*, 1995). SH2 umfasst etwa 100 Aminosäuren und wurde auf Grund ihrer Homologie zu Motiven der Proteine Src und Fps entdeckt (Pawson *et al.*, 1988). Die Bindung erfolgt carboxy-terminal auf den Phosphotyrosinrest und die Spezifität wird dabei von den drei bis fünf Aminosäureresten bestimmt. Das Bindungsmotiv PTB besteht aus ca. 200 Aminosäuren und erlangt ihre Spezifität durch Aminosäurereste, die in N-terminaler Richtung des phosphorylierten Tyrosinrestes liegen (Kavanaugh *et al.*, 1994). PTB ist sogar in der Lage nicht-phosphorylierte Sequenzen zu erkennen und fungiert in diesem Falle als „Proteinerkennungselement (Pawson *et al.*, 1997)

Jede Domäne bindet sich an eine bestimmte Aminosäuresequenz in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Phosphotyrosinrest, wobei die Primärstruktur der jeweiligen SH2-Domäne die korrekten Phosphotyrosinreste auswählt. So wird die SH2-Domäne von Src fest an einem Peptid mit der Sequenz Phosphotyrosin-Glutaminsäure-Glutaminsäure-Isoleucin gebunden. Peptide mit diesen vier Aminosäuren bilden daher einen engen Kontakt mit der Bindungsstelle der SH2-Domäne von Src. Die Bindung lässt sich mit dem Einpassen eines zweizinkigen „Steckers“, nämlich den Phosphotyrosin- und Isoleucinresten, in eine Steckdose mit zwei Löchern innerhalb der SH2-Domäne vergleichen.

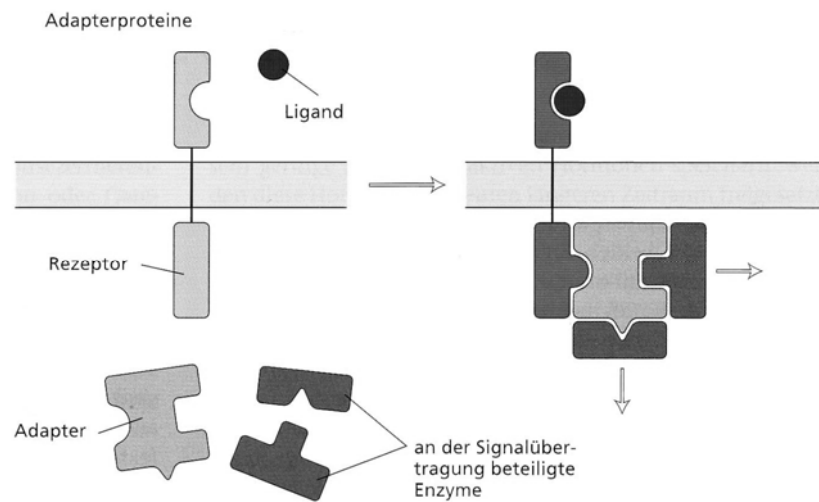


Abb. 3 Schematischer Aufbau von der Aktivierung der PTK und Lokalisation der Adapterproteine.

Als weitere Bindungsdomäne existiert SH3 (src homology 3), die an prolinreiche Sequenzen in Proteinen binden können (Yu *et al.*, 1994).

Ein weiterer wichtiger Vertreter der Signalproteine ist das GRB2 (growth factor receptor binding protein 2) (Lowenstein *et al.*, 1992). Die Domäne erhielt ihren Namen aufgrund der Homologie mit der vom Gen src codierten cytosolischen tyrosinspezifischen Proteinkinase Src. GRB2 und vergleichbare Adapterproteine binden auf zytosolischer Seite mit ihren konservierten SH2-Domänen an unterschiedliche Phosphotyrosinreste einer RTK nach deren hormonellen Aktivierung. GRB2 enthält außerdem zwei SH3-Domänen, an denen der Guaninnucleotidaustauschfaktor Sos (son of sevenless) gebunden und aktiviert wird. Für die Bildung dieses Komplexes ist die Fähigkeit von GRB2 entscheidend, zwei verschiedene Liganden binden zu können (s. Abb. 3). Nach der Aktivierung des Rezeptors wird Sos aus dem Zytoplasma in die Nähe des kleinen G-Proteins Ras transferiert (Rozakis-Adcock *et al.*, 1992 und 1993; Li *et al.*, 1993; Egan *et al.*, 1993). Es verhält sich nun wie ein Guaninnucleotidaustauschprotein (GEF) und ermöglicht die Bildung des aktiven Ras/GTP-Komplexes (Holgado-Madruga *et al.*, 1996). Sos fördert die Ablösung von GDP von Ras; nach der Bindung von GTP wird Sos vom aktiven Ras abgespalten. Dies führt zu verschiedensten zellulären Antworten, wie z.B. zur Proliferation, Differenzierung oder auch zur Zellzyklusprogression (Downward, 1997).

Ras ist ein GTP-bindendes Schaltprotein, das ebenso wie die $G\alpha$ -Untereinheiten zwischen einem aktiven Zustand mit gebundenem GTP und einem inaktiven Zustand mit gebundenem GDP pendelt. Während $G\alpha$ direkt mit den G-Protein gekoppelten Rezeptoren verbunden ist und Signale an verschiedene Effektorproteine, wie die Adenylat-Cyclase, weitergibt, ist Ras nicht direkt mit den tyrosinspezifischen Rezeptor-Kinasen verbunden.

Die Ras-Proteine von Säugetieren sind eingehend untersucht worden, weil bei vielen menschlichen Tumoren veränderte Ras-Proteine nachgewiesen wurden, die nicht mehr GTP hydrolysieren können und daher permanent angeschaltet bleiben, wodurch neoplastische Transformationen entstehen können.

Aus biochemischen und genetischen Untersuchungen geht hervor, dass die Aktivität von Sos als Nucleotidaustauschfaktor durch den C-Terminus von Sos gehemmt wird, während durch die Bindung von GRB2 diese Hemmung aufgehoben wird. Nach der Sos-Bindung an Ras/GDP ändert sich die Konformation der beiden Ras-Regionen Schalter I und II, wodurch sich die Bindungstasche für GDP öffnet, das nun Ras verlässt. Da der GTP-Gehalt rund zehnfach höher als der von GDP ist, wird nun vorzugsweise GTP gebunden und damit Ras aktiviert. Die Aktivierung von Ras und $G\alpha$ erfolgt demnach mit dem gleichen Mechanismus: durch die Bindung eines Proteins, nämlich von Sos, wird die Proteinstruktur so weit geöffnet, dass GDP den Komplex im Austausch gegen GTP verlassen kann. GTP löst nach der Bindung an Ras im Bereich von Schalter I und II eine Konformationsänderung aus, durch die der Ras/GTP-Komplex das nächste Effektormolekül in der Signalkette aktivieren kann.

Im Gegensatz zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die eine direkte Wechselwirkung mit dem assoziierten G-Protein eingehen, sind RTK-Moleküle indirekt mit Ras unter Beteiligung der beiden Proteine GRB2 und Sos verbunden. So hat das myristilierte, membranassoziierte Adapterprotein SNT-1/FRS2 (Wang *et al.*, 1996; Kouhara *et al.*, 1997) eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion durch FGF Rezeptoren. FGFR1 aktiviert SNT-1/FRS2 und bindet somit GRB2-Sos, das wiederum Ras zum FGFR1 rekrutiert. Auf diese Weise wird das FGF vermittelte Signal an den Ras/MAP-Kinase Signalweg gekoppelt (Kouhara *et al.*, 1997). Normalerweise werden sowohl die Aktivierungen von Ras als auch die dadurch gesteuerten Zellreaktionen erst durch die Bindung des Liganden am RTK induziert. Wenn allerdings die Zelle ein konstitutiv aktives Ras-Molekül aufweist, erfolgen die Zellreaktionen auch in Abwesenheit des Liganden.

Aktiviertes Ras wird an der N-terminalen Domäne der serin/threoninspezifischen Proteinkinase Raf gebunden und induziert nun eine Kinase-Kaskade, die schließlich mit der Aktivierung einer MAP-Kinase ihren Höhepunkt erreicht.

Die gleichen aktivierten RTK, von denen aus der Signalübertragungsweg über Ras gestartet wird, können auch den Inosit-Lipid-Weg nach Bindung von Phosphatidyl-Inosit-3-Kinase und PLC γ anschalten. Die Phosphatidyl-Phosphatase PLC γ ist also ein weiteres Signalmolekül, das in der FGF Signalkaskade von Bedeutung ist. Aktivierte PLC γ hydrolysiert Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphate zu den „second messengers“ Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und 1,2-Diazylglycerin (DAG) und reguliert so die Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Speichern und die Aktivierung der Proteinkinase C. Mit Hilfe der SH2-Domäne von PLC γ wird das Enzym an bestimmte Phosphotyrosinreste einiger RTKs gebunden, so dass das Enzym in unmittelbare Nachbarschaft zu seinen membrangebundenen Substraten gelangt. Die aktivierte RTK steigert daher die Aktivität der PLC γ auf zweifache Weise: zum einen wird das Enzym an der Membran fixiert, zum anderen wird es durch Phosphorylierung aktiviert. PLC γ wurde als ein 150 kDa Phosphoprotein identifiziert, das spezifisch nach FGF-1 Stimulation an den FGFR1 bindet (Burgess *et al.*, 1990). Die Bedeutung der PLC γ Aktivierung durch FGF ist aber noch nicht genau bekannt, da eine FGF Mutante, die nicht mehr mit PLC γ interagieren kann, keine veränderten biologischen Eigenschaften hat (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994).

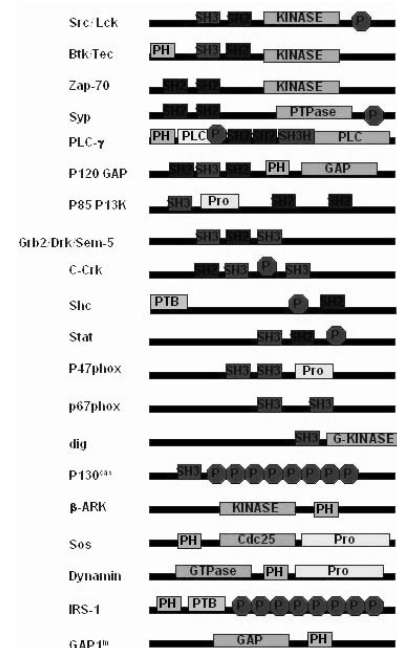


Abb. 4 Substrate von RTK im schematischen Aufbau

Verwendete Abkürzungen:

SH: Src homology,

PH: Pleckstrin homology,

Pro: Prolin-reiche Domäne,

PTB: Phosphotyrosin-bindende Region,

PTPase: Phospho-Tyrosinphosphatase Domäne (Pawson *et al.*, 1995)

2.1.4 MAP Kinase Kaskaden und mitogene Signalübertragung

Die Grb2/Sos-vermittelte Aktivierung von Ras spielt nach der Stimulation von RTK eine zentrale Rolle in der mitogenen Signalantwort (Downward *et al.*, 1997). Aktiviertes Ras induziert nun eine *Kinase-Kaskade*, die schließlich mit der Aktivierung einer MAP-Kinase (mitogen activated protein) ihren Höhepunkt erreicht. Diese Serin-/Threonin-Kinase gelangt in den Zellkern und phosphoryliert viele unterschiedliche Proteine einschliesslich Transkriptionsfaktoren, welche die Expression wichtiger Proteine steuern, die für den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung sind. Die Aktivierung der MAP-Kinase kann in zwei verschiedenen Zellen gleiche oder auch unterschiedliche Zellreaktionen auslösen. Dies gilt auch für die Stimulation verschiedener RTK-Moleküle der gleichen Zelle. Die an der Regulation der Reaktionsspezifität der MAP-Kinasen beteiligten Mechanismen sind noch weitgehend unbekannt.

Aktiviertes und membran-assoziiertes Ras wird an der N-terminalen Domäne der serin/threoninspezifischen Proteinkinase Raf-1 gebunden, was somit zur Translokation von Raf-1 zur Plasmamembran führt, wo es von MEK1 und MEK2 gebunden wird und gleichzeitig diese Proteinkinase phosphoryliert (Morrison und Cutler, 1997; Barnard *et al.*, 1998). MEK aktiviert die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, bei der es sich um eine weitere serin/threoninspezifische Proteinkinase handelt, und phosphoryliert diese an bestimmten Serinresten. Diese werden durch Tyrosin- und Threoninphosphorylierung des regulatorisch wichtigen TEY-Motivs modifiziert (Robinson und Cobb, 1997) und wandern daraufhin in den Zellkern. Dort phosphorylieren die MAP-Kinasen viele Substratproteine an Serinresten, zu denen Transkriptionsfaktoren gehören, welche die Expression von Genen und damit zahlreichen Zellreaktionen steuern (Robinson und Cobb, 1997). Im Zellkern werden die aktivierten MAP-Kinasen an bestimmten Stellen an der C-terminalen Domäne eines als ternärer Komplexfaktor (TCF) bezeichneten Proteins phosphoryliert, das nun zwei Moleküle des Serum-Response-Faktors (SRF) bindet. Dadurch entsteht ein trimerer DNA-bindender Faktor, der nach Bindung an SRE die Transkription stimuliert. Wenn nach einer Mutation TCF keine durch die MAP-Kinase phosphorylierbaren Serinreste trägt, wird die Genexpression bei Transfektionsexperimenten nicht mehr durch das veränderte TCF aktiviert. Die von Wachstumsfaktoren abhängige Phosphorylierung von SRF an Serin-103 erhöht die Geschwindigkeit, mit der SRF an SRE *in vitro* gebunden wird, sowie die Affinität zwischen

SRF und SRE *in vitro*. Die Phosphorylierung der Serinreste von SRF wird *in vitro* durch eine als pp90 bezeichnete MAP-Kinase katalysiert.

Außer der zuvor beschriebenen MAP-Kinasen enthalten Zellen höherer Eukaryoten funktionell vergleichbare Proteine, die je nach Stimulus die Signalübertragung in den Zellkern übernehmen. Es handelt sich dabei um die zu den ERK1 und ERK2 homologen Kinasen JNK1 und JNK2 (c-jun N-terminal Kinase 1 und 2) und die nach ihrer scheinbaren Molekülmasse bezeichneten p38-Kinasen (Dhanasekaran und Reddy, 1998). Sie werden als MAP-Kinasen zusammengefasst und haben die Eigenschaften von serin/threoninspezifischen Proteinkinasen, die im Zytosol nach Einwirkung bestimmter extrazellulärer Signale aktiviert und anschliessend in den Zellkern transferiert werden. Die Aktivierung der ERK und JNK MAP-Kinase Kaskaden führt innerhalb kürzester Zeit zur Transkription der sogenannten *immediate early genes* c-fos und c-jun.

Bei der Aktivierung aller bekannten MAP-Kinasen werden *zwei* analoge Aminosäuren in der Phosphorylierungslippe des jeweiligen Proteins phosphoryliert. Bei allen eukaryotischen Zellen erfolgt daher nach Bindung sehr unterschiedlicher extrazellulärer Signalmoleküle die Aktivierung einer bestimmten MAP-Kinase über eine hoch konservierte Kaskade von Proteinkinasen. Die unterschiedlichen MAP-Kinasen steuern jeweils bestimmte Zellreaktionen, die bei der Morphogenese, bei der Apoptose oder bei der zellulären Antwort auf Stressoren erfolgen (Abb. 5).

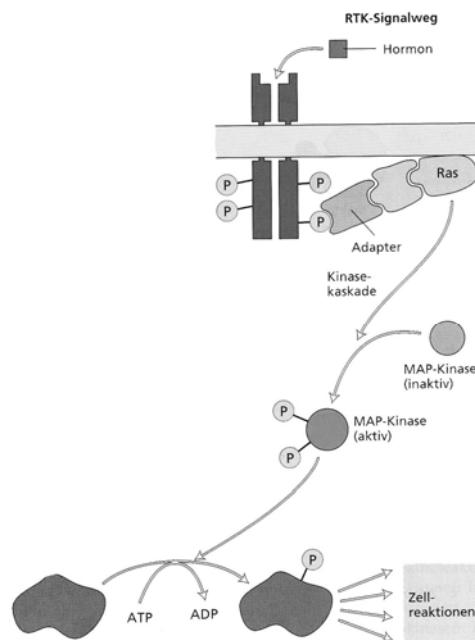


Abb 5 Schematischer Überblick der Signalwege nach Aktivierung von RTK

2.1.5 Die Liganden der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptorfamilie

Die aktivierenden Liganden dieser Rezeptoren der FGF-Familie haben sich in den letzten Jahren als die wahrscheinlich größte Familie unter den Peptid-Wachstumsfaktoren herausgestellt. Bis heute sind 22 verschiedene Mitglieder dieser Familie in menschlichen Geweben identifiziert worden (Bellosa *et al.*, 2001). Die strukturell verwandten und Heparin-bindenden Polypeptide können als Mitogene wirken und unterschiedliche zelluläre Antworten hervorrufen. Die am besten charakterisierten Mitglieder sind FGF-1 (Jaye *et al.*, 1986) und FGF-2 (Abraham *et al.*, 1986). Sie zeigen die größte Expressionsbreite in den verschiedenen menschlichen Gewebetypen. Beide Faktoren wurden aufgrund ihres mitogenen Potentials gegenüber Fibroblasten aus der Hirnanhangdrüse und Gehirngewebe gewonnen. In der Zwischenzeit ist sowohl FGF-1 als auch FGF-2 aus einer Reihe von verschiedenen Geweben isoliert worden und es konnte gezeigt werden, dass sich das mitogene Potential beider Faktoren auf eine große Anzahl verschiedener Zelltypen erstreckt (Burgess und Maciag, 1989). Besonders interessant ist, dass beide Faktoren sowohl beim Wachstum als auch bei der Steuerung der Wanderungseigenschaften von Endothelzellen eine wichtige Rolle spielen (Burgess und Maciag, 1989; Folkam und Klagsbrun, 1987). Beides sind Prozesse, die der Neubildung von Blutgefäßen zu Grunde liegen, und daher für die Versorgung eines wachsenden Tumors essentiell wären. Ein weiterer Unterschied zu anderen Liganden der RTK Familie sind außerdem nukleäre Translokationssignale in der Aminosäuresequenz von FGF-1 und FGF-2 (Imamura *et al.*, 1990; Bugler *et al.*, 1991), die wenigstens für die mitogenen Eigenschaften von FGF-1 von essentieller Bedeutung sind (Imamura *et al.*, 1990). Weitere FGFn sind FGF-3 (INT-2), dessen Gen ursprünglich als bevorzugte Insertionsstelle für den MMTV-Virus identifiziert wurde (Goldfarb *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1986). FGF-3 scheint hauptsächlich während der Entwicklung exprimiert zu werden und konnte noch nicht in normalen adulten Gewebe nachgewiesen werden (Stamp *et al.*, 1993). FGF-4 und FGF-6 (K-FGF, HAST) wurden bei der Suche nach Genen aus Magentumoren und Karposi-Sarkomen, die NIH3T3 Zellen transformieren können, entdeckt (Taira *et al.*, 1987). Die genaue biologische Rolle ist noch unbekannt. Auch FGF-5 wurde auf der Suche nach Tumorgen gefunden, die NIH3T3 Zellen transformieren können (Zhan *et al.*, 1988), während FGF-7 (KGF) als wichtiges Mitogen für Keratinozyten identifiziert wurde (Finch *et al.*, 1989).

FGF-7 ist zusammen mit dem erst kürzlich identifiziertem FGF-19, das einzige Mitglied der FGF-Familie, das nur einen spezifischen FGF-Rezeptor aktivieren kann (Ornitz *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1999). Mitglieder der FGF-Familie spielen häufig eine herausragende Rolle bei der Tumorentwicklung, da sie sowohl als Onkogene zur Tumorentstehung beitragen, und als Angiogenese-Faktoren die weitere Versorgung des Tumors mit Nährstoffen positiv beeinflussen können. Dieses belegt auch die häufig erhöhte Expression von Genen der FGFn in verschiedenen Tumortypen, wie zum Beispiel in Nieren-, Brust- und Harnblasenkrebs.

Die Interaktionen zwischen FGF und ihren FGFRn sind ziemlich komplex. Jeder Rezeptor hat die Fähigkeit mehrere Liganden mit unterschiedlicher Affinität zu binden. (Dionne *et al.*, 1990; Keegan *et al.*, 1991; Vainikka *et al.*, 1992). Außerdem sind Heparansulfat-Proteoglykane, die sich entweder auf der Oberfläche der Zelle oder in der extrazellulären Matrix befinden, essentiell für die Bindung von FGF-1 und FGF-2 und ihre Rezeptoren (Givol und Yayon *et al.*, 1992). Freier FGF kann sich nicht an FGFR in der Plasmamembran binden. Die Bindung von FGF an Heparansulfatketten, wie sie beispielsweise in dem Zelloberflächenproteoglykan Syndecan vorkommen, bewirkt eine Konformationsänderung des Moleküls, wonach sich FGF an seine spezifischen Rezeptoren binden kann. Auch die Bindung von FGF an Heparansulfatketten, die durch Proteolyse von Proteoglykanen der Matrix freigesetzt wurden, ermöglicht die Bindung an FGFR. Die Wechselwirkung von FGF mit extrazellulären heparansulfathaltigen Proteoglykanen verhindert den Abbau des Wachstumsfaktors und stellt einen Vorrat an aktivem FGF bereit (Ruoslathi E und Yamaguchi, 1991).

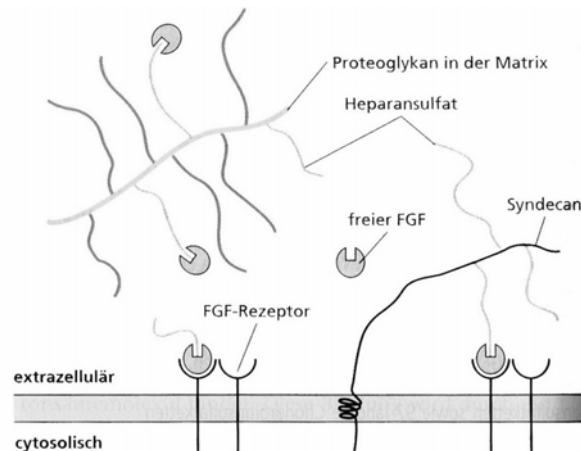


Abb. 6 Die Aktivität des FGFs wird durch heparansulfathaltige Proteoglykane beeinflusst

Nach Bindung der Liganden dimerisieren die Rezeptor-Moleküle und setzen spezifische intrazelluläre Signalübertragungsmechanismen in Gang.

Die extreme Vielseitigkeit der hervorgerufenen Antworten wird u.a. durch die Existenz von mehreren Rezeptor Isoformen des FGFR1, FGFR2, und FGFR3 möglich (Dionne *et al.*, 1990; Champion-Arnaud *et al.*, 1991; Eisenmann *et al.*, 1991; Hou *et al.*, 1991; Miki *et al.*, 1992). Diese Isoformen werden durch alternatives mRNA Splicing hervorgerufen. Auf diese Weise können durch transkriptionelle Kontrolle viele Rezeptorproteine, mit strukturellen Permutationen in der extrazellulären, der juxtamembran oder der zyttoplasmatischen Tyrosin-Kinase Domäne, erzeugt werden (Givol und Yayon, 1992). Ferner wurden für die Isoformen von FGFR1 und FGFR2 verschiedene biologische Funktionen vorgeschlagen. Beispielsweise wurden Splice-Varianten identifiziert, die verschiedene Liganden binden (Champion-Arnaud *et al.*, 1991; Miki *et al.*, 1992) oder mit einer anderen katalytischen Aktivität ausgestattet sind (Shi *et al.*, 1993). Somit können Zellen durch gewebespezifisches RNA Splicing ein einzelnes *fgf* Gen exprimieren, das unterschiedliche Isoformen generiert und so verschiedene Funktionen oder Spezifitäten für Liganden ausüben kann.

Tabl. 1 Charakteristika der Mitglieder der FGF Familie

Name	Synonym	Signalübertragung durch hochaffine Rezeptoren	Kommentar
FGF-1	aFGF	FGF-1, IIIb & IIIc; FGF-2, IIIb & IIIc; FGF-3, IIIb & IIIc; FGF-4	1 mRNA Form, keine Signalsequenz, kernlokalisiertes Motiv
FGF-2	bFGF	FGF-1, IIIb & IIIc; FGF-2, IIIc; FGF-3, IIIc; FGF-4	4 Isoformen durch versch. Startcodons, keine Signalsequenz
FGF-3	Int-2	FGF-1, IIIb; FGF-2, IIIb	Signalsequenz, kernlokalisierte Motive
FGF-4	kFGF, kaposi FGF, hst1	FGF-1, IIIc; FGF-2, IIIc; FGF-3, IIIc; FGF-4	bei Untersuchungen von Magentumoren und Karposi-Sarkomen identifiziert; Signalsequenz
FGF-5		FGF-1, IIIc; FGF-2, IIIc	Signalsequenz
FGF-6	hst-2	FGF-1, IIIc; FGF-2, IIIc; FGF-4	Signalsequenz
FGF-7	KGF	FGF-2, IIIb	Epithelzellenspezifisch; Signalsequenz
FGF-8	alGF	FGF-1; FGF-2; IIIc; FGF-3, IIIc; FGF-4	7 Isoformen, Signalsequenzen
FGF-9	GAF	FGF-2, IIIc; FGF-3, IIIb & IIIc; FGF-4	Keine Signalsequenz, keine angiogene Eigenschaften
FGF-10	KFG-2	FGF-1, IIIb; FGF-2, IIIb	Signalsequenz, ähnlich der Struktur von FGF-7
FGFn 11-14	FGFn	unbekannt	keine Signalsequenzen, alle sind kernlokalisierte Motive
FGF-15		unbekannt	Gen wird durch E2A-Pbx1 aktiviert
FGFn 16-19		FGF-17; FGF-1, IIIc; FGF-2, IIIc	Alle haben Signalsequenzen
FGF-20	XFGF-20	unbekannt	Sequenzhomologie zu FGF-9

2.1.6 Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 4

Der FGFR4 wurde vor zehn Jahren aus der cDNA der Zelllinie K562 (multiple myeloische Leukämie) kloniert (Partanen *et al.*, 1991). Seine Aminosäuresequenz ist zu 55% homolog zu den vorher bereits identifizierten FGFR1 und FGFR2 (Dionne *et al.*, 1990) und besitzt die charakteristischen strukturellen Komponenten der FGF Proteinfamilie, wie z.B. drei Immunglobulindomänen im extrazellulären Teil und eine zweigeteilte Kinasedomäne. Die Chromosomenlokalisierung für den FGFR4 ist nicht eindeutig geklärt. Armstrong und Mitarbeiter (1992) haben den FGFR4 durch *in situ* Hybridisierungen im Chromosomenabschnitt 5q33q lokalisiert, ein Bereich, der durch Chromosomen-Translokationen eine Funktion bei Lymphomen und Leukämien zu haben scheint. Andererseits wurde durch die Untersuchung von 18 Genen im Chromosomenabschnitt 5q gezeigt, dass der FGFR4 mit hoher Wahrscheinlichkeit in unmittelbarer Nachbarschaft zum Gen DRD1 angesiedelt ist (Warrington *et al.*, 1992) und sich damit im Chromosomenabschnitt 5q35q befindet.

Das Expressionmuster des FGFR4 unterscheidet sich deutlich von dem des FGFR1, FGFR2 und auch von dem des FGFR3, der ebenfalls aus der cDNA der Zelllinie K562 kloniert wurde (Keegan *et al.*, 1991). Im 17-18 Wochen alten humanen Fötus und im adulten humanen Organismus wird der FGFR4 in mittlerer Stärke in Niere, im Verdauungssystem, in der Bauchspeicheldrüse, in der Milz und in der Leber exprimiert, während er in grossen Mengen in der Lunge vorkommt (Hughes, 1997; Partanen *et al.*, 1991). Im Gefäßsystem des Blutkreislaufs wird der FGFR4 besonders häufig in der Media exprimiert (Hughes, 1996), die hauptsächlich durch die glatte Muskulatur gebildet wird. Interessanterweise konnte in Maus-Embryonen während der Entwicklung der Muskelzellen gezeigt werden, dass der FGFR4 auch hier stark exprimiert wird (Stark *et al.*, 1991).

In den letzten Jahren sind funktionelle Besonderheiten, die den FGFR4 von den anderen Mitgliedern der FGFR Proteinfamilie unterscheiden, gefunden worden. Expression von FGFR1 in FGF-negativen L6 Ratten Myoblasten induziert nach Stimulation mit FGF-1 die Tyrosinphosphorylierung von PLC γ , SHC, ERK-1, ERK-3 und FRS2, während in FGFR4 exprimierenden L6 Zellen nur sehr schwache oder gar keine Aktivierung dieser Proteine zu beobachten ist (Shaoul *et al.*, 1995; Vainikka *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994).

Auch die Fähigkeit der Rezeptoren, die Zellproliferation in BaF3 Zellen zu aktivieren, unterscheidet sich deutlich. Während die Proliferation von BaF3/FGFR1 Zellen sehr stark und von BaF3/FGFR3 Zellen etwas schwächer durch FGF1 aktiviert wird (Ornitz und Leder, 1992; Wang *et al.*, 1994), ist in BaF3/FGFR4 Zellen keine Zellproliferation gefunden worden (Wang *et al.*, 1994). Weiterhin können L6/FGFR1- und L6/FGFR2-Zellen in Weichagar eingebettet wachsen („Soft Agar Assay“; Parameter für die Zelltransformation), wogegen L6/FGFR4-Zellen keine Kolonien in Weichagar bilden (Shaoul *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite wird FGFR4 durch Heparin aktiviert und ist damit das erste Beispiel für eine RTK, die durch ein Polysaccharid stimuliert wird (Gao und Goldfarb, 1995).

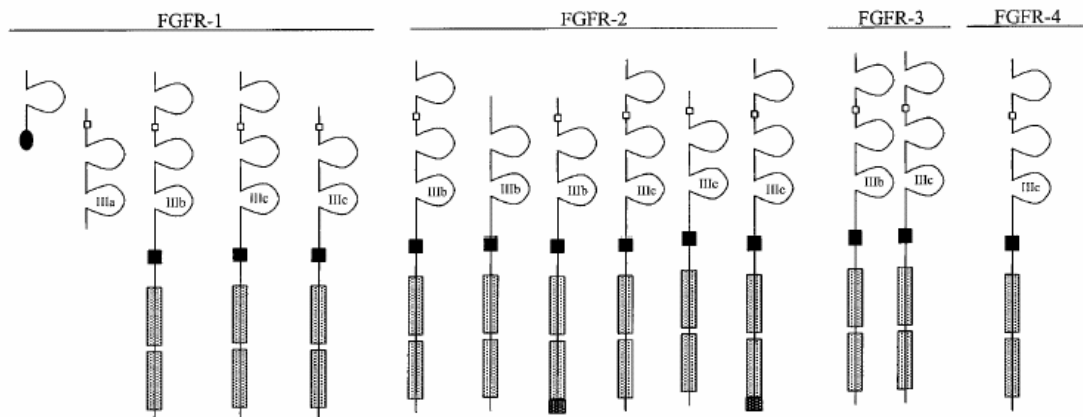


Abb 7 Mögliche Varianten von FGF Rezeptoren durch die Verwendung von Splice-Varianten (Johnson & Williams, 1993). Ovale Schleifen repräsentieren die Ig-Domänen, schwarzes Quadrat die Transmembrandomäne, längliche Rechtecke die Kinasedomäne, abschliessend die C-Termini.

Über die biologische Funktion des FGFR4 ist noch wenig bekannt. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass Umlagerungen im Actin-Zytoskelett (*membrane ruffling*), die nach Stimulation durch FGF-1 in Brustkrebs-Zellen, aber nicht in normalen Brust-Epithelzellen erfolgen, durch den FGFR4 kontrolliert werden (Johnston *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der FGFR4 eine Funktion in der Zellmigration besitzt.

Eine andere Möglichkeit die Funktion von Genen *in vivo* zu untersuchen, ist die Generierung von Mäusen, in denen das Gen ausgeschaltet wird (*Knock-Out* Mäuse). Während die Blockierung des FGFR1 letal ist (Deng *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1994) und die des FGFR3 zu verlängerten Knochen der Extremitäten in Mäusen führt, erzeugt die Inhibierung des FGFR4 Genes einen „milden“ Phänotyp, der durch einen verstärkten Cholesterinstoffwechsel charakterisiert ist (Yu *et al.*, 2000).

Eine Doppelmutante, in der das *fgfr4* und das *fgfr3* Gen ausgeschaltet ist, resultiert dagegen in einer dramatisch reduzierten Alveogenese in der Lunge (Weinstein *et al.*, 1998).

Im adulten, gesunden menschlichen Gewebe wird der FGFR1 vor allem in der Haut, Cornea, Lunge, Herz, Plazenta, Niere und dem Ureter exprimiert. Eine Expression des FGFR2 wurde besonders in der Prostata und dem Magen entdeckt. Die FGFRn 3 und 4 dagegen zeigen eingeschränktere Expressionsmuster. Der FGFR3 ist im Appendix veriformis, Plazenta und Hals vorhanden. Der FGFR4 wird überwiegend in der Leber, Niere, Ureter und der Media einiger Arteriolen und Venen exprimiert (Hughes, 1997). In menschlichen Föten wird der FGFR4 als 3 kb mRNA in Geweben der Nebenniere, der Lunge, der Niere, der Leber, des Pankreas, der gestreiften Muskeln und der Milz exprimiert (Partanen *et al.*, 1991). Die höchsten Konzentrationen wurden in der Nebenniere und der Lunge gefunden. Dieses häufige Auftreten der vier Rezeptoren weist auf eine wichtige funktionelle Rolle in der Aufrechterhaltung von normalen Geweben hin (Hughes, 1997).

Bei Plattenepithelkarzinomen aus der Kopf- und Halsregion wurde eine erhöhte Expression der Rezeptoren FGFR1 und FGFR2 festgestellt: bei Patienten im Stadium III war diese deutlich ausgeprägter als bei Patienten im Stadium IV (Dellacono *et al.*, 1997). In Brustkrebsgewebe werden diese zwei Rezeptoren ebenfalls stark exprimiert (Penault-Ilorca *et al.*, 1995). Die häufig beobachtete starke Expression von FGFR4 in Brust-, Pankreas- und Nieren-Karzinomen (Penault-Ilorca *et al.*, 1995; Jaakola *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1991) lässt auf eine wichtige Funktion des FGFR4 in der Tumorgenese schließen. Allerdings haben Experimente mit einem *in vivo* Pankreas-Karzinom Modell ergeben, dass weder die Überexpression noch die Blockierung des *fgfr4* Gens einen Einfluss auf die Entstehung von Pankreaskarzinomen hat (Olson *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der FGFR4 nicht in der Tumorentstehung, sondern in der weiteren Progression von Bedeutung ist. Interessanterweise haben Olson und Mitarbeiter gezeigt, dass in Pankreas-Karzinomen FGFR4 erst zu einem späten Tumorstadium aktiviert wird.

2.2 Fehlregulation von Signalwegen und Tumorentstehung

Zwei Charakteristika definieren die Tumorentstehung: Autonomes Zellwachstum, welches unabhängig von externen regulierenden Kontrollsignalen vonstatten geht, sowie die Fähigkeit umliegendes Gewebe zu infiltrieren und Metastasen zu bilden, die sich in den weiteren Organismus absetzen. So findet man bei Tumorzellen eine gegenüber normalen Zellen erhöhte Zellteilungsrate, den Verlust der Differenzierungsfähigkeit und der Kontaktinhibition. Tumorenstehung ist eine genetische Erkrankung, die, neben vereinzelt vererbten Mutationen, die in der Keimbahn zu finden sind und das Individuum besonders anfällig für bestimmte Krebsarten machen, in den meisten Fällen durch Mutation in somatischen Zellen stattfindet.

Allerdings ist eine einzelne Mutation für gewöhnlich nicht ausreichend, eine maligne Entartung des Gewebes herbeizuführen, sondern es bedarf in Abhängigkeit der Krebsart mindestens drei bis zwanzig Mutationen von Genen, deren Produkte normalerweise die Zellteilung steuern. Diese große Anzahl von Mutationen ist das Ergebnis eines mehrstufigen Prozesses, der durch Akkumulation von sowohl angeborenen als auch im Laufe der Zeit hinzugekommenen Gen-Defekten ausgelöst wird (Kinzler und Vogelstein, 1996), so dass die neoplastische Entwicklung von Zellen erst nach vielen Jahren erfolgen kann und Krebs somit in erster Linie zu einer Erkrankung des Alters gehört. Die Ursachen für Mutationen können sehr unterschiedlich sein. Das Spektrum reicht von intrinsischen Veränderungen, wie z.B. Fehler bei der DNA-Replikation über extern bedingte Schädigungen durch z.B. UV- oder Röntgenstrahlen und nutritive Noxen (Alkohol, Nikotin) bis hin zu Viren, die Mutationen verursachen können.

In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Gene, die in der positiven als auch negativen Regulation des Zellwachstums eine entscheidende Rolle spielen. Gen-Defekte sind Chromosomenveränderungen, z.B. durch Translokation ganzer Chromosomen-Abschnitte, Verlust von Chromosomenabschnitten, aber auch die Vervielfältigung von Genen oder die Veränderung der Nukleotidsequenz einzelner Gene durch Punktmutation, Insertionen oder Verlust von Nukleotiden. Alle diese Gen-Veränderungen verursachen Störungen in der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle, indem sie entweder die Aktivität von Proteinen der Signalketten erhöhen oder deren negative Regulatoren blockieren.

Gene, die in die Kontrolle des Zellwachstums involviert sind und von Mutationen betroffen sind, können aufgrund ihrer Funktion in zwei Kategorien eingeteilt werden, Onkogene und Tumorsuppressorgene. Der Aktivierung eines Protoonkogens zum Onkogen liegen oftmals Mutationen zugrunde, die entweder die Struktur des kodierten Proteins betreffen oder zu einer Konzentrationserhöhung des kodierten Proteins führen. Protoonkogene können in folgende Gruppen zusammengefaßt werden (nach Hunter, 1991): Wachstumsfaktoren, Rezeptortyrosinkinasen und zytoplasmatische Tyrosinkinasen, regulatorische GTPasen, zytoplasmatische S/T-Kinasen, Adapterproteine und Transkriptionsfaktoren. Wachstumsfaktoren können parakrin und/oder autokrin wirken. Mittlerweile sind auch zahlreiche Beispiele für Onkogene bekannt, die für mutierte Formen von Rezeptortyrosinkinasen kodieren und deren transformierende Eigenschaften häufig auf ihre konstitutive Aktivierung zurückzuführen sind. Mutationen können dazu beitragen, daß die Tyrosinkinase-Aktivität ständig aktiv und nicht mehr der Kontrolle der Liganden unterworfen ist.

2.2.1 Die Rolle der unkontrollierten Expression von Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden in der Tumorentwicklung

Man findet in Tumorzellen häufig sowohl eine unkontrollierte Bildung von Rezeptoren als auch eine Überexpression von Liganden. Gerade bei einer Überexpression von Tyrosinkinasen und im besonderen von RTK, kann eine Krebszelle hypersensitiv auf eine sehr geringe Menge eines bestimmten Wachstumsfaktors i. S. eines unkontrolliertem Wachstums reagieren, die normalerweise nicht ausreicht, um die Zellproliferation zu stimulieren (Alimandi *et al.*, 1997). Daneben führt die Überexpression von Tyrosinkinasen zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von Signalketten (DiFiore *et al.*, 1987). Dies ist dadurch zu erklären, dass auf der Zelloberfläche ein dynamisches Gleichgewicht zwischen inaktiven Rezeptor-Monomeren und aktiven Rezeptor-Dimeren vorliegt. Dieses Gleichgewicht wird entweder durch stabilisierende Liganden oder durch die Überproduktion von Rezeptoren zum Dimer verschoben. In klinischen Studien konnte eine Korrelation zwischen dem erhöhten Vorkommen von Rezeptoren der EGFR Familie in Brust-, Blasen- und Kopf-Hals-Karzinomen (Neal *et al.*, 1990; Nicholson *et al.*, 1991, Grandis *et al.*, 1993) und einer schlechten Überlebensprognose hergestellt werden. Das Gleiche gilt für die Gen-Amplifikation eines anderen Mitglieds der EGF Rezeptor-Familie, HER2, in Brust-Karzinomen (Slamon *et al.*, 1987).

Die Überexpression des PDGF-Rezeptors wurde in astrozytischen Hirn-Tumoren gefunden (Hermanson *et al.*, 1992) und beeinflusst hier die Neuentwicklung von Blutgefäßen (Fleming *et al.*, 1992).

Viele Tumoren bilden Wachstumsfaktoren, welche z.B. die Angiogenese stimulieren. Andere Tumoren veranlassen die umgebenden normalen Zellen zur Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren. Sowohl der basische Fibroblastenfaktor (bFGF) als auch der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF α) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) wird von vielen Tumoren sezerniert und hat angiogene Eigenschaften. Die neuen Blutgefäße ernähren den wachsenden Tumor, ermöglichen dessen Vergrößerung und erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass sich zusätzliche Mutationen ereignen. Benachbarte Blutgefäße erleichtern schließlich die Metastasierung. (Tateishi *et al.*, 1990; Rusch *et al.*, 1993; Hermanson *et al.*, 1992).

In vielen Tumorarten ist auch die unkontrollierte Bildung von FGF-Rezeptoren und ihrer Liganden beschrieben worden. Bisher konnten zwei verschiedene Quellen der FGF Sekretion identifiziert werden: zum einen die Tumorzellen selbst oder zum anderen das sie umgebende Stromagewebe. FGFs können daher sowohl parakrin als auch autokrin auf beide Zellarten einwirken. Dabei gibt es drei denkbare Mechanismen: erstens, FGFn werden von den Tumorzellen überexprimiert; zweitens, die Stromazellen werden durch den Tumor angeregt FGFn zu produzieren; drittens, die Tumorzellen werden durch das Stroma zur vermehrten FGF Expression angeregt. Ein Beispiel für eine parakrine und autokrine Wirkung von FGFn kann man in Glioblastomen finden. FGF-2 wird von 94% aller Glioblastome exprimiert. Im gesunden Gewebe dagegen wird er kaum exprimiert. FGF-2 Expression korreliert damit mit der Ausprägung der Erkrankung (Takahashi *et al.*, 1992). Da FGF Rezeptoren sowohl in Tumorzellen als auch in Stromazellen gefunden wurden (Takahashi *et al.*, 1991), ist es nicht überraschend, dass in diesem Fall FGF-2 sowohl autokrin das Tumorstadium stimulieren kann, als auch parakrin die Angiogenese durch das umgebende Gewebe beschleunigt. Daneben sind aber auch FGF-Rezeptoren in vielen Tumorsubtypen stärker exprimiert als im jeweils korrespondierenden gesunden Gewebe, wie zum Beispiel in Melanomen (Ahmed *et al.*, 1997), in Hirn- (Morrison *et al.*, 1994), in Brust- (Yoshimura *et al.*, 1998), in Prostata- (Giri *et al.*, 1999) und in Schilddrüsen-Tumoren (Shingu *et al.*, 1998). Interessanterweise können FGFR und ihre Liganden aber auch eine negative Wirkung auf die Tumorentwicklung

haben, so dass sie nicht immer eindeutig als Onkogene oder Tumorsuppressorgene bezeichnet werden können.

Zum Beispiel ist in vielen Brusttumoren ein stark erhöhtes FGF-2 Niveau gegenüber dem normalen Brustgewebe gefunden worden. Innerhalb der Gruppe der Patienten zeigte sich aber, dass erhöhte FGF-2 Spiegel mit einer guten klinischen Prognose und verlängerten Überlebenszeiten korrelieren (Colomer *et al.*, 1997; Yiangou *et al.*, 1997). In anderen Tumortypen dagegen ist eine erhöhte FGF-2 oder FGFR1 Expression mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert (Salven *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1995; Bredel *et al.*, 1997).

2.2.2 Die Rolle von Mutationen der RTK bei der Entstehung von Krankheiten

RTK spielen bei Entstehung von Krankheiten, wie z.B. Krebs, eine wichtige Rolle. So stellt z.B. die Genamplifikation von HER2 oder die Überexpression anderer RTK einen wichtigen Schritt in der Tumorentstehung dar. Zum einen hat man in den letzten Jahren Sequenzveränderungen bei somatischen Mutationen identifizieren können; so z.B. somatische Mutationen des FGFR3 bei Blasenkrebs und Multiplen Myelom (Chesi *et al.*, 1997, Capellen *et al.*, 1999) und des FGFR2 (Markovitz *et al.*, 1995). Zum anderen wurden in vielen RTK-Familien auch Keimbahnmutationen identifiziert, die zu schweren Krankheitsbildern führen können. Besonders die Familie der FGF Rezeptoren ist ein deutliches Beispiel für RTK, deren Veränderungen zu dominanten, autosomal vererbten Krankheiten führen. Bis heute sind etwa 50 Mutationen in den FGF Rezeptoren 1-3 gefunden worden, die krankhafte Veränderungen im Skelettknochen auslösen. Ein Beispiel dafür ist die Erkrankung an Achondroplasie, die zur Zwergwüchsigkeit führt. Man hat bei 90 Prozent der Erkrankten eine Punktmutation im FGFR3 Gen gefunden, die zu einem Austausch von Glycin gegen Arginin in der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne des Rezeptors führt. Man nimmt an, dass diese stark geladene Aminosäure in der sonst hydrophoben Umgebung der Zellmembran zu einer verstärkten Signalbildung durch den Rezeptor beiträgt (Webster und Donoghue, 1996). Weitere Mutationen der Rezeptoren FGFR1 und FGFR2 konnten bei klinischen Syndromen, wie Apert, Crouzon, Jackson-Weiss und Pfeiffer identifiziert werden (Webster und Donoghue, 1997). Alle diese Veränderungen in der Nukleotidsequenz der entsprechenden Gene haben eine verstärkte Signal-Kapazität durch die Rezeptoren zur Folge.

Die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN2) ist ein autosomal-dominant vererbtes neoplastisches Syndrom, welches in drei verschiedenen Subtypen auftreten kann und sich durch die Entwicklung eines medullären Schilddrüsenkarzinoms definiert. Das Gen, welches für die Entwicklung dieses Syndroms verantwortlich ist, ist als RET-RTK (Rearranged during Transformation) identifiziert worden. Das RET Protoonkogen codiert ein Protein, welches sich durch eine dem Cadherin ähnliche und Cystin-reiche Domäne im extrazellulären Bereich des Rezeptors auszeichnet (Edery *et al.*, 1997).

Interessanterweise findet man bei dem Morbus Hirschsprung, einer Krankheit, bei der es zur fehlenden Ausbildung von Ganglienzellen im Gastrointestinaltrakt kommt, Gendelektionen oder Punktmutationen, die die Rezeptoraktivität von RET blockieren oder gar einen totalen Verlust des RET Genes zeigen (Pasini *et al.*, 1996; Eng & Mulligan, 1997). In diesem Fall führt also die Aktivierung oder Inhibierung einer RTK zu zwei völlig unterschiedlichen Krankheitsbildern. Beide Krankheitsbilder sind in ihrem Vorkommen allerdings sehr selten.

Viel häufiger im Gegensatz dazu sind die *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), die sehr zahlreich in der Bevölkerung auftreten und mit einer Häufigkeit von 1/1000 zu den häufigsten genetischen Variationen zwischen Individuen gerechnet werden. Es handelt sich dabei um evolutionär alte und stabile Mutationen, die mit einer Verteilung von etwa 1 pro 500 Nukleotide für extragenetische und mit 1 pro 2000 Nukleotiden für intragenetische Regionen angegeben werden (Halushka *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die individuelle Verteilung der SNPs unter anderem für Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber Krankheiten (wie z.B. Alzheimer, Diabetes) und unterschiedliche Therapieerfolge innerhalb der Bevölkerung verantwortlich ist (Brookes *et al.*, 1999). Weiterhin ist seit langem bekannt, dass SNPs und andere DNA Variationen in Genen Medikamente-metabolisierende Enzyme (z.B. die Familie der Cytochrom P450-Proteine) Nebenwirkungen, Verträglichkeit und Effizienz von zahlreichen Medikamenten beeinflussen können (Linder *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1999). Deshalb ist die Kenntnis dieser SNPs essentiell für das Verständnis der an der Krankheitsentstehung beteiligten Gene und deren (Fehl-) Funktionen.

2.2.3 Die Relevanz von Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene für die Karzinogenese

Es zeigte sich in den letzten Jahrzehnten, dass Veränderungen der molekularen Prozesse der Tumorgenetik maßgeblich an der Karzinogenese beteiligt sind. Es sind verschiedene Gene identifiziert worden, die an der malignen Transformation einer Zelle Einfluss haben. Auf DNA-Ebene spricht man von Genamplifikation, Mutation und Genrearrangement. Die Veränderungen der Expression der Gene geschehen auf RNA- und Proteinebene. Chromosomale Deletionen und andere Veränderungen, wie z.B. in den Chromosomen 3p, 9p, 17p und 13q, sind sowohl in dysplastischen wie in malignen Zellveränderungen bei Kopf-Hals-Tumoren gefunden worden. Man fand bisher Mutationen in Tumorsuppressorgenen, wie für das Gen für p53 und p16 (Honk *et al.* 2000) und anderen Onkogenen. Bislang wurden über 60 Onkogene und etwa ein Dutzend Tumorsuppressorgene charakterisiert (Issing, 1994; 1997), von denen bereits einige in direkten Zusammenhang mit HNSCC gebracht werden konnten. So wurden bislang Überexpression von PRAD-1/bcl-1 (cyclin D1), bcl-2, vom transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β) und vom epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) beschrieben. Der EGFR und HER2 sind dabei die am besten untersuchten Proteine dieser Familie. Eine Überexpression des EGFR wurde in vielen menschlichen Tumoren wie Blasen-, Lungen- und neuroektodermalen Krebserkrankungen gefunden (Tateishi *et al.*, 1990; Gorgoulis *et al.*, 1992; Neal *et al.*, 1990 und Hiesinger *et al.*, 1993). Sie korreliert in den meisten Fällen mit einer schlechten Prognose der Patienten, d.h. einer kürzeren Überlebensrate sowie eine frühere Progression der Krankheit. Die Prognose verschlechtert sich zunehmend, wenn der EGF Rezeptor zusammen mit einem seiner Liganden exprimiert wird (Tateishi *et al.*, 1990). So wurde das Konzept des EGFR/TGF α Systems beschrieben. Es wurde nachgewiesen, dass die Tumorzellen mit einer Überexpression von EGFR bei Überschreiten einer kritischen Konzentration von TGF α durch diesen aktiviert werden und somit einen klonalen Wachstumsvorteil erhalten. Bei Vorliegen der Expression von EGFR und TGF α lässt sich eine signifikante Verschlechterung der Überlebenszeit feststellen. Dieses Phänomen wird als autokriner loop beschrieben (Issing *et al.*, 1997).

2.3 Plattenepithelkarzinome im Oropharynx

Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich stellen 5% der jährlichen Krebsneuerkrankungen dar und nehmen in der Rangliste der häufigsten Krebserkrankungen weltweit Platz 6 ein (Muir und Weiland, 1995; Bootz *et al.*, 1999). Diese Erkrankungen stellen somit ein wichtiges Gesundheitsproblem auf der ganzen Welt dar. Die Ätiologie ist risikoassoziiert; Alkohol- und Nikotinkonsum sind als wichtigste Einflussfaktoren weitgehend akzeptiert (Tuyns *et al.*, 1988). In der vorliegenden Arbeit betrachteten wir ausschließlich Plattenepithelkarzinome aus der Gruppe der oropharyngealen Tumorerkrankungen, die maligne Neoplasien der Mundhöhle, Tonsillen, Zungengrund und Rachenhinterwand der mittleren Pharynxloge umfassen. Die Inzidenz der Oropharynxkarzinome variiert in der westlichen Welt nur geringfügig. In Nordamerika stellen Kopf-Hals-Tumore etwa 9% der Malignome dar, mit einer Inzidenz von 0,2/100000 sind sie für etwa 4% aller durch Krebs verursachten Todesfälle verantwortlich (Hussey *et al.*, 1991). Die Inzidenzangaben in Europa sind mit diesen vergleichbar (Becker *et al.*, 1989; Uzcudun *et al.*, 2001). Die jährliche Inzidenz in Südostasien dagegen beträgt 20 bis 40/100000, was durch die grundlegend verschiedenen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten erklärt werden kann (Issing *et al.*, 1993). Die Inzidenzen für Karzinome des Gaumenbogens und der Tonsille sind in der Bundesrepublik Deutschland mit ca. 0,5/100000 dagegen relativ gering, die des Zungengrundes liegen bei 2,2/100000 und Jahr. Männer sind in Deutschland ca. 3 bis 4 Mal häufiger betroffen als Frauen. Zur zeitlichen Entwicklung mag überraschen, dass die altersstandardisierte Mortalität in Deutschland bei keiner anderen Krebserkrankung in den letzten 20 Jahren fast auf das 3-fache angestiegen ist, wobei der Anstieg für Frauen wesentlich deutlicher hervortritt (Uzcudun *et al.*, 2001). Der Häufigkeitssgipfel liegt im 6. und 7. Lebensjahrzehnt. Nach den Larynxtumoren sind die Oropharynx-Karzinome die zweithäufigste Gruppe innerhalb der HNO-Tumoren (Wollenberg *et al.*-Tumorzentrum München, 2003). Speziell in der Gruppe der Karzinome im Oropharynx spielen neben Alkohol- und Nikotinabusus auch Malnutrition und schlechte Mundhygiene eine bedeutende Rolle in der Pathogenese. Außerdem können vorangegangene ionisierende Bestrahlung, Immunsuppression und Vitaminmangel von Bedeutung sein. Darüber hinaus wird den humanen Papillomaviren und dem Herpes-simplex-Virus Typ I eine Rolle bei der Tumorentstehung (35-40%) zugeschrieben (Singh *et al.*, 1996).

Die Schleimhaut des kompletten Pharynx ist den Alkohol- und Tabak-relevanten Karzinogenen ausgesetzt und hat somit ein Risiko für die Entwicklung einer dysplastischen oder malignen Entartung, wie z.B. Erythroplakie oder Leukoplakie, die sich zu einem invasiven Karzinom entwickeln kann. Weiterhin können sich mehrere synchrone oder metachrone Entartungen im Sinne der „*field cancerization*“ entwickeln. Das Risiko der Entwicklung eines solchen zweiten Primärtumors wird in der Literatur mit 5-20% angegeben (Braakhuis *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004), es steigt aber eminent mit der Dauer der tumorfreien Überlebenszeit an. Daher verhält sich die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Zweitkarzinoms umgekehrt proportional zum Stadium der Tumorerkrankung und gewinnt schon nach drei Jahren Follow-up mehr Bedeutung als das lokoregionäre Rezidiv. Mohadjer ermittelte in seiner Studie eine durchschnittliche Überlebenszeit von 34 Monaten nach Diagnosestellung eines Zweitkarzinoms (Mohadjer *et al.*, 1996).

Das Risiko, an einem Plattenepithelkarzinom im Oropharynx zu erkranken, steigt proportional mit dem Konsum von Tabak und Alkohol (Grønbæck *et al.*, 1998; Issing *et al.*, 1997). So erhöht sich das Tumorerkrankungsrisiko bei einem Konsum von 60 Packyears (PY) (ein Packyear entspricht 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr) um das 23-fache, bei einem Konsum von 100g Alkohol pro Tag um das 21fache.

Die Kombination von Tabak- und Alkoholkonsum führt zu einem synergistischen Effekt, der für eine extreme Steigerung des Risikos sorgt. So erhöht sich das Erkrankungsrisiko bei 50 PY und 75g Alkohol pro Tag auf das 146fache (Maier *et al.*, 1990)! Ebenso erhöht sich durch Alkoholabusus das Risiko unabhängig vom Staging, Alter, Lokalisation, an der Erkrankung zu versterben (Deleyiannis *et al.*, 1996).

Die Mehrheit (80-90%) der Kopf-Hals-Tumore setzt sich histologisch aus Plattenepithelkarzinomen zusammen (Forastiere, 1986), gefolgt von lymphoepithelialen Tumoren und seltener auch Adenokarzinomen.

2.3.1 Histopathologie und klinische Stadieneinteilung

HNSCC können histopathologisch in gut, mäßig, gering und undifferenzierte Karzinome eingeteilt werden. Die Kategorien werden bei abnehmenden Differenzierungsgrad mit ansteigenden Zahlen beziffert (siehe Tabelle 1).

Tabl 2 Differenzierungsgrade von Tumoren

G1	hochdifferenzierter Tumor	meist geringe Malignität
G2	mitteldifferenzierter Tumor	mäßiggradige Malignität
G3	wenig differenzierter Tumor	meist hohe Malignität
G4	undifferenzierter Tumor	anaplastisch
Gx	der Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden	

Das Karzinomgewebe wird nach histologischen bzw. zytologischen Kriterien, wie zelluläre Pleomorphie, Nukleolenvergrößerung, Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses zugunsten des Zellkerns, sowie der Mitoserate beurteilt.

Mit abnehmender Differenzierung kann man diese Kriterien in steigendem Maße beobachten, da die Malignität und die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors proportional ansteigen. So liegen zum Beispiel im Falle der Kategorie G4 die Zeichen der plattenepithelialen Differenzierung nur noch spärlich vor, dafür ist die Kernpleomorphie enorm und die mitotische Aktivität mit häufigen atypischen Mitsosen sehr ausgeprägt (Pindborg *et al.*, 1997). Patienten mit einem Karzinom der gering- bzw. undifferenzierten Kategorie haben eine weitaus schlechtere Prognose, als Patienten mit gut differenzierten Tumoren.

Das Stadium einer Tumorkrankheit (stage) wird in Übereinkunft mit der „Union Internationale Contre le Cancer“ (UICC) aufgrund folgender drei Kriterien beurteilt:

- Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T),
- Tumorbefall der regionalen Lymphknoten (N) und
- Nachweis von Fernmetastasen (M)

Dadurch ist es möglich, eine vage Standardisierung der Erkrankung sowie der individuellen Prognose international zu etablieren. Die drei Kriterien werden durch Hinzufügen der Ziffern 0 bis 4 (T), bzw. 0 bis 3 (N) oder 0 bis 1 (M) gewichtet. Die postoperative histopathologische (p) Klassifikation ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabl 3 TNM Klassifikation der Oropharynx-Karzinome

T = Primärtumor	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
Tis	präinvasives Karzinom (Carcinoma in situ) Basalmembran Ø durchbrochen
T0	keine histologische Evidenz für einen Primärtumor
T1	Tumor 2cm oder weniger in grösster Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2cm, aber nicht mehr als 4cm in grösster Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4cm in grösster Ausdehnung
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie z.B. M.pterygoideus, Unterkiefer, harter Gaumen, Aussen- (Skelett-)muskel der Zunge, Larynx
N = regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2a	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten mehr als 3 cm aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6cm in größter Ausdehnung
M = Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Es gibt einige Versuche, eine alternative Stadieneinteilung in die Medizin einzuführen, die eine gegenüber dem TNM-System verbesserte prognostische Relevanz besitzen soll, so zum Beispiel von Hartl *et al.*. In diese neue Stadieneinteilung sollen weitere patientenbezogene Faktoren einfließen, die in statistischen Analysen ihre Signifikanz für die Prognose gezeigt haben. Diese neue Variante konnte sich allerdings bisher nicht durchsetzen (Ambrosch *et al.*, 1998).

Die komplette Angabe der TNM-Klassifikation des Malignoms gestattet die Einteilung in ein Tumorstadium, das einen elementaren Ausgangspunkt für die weitere Behandlungsplanung und das Follow-up darstellt. Der Einordnung des Oropharynxkarzinoms in ein Tumorstadium I-IV kommt somit eine entscheidende Bedeutung zu (siehe Tabelle 3).

Tabl 4 Stadiengruppierung von Oropharynxkarzinomen

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IV A	T4	N0, N1	M0
	jedes T	N2	M0
Stadium IV B	jedes T	N3	M0
Stadium IV C	jedes T	jedes N	M1

Viele Patienten mit einem Oropharynxkarzinom konsultieren erst in fortgeschrittenen Stadien ihrer Erkrankung eine HNO-Fachabteilung, da die Symptome bei diesen Karzinomen sehr unspezifisch und vergleichsweise mild ausgeprägt sind. Die Patienten beklagen in den Anfangsstadien oft keine oder nur geringfügige Schmerzen. Manchmal zeigt sich erst in späteren Stadien ein symptomatisches klinisches Bild mit starken Schluckbeschwerden, Fötör ex ore, blutigem Sputum und ggf. kloßiger Sprache.

Ein weiterer Parameter, der zur Prognoseverschlechterung beiträgt, ist das Vorliegen einer Tumor-Metastasierung. Immerhin weisen Oropharynxkarzinome innerhalb der Gruppe der Kopf-Hals-Karzinome die höchste Metastasierungstendenz auf (Rudert *et al.*, 1992). Das Vorliegen einer Metastase ist sogar prognostisch relevanter als die Ausdehnung und Infiltrationstiefe des Primärtumors. Bereits eine solitäre Lymphknotenmetastase vermindert die 5-Jahres-Überlebensrate um 45% (Hussey *et al.*, 1991; Mohadjer *et al.*, 1996; Uzcudun *et al.*, 2001). Ein extranodales Tumorwachstum reduziert die 5-Jahres-Überlebensrate sogar auf 11%. Allerdings ist im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen das Auftreten von Fernmetastasen beim Oropharynxkarzinom aufgrund des primär lymphogenen Metastasierungsverhaltens relativ selten (Mohadjer *et al.*, 1996). Die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten wird in der Literatur mit 30% angegeben (Hölzel *et al.*; Lang *et al.*, 2002; Kühn *et al.*, 2004).

2.4 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden Tumorgewebeprobe von 301 Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen aus dem Archiv der Pathologie des Universitätsklinikums Grosshadern der LMU München auf das Vorhandensein der in dieser Arbeitsgruppe zuvor identifizierten Mutation des Gens, welches die Transmembrandomäne für den FGFR4 kodiert, untersucht. Diese Gewebeprobe wurden ebenfalls mit Hilfe von für den Rezeptor spezifischen immunhistochemischen Färbungen bezüglich ihrer Rezeptorstärke analysiert. Die Ergebnisse wurden anhand umfassender klinischer Daten der jeweiligen Patienten auf eine mögliche Signifikanz der Rezeptormutation für die Karzinogenese respektive der Tumorprogression untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsquellennachweis

3.1.1 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p.a.- Qualität bezogen.

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose	Gibco-BRL (Eggenstein)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
BSA	Sigma (Taufkirchen)
3,3'-Diaminobenzidin	Sigma (Taufkirchen)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Biomol (Hamburg)
Hämalaun	Fluka (Schweiz)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva (Heidelberg)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel de Haen (Seelze)
Tween 20	Sigma (Taufkirchen)
Wasserstoffperoxid	Aldrich (Steinheim)

3.1.2 Enzyme

Proteinase K	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsenzym Mval (BstN1)	Biolabs (New England)

3.1.3 „Kits“ und sonstige Materialien

Deckgläser (24x60mm)	Menzel-Gläser
Filterpapier 3MM	Whatmann (USA)
Objektträger	Menzel-Gläser
Parafilm	American National Can (Chicago)
PCR Beads (Ready•To•Go)	Amersham Pharmacia Biotech (USA)
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories (USA)

3.2 Medien und Puffer

Die nachstehend aufgeführten Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Die zur Einstellung des pH-Wertes verwendete Säure bzw. Base ist in Klammern angegeben.

Acrylamidlösung	30.0% (w/v)	Acrylamid
	0.8% (w/v)	Bisacrylamid
Citratpuffer	100.0 mM	Citronensäure-Monohydrat pH 6.0 (NaOH)
DNA-Auftragspuffer (6x)	0.25%	Bromphenolblau
	0.25%	Xylencyanol
	30.0%	Glycerin
PBS	100.0 mM	EDTA pH 8.0
	13.7 mM	NaCl
	2.7 mM	KCl
	80.9 mM	Na ₂ PO ₄
TBE (10x)	1.5 mM	KH ₂ PO ₄ pH 7.4 (HCl)
	890.0 mM	Tris/HCl pH 8.0
	890.0 mM	Borsäure
	20.0 mM	EDTA pH 8.0

3.3 Antikörper

Primärantikörper	Eigenschaften	Referenz
FGFR4	Kaninchen, polyklonales IgG, gegen carboxy-terminales Peptid der humanen <i>fgfr4</i>	Santa Cruz Biotechnologie

3.4 Genotypisierung von Plattenepithelkarzinomen

3.4.1 Präparation der Gewebeschnitte

Die durch das Tumorregister der Ludwig-Maximilian-Universität ermittelten und von dem Pathologischen Institut zur Verfügung gestellten Gewebeprobe sind zur Konservierung in Paraffin eingebettet. Von diesen Gewebe-Paraffin-Blöcken wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 8 µm dicke Schnitte entnommen (siehe auch 3.5.1.), die anschließend mit einem sterilen Zahnstocher in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurden.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde nach jedem geschnittenen Block eine neue Klinge verwendet und das Mikrotom sowie der gesamte Arbeitsbereich regelmäßig sorgfältig mit Xylol gereinigt.

3.4.2 Entparaffinieren

Zur Extraktion des Paraffins der Gewebsschnitte, wurde jede Probe zwei Mal mit Xylol extrahiert. Das Xylol wurde dazu zu je 1 ml in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und anschließend bei Raumtemperatur 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Das Gewebe wurde durch Zentrifugation (8min, RT, 13000rpm) pelletiert und das Xylol abpipettiert. Daraufhin wurden die Proben in zwei Waschschritten mit 500µl 100% Ethanol invertiert, um anschließend das Lösungsmittel abpipettieren zu können. Anschließend wurden die Proben mit 20 µl Aceton versetzt und im Heizblock bei 50°C 60min getrocknet. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Pipettierschritte mit „gestopften“ Spitzen durchgeführt.

3.4.3 Verdau mit Proteinase K

Die getrockneten Proben wurden mit je 100 µl Verdauungspuffer versetzt, der 200µg/ml Proteinase K enthält und invertiert. Anschließend wurden sie 3 Stunden bei 55°C inkubiert. Darauf folgte eine 10 minütige Zentrifugation und eine 8 minütige Phase bei 95°C im Heizblock, um die Proteinase K zu inaktivieren. Der Überstand wurde abpipettiert und zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

3.4.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekulargenetische Methode, um kleinste Mengen bestimmter DNA-Abschnitte (10^{-9} bis 10^{-15} g) nach mehrmaligen Wiederholen des Ablaufs selektiv *in vitro* zu vervielfältigen (Amplifizieren). Die bestimmten DNA-Abschnitte werden dabei durch zwei synthetische Oligonukleotiden (sog. Primer) eingerahmt und mittels DNA-Polymerasen in exponentieller Weise vervielfältigt.

Es werden sog. Forward-Primer („sense“-Oligomer) in 3'-5' Richtung und Reverse-Primer („antisense“-Oligomer) in 5'-3' Richtung eingesetzt, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren und den DNA-Polymerasen die jeweilige Ansatzstelle zur Amplifikation bieten. DNA-Polymerasen sind Enzyme (Transferasen), die an einer einsträngigen DNA als Matrize aus Desoxyribonukleotiden einen komplementären zweiten DNA-Einzelstrang vom 5'- zum 3'-Ende synthetisieren.

Durch mehrmalige Wiederholung der zyklischen Abläufe (Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere (Annealing der Primer) an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Strangs durch Verlängerung der Oligomere durch die DNA-Polymerasen) wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987).

Durch den Einsatz der thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) wurde es möglich, den Reaktionszyklus oftmals zu wiederholen, ohne nach jedem Denaturierungsschritt erneut Enzym zuzugeben (Saiki, 1988).

Ein Temperaturoptimum des Hybridisierungsschrittes, die sog. Annealing Temperatur für die jeweiligen Oligomere kann ermittelt werden, indem pro A/T-Basenpaar 2°C und pro G/C-Basenpaar 4°C berechnet werden. Die Oligomere sollen eine Länge zwischen 17 und 24 Nukleotiden aufweisen, deren G/C Gehalt höchstens bei 50% liegen, da sonst die Annealing Temperatur zu hoch würde. Es sollen zudem Bereiche innerhalb der Primer vermieden werden, die zueinander komplementär sind, da es sonst zur Bildung von Primer-Dimeren kommen kann.

Aufgrund der hohen Anzahl der durchgeführten PCR-Reaktionen wurden PCR-Beads (Ready•To•Go™, Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Diese enthalten, außer Primer und DNA, alle nötigen Reagentien für eine 25µl PCR-Reaktion.

Bei einem Endvolumen von 25µl enthält jeder Reaktionsansatz:

1,5U	Taq-Polymerase
10mM	Tris-HCl pH 9,0
50mM	KCl
1,5mM	MgCl ₂
200µM	je dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)

Dazu wurden zugegeben:

1µl	DNA
1µl	„sense“ Oligomer (10 µM)
1µl	„antisense“ Oligomer (10 µM)
22µl	H ₂ O _{bidest.}

Hierzu wurden die folgenden Oligonukleotide als Primer für die PCR-Reaktion verwendet:

„sense“-Oligomer	5'-GACCGCAGCAGCGCCCGAGGCCAGGTATACG-3'
„antisense“-Oligomer	5'-AGAGGGAAGCGGGAGAGCTTCTGCACAGTGG-3'

Es wurde zusätzlich eine Reaktion mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die DNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O_{bidest.} ersetzt.

Die Synthesereaktion wurde in einem „Thermal Reactor“ der Fa. Techne (Cambridge) durchgeführt. Unter Verwendung dieses Gerätes ist die Benutzung von Mineralöl zum Schutz vor Verdampfen des Reaktionsansatzes nicht notwendig, da eine Deckelheizung integriert ist.

Für die PCR-Reaktion wurde der folgende Reaktionszyklus verwendet:

erste Denaturierung:	3min	95°C (Denaturierung)
Amplifikation 35 Zyklen	45sek	72°C (Amplifikation)
	45sek	94°C
letzte Synthese	5min	72°C (Amplifikation)

Nach Beendigung der Synthese wurde der gesamte Ansatz mit dem Restriktionsenzym BstNI und 3 µl DNA-Auftragspuffer verdaut und auf ein DNA-Polyacrylamidgel bei 260 V und einer Laufzeit von ca. 4h aufgetrennt. Anschließend wurde das DNA-Gel für 10 min mit Ethidiumbromid in einem Schüttlerbad behandelt, um durch die interkalierenden Eigenschaften des Agens die Laufweite der einzelnen DNA-Proben unter dem UV-Licht sichtbar zu machen.

3.4.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.4.5.1 Enzymatische Behandlung von DNA

Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Es wurde eine TYP II Restriktionsendonuklease zur Restriktion der DNA-Fragmente verwendet, die die meisten Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen mit palindromischer Struktur erkennen.

Diese Erkennungssequenzen bieten eine Ansatzstelle für die Enzyme, welche für den Verdau von DNA in kleinere Fragmente besonders geeignet sind, und schneiden die DNA so, dass entweder glatte (blunt ends) oder, bei versetzter Spaltung, überhängende (sticky ends) 3' bzw. 5' Enden entstehen.

Die Enzymmengen, die zur Restriktion eingesetzt wurden, sind aus der Anzahl der Schnittstellen pro DNA-Molekül, der DNA Menge, der Inkubationszeit sowie der vom Hersteller angegebenen Enzymaktivität in Units (U) berechnet. Die Reaktionen erfolgten in dem vom Hersteller empfohlenem Inkubationspuffer für einen Zeitraum von 1-12 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur.

Die Enzymmenge sollte dabei nie mehr als 10% des gesamten Reaktionsvolumens betragen, da die Enzyme, die in 50% (v/v) Glycerin bei -20°C gelagert werden, bei Bedingungen mit mehr als 5% (v/v) Glycerin die sogenannte Sternaktivität zeigen. Dies würde sich in einer geringeren Substratspezifität zeigen, indem die Enzyme die DNA auch an anderen Stellen schneiden, als an der den Erkennungssequenz entsprechenden Stelle.

3.4.5.2 Gelelektrophorese von DNA

Die doppelsträngigen DNA-Moleküle mit einer Länge bis zu 2000bp wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die negative geladene DNA wandert dabei zur Anode. DNA-Moleküle im Größenbereich von 250bp-10kb dagegen können in 0.6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt werden. Zur Auftrennung von DNA Fragmenten zwischen 20 und 100bp wurden 18% (w/v) Acrylamidgele verwendet. Das Verhältnis von Methylenbisacrylamid zu Acrylamid lag bei 1:3. Acrylamid ist ein Monomer das zu langen Ketten polymerisiert. Durch Zugabe von Methylenbisacrylamid werden die Ketten quervernetzt. Anschließend wurde die Lösung nach Zugabe von 1/250 10% APS und 1/1000 TEMED zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandshalter (Spacer) getrennt waren. Die Größe der linearisierten DNA-Fragmente wurde im Vergleich zu einem Längenstandard (1kb DNA Leiter, Gibco) ermittelt. Als Laufpuffer diente 1xTBE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen eines 6x Laufpuffers versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 190-270 Volt innerhalb von 3-4 Stunden. Nach 10 minütiger Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (etwa 12 µl/l einer Stocklösung von 10 mg/ml in dest. Wasser) konnten die DNA Banden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters photographiert (Polaroid 667) werden.

3.5 Immunhistochemie an Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen

Die Immunhistochemie stellt eine Methode zur Detektion von Proteinen in Gewebeschnitten dar. Sie ist damit eine effiziente Methode um Expressionsmuster bestimmter Proteine zu studieren.

3.5.1 Schneiden von Geweben

Für die Immunhistochemie wurden von dem in Paraffin eingebetteten Tumormaterial dünne Gewebeschnitte an Mikrotomen der Pathologie des Klinikums Großhadern angefertigt. Die zu verarbeitenden Gewebelöcke wurden so auf dem Objektkopf befestigt, dass immer eine konstante Schnittrichtung gewährleistet war. Die Dicke der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie betrug 3-4 μm , Schnitte für die Genotypisierung betrugen bis zu 8 μm (siehe 3.4.1). Die Schnitte wurden in einem etwa 40°C warmen Wasserbad geglättet und vorsichtig mit einem Pinsel auf die Objektträger gebracht. Jeder Objektträger wurde mit nur einem Schnitt versehen, da die Resektionen teilweise sehr groß waren. Die Gewebeschnitte für die Immunhistochemie wurden ü.N. bei 46°C getrocknet. Einen Teil der Gewebeschnitte führten wir der Hämatoxylin/Eosin Färbung zu und trockneten sie daher für 20 min bei 65°C. Unsere H/E Färbungen dienten v.a. zur genaueren Charakterisierung des Gewebes.

3.5.2 Färbung der Paraffinschnitte

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Gewebeschnitten von Plattenepithelkarzinomen durchgeführt, um die Expression des FGFR4 zu untersuchen. Diese Methode wurde mit Hilfe des Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, USA) durchgeführt. Die sogenannte ABC-Technik beruht auf der außerordentlich hohen Affinität des Glycoproteins Avidin zu dem Vitamin Biotin. Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin sowie für die Antikörper und Enzyme. Diese Aspekte ermöglichen makromolekulare Komplexe, die zwischen Avidin und den biotinylierten Enzymen zustande kommen können.

Diese Methode beinhaltet den ersten Antikörper, gefolgt von dem biotinylierten sekundären Antikörper und dann den vorgeformten Avidin und biotinylierten Meerrettich-Peroxidase Komplex (ABC). Zur Lokalisation der Peroxidase in den Gewebeschnitten wurde als Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma) verwendet.

Die Schnitte für die ABC-Peroxidase Methode wurden zunächst zweimal 10 min lang in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol/Xylol, 100% Ethanol, 80% Ethanol, 60% Ethanol, 40% Ethanol und destilliertes Wasser) je 2 min hydratisiert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 10 min in 1% H₂O₂ in PBS-Puffer inkubiert. Zur Denaturierung der Antigene wurden die Schnitte zweimal 6 min in Citratpuffer in einer Mikrowelle (Panasonic) bei 700 Watt gekocht. Nun wurden die Schnitte bei RT mit verdünntem Normalserum inkubiert. Nach 20 min wurde das überschüssige Normalserum mit Filterpapier abgesaugt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 Stunde. Der Anti-FGFR4-Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Um die Absorption der Antikörper an Plastik oder Glas zu verhindern, wurden sie in 1%BSA in PBS-Puffer verdünnt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper für 20-30 min bei RT. Daraufhin wurde das Vectastain Elite ABC-Reagenz auf die Schnitte gegeben und 30 min inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils ein dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer. Die Lokalisation der Peroxidase erfolgte dann mit dem Substrat 3-3'-Diaminobenzidin, das für 10 min auf die Schnitte gegeben wurde. DAB erzeugt rotbraune Präzipitate in den Gewebeschnitten. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalaun (0.4% Hämalaun, 10% Kalialaun in 2% Eisessig) für 1 min. Gespült wurde zunächst mit destilliertem Wasser, dann mit warmem Leitungswasser.

Die Schnitte wurden mit Kaiser's Glycerin Gelatine und Deckgläsern eingedeckt und konnten zur genaueren Charakterisierung unter einem Mikroskop betrachtet werden. Durch die Intensität der braunen Präzipitate konnte auf die Stärke der Expression der Proteine geschlossen werden.

3.6 Statistische Auswertung der Daten

Die erfassten Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2000 unter dem Betriebssystem Microsoft Windows XP verarbeitet. Die statistische Auswertung der Daten wurde unter Mithilfe von Herrn Dr. med. Samuel Henz (Master of Public Health - Departement Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen) mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0 vorgenommen. Die Gültigkeit der Nullhypothese zur Verteilung der Genotypen in den einzelnen Subgruppen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht. Aufgrund der kleinen Anzahl der homozygoten *fgfr4* Arg388 Träger wurden diese z.T. mit den heterozygoten *fgfr4* Arg388 (Gly/Arg) Trägern zusammengefasst. Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier aufgetragen und mittels einer Log-Rank Statistik verglichen. Zur genaueren statistischen Untersuchung der Daten, wurde das Verfahren der Multivariaten Cox-Regression verwendet. Allen Testverfahren wurde ein Signifikanz-Level von $\alpha = 0.05$ zu Grunde gelegt. Die deskriptive Statistik wurde mittels des Statistikprogramms WinSTAT V1999.3 (Zierenberg) erstellt.

4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit umfasste die Untersuchung von 301 tumorpositiven Gewebeproben von Patienten, die an einem histologisch gesicherten Primärtumor eines Plattenepithelkarzinoms aus dem Bereich des Oropharynx litten. Die Beurteilung des Differenzierungsgrades und die Überprüfung der klinischen Daten zum Staging der Tumore erfolgte durch den Facharzt für Pathologie, Priv Doz. Dr. med. Stefan Ihrler, (Pathologisches Institut der LMU München, Direktor: Prof. Dr. med. Löhrs).

Die Gewebeproben wurden mit Hilfe von RFLP-PCR und immunhistochemischen Untersuchungen auf die Stärke der Rezeptorexpression sowie auf die Punktmutation im *fgfr4* Gen im Codon 388 überprüft. Die erhaltenen Daten wurden mit klinischen Daten verglichen.

4.1 Charakterisierung der Patienten

Die vorliegenden Tumorgewebeproben entstammen dem histologischen Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München. Es handelt sich dabei ausschließlich um Primärtumore von invasiven Plattenepithelkarzinomen aus dem Bereich des Oropharynx. Die Tumorgewebeproben wurden diesen Kriterien entsprechend aus einem Datenpool des Tumorregisters München ausgewählt. Durch Zugang zu den jeweiligen Patientenakten konnten umfassende Informationen über klinische Daten der Patienten zusammengestellt werden. Die Resektionen der Tumore der Patienten wurden in den Jahren von 1981 bis 2000 im Klinikum Großhadern vorgenommen. Die Charakterisierung der Patienten ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Das histopathologische Tumorstadium wird im nachfolgenden als Stadiengruppierung (Stage Grouping) gemäß den Richtlinien der UICC (Union Internationale Contre Le Cancer) angegeben, um Tumorgöße, Lymphknotenbefall und das Vorhandensein von Fernmetastasen zusammenzufassen. Bei Fällen mit pMx Klassifikation wurde angenommen, dass Fernmetastasen nicht vorhanden sind, da sie bei Plattenepithelkarzinomen relativ selten vorkommen, und sich klinisch und pathologisch nur äußerst schwierig klassifizieren lassen. Patienten mit pMx wurden somit als pM0 eingestuft.

Tabelle 4 Charakterisierung der Patienten

	<i>n</i>	%
<i>Gesamtkollektiv</i>		
männlich	253	84.1%
weiblich	48	15.9%
<i>Alter</i>		
> 50	254	84.4%
< 50	47	15.6%
<i>Histologischer Differenzierungsgrad</i>		
G1	14	4.6%
G2	145	48.1%
G3	128	42.6%
G4	14	4.7%
<i>Tumorgröße</i>		
T ₁	34	11.3%
T ₂	92	30.6%
T ₃	70	23.3%
T ₄	82	27.2%
T _x	23	7.5%
<i>Metastasierung</i>		
M ₀	236	78.4%
M ₁	9	3.0%
M _x	36	12.0%
keine Daten	20	6.6%
<i>Lymphknotenbefall</i>		
pN ₀	84	27.9%
pN ₁	72	23.9%
pN ₂	85	28.3%
pN ₃	38	12.6%
keine Daten	22	7.3%
<i>Stadieneinteilung nach UICC</i>		
I	21	7.0
II	23	7.6
III	51	16.9
IVa	62	20.6
IVb	18	6.0
IVc	5	1.7
keine Daten	121	40.2

Die Studienkohorte hatte einen deutlichen männlichen Anteil an Patienten (84.1%) gegenüber dem weiblichen Anteil (15.9%). Das mediane Alter betrug 61.7 Jahre mit einer Variationsbreite von 37 bis 101 Jahren. Das mediane Alter bei den weiblichen Patienten lag bei 67.7 Jahren (*range* 45 bis 101 Jahren) und das mediane Alter bei den männlichen Patienten lag bei 60.6 Jahren (*range* 37 bis 100 Jahren).

Um die Studienkohorte genauer charakterisieren zu können, zeigt Tabelle 4 eine genauere Darstellung der klinisch-pathologischen Variablen und in den folgenden Abschnitten deren Zusammenhang mit der genotypischen Ausprägung des FGFR4 Rezeptors.

4.2 Genotypisierung der Plattenepithelkarzinome mittels PCR-RFLP

In dieser Arbeitsgruppe konnte eine Punktmutation in dem für den FGFR4 kodierenden Gen der Brustkrebszelllinie MDA MB 453 durch Sequenzierung der cDNA identifiziert werden. Durch diese Keimbahnmutation wird an Position 1217 ein Guanosin durch Adenosin ersetzt, was zu einem Austausch des für die hydrophobe Aminosäure Glycin stehenden Codons GGG gegen das für die stark hydrophile Aminosäure Arginin stehende Codon AGG führt. Das Arg388 Allel wurde mit einer schlechteren Prognose bei Darmkrebs in Verbindung gebracht (Bange *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen legen eine Rolle des FGFR4 bei der Progression der Krebserkrankung nahe. In dieser Dissertation wurde versucht, durch die Korrelation der o.g. Untersuchungen mit umfassenden klinischen Daten eine vorhandene Relevanz dieser Mutation aufzuklären.

4.2.1 Verteilung des FGFR4 Allels in Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Oropharynx

Das vorliegende Kollektiv an 301 Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx wurde anhand der PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) untersucht. Dazu wurden Paraffinschnitte von Gewebeblöcken erstellt und verschiedenen Aufreinigungs- und Verdau-Schritten zugeführt, um die genomische DNA zur Genotypisierung des *fgfr4* Gens isolieren zu können. (s. Kapitel 3.4.4)

Ein 168 Basenpaare (bp) langes Fragment der genomischen DNA, das die Codierung für die Transmembrandomäne einschließt, wurde mit Hilfe spezifischer Primer durch eine PCR amplifiziert. Die Punktmutation im Gen für den FGFR4 schafft durch den Guanosin / Adenosin Austausch ein zusätzliches Erkennungsmotiv für das Restriktionsenzym *Mva*I im *fgfr4* Gen. Das PCR Produkt wurde anschliessend mit dieser Restriktionsendonuklease verdaut und schliesslich über ein 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Genotypisierung konnte anhand charakteristischer Bandenmuster vorgenommen werden. So erkannte das Restriktionsenzym im Falle des Wildtyps Gly388 Allels zwei Stellen, so dass der amplifizierte Abschnitt in drei Fragmente der Länge 20, 37 und 109bp gespalten wurde. Auf dem mit Ethidiumbromid entwickelten Gel wurden somit 3 Banden sichtbar (Abb. 9 Gly/Gly). Im Gegensatz dazu besitzt das mutierte *fgfr4*-Gen Arg388 drei Schnittstellen für das Enzym. Dadurch werden nach dem Restriktionsverdau mit BstN1 Banden mit einer Fragmentlänge von 80, 37, 29 und 20bp sichtbar. Die Fragmente mit 20 und 37bp treten in beiden Genotypen auf. Folglich sind bei Heterozygoten fünf Banden sichtbar.

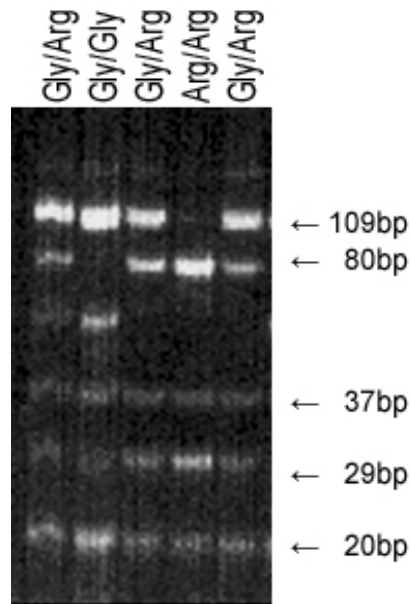


Abb. 9: Auswahl von 5 Plattenepithelkarzinomen zur Demonstration des PCR-RFLP

Zur Kontrolle wurde die PCR-RFLP Analyse zweimal durchgeführt. Von den 301 Patienten zeigen 12 die Mutation auf beiden Allelen (Arg/Arg), 91 sind heterozygot (Gly/Arg) und bei 198 Patienten tritt die Mutation in keinem der beiden Allele auf (Gly/Gly):

Tabl 5 FGFR4 Genotypverteilung in 301 Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx

<i>Genotyp</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Gly/Gly	198	65,78%
Gly/Arg	91	30,23%
Arg/Arg	12	3,99%

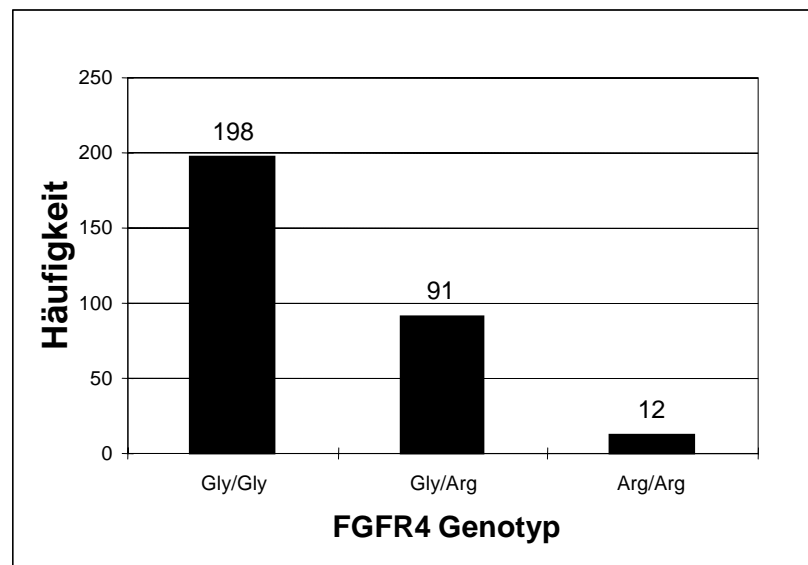


Abb 10 stellt die Verteilung der Genotypen in den analysierten Plattenepithelkarzinomen dar. Gly/Gly entspricht dem homozyoten Wildtyp, Gly/Arg der heterozygoten Mutanten und Arg/Arg der homozygoten Mutanten

Werden die heterozygoten und die homozygoten mutierten Fälle addiert, ist die Mutation insgesamt in einem Drittel (34,22%) der Patienten vertreten.

Dies entspricht einer Einzelallelfrequenz wie folgt:

Tabl. 6 Einzelallelfrequenz des FGFR4 Genotyps in 301 Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx

<i>Genotyp</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Wildtyp	487	80,9%
Mutante	115	19,1%

Weiterhin wurde zur Referenz die Allelverteilung in einer gesunden **Kontrollgruppe** untersucht:

Tabl. 7 FGFR4 Verteilung der Einzelallele beider Gruppen

<i>Genotyp</i>	<i>Kontrollgruppe</i>	<i>Studienkohorte</i>
Gly	170 (69.1%)	487 (80.9%)
Arg	76 (30.9%)	115 (19.1%)

Die Allelfrequenz bei den Patienten unserer Studie ist somit mit einem signifikanten Unterschied (p-Wert: 0.0002) eine andere als in den gesunden Kontrollen (Tabelle 7).

Allerdings folgt daraus zunächst, dass die Mutation mit einem reduzierten Risiko assoziiert ist, einen Tumor im Oropharynxbereich zu entwickeln, sofern die Patienten einem ähnlichen genetischen Hintergrund entstammen wie die Kontrollen.

Ebenso ist die Verteilung der Genotypen zwischen den Kontrollen und den Patienten signifikant anders (p-Wert: 0.0002):

Tabl. 8 FGFR4 Verteilung der Genotypen beider Gruppen

<i>Genotyp</i>	<i>Kontrollgruppe</i>	<i>Studienkohorte</i>
Gly/Gly	55 (45%)	198 (66%)
Gly/Arg	60 (49%)	91 (30%)
Arg/Arg	8 (6%)	12 (4%)

Unter der Annahme, dass jeder Patient je 2 Allele völlig zufällig aus einem Bevölkerungspool mit 30.9% mutierten Genen bzw. aus 19.1% mutierten Genen erhalten hätte, beträgt seine Wahrscheinlichkeit der Genverteilungen:

Tabl. 9 FGFR4 Genotyp: Genverteilung in beiden Gruppen

<i>Genotyp</i>	<i>Kontrollgruppe</i>	<i>Studienkohorte</i>
Gly/Gly	0.47756	0.654433
Gly/Arg	0.426995	0.309075
Arg/Arg	0.095446	0.036492

Unter diesen angenommenen Wahrscheinlichkeiten würden daraus bei 301 Patienten folgende Konstellationen resultieren:

Tabl. 10 Stochastische Betrachtung der Allelverteilung des FGFR4 Genotyps

Genotyp	vorausgesagte	vorausgesagte	
	Allelverteilung	Allelverteilung	Allelverteilung
	Allelfrequenz	Allelfrequenz	Allelfrequenz
	der Kontrollen	der Patienten	der Patienten
Gly/Gly	143	197	198
Gly/Arg	129	93	91
Arg/Arg	29	11	12

Würden wir postulieren, dass der homozygot mutierte FGFR4 Genotyp ein höheres Karzinomrisiko hätte als der heterozygot mutierte FGFR4 Genotyp, wird durch Tabelle 10 deutlich, dass dem nicht so sein kann. Folgt man den Wahrscheinlichkeiten in Tabelle 9, ist bei einem von den Patienten der Studie ausgehenden genetischen Hintergrund die Verteilung nicht signifikant von einer Zufallsverteilung zu unterscheiden. Dies spricht gegen eine Kausalität zwischen Mutation und der Entstehung eines Tumors.

4.3 Immunhistochemische Untersuchung der Tumorgewebeprobe

Die Gewebeschnitte wurden mittels Immunhistochemie spezifisch auf die Expressionstärke des FGFR4 analysiert. Dazu wurden von den Gewebestücken 6µm dicke Paraffinschnitte mit Hilfe des Mikrotoms angefertigt und auf Objektträgern plaziert. Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem *Vectastatin Elite ABC Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten basieren auf der Fähigkeit von Antikörpern an ihre Antigene im Gewebe zu binden. Grundsätzlich ist es wichtig, die Struktur des Gewebes beizubehalten, um Zelltypen und Gewebe eindeutig identifizieren zu können. Deshalb wurde ebenfalls von jeder Tumorgewebeprobe eine Hämalaun/Eosin (HE-) Färbung auf weiteren Objektträgern angefertigt, um das tumoröse Gewebe unter dem Mikroskop in seinem Gewebeverband in toto und v.a. bezüglich der Invasivität beurteilen zu können. Das Hämalaun färbt dabei die Zellkerne blau und das Eosin das Zytoplasma rosa. Die Invasivität eines Karzinoms ist histologisch definiert als Durchbruch der Basalmembran, so dass es Karzinomzellen möglich ist in die darunterliegenden Schichten einzuwandern. Dies ist abzugrenzen von einem Carcinoma in situ oder einer Dysplasie, wobei trotz positiver zytologischer Malignitätskriterien die Basalmembran erhalten bleibt.

Die Spezifität der Anti-FGFR4 Antikörper-Antigen-Wechselwirkung wurde in dieser Arbeitsgruppe bereits in früheren Untersuchungen bestätigt. (Streit, 2001). Dazu wurde zu den Antikörper-überschichteten Proben ein *blocking peptide* (Santa Cruz Biotechnologie) als Negativkontrolle gegeben, das gegen den Antikörper selbst gerichtet war. Die Aminosäuresequenz des Peptids entsprach dabei der Bindungsstelle des Antikörpers am Protein, wodurch dieser bei Spezifität und Peptidüberschuss nicht mehr an endogenem FGFR4 binden konnte, und eine Färbung des Gewebes somit unterblieb. Desweiteren wurde in einer Versuchsreihe eine geeignete Konzentration des ersten Antikörpers mit einer Verdünnung von 1:100 gefunden, um ausreichend starke Signale zu erhalten.

In den folgenden Analysen wurde die Intensität der Färbung, wie in der Literatur üblich (Hughes 1996; Janot *et al.*, 1995; Dellacono *et al.*, 1997), unterteilt in eine schwache (+), eine mittlere (++) und eine starke (+++) Expression. Schnitte ohne detektierbare Färbung wurden mit 0 bewertet, aber aufgrund der geringen Anzahl zu den schwach exprimierenden Fällen addiert. Die Einteilung der Färbungen in eine Stärke der Expression wurde durch den Vergleich der Schnitte untereinander möglich.

Die Plattenepithelkarzinome zeigten insgesamt eine starke FGFR4 Expression. Es wird insbesondere das Zytoplasma der Krebszellen gefärbt. Die Zellmembran zeigte eine schwache Färbung, die allerdings durch die zu geringe Vergrößerung nur undeutlich zu erkennen ist. Über die Hälfte der Proben (64%) wurde mittel oder stark gefärbt und somit als mittel oder stark FGFR4 exprimierend bewertet. Einige Karzinome fielen durch ein heterogenes Expressionsmuster auf, wodurch die Bewertung erschwert wurde. In diesen Fällen wurde der gewichtigere Teil ausgewertet. Die Schnitte, auf denen sowohl normales als auch Tumorgewebe vorhanden ist, zeigten häufig eine stärkere Expression in dem gesunden im Vergleich zum pathologischen Gewebe. In sämtlichen Proben zeigte die Skelett- und die glatte Muskulatur eine starke Expression.

Im Allgemeinen ergab sich folgende Verteilung der Expressionsstärke:

Tabl. 11 Verteilung der Expressionsstärke des FGFR4 in Plattenepithelkarzinomen nach IHC Analyse

	<i>Expression</i>		
	+	++	+++
Fallzahl	108 (36%)	112 (37%)	81 (27%)

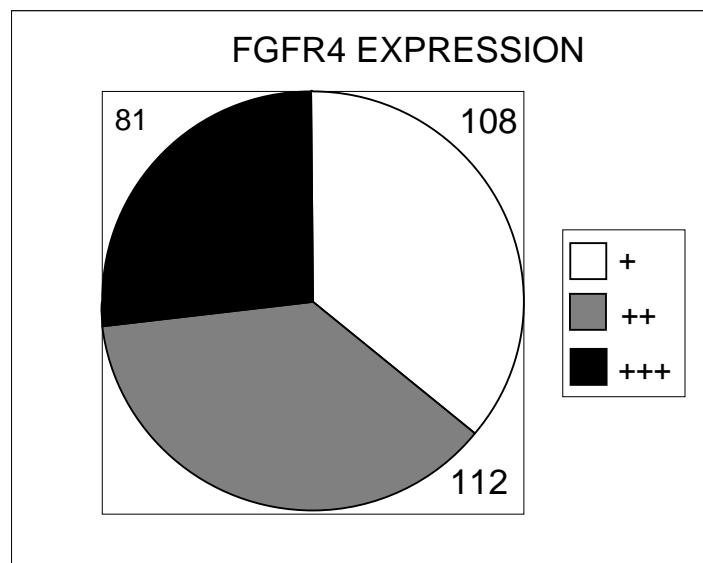


Abb. 11 Häufigkeitsverteilung der Expressionsstärke des FGFR4

Die nachfolgenden Bilder demonstrieren die Spezifität des FGFR4 (Abb.12 A und B) Antikörpers.

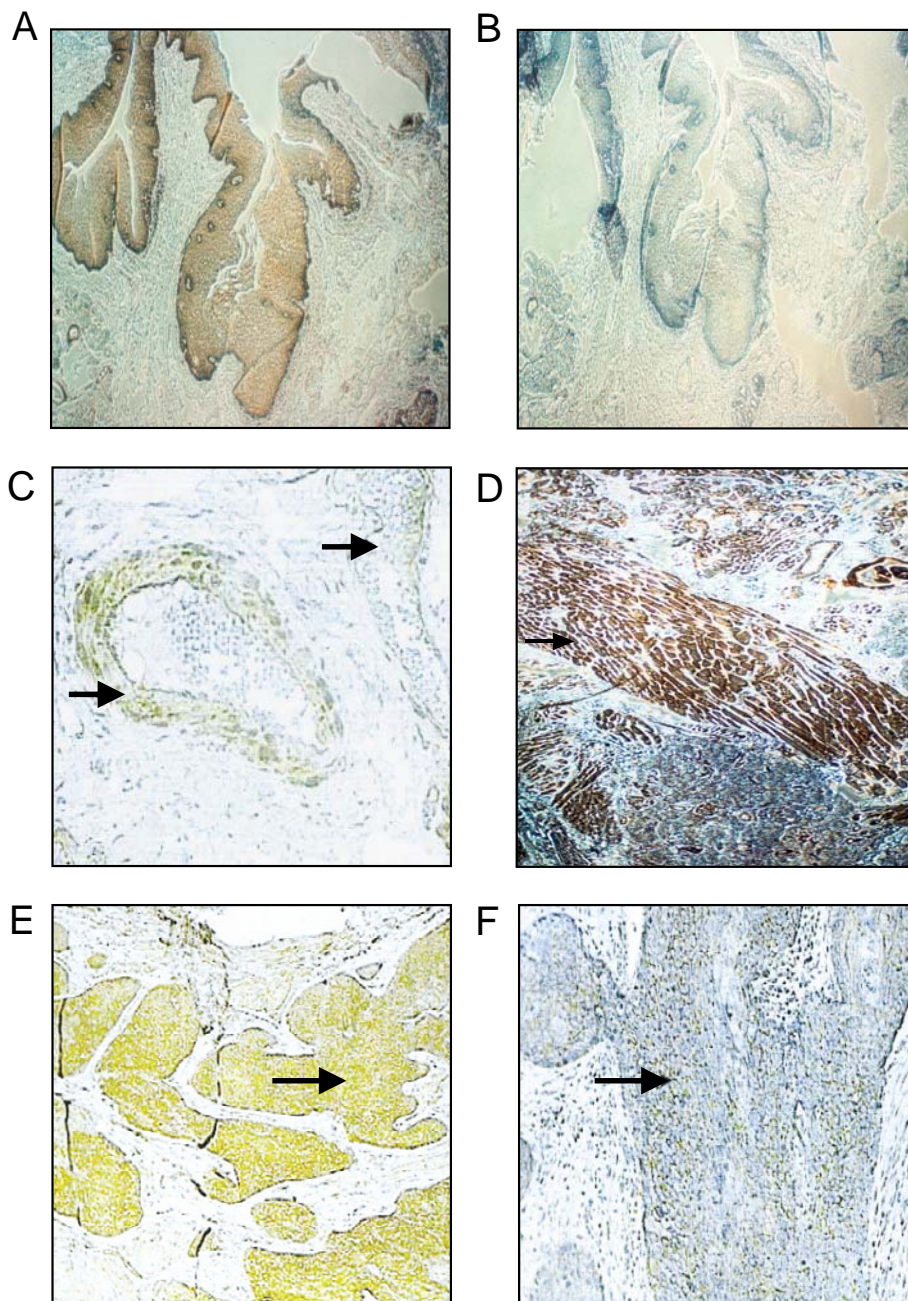


Abb. 12 Immunfärbungen mit dem FGFR4–Ab

FGFR4-Ab Spezifität

A) ausdifferenziertes Plattenepithel - ohne Blocking-Peptid

B) ausdifferenziertes Plattenepithel - in Gegenwart des Blocking-Peptids

FGFR4 Immunreaktivität

C) in Arteriolen und Venen

→ FGFR4

D) in Skelettmuskulatur

E) Plattenepithelkarzinom mit starker Expression

F) Plattenepithelkarzinom mit schwacher Expression

Die Expression verglichen mit dem Differenzierungsgrad und dem Tumorstadium ergab nachfolgende Aufstellung:

Tabl. 12 Expressionsstärke des FGFR4 in Plattenepithelkarzinomen geordnet zum Differenzierungsgrad

		<i>Expression</i>		
		+	++	+++
G1 + G2	n = 152	55 (36.2%)	53 (34.9%)	44 (28.9%)
G3 + G4	n = 149	53 (35.6%)	59 (39.6%)	37 (24.8%)
Fallzahl	n = 301	108 (35.9%)	112 (37.2%)	81 (26.9%)

Die Stärke der Expression stand in den untersuchten Proben in keiner Relation zum Differenzierungsgrad. In den hoch (G1, G2) und wenig (G3, G4) differenzierten Tumoren zeigen etwa 36% eine mittelstarke Expression (Tabelle 12). Auch die Fälle mit sehr starker bzw. geringer Expression verteilen sich ungefähr gleich häufig auf beide Gruppen. Ein anderes Ergebnis erhält man bei der Korrelation mit dem Tumorstadium (Tabelle 13): Hier zeigten alle Gruppen in 50% der Karzinome eine schwache Färbung respektive schwache Expression des FGFR4. Allerdings wurde eine Tendenz deutlich, da eine sehr stark ausgeprägte Expression überwiegend in Tumoren mit Stadium I und II zu erkennen sind.

Tabl. 13 Verteilung der Expressionsstärke des FGFR4 in Plattenepithelkarzinomen zum Tumorstadium

<i>Stadium</i>	+	++	+++	<i>n</i>
I + II	20 (45.5%)	13 (29.5%)	11 (25%)	44
III + IVA	47 (41.6%)	43 (38.0%)	23 (20.4%)	113
IVB + IVC	12 (52.2%)	5 (21.7%)	6 (23.1%)	23

Daneben sind Fälle mit deutlicher Expression mit 33% tendenziell mehr in den Proben mit grösserer Tumorausdehnung zu finden, und umgekehrt zeigte sich eine schwache Expression mit 47.1% eher in den Proben mit einer geringen Tumorausbreitung (Tabelle 14).

Tabl. 14 Verteilung der Expressionsstärke des FGFR4 in Plattenepithelkarzinomen zur Tumorgrosse

<i>T-Stadium</i>	+	++	+++	<i>n</i>
T ₁	16 (47.1%)	11 (32.3%)	7 (20.6%)	34
T ₂	35 (38.0%)	33 (35.9%)	24 (26.1%)	92
T ₃	29 (41.4%)	23 (32.9%)	18 (25.7%)	70
T ₄	24 (29.2%)	31 (37.8%)	27 (33.0%)	82
T _X	4 (17.4%)	14 (60.9%)	5 (21.7%)	23

4.4 Einfluss von *FGFR4 Gly388* und *Arg388* auf die Tumorexpression

4.4.1 Deskriptive Darstellung

Es gibt Hinweise darauf, dass die *FGFR4*-Mutation in der Tumorprogression von Brustdrüsenkarzinom eine Rolle spielt (Bange *et al.*, 2001). Aus diesem Grunde wurden die Genotypen der Oropharynxkarzinome mit dem Tumorstadium und dem Differenzierungsgrad verglichen, um die Daten auf einen Zusammenhang zwischen dem *FGFR4* Genotyp und den klinischen Daten zu untersuchen.

Tabl. 15 Zusammenfassung des *FGFR4 Genotyps*, gruppiert nach klinischen Parametern

FGFR4 <i>Allel</i>	<i>Plattenepithelkarzinom des Oropharynx</i>		
	Gly/Gly	Gly/Arg	Arg/Arg
n	198	91	12
Durchschnittsalter (Jahre)	62	61	62
durchschnittl. Überlebenszeit (Jahre)	8.57	6.54	5.42
Geschlecht			
M	161 (81%)	82 (90%)	10 (83%)
W	37 (19%)	9 (10%)	2 (17%)
Stadium			
I	10 (5.1%)	10 (11.0%)	1 (8.3%)
II	17 (8.6%)	4 (4.4%)	2 (16.7%)
III	29 (14.6%)	17 (18.7%)	5 (41.7%)
IVa	33 (16.7%)	27 (29.7%)	2 (16.7%)
IVb	12 (6.1%)	5 (5.5%)	1 (8.3%)
IVc	2 (1.0%)	3 (3.3%)	
fehlende Daten	95 (48.0%)	25 (27.5%)	1 (8.3%)
Differenzierung			
G1	10 (5%)	1 (1%)	
G2	93 (49%)	41 (47%)	7 (58%)
G3	75 (40%)	44 (50%)	5 (42%)
G4	12 (6%)	2 (2%)	

Betrachtet man die Differenzierung der Tumore, stellt sich die Verteilung in allen drei Genotyp-Gruppen ähnlich dar; G2 und G3 ist jeweils ausgewogen und vergleichbar stark repräsentiert. Der homozygote Genotyp der Mutante zeigt die Tendenz zu einer höheren Differenzierung, jedoch nicht signifikant. Dies kann aber an der geringen Fallzahl der homozygoten Mutante liegen.

Weiterhin wurde der FGFR4 Genotyp mit dem Stadium der Karzinome verglichen. Die Stadieneinteilung richtet sich nach den Festlegungen des UICC und schliesst Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Metastasierung mit ein. Patienten mit einem Stadium I oder II haben noch keinen Befall regionärer Lymphknoten, während bei den Stadien III und IVA die Lymphknoten entweder schon vom Karzinom befallen oder der Haupttumor einen Durchmesser von mindestens 4 cm hat. Bei Fällen mit einem Stadium IVB ist der Tumor in den regionären Lymphknoten bereits mindestens 6 cm groß.

Die Verteilung der Patientendaten hinsichtlich des Tumorstadiums auf die Genotypgruppen ist weitgehend gleichmässig. Die homozygote Mutante zeigt eine Tendenz zu Stadium II und III und somit zur geringeren Tumorprogression im Vergleich zu der Verteilung innerhalb beiden Gruppen mit den Gly388 Allelen. Der heterozygote Genotyp zeigt dagegen eine Tendenz zu mehr fortgeschrittenen Tumorstadium IV a.

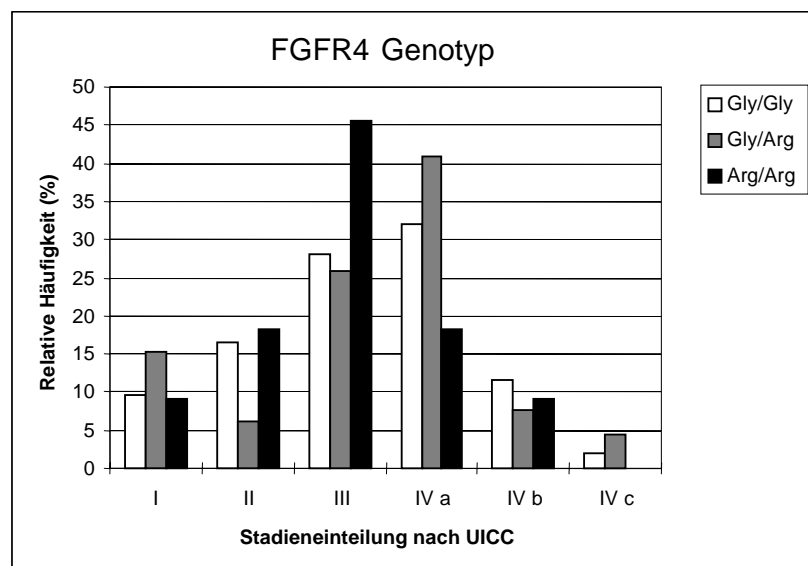


Abb. 13 Verteilung des FGFR4 Genotyps auf die Tumorstadien nach UICC

Abbildung 14 zeigt die graphische Auswertung der FGFR4 Rezeptorexpression als Funktion der Stadieneinteilung nach UICC:

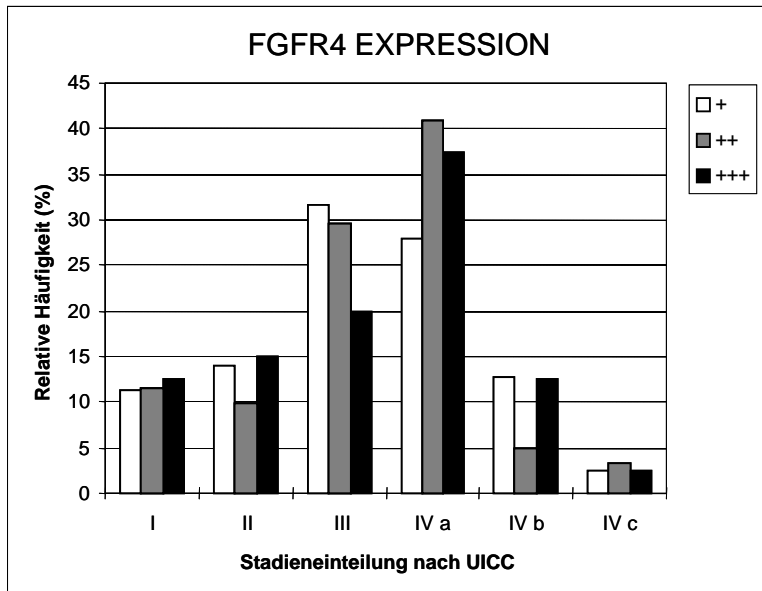


Abb. 14 Häufigkeitsverteilung der Expressionsstärke des FGFR4 gruppiert nach der Stadieneinteilung

Schwache, mittlere und starke FGFR4 Expression finden sich v.a. im Bereich der mittleren Tumorstadien III bis IV a. Eine klare Tendenz lässt sich von dieser Datenauswertung nicht ableiten.

Im Folgenden wird die graphische Auswertung der FGFR4 Expression als Funktion der T-Stadien, also der Ausdehnung des Primärtumors dargestellt.

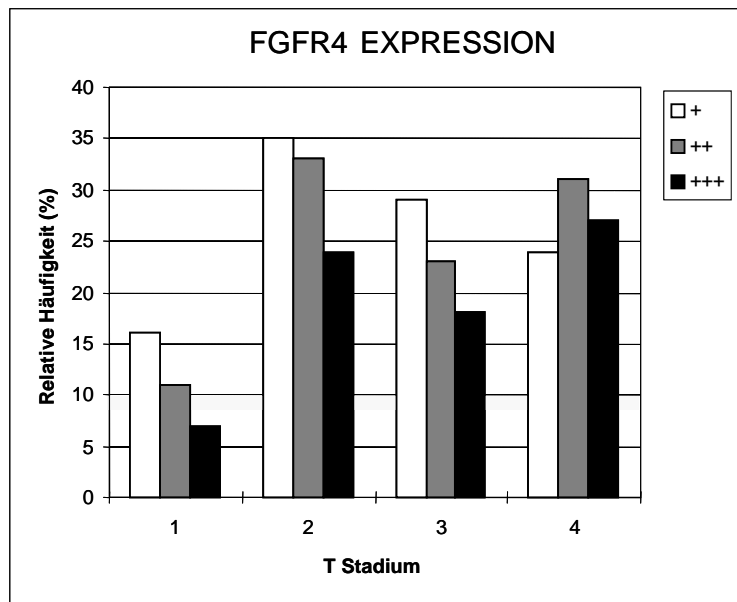


Abb. 15 Häufigkeitsverteilung der Expressionsstärke des FGFR4 gruppiert nach der Tumorgrosse

In der graphischen Auswertung in Abbildung 15 lässt sich tendenziell eine eher geringere FGFR4 Expression bei kleineren Tumoren ableiten. Dagegen zeigt sich bei größerer Tumorausdehnung eine eher stärker ausgeprägte Expression des Rezeptors. Diese Korrelationen sind statistisch jedoch nicht signifikant.

Tabelle 16 listet die Verteilung der einzelnen FGFR4 Genotypen und ihre Relation zu vorhandenen/fehlenden Lymphknotenmetastasen auf.

Tabl. 16 Verteilung des FGFR4 in der Kohorte von Patienten mit positiven/negativen Halslymphknoten

	Gly/Gly		Gly/Arg		Arg/Arg		
	n	n	%	n	%	n	%
N+	195	126	64.6	62	31.8	7	3.6
N-	84	57	67.9	23	27.4	4	4.7

Der FGFR4 Genotyp zeigt in dieser deskriptiven Auswertung keine Vorränge hinsichtlich eines bestimmten Genotypes und der Lymphknotenmetastasierung. Mehr Aufschluss mag die Überlebenszeitanalyse in Kapitel 4.4.2.2 mit den Tabellen 23 und 24 hinsichtlich dieser Kriterien erbringen.

Um eine mögliche Beteiligung der FGFR4 Arg388-Mutation an der Expressionstärke der RTK zu untersuchen, wurde auch die Expression der Rezeptoren mit dem Genotyp verglichen. Der Zusammenhang lässt sich ebenfalls der Tabelle 17 entnehmen.

Tabl. 17 FGFR4 Rezeptorexpression als Funktion des Genotyps:

	+	++	+++	Total
Gly/Gly	68	69	61	198
%	22.59	22.92	20.27	65.78
Gly/Arg	34	29	18	91
%	11.30	12.96	5.98	30.23
Arg/Arg	6	4	2	12
%	1.99	1.33	0.66	3.99
Total	108	112	81	301
%	35.88	37.21	26.91	100.00

p=0.2647 (Fisher's Exact Test)

Während bei den Gruppen mit Gly388 Allelen die Fälle mit einer mittleren Rezeptorexpression am häufigsten auftreten, ist die schwache Expression in der Gruppe der homozygoten Mutante überdurchschnittlich stark repräsentiert (siehe auch Abb. 16). Die Fälle mit sehr starker Expression bilden stets die kleinste Untergruppe. Die Expressionsmuster mittlerer Stärke von FGFR4 sind in allen Gruppen vergleichbar. Diese Zusammenhänge lassen sich bei einem p-Wert von 0.26 aber nicht statistisch signifikant ausdrücken. Die tendentiellen Übereinstimmungen zeigen sich dabei aber nicht nur in der jeweiligen Expressionsstärke, sondern in der vergleichbaren Lokalisation der Rezeptoren. Das Rezeptorprotein wird überwiegend im Zytoplasma der Zelle exprimiert und nur ein vergleichbar niedriger Anteil konnte in der Membran detektiert werden.

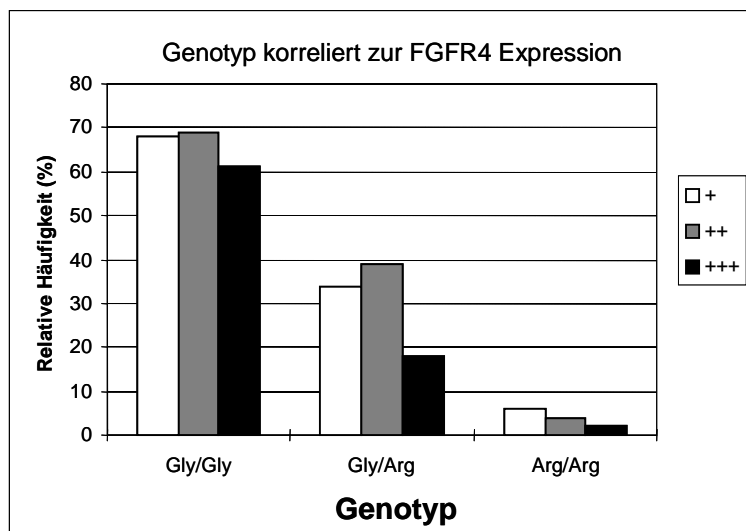


Abb. 16 Genotyp in Korrelation mit der Expression von FGFR4

4.4.2 Analyse der Überlebensdaten

Im Rahmen der Survivalanalyse bzw. Überlebenszeitanalyse wurden die Untersuchungsergebnisse aus der PCR und IHC mit verschiedenen Patientendaten korreliert, um eine Auswirkung des Expressionsmusters auf die Tumorentstehung respektive auf die Tumorprogression (Lymphknotenbefall, Metastasierung, Rezidivrate) zu eruieren. Dazu wird zuerst die Genotypisierung im Hinblick auf die Überlebenszeit und Überlebensrate sowie die Tumorprogression betrachtet. Anschliessend wird das Rezeptorexpressionsmuster in Hinblick auf o.g. Daten betrachtet. Zuletzt wurde die Genotypisierung auf Auswirkungen im Zusammenspiel mit anderen klinischen Parametern als prognostisch signifikanter Parameter ausgewertet.

4.4.2.1 Überlebenszeitanalyse als Funktion des Genotyps

Von 301 Patienten starben 152 im Laufe der Beobachtungszeit. 45 Patienten starben nachgewiesen tumorabhängig, 2 Patienten starben tumorunabhängig, bei 40 Patienten konnte die Todesursache laut Befund nicht ermittelt und bei 65 Patienten nicht beurteilt werden. 149 Patienten überlebten während der Beobachtungszeit, die durchschnittlich sieben Jahre und sieben Monate betrug. 40 Patienten entwickelten ein Lokalrezidiv, also ein Wiederauftreten der Krankheit in derselben Region.

3 Patienten entwickelten sogar zweimal ein Tumorrezidiv. Alle drei Fälle verstarben während des Beobachtungszeitraums, doch die weitere Charakterisierung dieser Einzelfälle ist nicht einheitlich. Bei einem Patient lag der FGFR4 Genotyp in homozygoter mutierter Form vor, in den beiden anderen Fällen als homozygoter Wildtyp. Alle drei Fälle wiesen unterschiedliche FGFR4 Expressionsstärken auf, und die Überlebenszeiten schwankten zwischen 2 Monaten (G3, Genotyp Gly/Gly) und 90 Monaten. (G1 und G2). Bei einem Patienten lag eine Fernmetastasierung vor, und bei zwei Patienten ein Befall der regionären Lymphknoten. Alle drei Fälle fielen durch hohen Nikotinkonsum und eine hohen Anzahl an Packyears (range: 30-90) auf.

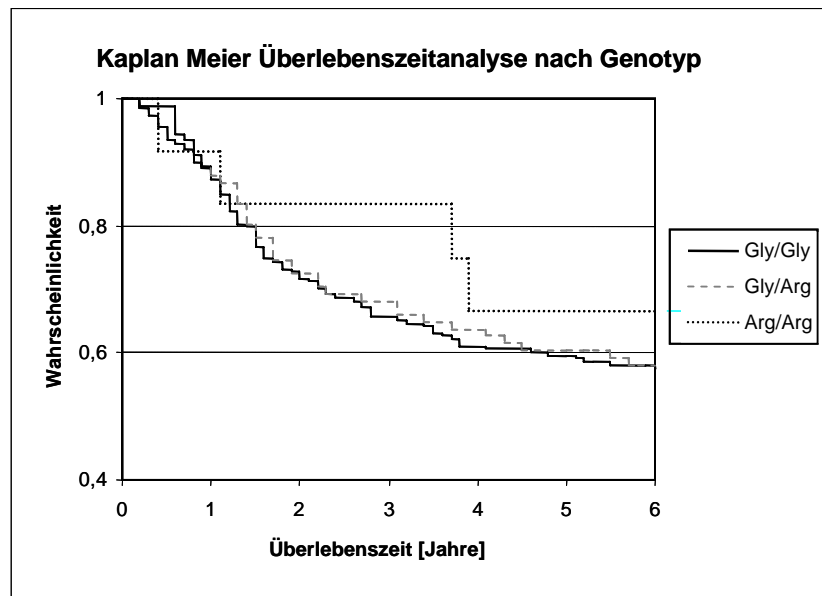


Abb. 17 Überlebenszeit nach FGFR4 Genotyp; $p=0.6499$ (Log-Rank-Test)

Die Darstellung nach Kaplan-Meier zeigt, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit im Rahmen der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung für Patienten mit einem oder beiden mutierten Allelen höher ist. Allerdings zeigt der Log-Rank-Test mit einem p-Wert von 0,64, dass es sich dabei um keinen signifikanten Zusammenhang handelt. Umgekehrt zeigen die deskriptiven Überlebenszeitdaten in unserer Kohorte (Tabelle 18), dass Patienten mit homozygotem Wildtyp des FGFR4 eine längere Überlebenszeit aufweisen als die Patienten mit einer Mutation des FGFR4. Dieser scheinbare Widerspruch wird in einer genaueren statistischen Untersuchung weiter unten aufgeklärt.

Tabl. 18 FGFR4 G388R Allel Verteilung und Überlebenszeit

	n	durchschnittliche Überlebenszeit Jahre
Gly/Gly	198	8.56
Gly/Arg	91	6.54
Arg/Arg	12	5.42

Zur statistischen Ergänzung folgt die tabellarische Auswertung der univariaten Cox – Regression der Daten:

Tabl. 19 univariate Cox Regression des FGFR4

Ch ²	Pr > Chi ²	HR	HR 95% Konfidenz	Ratio limits
0.84	0.35	0.87	0.648	1.17

Folgende Abbildung und Tabelle, die die deskriptive Auswertung des Überlebensstatus als Funktion des Genotyps darstellen, zeigen eine Tendenz für einen Überlebensvorteil für Patienten, die ein Allel oder gar zwei mutierte Allele des FGFR4 besitzen und stützen somit die Auswertung nach Kaplan-Meier. Nur in der Gruppe des homozygoten Wildtyps (Gly/Gly) überwiegt der Anteil an verstorbenen Patienten.

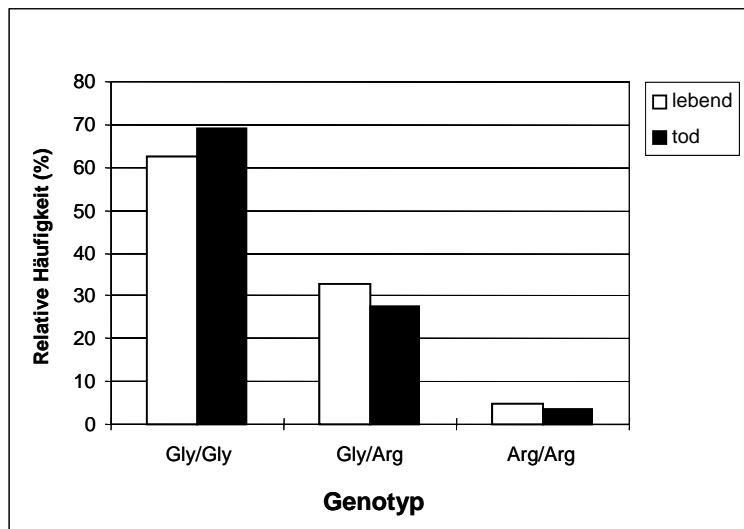


Abb. 18 Darstellung des Überlebensstatus nach FGFR4 Genotyp

Tabl. 20 FGFR4 Überlebensstatus des Genotyps in der Allel-Betrachtung:

	Häufigkeit	Prozent
<i>lebend</i>	149	49.50
Gly/Gly	93	62.42
Gly/Arg	49	32.89
Arg/Arg	7	4.70
<i>tod</i>	152	50.50
Gly/Gly	105	69.08
Gly/Arg	42	27.63
Arg/Arg	5	3.29

Zur deutlicheren Darstellung werden in Tabelle 21 der Überlebensstatus der Patienten nach *binärer Aufschlüsselung* des Genotyps aufgelistet. Es zeigt sich auch hier, dass der Anteil an lebenden Patienten in der Gruppe mit heterozygot oder homozygot mutiertem FGFR4 überwiegt.

Tabl. 21 FGFR4 Überlebensstatus des Genotyps in binärer Betrachtung:

		Häufigkeit	Prozent
<i>Wildtyp</i>		198	65.78
	lebend	93	46.97
	tod	105	53.03
<i>Mutante</i>		103	34.22
	lebend	56	54.37
	tod	47	45.63

In der folgenden Darstellung werden die mutierten Allele in ihrer homozygoten und heterozygoten Form und ihre Auswirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit gezeigt.

Tabl 22 Überlebenswahrscheinlichkeit heterozygoter und homozygoter Mutanten des FGFR4 (WT als Referenz)

FGFR4 <i>Mutante</i>	Trennung von homozygoter und heterozygoter Mutante				
	HR	P-Wert	Chi ²	95% Hazard Konfidenz	Ratio Limits
Alter	0.94	0.00	6.32	0.93	0.96
heterozygot	0.78	0.19	1.31	0.54	1.12
homozygot	0.63	0.33	0.97	0.25	1.57

Bei der heterozygoten Mutante ist das Überleben pro 1 Jahr älter um 5% besser als bei der homozygoten Mutante und um etwa 22% besser gegenüber dem Wildtyp. Bei der homozygoten Mutante ist das Überleben pro 1 Jahr älter um 37% besser gegenüber dem Wildtyp. Ältere Patienten mit einem oder beiden mutierten Allelen leben also länger nach der Diagnose als jüngere. Als offizielle Nomenklatur ist jedoch die Hazard Ratio zu betrachten. Obwohl die Hazard Ratio bei homozygoten noch tiefer ist als bei heterozygoten findet sich keine Signifikanz, möglicherweise weil die Patientenzahl mit homozygoter Mutation zu klein ist. Findet man in Tabelle 18 noch längere Überlebenszeiten für den Wildtyp des FGFR4, ergibt die das Alter der einzelnen Patienten betreffende differenziertere statistische Analyse einen Überlebensvorteil für Patienten mit einem oder beiden mutierten Allelen. Da die Korrelation der Daten nicht signifikant sind, scheint die Mutation unseren Ergebnissen nach keine prognostische Bedeutung zu haben.

4.4.2.2 Multivariate Cox-Regression des FGFR4 Genotyps

Oben genannte Daten haben gezeigt, dass die FGFR4 Mutation aufgrund mangelnder Signifikanz keine prognostische Bedeutung zu haben scheint. Aus diesem Grund haben wir die Daten mit weiteren tiefer gehenden statistischen Untersuchungen untersucht, um dieses zu bestätigen. In der *stepwise selection* bleiben nur das Alter und der Lymphknotenstatus als prognostisch signifikanter Parameter erhalten. Bei dieser Untersuchung hat sich das Geschlecht als nicht signifikant herausgestellt, obwohl das männliche Geschlecht mit einem p-Wert von 0.08 einen Trend zu besserem Überleben gezeigt hat.

Es ist üblich, für Geschlecht und Alter zu "korrigieren" ("adjusted for age"), auch wenn bei unseren Daten keine statistische Signifikanz für diese beiden Parameter vorliegt. Um die komplexen Zusammenhänge verständlich zu erfassen, entschieden wir uns für das nach diesen Gesichtspunkten korrigierte statistische Verfahren *Analysis of Maximum Likelihood Estimates* (Tabelle 23). Es schließt gemäß einer Multivarianzanalyse den Lymphknotenstatus und das Alter nach 10-Jahres-Schritten gruppiert ein und trennt die Ergebnisse in Wildtyp und Mutation binär auf.

Tabl. 23 Binäre Betrachtung des FGFR4 Genotyps hinsichtlich Überleben und LK-Status

FGFR4 Genotyp	Analyses of maximum likelihood estimates				
	Chi ²	P-Wert	Hazard Ratio	95% Hazard Konfidenz	Ratio Limits
LK binär	7.13	0.0075	1.60	1.13	2.26
Alter (10)	43.51	<0.0001	0.58	0.49	0.68
Wildtyp	2.77	0.09	0.69	0.45	1.06
Mutante	2.53	0.11	0.75	0.53	1.06

Die Mutation ist hinsichtlich eines positiven Lymphknotenstatus mit einem etwas schlechteren Überleben assoziiert (HR=0.75). Da aber das 95%-Konfidenzintervall die Zahl eins überschneidet (CI=0.53-1.07), ist der Effekt nicht signifikant (p=0.11). Dies bestätigt sich auch in der deskriptiven Darstellung der Ergebnisse in Tabelle 24. Patienten mit Mutation und positiven Lymphknoten erkranken früher (53.2 Jahre gegenüber 54.8 Jahre beim Wildtyp) und haben ein geringere Überlebenszeit (81.7 Monate gegenüber 84.2 Monate). Es gab bereits in früheren Untersuchungen (Johannes Bange, 2001; Silvia Streit, 2004; diese Arbeitsgruppe) Hinweise darauf, dass sich die Rezeptormutation Arg388 beschleunigend auf die Tumorprogression im Sinne einer Lymphknotenmetastasierung auswirkt.

Auch das Auftreten von Tumorrezidiven als weiteres Kriterium der Tumorprogression lag bei Patienten mit mutiertem FGFR4 und positiven Lymphknoten verhältnismässig gesehen höher als bei Patienten mit der Wildtypform des FGFR4.

Tabl. 24 Assoziation zwischen der FGFR4 Allelverteilung und klinischen Parametern

	N+				N-			
	Arg/Arg Gly/Arg	%	Gly/Gly	%	Arg/Arg Gly/Arg	%	Gly/Gly	%
n	69		126		27		57	
medianes Alter bei Diagnose (Jahre)	53.2		54.8		54.6		54.4	
männlich	63	91.3	102	81.0	23	85.2	45	79.0
weiblich	6	8.7	24	19.0	4	14.8	12	21.0
Follow-up, Median (Monate)	81.7		84.2		102.7		104.6	
Survivalstatus (leb)	32	46.4	58	46.0	17	63.0	24	42.1
Rezidiv	7	10.1	13	10.3	5	18.5	13	22.8

Die Daten zeigen in dieser differenzierten Form, dass beim Auftreten von Lymphknotenmetastasen die Mutation des FGFR4 die weitere Tumorentwicklung im Sinne von Rezidiven und reduzierter Überlebenszeit beeinflusst. Die Überlebenswahrscheinlichkeit ist aber in diesem Zusammenhang bei gleichem Überlebensstatus von jeweils 46% nicht betroffen. Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht signifikant und kann nicht als prädiktives Moment betrachtet werden.

4.4.3 Rezeptorexpression

Um die Auswirkung unterschiedlicher Rezeptorexpression auf das Überleben zu untersuchen, haben wir die Daten verschiedenen statistischen Berechnungen unterzogen.

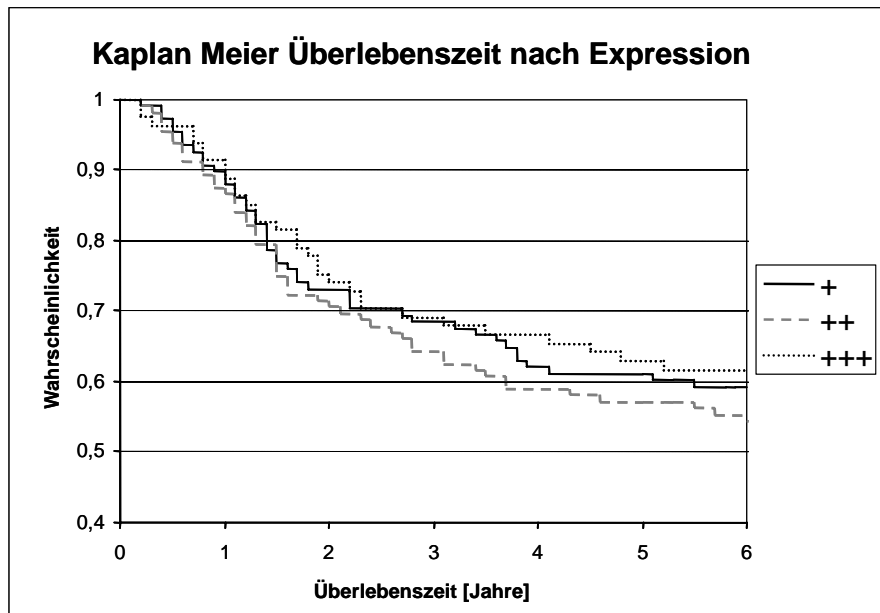


Abb. 19 Überlebenszeit nach FGFR4 Expression;

Alle statistischen Tests, sowohl bei deskriptiver (Tabelle 26) Betrachtung als auch bei univariater (Tabelle 25) und multivariater Cox-Regression (Tabelle 28) bestätigen hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit im Verhältnis zur FGFR4 Expression, dass eine stärkere Expression des FGFR4 grundsätzlich mit einer gering erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht, und stützen damit die graphische Darstellung nach Kaplan-Meier. Jedoch ist nach dem Log-Rank-Test mit einem p-Wert von 0.72 diese Aussage nicht signifikant.

Tabl. 25 univariate Cox Regression der FGFR4 Expression

Ch ²	Pr > Chi ²	HR	HR 95% Konfidenz	Ratio Limits
0.0015	0.96	0.99	0.81	0.21

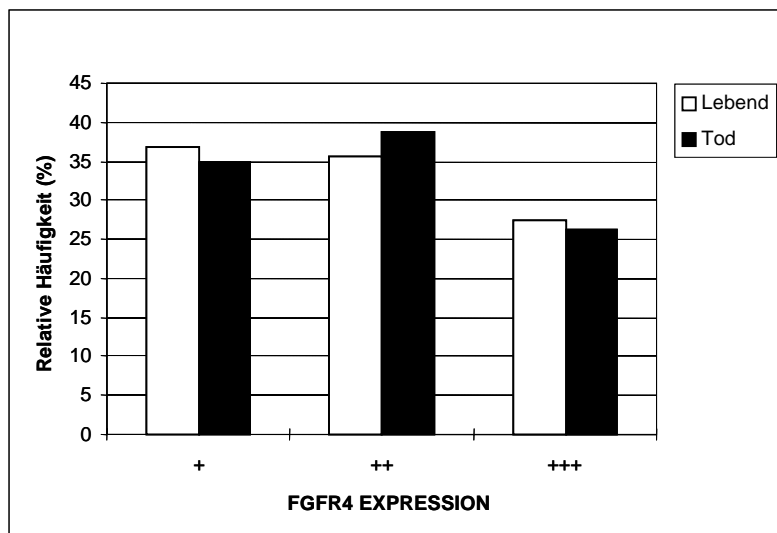
Tabl. 26 Verteilung der Überlebenszeit nach FGFR4 Expression

FGFR4 Expression	n	durchschnittliche Überlebenszeit Jahre
+	108	7.35
++	112	6.93
+++	81	9.09

Tabelle 26 zeigt, dass Patienten mit einer starken FGFR4 Expression eine deutlich längere Überlebenszeit haben, als die mit schwacher Expression. Betrachtet man die Rezeptorexpression hinsichtlich des Überlebensstatus, erkennt man aber die mangelnde statistische Signifikanz dieser Parameter. Am Ende des Beobachtungszeitraums sind nur unwesentlich weniger Patienten mit einer starken als mit einer schwachen FGFR4 Expression verstorben.

Tabl. 27 Verteilung der FGFR4 Expression in Relation zur Überlebensrate

Status	+++	++	+	N
lebend	41 (50.6%)	53 (47.3%)	55 (50.9%)	149
tod	40 (49.4%)	59 (52.7%)	53 (49.1%)	152

**Abb. 20** Verteilung der FGFR4 Expression zum Überleben

4.4.3.1 Multivariate Cox-Regression der FGFR4 Expression

Um die statistischen Untersuchungen zu erweitern, bedienen wir uns wieder der multivariaten Cox-Regression, die hierbei das Alter und den Lymphknotenstatus in die Betrachtung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei unterschiedlicher Rezeptorexpression mit einschließt.

Tabl 28 Betrachtung der FGFR4 Expression hinsichtlich Überleben und LK-Status

	Multivariate Cox-Regression				
	Chi ²	P-Wert	Hazard Ratio	95% Hazard Konfidenz	Ratio Limits
LK binär	6.77	0.009	1.58	1.12	2.24
Alter (10)	42.54	< 0.0001	0.59	0.50	0.69
Geschlecht	3.31	0.06	0.67	0.43	1.03
FGFR4 Rezeptor	0.47	0.49	1.07	0.87	1.31

Hier zeigt sich, dass stärkere Expression in Abhängigkeit von weiteren Parametern ebenfalls mit einem tendenziell besseren Überleben assoziiert ist (HR über 1). Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht signifikant. Das Überleben ist demnach nicht mit der Expression des FGFR4 assoziiert.

Betrachtet man abschliessend die Auswertung der Gegenüberstellung von FGFR4 Expression und FGFR4 Genotyp (Tabelle 29) unter Einbeziehung der Parameter, die sich bisher als signifikant herausgestellt haben, erkennt man hierbei keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern und der Überlebenswahrscheinlichkeit.

Tabl 29 Untersuchung der statistisch signifikanten Parameter hinsichtlich der Untersuchungsergebnisse

	Multivariate Cox-Regression				
	Chi ²	P -Wert	Hazard Ratio	95% Hazard Konfidenz	Ratio Limits
LK binär	7.26	0.007	1.61	1.13	2.28
Alter (10)	43.64	<0.0001	0.58	0.49	0.68
<i>Männl</i> <i>Geschlecht</i>	2.86	0.09	0.69	0.45	1.06
FGFR4 Expression	0.26	0.61	1.05	0.86	1.29
FGFR4 Genotyp	2.46	0.11	0.78	0.58	1.06

4.5 Assoziation der Mutation mit anderen klinischen Charakteristika

Abschließend wurden die Daten auf mögliche Assoziationen der Mutation mit anderen klinischen Charakteristika untersucht. Die vorliegenden Patientenakten enthielten Informationen über die genauere Tumorcharakterisierung (siehe Tabelle 4), wie Tumorstadium und Differenzierung, sowie über angewandte Therapieformen und bestehende Risikofaktoren der Patienten. In Form einer logistischen Regression, bei der die Genotypen als *binäres Outcome* in homozygote und heterozygote mutierte Genotypen als eine Gruppe und homozygote Wildtypen als zweite Gruppe eingeteilt wurden, versuchten wir mögliche Einflüsse bei Vorliegen eines oder zwei mutierter Allele in Abhängigkeit von klinischen Parametern auf das Überleben der Patienten herauszustellen.

Tabl. 30 FGFR4 Wildtyp und Zuordnung klinischer Risikofaktoren und Überleben

	Wildtyp Gly/Gly					
	Nikotin		Alkohol		Alkohol & Nikotin	
	+	-	+	-	+	-
total	129	72	99	99	98	100
tod	67 (52%)	38 (53%)	54 (54%)	51 (52%)	53 (54%)	52 (52%)
lebend	59 (48%)	34 (47%)	45 (46%)	48 (48%)	45 (46%)	48 (48%)
p-Wert	0.75		0.52		0.65	

Tabl. 31 FGFR4 Wildtyp und Zuordnung klinischer Risikofaktoren und Überleben

	Mutante Gly/Arg, Arg/Arg					
	Nikotin		Alkohol		Alkohol & Nikotin	
	+	-	+	-	+	-
total	70	33	56	47	56	47
tod	32 (45%)	15 (45%)	27 (48%)	20 (43%)	27 (48%)	20 (43%)
lebend	38 (55%)	18 (55%)	29 (52%)	27 (57%)	29 (52%)	27 (57%)
p-Wert	0.98		0.56		0.56	

Desweiteren stellt sich die Frage, wie sich Gewohnheiten wie Nikotin- und Alkoholkonsum zur Ausprägung genetischer Prädisposition des FGFR4 verhalten. Die Tabellen 30 und 31 zeigen interessanterweise, dass sich Verzicht auf Reizmittel nicht positiv auf die Inzidenz der Tumorerkrankung in allen FGFR4 Genotypen auswirkt. Viele Studien belegen bereits, dass Verzicht auf Alkohol und Nikotin einen Vorteil bei der Inzidenz von Tumorerkrankungen der Kopf-Hals-Region birgt, nur scheint eine Rezeptormutation des FGFR4 dabei keine Rolle zu spielen, wie die Signifikanzanalyse (Tabelle 31) zeigt.

Nachfolgend wurden weitere mögliche Prädiktoren auf eine Abhängigkeit vom FGFR4 Genotyp überprüft (Tabelle 32).

Tabl. 32 Statistische Signifikanzanalyse von klinischen Parametern als Funktion des FGFR4 Genotyps

		Klinische Parameter als Funktion des Genotyps						<i>P-Wert</i> <i>Fisher's Exact</i>
		Gly/Gly	%	Gly/Arg	%	Arg/Arg	%	
		n = 198		n = 91		n = 12		
Grading	G1;G2	103	52.0	42	46.1	7	58.3	0.58
	G3;G4	95	48.0	49	53.8	5	41.7	
LK Status	N0	75	37.8	28	30.8	5	41.7	0.75
	N1	45	22.7	23	25.3	4	33.3	
	N2	52	26.3	28	30.8	3	25.0	
	N3	26	13.1	12	13.2	0	0	
Geschlecht	m	161	81.3	82	90.1	10	83.3	0.13
	w	37	18.7	9	9.9	2	16.7	
Nikotin	+	126	63.6	61	67.0	9	75.0	0.69
	-	72	36.4	30	33.0	3	25.0	
Nikotin&Alk	+	91	46.0	47	51.6	7	58.3	0.50
	-	107	54.0	44	48.4	5	41.7	
Tumorrezidiv	ja	28	14.1	10	11.0	2	16.7	0.66
	nein	170	85.9	81	89.0	10	83.3	
Chemotherapie	ja	63	31.8	19	20.9	7	58.3	0.01
	nein	135	68.2	72	79.1	5	41.7	
Radiatio	ja	181	91.4	79	86.8	11	91.7	0.42
	nein	17	8.6	12	13.2	1	8.3	

Die Signifikanz der o.g. Korrelationen wurde durch den *Fisher's Exact Test* ermittelt und überprüft Abhängigkeiten bzw. Assoziationen zwischen den verschiedenen Parametern. Die angegebenen P-Werte zeigen allerdings, dass keine Zusammenhänge zwischen dem FGFR4 bzw. dessen Mutation und den gelisteten klinischen Daten bestehen. Die FGFR4 Mutation scheint weder einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Tumorerkrankung, noch auf die Therapie zu haben. Auch der Einfluss von Risikoverhalten, wie Nikotin und/oder Alkohol stellte sich als nicht signifikant auf die Progression der Tumorerkrankung hinsichtlich eines bestimmten FGFR4 Genotyps dar.

Auffällig ist nur das Ergebnis der Korrelation des FGFR4 Genotyps mit dem Parameter Chemotherapie (P-Wert=0.01). Denn in dem Patiententeilkollektiv lag bei 32% ein homozygoter Wildtyp (Gly/Gly), bei 21% die heterozygote FGFR4 Mutante (Gly/Arg) und bei 58% die homozygote FGFR4 Mutante vor. Man hätte bei bereits vorhandener Kenntnis, dass bei Vorliegen eines homozygot mutierten FGFR4 Genotyps eine Chemotherapie besonders gut ansprechen würde, wie es z.B. beim Mammakarzinom hinsichtlich der Hormontherapie bei positiven Rezeptorstatus der Fall ist, o.g. statistische Untersuchung als Bestätigung nutzen können. Hierbei geht es jedoch vielmehr um die Überprüfung bestimmter klinischer Faktoren auf ihre Prädiktivität. Insbesondere handelt es sich bei dem Kriterium *Chemotherapie* um einen sehr weichen Parameter. Die Entscheidung zur Chemotherapie hängt nicht von dem vorliegenden FGFR4 Genotyp ab, sondern folgt etablierter Therapieschemata, die sich an Kriterien, wie Tumorausbreitung, Lymphknotenbefall und Metastasierungsstatus orientieren.

Tabl. 33 Überlebenswahrscheinlichkeit bei mutiertem FGFR4 Genotyp korreliert mit dem T-Stadium

	Multivariate Cox-Regression				
	Hazard Ratio	z	P-Wert	95% Hazard Konfidenz	Ratio Limits
Gly/Arg	0.89	-0.52	0.60	0.56	1.39
Arg/Arg	0.59	-0.99	0.32	0.21	1.66
T-Stadium	1.027	0.31	0.75	0.86	1.21
Alter	0.93	-5.73	0.000	0.91	0.95
Geschlecht	1.23	0.60	0.55	0.61	2.49

Tabelle 33 gibt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei bestimmtem FGFR4 Genotypen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Tumorgrosse wieder. Der homozygote Wildtyp des FGFR4 wurde hierbei als Referenz angenommen. Deshalb sind nur die mutierten Genotypen in heterozygoter (Gly/Arg) und homozygoter (Arg/Arg) aufgeführt.

Im Falle des T-Stadiums (Tumorgrosse) lässt sich die Aussage ableiten, dass je T-Stadium die Mortalität um 2.7% steigt (HR von 1.027). Steigendes Alter verschafft laut unserer Daten einen Überlebensvorteil bei Vorliegen eines mutierten FGFR4, v.a. bei Vorliegen der homozygoten Mutante (Arg/Arg) in Abhängigkeit des T-Stadiums. Jedoch sind alle genannten Aussagen nicht signifikant, sondern weisen lediglich eine Tendenz auf.

Tabl. 34 Überlebenswahrscheinlichkeit bei mutiertem FGFR4 Genotyp korreliert mit dem Tumorstadium

	Multivariate Cox-Regression				
	Hazard Ratio	z	P-Wert	95% Hazard Konfidenz	Ratio Limits
Gly/Arg	0.91	-0.41	0.68	0.57	1.43
Arg/Arg	0.42	-1.58	0.11	0.14	1.23
<i>Tumor-Stadien</i>					
II	1.22	0.45	0.65	0.5	2.98
III	1.80	1.50	0.13	0.83	3.88
IVa	1.00	0.02	0.98	0.47	2.18
IVb	2.26	1.80	0.07	0.93	5.53
IVc	0.50	-0.64	0.52	0.06	4.00
Alter	0.93	-5.86	0.000	0.91	0.95
Geschlecht	1.39	0.91	0.36	0.68	2.82

Tabelle 34 stellt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei bestimmten FGFR4 Genotyp (auch hier wurde der Wildtyp wieder als Referenz genommen) dar, in Abhängigkeit der Tumorstadien nach UICC im Einzelnen. Auch bei diesen Daten lässt sich keine Signifikanz der Zusammenhänge darstellen.

Zusammenfassend scheint die Mutation keine Assoziation mit anderen klinischen Prädiktoren zu haben und auch keinen prognostischen Wert aufzuweisen

5 Diskussion

Das Zellwachstum wird sehr genau kontrolliert und ist den unterschiedlichen Bedürfnissen des Körpers angepasst. Die Zellen unterliegen dabei einer Vielzahl von komplexen Regelmechanismen, die es ermöglichen, dem Bedarf des Körpers und seiner Zellverbände im Rahmen seiner Anpassung an exogene und endogene Einflüsse zu entsprechen. Gelegentlich versagt allerdings das außerordentlich genau regulierende System, mit dem die Zellvermehrung gesteuert wird, sodass sich eine Zelle vergrößert und teilt, obwohl für den Körper kein Bedarf besteht. Die Entwicklung einer Zelle zu unkontrolliertem Wachstum ist ein vielstufiger und kumulativer Prozess, an dem eine Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind. Fehlerhafte Abläufe in solchen Signalwegen, die durch Überexpression oder Mutation von Signalmolekülen oder deren Rezeptoren verursacht sein können, führen zu einer Dysregulation dieser Mechanismen und somit zu einer unkontrollierten Interaktion zwischen den Zellen, die zu Erkrankungen, wie z.B. Krebs führen kann. Der mitogenen Signalübertragung kommt hierbei eine Schlüsselrolle in der Pathogenese eines neoplastischen Prozesses zu, so dass die Aufklärung über deren molekulare Mechanismen zum Verständnis von neoplastischen Entwicklungsprozessen essentiell ist.

Bange *et al.* hatten 2002 die Funktion eines Vertreters aus der Familie der FGF-Rezeptoren genauer betrachtet und bei ihren Untersuchungen eine Keimbahn-Mutation in der Transmembrandomäne der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 entdeckt. Diese Mutation führt zum Austausch von Arginin gegen Glycin an Position 388 des Proteins und somit zu einer veränderten biologischen Aktivität des Rezeptors. Diese Veränderung konnte in Zusammenhang mit der Entstehung von Kolorektalkarzinomen und Mammakarzinomen gebracht werden. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten Aufschluss über die Bedeutung der Expression der Mutation des FGFR4 in der Tumorentwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen bringen. Dazu wurden Oropharynx-Tumorproben eines Kollektivs aus 301 Patienten untersucht. Mittels der PCR-RFLP Analyse und der immunhistochemischen Färbung des FGFR4 erhielt man Angaben zum Genotyp der Proben und zu deren Expressionsstärke des Rezeptors. Über die Auswertung umfassender klinischer Patientendaten des Kollektivs konnten die Ergebnisse mit verschiedenen Parameter, wie Tumorstadium, Überlebenszeit und Risikofaktoren verglichen werden, um mögliche Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Genotypen des FGFR4 und der Tumorentwicklung zu ermitteln.

5.1 FGFR4 Rezeptorexpression

Die FGFR4 Expressionsanalyse der Gewebeproben von 301 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, ergaben in 108 Fällen (36%) eine schwache (+), in 112 Fällen (37%) eine mittlere (++) und in 81 Fällen (27%) eine starke (+++) Expressionsstärke des Rezeptors. Diese Verteilung deckt sich nicht mit vorhergehenden Untersuchungen eines 104 Patienten umfassenden Kollektivs (+: 27%, ++: 57%, +++: 16%), das nach denselben Kriterien zusammengestellt und den gleichen Untersuchungen unterzogen wurde, wie unsere Kohorte (Streit *et al.*, 2004). Sie decken sich jedoch in etwa mit den FGFR4 Expressionsanalysen einer Kohorte von Brustkrebspatienten, die in dieser Arbeitsgruppe untersucht wurde (Bange *et al.*, 2002). Auch in früheren Untersuchungen wurde eine erhöhte Expression von FGF Rezeptoren, unter anderem in Brustkrebsgewebe (McLeskey *et al.*, 1994; Jacquemier *et al.*, 1994; Adnane *et al.*, 1991), Ovarialkarzinomen (Jaakkola *et al.*, 1993) Bauchspeicheldrüsenkarzinomen (Leung *et al.*, 1994), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Berger *et al.*, 1999) und Magenkarzinomen (Shin *et al.*, 2000) gefunden. Bange, Cherburkin und Knayzew konnten weiterhin zeigen, dass der FGFR4 nur in Tumoren des Brustgewebes, aber nicht in gesunden Brustgewebe vorkommt (auch Hughes, 1997). Auch Makkola *et al.* beschrieb 1993 eine Rolle des FGFR4 in der Entwicklung von Brusttumoren. Die spezifische Inhibition der FGF Rezeptoraktivität durch dominant negative Mutanten oder *anti-sense* Technik führte zur Reduzierung des Zellwachstums von Melanomzellen *in vivo* und *in vitro* (Yayon *et al.*, 1997; Wang & Becker, 1997). Diese Untersuchungen ergaben somit Hinweise auf eine Beteiligung des FGFR4 an der Tumorgenese.

Unsere statistischen Untersuchungen zeigen hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit bei unterschiedlicher FGFR4 Expression, dass eine stärkere Expression des FGFR4 sogar mit einer gering erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht. Die Überlebenszeit von Patienten mit einer starken Rezeptorexpression beträgt in unserer Kohorte durchschnittlich 9.09 Jahre gegenüber denen mit einer schwachen Rezeptorexpression mit 7.35 Jahre. Diese Aussage ist jedoch nicht signifikant ($p=0.72$). Auch Streit *et al.* (2004) geben an, dass es in bezug auf die Überlebensrate und Tumorprogression keine auffälligen Zusammenhänge mit der FGFR4 Expression in der untersuchten Population von Plattenepithelkarzinomen gibt.

Ihre Aussage, dass eine starke FGFR4 Expression v.a. in geringem oder undifferenziertem Gewebe nachzuweisen wäre, konnten wir nicht bestätigen. Unseren Ergebnissen zufolge ist die Rezeptorexpression in etwa vergleichbar in allen Differenzierungsgraden. Alle weiteren

statistischen Untersuchungen, bei denen klinische Daten mit der Rezeptorexpression korreliert wurden, ergaben, dass das Überleben nicht mit der Expressionsstärke des FGFR4 assoziiert ist. Daneben zeigte auch die Expressionsanalyse von gesundem Gewebe, dass der FGFR4 insgesamt sehr stark exprimiert wird, in einigen Fällen sogar stärker als in malignem Gewebe. In vorhergehenden Untersuchungen wurde eine Überexpression des FGFR4 mit einer beschleunigten Tumorprogression in Zusammenhang gebracht. Unsere Analysen bezüglich der Korrelation von Expressionsstärke des FGFR4 mit Tumorstadium oder Tumorgröße, führten zu keinen signifikanten Aussagen, die die zuvor postulierten Thesen unterstützen könnten. Es lassen sich lediglich Tendenzen erkennen, dass eine starke Rezeptorexpression eher in niedrigeren Tumorstadien und schwache Rezeptorexpression eher bei mehr fortgeschrittenen Tumorstadien zu finden ist. Der alleinige Parameter der Tumorgröße scheint hingegen tendenziell eher mit einer starken Rezeptorexpression bei größeren Tumoren und mit einer schwachen Rezeptorexpression bei kleineren Tumoren in Zusammenhang zu stehen. Obwohl nicht signifikant, deckt sich diese Tatsache mit Ergebnissen früherer Veröffentlichungen (Kwabi-Addo *et al.*, 2004; Streit *et al.*, 2004)

5.2 FGFR4 und seine Bedeutung in der Pathogenese

In den vergangenen 20 Jahren konnten in mindestens 10 verschiedenen Klassen der Familie der Rezeptortyrosinkinase Rezeptormutationen als Ursache für Entwicklungsstörungen und schwere Krankheiten identifiziert werden. Keimbahnmutationen der FGF Rezeptorfamilie werden ursächlich in Zusammenhang gebracht mit autosomal-dominanten Erkrankungen, wie bei Formen des Zwergwuchs durch Punktmutationen im FGFR3, wie z.B. Achondroplasie, Hypochondroplasie, Thanatophorische Dysplasie I und II (Shiang, *et al.*, 1994; Rousseau, *et al.*, 1994; Tavormia *et al.*, 1995 und Bellus *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2001; Iwata *et al.*, 2000). Achondroplasie –die häufigste Form des Zwergwuchs– wird durch eine Glycin->Arginin Substitution in der Transmembrandomäne des FGFR3 ausgelöst, die der Glycin->Arginin Substitution in der Mutation des FGFR4 ähnlich ist.

Die Entwicklung kraniosynostotischer Syndrome wird mit Mutationen im FGFR2 in der extrazellulären Domäne, wie z.B. Crouzon (Eswarakumar *et al.*, 2004), Pfeiffer (Zhou *et al.*, 2000; Muenke *et al.*, 1994), Apert oder Jackson-Weiss (Rutland *et al.*, 1995; Reardon *et al.*, 1994; Wilkie *et al.*, 1995 und Jabs *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2003) in Verbindung gebracht. Insgesamt wurden in den letzten Jahren über 30 Punktmutationen in den menschlichen FGFR1, FGFR2 und FGFR3 Genen identifiziert, die einzelne Aminosäuren-Substitutionen

zur Folge haben. Die Substitutionen kommen in Regionen zwischen den Immunglobulindomänen IgII und IgIII, der Transmembran- oder der Tyrosinkinasedomäne vor (Neilson *et al.*, 1996). Bei einigen dieser Mutationen wurde herausgefunden, dass sie eine liganden-unabhängige Stimulation der Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors hervorrufen (Webster und Donoghue, 1996; Tarvornia *et al.*, 1999 und Naski *et al.*, 1996). Der FGFR3 scheint gegensätzliche Signale zu vermitteln. Zum einen wirkt er als negativer Regulator im Knochenwachstum und zum anderen als Onkogen in einigen Tumortypen (Bourdin *et al.*, 1999). Noch zu erwähnen sei das Kallmann Syndrom, das eine Entwicklungsstörung darstellt und mit dem Symptomenkomplex von Hörverlust, Zahnfehlentwicklung und Kieferbildungsstörungen einhergeht. Erst kürzlich wurden somatische Mutationen des FGFR1 ursächlich mit der autosomal-dominanten Form des Kallmann Syndrom (KAL2) in Verbindung gebracht (Dode *et al.*, 2003). Bis jetzt sind 15 verschiedene Mutationen des FGFR1 mit dem KAL2 Syndrom in Verbindung gebracht worden (Dode *et al.* 2004), und die Mehrheit dieser Mutationen führt zu einem Mangel an der Funktionsfähigkeit des FGFR1. Allen diesen Mutationen ist im Gegensatz zur FGFR4 Gly³⁸⁸Arg Mutation gemeinsam, dass sie mit einer Allelfrequenz von <0.1% sehr selten sind.

In jüngerer Vergangenheit wurden Mutationen in Mitgliedern der FGFR Familie in Zusammenhang mit der Pathogenese von Krebserkrankungen gebracht, wie z.B. die FGFR1 Translokation beim Myeloproliferativen Syndrom (Popovici *et al.*, 1998 u. 1999; Reiter *et al.*; 1998; Smedley *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1998; Guasch *et al.*, 2000 u. 2003, Fioretos *et al.*, 2001; Demiroglu *et al.*, 2001), die Überexpression des FGFR1 bei Brustkrebs Patientinnen (Yoshomura *et al.*, 1998), eine abnorme Expression von FGFR1 und FGFR4 im pankreatischen Adenokarzinom (Kobrin *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 2002), Isoformenwechsel von FGFR2 bei Prostatakarzinomen (Kwabi-Addo *et al.*, 2001), FGFR3 Mutationen in Blasenkarzinomgewebe (Kimura *et al.*, 2001) und bei Zervixkarzinomen (Wu *et al.*, 2000) sowie in multiplen Myelomen (Chesi *et al.*, 1997; Capellen *et al.*, 1999).

Als Novum stellte sich die hier erwähnte Rezeptormutation im FGFR4 heraus, da sich bei diesem Rezeptor bis 1998 (Gaudenz *et al.*, 1998) keine Zusammenhänge zu humaner Pathogenese hergestellt haben. Doch 2001 wies die Arbeitsgruppe um Yura den Einfluss von FGFR4 auf die Tumorprogression in der Glandula submandibularis nach. Zudem konnte eine britische Arbeitsgruppe bei der Evaluierung eines Kollektivs von Patienten mit Prostatakrebs einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer FGFR4 Überexpression und einer deutlich reduzierten Überlebenszeit feststellen (Gowardhan *et al.*, 2005).

Andere Arbeiten zeigen, dass einzelne Vertreter der FGF Rezeptoren und deren Liganden auch eine inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum haben können. So verursacht die exogene Expression von FGFR2IIIb, einer spezifischen Spleiss-Variante des FGFR2, in Prostata- oder von FGF-2 in Brustkrebszellen eine Verringerung der Tumorgenität (Korah *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1997). Dazu gegensätzliche Untersuchungen berichten von Tumorwachstum und Verlust der Kontakt-Inhibition bei Überexpression von FGFR Liganden in NIH3T3 Fibroblasten nach Injektion in immundefiziente Nacktmäuse (Li *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1996).

Cavallaro *et al.* zeigen 2001, dass der FGFR4 im Verbund mit Komplexpartner N-CAM eine regulierende Rolle bei dem Verlust der Tumorzellmatrix-Adhäsion und somit nachfolgender Metastasierung bei pankreatischen β -Zell-Tumoren einnimmt. Dazu enthält FGFR4 in seinem extrazellulären Bereich drei Immunglobulin-Domänen und weist somit Homologien zu Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin Super-Familie wie N-CAM und Ng-CAM auf (Cunningham *et al.*, 1995). N-CAM stimuliert die Zelladhäsion durch die Aktivierung des FGFR4 Signalweges. Cavallaro postuliert damit einen möglichen Mechanismus, der die Zellen vor Verteilung metastasierender Tumorzellen schützt. Desweiteren wurde eine verringerte N-CAM Expression mit einer schlechteren Prognose für einige Tumortypen in Verbindung gebracht (Fogar *et al.*, 1997). Diese Zusammenhänge geben Hinweise, dass der FGFR4 Signalweg eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zellmatrix-Adhäsion einnimmt und somit Einfluß auf das metastasierende Potential einer Tumorzelle hat.

5.3 Der FGFR4 Gly388Arg Polymorphismus und seine Bedeutung in der Tumorphathogenese

Der Polymorphismus der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 wurde durch Bange und Streit *et al.* bei Untersuchungen der Brustkrebszelllinie MDA MB 453 durch Sequenzierung der cDNA identifiziert. Durch diese Keimbahnmutation kommt es zu einem Austausch der Nukleosidbase Guanosin durch Adenosin an Position 1217. Das veränderte Codon an Position 388 codiert nun für die Aminosäure Arginin anstatt für Glycin. Diese Mutation respektive Veränderung in der Proteinstruktur zeigte sich in früheren Untersuchungen von Brustkrebspatienten deutliche überrepräsentativ und wurde im Vergleich zu Trägern des FGFR4 Gly³⁸⁸ Allels mit einer deutlich signifikant verringerten rezidivfreien Überlebenszeit in Patienten mit axilliären Lymphknotenmetastasen in Verbindung gebracht. Ebenso konnten Zusammenhänge zwischen der FGFR4 Rezeptormutation und der Tumorprogression bei Darmkrebspatienten gezeigt werden (Bange *et al.*, 2002). Jüngere Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe (Stadler *et al.*, 2005) stützen diese Ergebnisse und postulieren als Ursache für die gesteigerte Tumorprogression in Brustkrebs bei Vorliegen der FGFR4 Mutanten, den Verlust von Tumorsuppressionsaktivität und somit den Wegfall eines wichtigen Kontrollbereichs in den Signalwegen. Die Arbeitsgruppe um Wang konnte einen Zusammenhang zwischen dem FGFR4 Arg³⁸⁸ Allel und Prostatakrebs herstellen. Ihren Ergebnissen zufolge kommt es bei Vorliegen dieses Genotyps zu einer gesteigerten Inzidenz der Erkrankung, sowie zu einer veränderten Zellmotilität mit gesteigertem Invasivitäts- und Metastasierungspotential (Wang *et al.*, 2004). Diese Assoziation war ebenfalls verknüpft mit einer gesteigerten Expression des Plasminogen-Aktivator-Rezeptor vom Urokinase-Typ, dessen Auftreten zuvor in Zusammenhang mit gesteigerter Invasivität und Metastasierung gebracht wurde (Sidenius *et al.*, 2003). Wang *et al.* vermuten, dass bei Prostatakrebs ein synergistischer Effekt zwischen einer FGFR4 Überexpression, einer gesteigerten FGFR4 Liganden Expression und dem Vorliegen des FGFR4 Arg³⁸⁸ Allels zu einem hochaggressiven Verhalten des Tumors führt. Morimoto und seine Mitarbeiter wiesen einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem FGFR4 Polymorphismus und der Prognose für Patienten mit Weichteilsarkomen nach (p=0.029).

Ebenso konnten sie zeigen, dass Patienten, bei denen der Wildtyp des FGFR4 vorliegt, eine signifikant ($p=0.045$) verlängerte metastasierungsfreie Beobachtungszeit vorliegt (Morimoto *et al.*, 2003). Weiterhin publizierten Spinola *et al.* signifikante Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen eines homo- oder heterozygoten FGFR4 Arg³⁸⁸ und einer gesteigerten Tumorprogression in Adenokarzinomen der Lunge. Diese Patienten hatten ein früheres Diagnosedatum, einen höheren Anteil an fortgeschrittenen Tumoren und gesteigerter Lymphknotenmetastasierung, als Patienten mit einem FGFR4 Gly³⁸⁸. Unterschiedliche Auswirkungen bei Vorliegen eines homozygoten (Arg/Arg) oder heterozygoten (Gly/Arg) Genotyps ließen sich dabei nicht erkennen. (Spinola *et al.*, 2005)

Dieselbe Arbeitsgruppe widerlegte jüngst die Zusammenhänge zwischen der FGFR4 Rezeptormutation und gesteigerter Tumorprogression in Colonkarzinomen und Brustkrebs (Spinola *et al.*, 2005). Sie konnten bei ihren Untersuchungen von 142 Brustkrebspatientinnen und 179 Darmkrebspatienten weder einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem FGFR4 Polymorphismus und der Überlebenszeit in Brustkarzinomen, noch mit den Dukes-Stadien, der Lymphknotenmetastasierung, Fernmetastasierung oder Diagnosealter beim Kolon-Karzinom nachweisen. Ein französische Arbeitsgruppe (Jezequel *et al.*, 2004), die eine Patientenkohorte von 234 Frauen auf diese Zusammenhänge untersuchte, kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Auch die deutsche Arbeitsgruppe um Becker, die 706 Fälle von Brustkrebspatientinnen untersuchte, kam zu der Aussage, dass das FGFR4 Arg³⁸⁸ Allel nicht mit einem erhöhten Risiko einer Lymphknotenmetastasierung bei Brustkrebs assoziiert ist (Becker *et al.*, 2003).

Bezüglich der Plattenepithelkarzinome in der Kopf-Hals-Region wurde 2004 von Streit *et al.* bei einer genotypischen Analyse von 104 Fällen ein signifikanter Zusammenhang ($p=0.03$) zwischen dem Auftreten des FGFR4 Arg³⁸⁸ Allels und einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit gezeigt. Diesen Zusammenhang konnten wir durch unsere Untersuchungen nicht bestätigen. Die Patienten unseres Kollektivs, die Träger des FGFR4 Wildtyp Allels (Gly/Gly) sind, haben eine längere Überlebenszeit (8.5 Jahre) als die Träger der Rezeptormutanten (6 Jahre), weiterführende statistische Untersuchungen zeigten, dass Patienten die Träger eines oder beider mutierter Arg³⁸⁸ Allele sogar einen Überlebensvorteil gegenüber den Trägern des Rezeptors in Wildtypform haben. Der Unterschied ergibt sich in der Betrachtung des Diagnosealters der Patienten. Das Überleben der Patienten pro ein Jahr älter ist 22% (Gly/Arg) resp. 37% (Arg/Arg) besser gegenüber dem Wildtyp.

Ältere Patienten mit einem oder beiden mutierten Allelen leben also länger nach der Diagnose als jüngere. Die graphische Auswertung der Überlebenszeit nach Kaplan-Meier zeigt, dass innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit heterozygoter und homozygoter Rezeptormutante höher ist als für Patienten mit homozygotem Wildtyp des Rezeptors. Mit einem p-Wert von 0.64 nach Log-Rank ist dieser Zusammenhang allerdings nicht signifikant. Daneben ergab die statistische Auswertung der klinischen Daten in Korrelation mit den verschiedenen Genotypen des FGFR4 keine signifikanten Zusammenhänge hinsichtlich der Tumorstadien und des Status der Lymphknotenmetastasierung und somit keine Präferenz bezüglich eines bestimmten Genotyps. In der multivariaten Cox-Regression wurden Tendenzen für schlechteres Überleben und verringerter Überlebenszeit für Patienten mit vorliegender FGFR4 Rezeptormutation und positivem Status der Lymphknotenmetastasierung deutlich. Weiterhin war das Auftreten von Tumorrezidiven als ein Kriterium der Tumorprogression bei diesen Patienten mit Lymphknotenmetastasierung vermehrt und würde in dieser Konstellation die Untersuchungsergebnisse von Bange *et al.* und Streit *et al.* unterstützen. Da diese Assoziationen nicht signifikant sind, können wir sie nicht als prädiktives Moment werten.

Der FGFR4 Arg³⁸⁸ Polymorphismus ist eine häufige Sequenzvariante, die in heterozygoter und homozygoter Form bei ca. 50% der Bevölkerung auftritt (Bange *et al.*, 2002). In unserer Studienkohorte lag dieses Allel in rund 35% der Fälle (103 von 301) vor. Betrachtet man die Allelfrequenz des FGFR4 Arg³⁸⁸, liegt sie in unserer Gruppe bei 0.2. In der gesunden Kontrollgruppe haben die Träger des FGFR4 Arg³⁸⁸ in homozygoter und heterozygoter Form einen Anteil von 55%. Man kann daher von einem sogenannten *susceptibility polymorphism* bzw. Prädispositions-Polymorphismus sprechen. Spinola *et al.* wies 2005 in seinen Untersuchungsgruppen eine Allelfrequenz für das Arg³⁸⁸ von 0.33 bei Brustkrebspatienten, 0.28 bei Patienten mit Kolonkarzinom und 0.3 der gesunden Kontrollgruppe nach. Becker *et al.* wiesen in ihrer Studienkohorte eine Allelfrequenz für das Arg³⁸⁸ von 0.33 nach (Becker *et al.*, 2003). Die Studienkohorte der Arbeitsgruppe um Morimoto wies eine Allelfrequenz von 0.37 für die Patientengruppe mit Weichteilsarkomen und 0.37 für die gesunde Kontrollgruppe auf (Morimoto *et al.*, 2003). Wang teilte seine Studienkohorte in zwei Gruppen: eine Gruppe mit Patienten und Kontrollen der weißen Rasse und eine Gruppe mit Patienten und Kontrollen von Afro-Amerikanern.

Die Gruppe von Prostatakarzinom-Patienten der weißen Rasse wies eine Allelfrequenz von 0.35 und die Kontrollgruppe einer Population der weißen Rasse wies 0.24 auf. Interessanterweise wies die Patientengruppe der Afro-Amerikaner eine Allelfrequenz von 0.11 und die Kontrolle derselben Gruppe eine Frequenz von 0.095 auf (Wang *et al.*, 2004). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Lungenadenokarzinom-Patienten von Spinola zeigten eine Arg³⁸⁸ Allelfrequenz von 0.27 in der Patientengruppe und 0.31 in der gesunden Kontrollgruppe. Auch die stochastische Betrachtung der Allelverteilung des FGFR4 Genotyps in unserer Kohorte deckt auf, dass sich die Allelhäufigkeit zwischen gesunder Kontrollgruppe und der Patientengruppe nicht signifikant unterscheidet. Eine Homozygotie der FGFR4 Mutanten hat man nicht häufiger gefunden, als man aufgrund der Allelfrequenz im Patientenkollektiv annehmen würde, was deutlich gegen eine Kausalität zwischen Mutation und Tumor spricht. Daher lässt sich auch besser nachvollziehen, weshalb kein Zusammenhang zwischen Mutation oder Rezeptorexpression und Überleben ersichtlich ist. Molekularbiologische Untersuchungen von RTK und insbesondere des FGFR4 zeigten, dass die durch die Arg³⁸⁸ Mutation veränderte Polarisierung des Rezeptors durch den Einbau einer nun hydrophilen Aminosäure an Position 388 der Transmembrandomäne nur schwache Veränderungen der Rezeptoraktivität bewirkt (Bell *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 1999; Bange *et al.*, 2002). Dies kann erklären, warum dieser Polymorphismus keinen offensichtlichen Einfluss auf den gesunden Träger hat. Viele Publikationen postulieren, dass die Funktion des FGFR4 Rezeptors wahrscheinlich nicht in der initialen Tumorentstehung oder der weiteren Proliferation der Tumorzellen, sondern eher in den Prozessen der Metastasierung von Tumoren eine Rolle spielt (Stadler *et al.*, 2005; Bange *et al.*, 2002; Streit *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Der Prozess der Metastasierung ist durch vielfältige Wechselwirkungen zwischen Tumor und Wirtsgewebe gekennzeichnet, wie z.B. die Mobilisierbarkeit, Migration- und Deformierbarkeit von Zellen, sowie die Produktion von Proteasen, die Zellproliferation und die Tumorangio-genese. In diesem Zusammenhang muss man auch die Expressionsstärke der Liganden der RTK in die Betrachtung miteinschliessen. FGF-8b, ein Ligand mit besonderer Spezifität für den FGFR4, wurde häufig stark exprimiert in Tumor- und benachbarten stromalen Geweben, v.a. bei Brustkarzinome und Prostatakarzinome gefunden. Gleichzeitig war auch der FGFR4 überrepräsentativ vertreten.

Da der FGFR4 in allen bisher getesteten Zellsystemen als einziger der FGF-Rezeptorfamilie keine mitogenen Eigenschaften gezeigt hat (Vainikka *et al.*, 1994; Shaoul *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997), ließe sich seine Rolle in der Zellmigration erklären. Johnson *et al.* konnten 1995 demonstrieren, dass die Wachstumsfaktoren FGF-1 und FGF-2, die eine Affinität zum FGFR4 besitzen, in Brustkrebszellen, nicht aber in gesundem Brustepithel einen Vorgang induzieren können, der als *membrane ruffling* bezeichnet wird, und einen wichtigen Prozess während der Zellmigration und damit der Metastasierung darstellt (Jiang, 1995; Hojo *et al.*, 1999). Interessanterweise können nur Zellen, die FGFR4 exprimieren, *membrane ruffling* induzieren. Nach Bange und Hughes wird FGFR4 nur in Brustkrebszellen exprimiert, nicht aber in gesunden Brustepithelgeweben, so dass aus dieser Tatsache u.a. eine Kausalität zwischen Tumorzellen und gesteigertem Metastasierungsverhalten bei exprimiertem FGFR4 erarbeitet wurde.

Bange *et al.* zeigte 2002, dass sich Unterschiede der Migrationsfähigkeit der Tumorzellen bei den unterschiedlichen Genotypen des FGFR4 feststellen lassen. Zellen der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit exogen exprimierter FGFR4 Gly³⁸⁸ Variante wiesen eine verringerte Zellmigrationsfähigkeit auf als Zellen mit der exprimierter FGFR4 Arg³⁸⁸ Variante.

Betrachtet man nun die genannten Publikationen inklusive unserer Untersuchungen, in denen Ergebnisse bezüglich einer möglichen Assoziation des FGFR4 Polymorphismus mit Tumorerkrankungen verschiedener Organsysteme vorgestellt wurden, so stellt man sowohl eine Widersprüchlichkeit in der Bedeutung des FGFR4 Polymorphismus für die Tumorphathogenese in verschiedenen Organsystemen fest, als auch eine mangelnde Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, die man bei verschiedenen Studien von gleichen Organsystemen nach gleichem Studiendesign beobachten kann. Tatsächlich ist es bekannt, dass die Resultate von Untersuchungen, die oft nur eine bestimmte Population respektive Völkergruppe einschliessen, nicht in Untersuchungen von anderen Populationen reproduzierbar sind oder sich sogar mit vermeintlich vergleichbaren Studien widersprechen. Daher spiegeln die Probleme, bei dem Versuch reproduzierbare Zusammenhänge von genetische Polymorphismen mit Krankheitsphänotypen zu untersuchen, möglicherweise wahre Populationsdifferenzen wieder, oder decken durch die Metaanalyse von verschiedenen Studien mit gleichem Fokus die möglicherweise nur geringe Rolle bestimmter Polymorphismen bei Krankheitsätiologien auf (Ioannidis *et al.*, 2001; Lohmueller *et al.*, 2003).

Nach der initialen Publikation einer signifikanten Assoziation zwischen FGFR4 Gly³⁸⁸Arg Polymorphismus und dem Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Brustkrebs, sowie dem Einfluss auf das Lymphknoten-Metastasierungspotential bei Kolonkarzinom-Patienten (Bange *et al.*, 2002), konnten zwei weitere nachfolgende Studien die Assoziation bei Brustkrebs-Patienten nicht bestätigen (Becker *et al.*, 2003; Jezequel *et al.*, 2004). Die Studie von Bange *et al.* schloss deutsche und russische Brustkrebs-Patientinnen, sowie italienische Kolorektalkarzinom-Patienten ein. Die späteren Studien unterlagen einer ähnlichen Intention wie die Arbeit von Bange *et al.* und untersuchten eine französische (Jezequel *et al.*, 2004) und eine deutsche (Becker *et al.*, 2003) Gruppe von Patienten. Allerdings stimmte interessanterweise die Allelfrequenz des seltenen FGFR4 Arg³⁸⁸ Allel in allen genannten Studien, inklusive unserer (deutsche Patienten), nahezu überein. So scheint der Mangel an Reproduzierbarkeit der Daten von Bange *et al.* nicht die populationsbedingten Unterschiede des FGFR4 Polymorphismus zu reflektieren. Nur die Studie von Wang *et al.* zeigt deutliche Unterschiede in der Allelfrequenz bei den untersuchten Gruppen: die Gruppe der afro-amerikanischen Patienten, wie auch die Kontrollgruppe hatte eine deutliche niedrigere Arg³⁸⁸ Allelfrequenz (total: 0.09) als die Patienten- und Kontrollgruppe der weißen Rasse (total: 0.24) mit einem hochsignifikanten Unterschied von $P < 0.00003$ nach χ^2 . Zu bemerken ist hierbei, dass kein Fall in der afro-amerikanischen Kontrollgruppe einen homozygoten Arg³⁸⁸ Genotyp aufwies. Neben den möglichen genomischen Unterschieden zwischen verschiedenen Kulturkreisen und Rassen, spielen sicher auch der Kohortenumfang hinsichtlich einer statistischen *Aussagekraft* eine für die gewählte Population ausreichende Repräsentativität der ausgesuchten Kohorte, sowie die Durchführung und Nachvollziehbarkeit der Studie eine wichtige Rolle. Vielleicht sind Auswirkungen des FGFR4 Polymorphismus nur für einige Untergruppen von Patienten relevant und erscheinen deshalb als nicht-signifikant in randomisierten Studien, so dass die Definierung eindeutiger Kriterien eine Perspektive für die Etablierung des FGFR4 Polymorphismus eines prognostischen respektive prädiktiven Faktors sein kann. Die Diskrepanzen in den Untersuchungsergebnissen bei verschiedenen Organsystemen deuten darauf hin, dass auch die Berücksichtigung der Spezifität für nur wenige Tumortypen eine Gewichtung haben kann. Letztlich zeigt sich ein heterogenes Informationsbild bezüglich des FGFR4 Polymorphismus und seinem Stellenwert in der Pathogenese von Krankheiten, das die Komplexität der Signalwege, die in der Zellkommunikation ablaufen, sehr gut widerspiegelt.

5.4 Ausblick

Die bereits vielfach postulierte Perspektive, den FGFR4 als Prädiktor oder prognostischen Parameter bei Krebserkrankungen und somit als Ansatzpunkt therapeutischer Interventionen deklarieren zu können, kann durch diese Arbeit nicht gestärkt werden. Obwohl in dieser Studie ausschliesslich Plattenepithelkarzinome des Oropharynx hinsichtlich des FGFR4 untersucht wurden, lassen sich nach Zusammenfassung der Studien der letzten Jahre nur vereinzelt Ansatzpunkte für den Einfluss des FGFR4 Polymorphismus in einigen Organsystemen finden. Die wichtige Rolle von Rezeptortyrosinkinasen für spezifische Bereiche in der Krankheitsentstehung sowie in der Tumorentstehung und –progression ist unbestritten. Zudem ist ihr Stellenwert in der Angiogenese und Gewebedifferenzierung vielfach belegt, so dass weiterführende strukturanalytische Studien des FGFR4 (Tuominen *et al.* 2001; Chen *et al.*, 2005) und anderer RTK, u.a. mit dem Ziel des Drugdesigns (Fan *et al.* 1998; Al-Obeidi *et al.*, 2000, Hidalgo *et al.* 2001; Bange *et al.*, 2001; Zwick *et al.*; 2002), Aufschluss geben zum besseren Verständnis der Tumorgenese sowie der Etablierung bzw. Konsolidierung eines neuen Bereichs in der Krebstherapie.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedmann, J., Gospodarowicz, D. und Fiddes, J.C. (1986) Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.*, **5**, 2523-2528.
- Al-Obeidi, FA., Lam, KS. (2000) Development of inhibitors for proteine tyrosine kinases. *Oncogene*, **19**, 5690-5701.
- Alroy, I. und Yarden, Y. (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis. *FEBS Letters*, **410**, 83-86.
- Ambrosch, P., Kron, M., Freudenberg, L.S. (1998) Clinical staging of oropharyngeal carcinoma. *Cancer*, **82**, 1613-1620.
- Bange, J. (2001), Untersuchungen zur Funktion der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 in der Tumorentwicklung, *Dissertation, LMU München*
- Bange, J, Prechtel, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Müller, S., Gärtner, S., Sures, I., Wang, H., Imyanitov, E., Häring, H.-U., Knayzev, P., Iacobelli, S., Höfler, H., Ullrich, A. (2002) Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg388 Allele. *Cancer Research*, **62**, 840-847
- Bange, J, Zwick, E., Ullrich, A. (2001) Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nature Medicine*, **7**, 548-552.
- Bargmann, C.I., Weinberg, R.A. (1988) Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated *neu* oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 5394-5398.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C.C., Dantis, L., Sklarin, N.T., Seidman, A.D., Hudis, C.A., Moore, J., Rosen, P.P., Twaddell, T., Henderson, I.C., Norton, L. (1999) Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Seminars in Oncology*, **26**, 78-83.
- Basilico, C. & Moscatelli, D. (1992) The FGF family of growth factors and oncogenes. *Advances in Cancer Research*, **59**, 115-165.
- Becker, N., Nieters, A., Chang-Claude, J. (2003) The fibroblast growth factor receptor gene Arg388 Allele is not associated with early lymph node metastasis of breast cancer. *Cancer epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **12**, 582-583.
- Bellosta, P., Iwahori, A., Plotnikov, A.N., Eliseenkova, A.V., Basilico, C., Mohammadi, M. (2001) Identification of receptor and heparin binding sites in fibroblast growth factor 4 by structure-based mutagenesis. *Mol a Cell Biology*, **21**, 5946-5957.
- Bellus, G.A., McIntosh, I., Smith, E.A., Aylsworth, A.S., Kaitila, I., Horton, W.A., Greenhaw, G.A., Hecht, J.T., Francomano, C.A. (1995) A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat Genet*, **10**, 357-359.
- Berger, W., Setinek, U., *et al.* (1999) Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Int J Cancer*, **83**, 415-423.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G. und Rifkin, D.B. (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrinol. Rev.*, **18**, 26-45.

-
- Bitran, J.D., Samueles, B., Trujillo, Y., Klein, L., Schroeder, L. und Martinec, J. (1996) Her2/neu overexpression is associated with treatment failure in woman with high-risk stage II und IIIA breast cancer (> 10 involved lymph nodes) treated with high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell support following standard-dose adjuvant chemotherapy. *Clin. Cancer Research*, **2**, 1509-1513.
- Blons, H., Laurent-Puig, P., (2003) TP53 and Head and Neck Neoplasms. *Human Mutation*, **21**, 252-257.
- Braakhuis, BJM., Tabor, MP., Leemans, R., van der Waal, I., Snow, GB., Brakenhoff, RH. (2002) Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head neck*; **24**: 198-206
- Brennan, P., Boffetta, P. (2004) Mechanistic considerations in the molecular epidemiology of head and neck cancer. *IARC Sci Publ.*, **157**, 393-414.
- Bunz, F. *et al* (1999) Disruption of p53 in human cancers cells alters the response to therapeutic agents. *J Clin Invest*, **104**, 263.
- Burgess, W.H. und Maciag, T., (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 575-606.
- Califano, J. *et al*, (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.*, **56**:2488.
- Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. und Radvanyi, F. (1999) Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nature Genetics*, **23**, 18-20.
- Carvalho, AL., Nishimoto, IN., Califano, JA., Kowalski, LP. (2004) Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*, (epub ahead of print)
- Cavallaro, U., Niedermeyer, J., Fuxa, M., Christofori, G. (2001) N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nature Cell Biology*, **3**, 650-657.
- Champion-Arnaud, P., Ronsin, C., Gilbert, E., Gensel, J.L., Houssaint, E. und Breathnach, R. (1991) Multiple mRNAs code for proteins related to the BEK fibroblast growth factor receptor. *Oncogene*, **6**, 979-987.
- Chen, L., Li, C., Qiao, W., Xu, X., Deng, C. (2001) A Ser(365)->Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum Mol Genet*, **10**, 457-465.
- Chen, L., Li, D., Li, C., Engel, A., Deng, CX. (2003) A Ser250Trp substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 results in craniosynostosis. *Bone*, **33**, 169-178.
- Chen, C., Patel, S., Corisdeo, S., Liu, X., Micolochick, H., Xue, J., Yang, Q., Lei, Y., Wang, B., Soltis, D. (2005) Generation and characterization of a panel of monoclonal antibodies specific for human fibroblast growth factor receptor 4. *Hybridoma*, **24**, 152-159.
- Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L. (2001) Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene, that contributes to tumour progression in multiple myeloma. *Blood*, **97**, 729-736.

-
- Clarke, R.W., Stell, P.M. (1992) Squamous carcinoma of the head and neck in the young adult. *Clin Otolaryngol*, **17**, 18-23.
- Clayman, G.L. (1995) Gene therapy for head and neck cancer. *Head & Neck*, **17**, 535-541.
- Cohen Jr, MM. (2003) FGFs/FGFRs and associated disorders. In: Epstein opment-the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis. *Oxford: Oxford University Press*, p. 380-400.
- Coope, R.C., Browne, P.J., Yiangou, C., Bansal, G.S., Walters, J., Groome, N., Shousha, S., Johnston, C.L., Coombes, R.C., Gomm, J.J. (1997) The location of acidic fibroblast growth factor in the breast is dependent on the activity of proteases present in breast cancer tissue. *Br J Cancer*, **75**, 1621-1630.
- Cornish, E.E., Natoli, R.C., Hendrickson, A., Provis, J.M. (2004) Differential distribution of fibroblast growth factor receptors on foveal cones: FGFR-4 is an early marker of cone photoreceptors. *Molecular Vision*, **10**, 1-14.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A. und Ullrich, A. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**, 1132-1139.
- Craven, J.M., Pavelic, Z.P., Stambrook, P.J., Pavelic, L., Gapany, M., Kelly, D.J., Bapany, S und Gluckman, J.L. (1992) Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma. *Anticancer Res.*, **12**, 2273-2276.
- Cronauer, MV., Schulz, WA., Seifert, HH., Ackermann, R., Burchardt M (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications. *European Urology*, **43**, 309-319.
- Crowe, D.L., Hacia, J.G., Hsieh, C.L., Sinha, U.K., Rice, H. (2002) Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol Histopathol*, **17**, 909-914.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, **379**, 557-560.
- Dellacono, F.R., Spiro, J., Eisma, R. und Kreutzer, D. (1997) Expression of Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptors by Head and Neck Squamous Carcinoma Tumor and Vascular Endothelial Cells. *The Am. J. of Surgery*, **174**, 540-544.
- Demiroglu, A., Steer, E.J., Heath, C., Taylor, K., Bentley, M., Allen SL., *et al.* (2001) The t(8;22) in chronic myeloid leukemia fuses BCR to FGFR1: transforming activity and specific inhibition of FGFR1 fusion proteins. *Blood*, **98**, 3778-3783.
- Dionne, C.A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J.M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W.H., Jaye, M. und Schlessinger, J. (1991) Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J.*, **9**, 2685-2693.
- Dode, C., Levilliers, J., Dupont, JM., De Paepe, A., Le Du, N., Soussi-Yanicosta, N., *et al.* (2003) Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet*, **33**, 463-465.
- Dode, C., Hardelin, JP. (2004) Kallmann syndrome: fibroblast growth factor signaling insufficiency? *J Mol Med*, **82**, 725-734.

-
- Dow, J.K., deVere White, R.W. (2000) Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology*, **55**, 800-806.
- Downward, J. (1997) Routine role for Ras. *Curr. Boil.*, **7**, 258-260.
- Egan, S.E., Giddings, B.W., Brooks, M.W., Buday, L., Sizeland, A.M. und Weinberg, R.A. (1993) Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, **363**, 45-51.
- Eisenmann, A., Ahn, J.A., Graziani, G., Tronick, S.R. und Ron, D. (1991) Alternative splicing generates at least five different isoforms of the human basic-FGF receptor. *Oncogene*, **6**, 1195-1202.
- Eswarakumar, V.P., Horowitz, M.C., Locklin, R., Morriss-Kay, G.M., Lonai, P.A. (2004) A gain-of-function mutation of FGFR2c demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 12555-12560.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I., Schlessinger, J. (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth factor Reviews*, **16**, 139-149.
- Ezzat, S., Zheng, L., Zhu, X.-F., Wu, G.E., Asa, S.L. (2002) Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. *J of Clinical Investigation*, **109**, 69-78.
- Ezzat, S., Huang, P., Dackiw, A., Asa, S.L. (2005) Dual inhibition of RET and FGFR4 restrains medullary thyroid cancer cell growth. *Clinical Cancer Research*, **11**, 1336-1341.
- Fan, Z., Mendelsohn, J. (1998) Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr Opin Oncol*, **10**, 67-73.
- Fendly, B.M., Winget, M., Hudziak, R.M., Lipari, M.T., Napier, M.A. und Ullrich, A. (1990) Charakterisation of murine monoklonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res.*, **50**, 1550-1558.
- Feng, S., Wang, F., *et al.*, (1997) Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. *Cancer Res*, **57**, 5369-5378.
- Ferning, D.G. und Gallagher, J.T. (1994) Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog. Growth Factor Res.*, **5**, 353-377.
- Field, J.K., Spandidos, D.A., Yiagisis, M., Gonsney, J.R., Papdimitriou, K. und Stell, P.M. (1992) c-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.*, **12**, 613-620.
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D., Aaronson, S.A. (1989) Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science.*, **245**(4919):752-755.
- Fioretos, T., Panagopoulos, I., Lassen, C., Swedin, A., Billstrom, R., Isakson, M., *et al.* (2001) Fusion of the BCR and the fibroblast growth factor receptor-1 genes as a result of t(8;22)(p11;q11) in a myeloproliferative disorder: the first fusion gene involving BCR but not ABL. *Genes Chromosomes Cancer*, **32**, 302-310.

-
- Fischer, OM., Streit, S., Hart, S., Ullrich, A. (2003) Beyond Herceptin and Gleevec. *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**, 490-495.
- Fogar, P., Basso, D., Pasquali, C., De Paoli, M., Sperti, C., Roveroni, G., Pedrazzoli, S., Plebani, M. (1997) Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res*, **17**, 1227-1230.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., Toker, A. (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*, **269**, 6207-6214.
- Gaudenz, K., Roessler, E., et al. (1998). Analysis of patients with craniosynostosis syndromes for a pro246Arg mutation of FGFR4. *Mol Genet Metab*, **64**, 76-79.
- Ghosh, AK., Shankar, DB., et al. (1996) Molecular cloning and characterization of human FGF8 alternative messenger RNA forms. *Cell Growth Differ*, **7**, 1425-1435.
- Givol, D. und Yayon, A., (1992) Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J.*, **6**, 3362-3369.
- Gorgoulis, V., Aninos, D., Mikou, P., Kanavaros, P., Karameris, A., Joordanoglou, J., Rasidakis, A., Veslemes, M., Ozanne, B. und Spandidos, D.A. (1992) Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Research*, **12**, 1183-7.
- Gowardhan, B., Douglas, DA., Mathers, ME., McKie, AB., McCracken, SR., Robson, CN., Leung, HY. (2005) Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. *British journal of cancer*, **92**, 320-327.
- Grandis, J.R., Tweardy, D.J. (1993) TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem. Suppl.* **17F**:188-191.
- Green, P.J., Walsh, F.S., Doherty, P. (1996) Promiscuity of fibroblast growth factor receptors. *Bioessays*, **18**, 639-646.
- Grooteclaes, M., Vernimmen, D., Plaza, S., Pasleau, F., Hodzic, D., Winkler-Gol, R. (1999) A new *cis* element is involved in the *HER2* gene overexpression in human breast cancer cells. *Cancer Research*, **59**, 2527-2531.
- Guasch, G., Mack, G.J., Popovici, C., Dastugue, N., Birnbaum, D., Rattner, JB., et al. (2000) FGFR1 is fused to the centrosome-associated protein CEP110 in the 8p12 stem cell myeloproliferative disorder with t(8;9)(p12;q33). *Blood*, **95**, 1788-1796.
- Guasch, G., Popvici, C., Mugneret, F., Chaffanet, M., Pontarotti, P., Birnbaum, D., et al., (2003) Endogenous retroviral sequence is fused to FGFR1 kinase in the 8p22 stem-cell myeloproliferative disorder with t(8;19)(p12;q13.3). *Blood*, **101**, 286-288.
- Habib, A.A., Högnason, T., Ren, J., Steffanson, K. und Ratan, R.R. (1998) The Epidermal Growth Factor Receptor associates with and recruits PI3Kinase to the Platelet-derived Growth Factor β Receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6885-6891.
- Hart, K.C., Robertson, S.C., Kanemitsu, M.Y., Meyer, A.N., Tynan, J.A., Donoghue, D.J. (2000) Transformation and stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, FGFR4. *Oncogene*, **19**, 3309-3320.
- Hildago, M. (2001) Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol*, **19**, 3267-3279.

-
- Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., Shimbo, T. & Suthanthiran, M. (1999) Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*, **397**, 530-534.
- Holgado-Madruga, M., Emllet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K. und Wong, A.J. (1996) A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature*, **379**, 560-564.
- Hölzel, D., Klammert, A., Schmidt, M. Krebs: Häufigkeiten, Befunde, und Behandlungsergebnisse; Perspektiven für die Krebsregisterdiskussion und eine quantitative klinisch-epidemiologische Onkologie aus dem Tumorregister München. Zuckschwerdt, München, Bern, Wien, New York, 237- 246
- Hou, J., Kann, M., McKeehan, K., McBride, G., Adams, P. und McKeehan, W.U. (1991) Fibroblast growth factor receptors from liver vary in three structural domains. *Science*, **251**, 665-668.
- Hussey, DH., Latourette, HB., Panje, WR. (1991) Head and neck cancer: an analysis of the incidence, aptterns of treatment, and survival at the University of Iowa. *Ann Otol Rhinol Laryngol*; **100**: 1-16
- Hughes, S.E. (1996) Localisation and differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovascular Research*, **32**, 557-569.
- Hughes, S.E. (1997) Differential Expression of the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Multigene Family in Normal Human Adult Tissues. *J. of Histochem. and Cytochem.*, **45**, 1005-1019.
- Hunter, T., Sefton, B.M. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1311-1315.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.
- Hunter, T., Ling, N. und Cooper, J.A. (1984) Protein Kinase C phosphorylation of the EGF Receptor at a threonin residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature*, **311**, 480-483.
- Hunter, T. (2000) Signaling 2000-and beyond. *Cell*, **100**, 113-127.
- Hunter, T. (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell*, **64**, 249-270.
- Hynes, N.E. und Stern, D.F. (1994) *Biochem. Biophys. Acta*, **1198**, 165-184.
- Ichimura, K. *et al*, (2000) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res.* **60**, 417-424.
- Ioannidis, JP, Ntzani, EE., Trikalinos, TA., Contopoulos-Ioannidis, DG. (2001) Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*, **29**, 306-309.
- Issing, WJ., Wustrow, TPU., Heppt, W., (1992) Onkogene und ihre Bedeutung für Kopf-Hals-Karzinome. *HNO*, **40**, 283-291.
- Issing, WJ., Heppt, WJ., Kastenbauer, ER. (1993) erbB3, a third member of the erbB/epidermal growth factor receptor gene family: ist expression in head and neck cancer cell lines. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **250**, 392-395.

-
- Issing, WJ., Wustrow, TPU., Heppt, WJ. (1993) Oncogenes related to head and neck cancer. *Anticancer Res*, **13**, 2541-2552.
- Issing, WJ (1994) p53 ein Zellprotein bei Kopf-Hals-Tumoren. *HNO*, **42**, 249-250.
- Issing, WJ., Struck, R., Naumann, A. (1996) Long-term follow-up of larynx leukoplakia under treatment with retinyl palmitate. *Head Neck*, **18**, 560-565.
- Issing, WJ., Wustrow, TPU. (1996) Expression of retinoic acid receptors in squamous cell carcinomas and their possible implication for chemoprevention. *Anticancer Res*, **16**, 2373-2378.
- Issing, WJ. (1997) Nachweis eines "autokrinen loops" zwischen EGF-Rezeptor und TGF- α in Kopf-Hals-Karzinomen. *Laryngol Rhinol Otol*, **76**, 415-420.
- Issing, WJ., Struck, R., Naumann, A. (1997) Positive impact of retinyl palmitate in leukoplakia of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **254**, 105-109.
- Iwata, T., Chen, L., Li, C., Ovchinnikov, DA., Behringer, RR., Francomano, CA, *et al.* (2000) A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet*, **9**, 1603-1612.
- Jaakkola, S., Salmikangas, P., Nylund, S., Partanen, J., Armstrong, E., Pyrhonen, S., Lehtovirta, P., Nevanlinna, H. (1993), Amplification of FGFR4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int J Cancer*, **54**, 378-382.
- Jallal, B., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1992) Tyrosine phosphatase inhibition permits analysis of signal transduction complexes in p185HER2/neu -overexpressing human tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4357-4363.
- Janot, F., El-Naggar, A.,K., Morrison, R.S., Liu, T.-J., Taylor, L. und Clayman, G.L. (1995) Expression of basic fibroblast growth factor in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with degree of histologic differentiation. *Int. J. Cancer*, **64**, 117-123.
- Jaye, M., Howk, R., Burgess, W., Ricca, G.A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T. und Drohan, W.N. (1986) Human endothelial cell growth factor: cloning nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science*, **233**, 541-545.
- Jeffers, M., LaRochelle, W.J., Lichtenstein, H.S. (2002) Fibroblast growth factors in cancers: therapeutic possibilities. *Expert Opin Ther Targets*, **6**, 469-482.
- Jézéquel, P., Champion, L., Joalland, M.-P., Millour, M., Dravet, F., Classe, J.-M., Delecroix, V., Deporte, R., Fumoleau, P., Ricolleau, G. (2004) G388R mutation of the FGFR4 gene is not relevant to breast cancer prognosis. *British journal of cancer*, **90**, 189-193.
- Jiang, W.G. (1995) Membrane ruffling on cancer cells: a parameter of tumour cell motility and invasion. *Eur J Surg Oncol*, **21**, 307-309.
- Johnson, DE, Williams, LT. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor family. *Adv Cancer Res*, **60**, 1-41.
- Johnson, CL., Cox, HC., Gomm, JJ., Coombes, RC. (1995) bFGF and aFGF induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells: FGFR-4 involvement. *Biochem J.*, **306**, 609-616.
- Kavanaugh, W.M., Williams, L.T. (1994) Alternative to SH2 domains for binding tyrosine phosphorylated proteins. *Science*, **266**, 1862-1865.

-
- Keegan, K., Johnson, D.E., Williams, L.T. und Hayman, M.J. (1991) Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 1095-1099.
- Keegan, K., Meyer, S. und Hayman, M.J. (1991) Structural and biosynthetic characterisation of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR-3) protein. *Oncogene*, **6**, 2229-2236.
- Kelloff, G.J., Boone, C.W., Steele, V.K., Perloff, M., Crowell, J., Doody, L.A. (1993) Development of chemopreventive agents for lung and upper aerodigestive tract cancers. *J Cell Biochem Suppl*, **17**, 2-17.
- Kimura, T., Suzuki, H., Ohashi, T., Asano, K., Keyota, H., Eto, Y. (2001) The incidence of thanatophoric dysplasia mutations in FGFR3 gene is higher in low-grade or superficial bladder carcinomas. *Cancer*, **92**, 2555-2561.
- Kobrin, MS., Yamanaka, Y., Friess, H., Lopez, ME., Korc, M. (1993) Aberrant expression of type I fibroblast growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res*, **53**, 4741-4744.
- Korah, RM., Sysounthone, V., *et al.*, (2000) Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Res*, **60**, 733-740.
- Kornmann, M., Beger, H.G., Korc, M. (1998) Role of fibroblast growth factors and their receptors in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreas*, **17**, 169-175.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. und Aaronson, S.A. (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. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **86**, 9193-9197.
- Kühn, MU., Müller, RM., Strelocke, K. (2004) Epidemiologische Untersuchungen zum Larynxkarzinom. *Forum HNO*; **6**: 144-147
- Kwabi-Addo, B., Ropiquet, F., Giri, D., Ittmann, M. (2002) Alternative splicing of fibroblast growth factor receptors in human prostate cancer. *Prostate*, **46**, 163-172.
- Kwabi-Addo, B., Ozen, M., Ittmann, M. (2004) The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-related Cancer*, **11**, 709-724.
- Laird, A.D. und Shalloway, D. (1997) Oncoprotein Signalling and Mitosis. *Cell. Sign.*, **9**, 249-255.
- Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, KM., Schwenzer, K., Sautier, W., Chucholowski, M., Eckel, R., Faas, I., Wilmes, E., Ehrenfeld, M., Arnold, W., Kastenbauer, E., Hölzel, D. (2002) Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Laryngo-Rhino-Otol*; **81**: 499-508
- La Rosa, S., Sessa, F., Colombo, L., Tibiletti, M.G., Furlan, D., Capella, C. (2001) Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol*, **54**, 37-41.
- Lee, D.W., Park, S.-W., Park, S.-Y., Heo, D.-S., Kim, K.H., Sung, M.-W. (2004) Effects of 53 or p27 overexpression on cyclooxygenase-2 gene expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head & Neck*, 706-715.

-
- Lemaire, F., Millon, R., Muller, D., Rabouel, Y., Bracco, L., Abecassis, J., Wasylyk, B. (2004) Loss of HOP tumour suppressor expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J of Cancer*, 1-4.
- Lemmon, M.A. und Schlessinger, J. (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerisation. *Trens Biochem. Sci.*, **19**, 459-464.
- Leung, H.Y., Gullick, W.J., Lemoine, N.R. (1994) Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **59**, 667-675.
- Lohmueller, KE., Pearce, CL., Pike, M., Lander, ES., Hirschhorn, JN. (2003) Metaanalysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*, **33**, 177-182.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. und Schlessinger, J. (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, **363**, 85-88.
- Li, Y., Basilico, C., *et al.* (1994) Cell transformation by fibroblast growth factors can be suppressed by truncated fibroblast growth factor receptors. *Mol Cell Biol*, **14**, 7660-7669.
- Linseman, D.A., Benjamin, C.W., Jones, D.A. (1995) Convergence of angiotensin and Platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12563-12568.
- Lippmann, S.M., Hong, W.K (1989) Second malignant tumours in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **17**, 691-694.
- Lowenstein, E.Y., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. und Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signalling. *Cell*, **70**, 431-442.
- Ma, B.B.Y., Poon, T.C.W., To, K.F., Zee, B., Mo, F.K.F., Chan, C.H.L., Ho, S., Teo, P.M.L., Johnson, P.J., Chan, A.T.C. (2003) Prognostic significance of tumor angiogenesis, KI 67, p53 oncoprotein, epidermal growth factor receptor and HER2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma-a prospective study. *Head & Neck*, 864-872
- Mao, L., Hong, W.K., Papadimitrakopoulou, V.A. (2004) Focus on head and neck cancer. *Cancer cell*, **5**, 311-316.
- Makkola, S., Salmikangas, P., Nylund, S., Partanen, J., Armstrong, E., Pyrhonen, S., Lehtovirta, P., Nevanlinna, H. (1993) Amplification of FGFR4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int. J. Cancer*, **54**, 378-382.
- Malarkey, K., Belham, C.M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P.H. und Plevin, R. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.*, **309**, 361-375.
- Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A. und Aaronson, S.A. (1992) determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 246-250.

-
- Mohadjer, C., Dietz, A., Maier, H., Weidauer, H. (1996) Fernmetastasierung und Zweitkarzinomhäufigkeit von Patienten mit Oropharynx- und Hypopharynxkarzinomen. *HNO*; **44**: 134-139
- Monsonogo-Ornan, E., Adar, R., Feferman, T., Segev, O. und Yayon, A. (2000) The Transmembrane Mutation G380R in Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Uncouples Ligand-Mediated Receptor Activation from Down-Regulation. *Mol. And Cell. Biology*, **20**, 516-522.
- Morimoto, Y., Ozaki, T., Ouchida, M., Umehara, N., Ohata, N., Yoshida, A., Shimizu, K., Inoue, H. (2003) Single nucleotide polymorphism in FGFR4 at codon 388 is associated with prognosis in high-grade soft tissue sarcoma. *Cancer*, **98**, 2245-2250.
- Moroni, E., Dell'Era, P., Rusnati, M., Presta, M. (2002) Fibroblast growth factors and their receptors in hematopoiesis and hematological tumors. *J Hematother Stem Cell Res*, **11**, 19-32.
- Morote, J., de Torres, I., Caceres, C., Vallejo, C., Schwartz, S. und Reventos, J. (1999) Prognostic value of immunohistochemical expression of the c-erbB-2 oncoprotein in metastatic prostate. *Int. J. of cancer*, **84**, 421-425.
- Mochly-Rosen, D. (1995) Localisation of Protein Kinases by Anchoring Proteins: A Theme in Signal Transduction. *Science*, **286**, 247-251.
- Muenke, M., Schell, U. (1995) Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet*, **11**, 308-313.
- Munro, NP., Knowles, MA (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in transitional cell carcinoma. *Journal of urology*, **169**, 675-682.
- Myoken, Y., Okamoto, T., Sato, J.D., Takada, K. (1994) Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). *J Oral Pathol Med*, **23**, 451-456.
- Nakamura, T., Ozawa, S., Kitagawa, Y., Shih, CH., Ueda, M., Kitajima, M. (2005) Expression of basic fibroblast growth factor is associated with a good outcome in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology reports*, **14**, 617-623.
- Naski, M.C., Wang, Q., Xu, J. und Ornitz, D.M. (1996) Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nature Genetics*, **13**, 233-237.
- Neal, D.E., Sharples, L., Smith, K., Fennelly, J., Hall, R.R. und Harris, A.L. (1990) The epidermal growth factor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, **65**, 1619-25.
- Neilson, K.M. und Friesel, R. (1996) Ligand-independent Activation of Fibroblast Growth Factor Receptors by Point Mutations in the Extracellular, Transmembrane, and Kinase Domains. *J. of Biol. Chem.*, **271**, 25049-25057.
- Nemoto, T., Ohashi, K., Akashi, T., Johnson, J.D., Hirokawa, K. (1997) Overexpression of protein tyrosine kinase in human esophageal cancer. *Pathobiology*, **65**, 195-203.
- Noble, ME., Endicott, JA., Johnson, LN. (2004) Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, **303**, 1800-1805.

-
- Olson, D.C., Deng, C., Hanahan, D. (1998) Fibroblast growth factor receptor 4, implicated in progression of islet cell carcinogenesis by its expression profile, does not contribute functionally. *Cell growth Differ.*, **9**, 557-564.
- Overholt, S.M., Liu, T.J., Taylor, D.L., Wang, M., El-Naggar, A.K., Shillitoe, E., Adler-Storthz, K., John, L.S., Zhang, W.W., Roth, J.A., Clayman, G.L. (1997) Head and neck squamous cell growth suppression using adenovirus-p53-FLAG: a potential marker for gene therapy trials. *Clin Cancer Res.*, **3**, 185-191.
- Partanen, J., Vainikka, S., Alitalo, K. (1993) Structural and functional specificities of FGF receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **340**, 297-303.
- Partanen, J., Makela, T.P., Eerola, E., Korhonen, H., Hirvonen, H., Cleason-welsh, L., Alitalo, K. (1991) FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.*, **10**, 1347-1354.
- Passos-Bueno, MR., Wilcox, WR., Jabs, EW., Sertie, AL., Alonso, LG., Kitoh, H. (1999) Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat*, **14**, 115-125.
- Pawson, T. (1988) Non-catalytic domains of cytoplasmic protein tyrosine kinases: regulatory domains in signal transduction. *Oncogene*, **3**, 491-495.
- Pawson, T., and Bernstein, A. (1990) *Trends Genet.* **6**, 350-356.
- Pawson, T. und Scott, J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring and adapter proteins. *Science*, **278**, 2075-2080.
- Penault-Llorca, F., Bertucci, F., Adalaide, J. (1995) Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, **61**, 170-176.
- Pindborg, JJ., Reichartm PA., Smith, CJ., Van der Waal, I. (1997) Histological typing of cancer and precancer of the oral muscosa. WHO International typing of cancer and precancer of the oral mucosa, second edition. *Springer Verlag, Heidelberg*
- Plowman, G.D. Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G., und 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**, 1746-1750.
- Plowman, G.D., Green, J.M., Culouscou, J.-M., Carlton, G.W., Rothwell, V.M., Buckley, S. (1993) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature*, **366**, 473-475.
- Plowman, G.D. Ullrich, A. und Shawver, L.K. (1994) Receptor tyrosine kinases as targets for drug intervention. *Drug News & Perspectives*, **7**, 334-339.
- Popovici, C., Adelaide, J., Ollendorf, V., Chaffanet, M., Guasch, G., Jacrot, M., et al. (1998) Fibroblast growth factor receptor 1 is fused to FIM in stemcell myeloproliferative disorder with t(8;22). *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5712-5717.
- Popovici, C., Zhang, B., Gregoire, MJ., Jonveaux, P., Lafage-Pochitaloff, M., Birnbaum, D., et al., (1999) The t(6;8)(q27;p11) translocation in a stem cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, FOP, to fibroblast growth factor receptor 1. *Blood*, **93**, 1381-1389.
- Powers, C.J., McLeskey, S.W., Wellstein, A. (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-related Cancer*, **7**, 165-197.

-
- Powles, T., Powles, J., Nelson, M., Sandison, A., Peston, D., Buchannan, J., Mandalia, S., Gazzard, B., Bower, M. (2004) Head and neck cancer in patients with human immunodeficiency virus-1 infection: incidence, outcome and association with Epstein-Barr virus. *J Laryngol Otol.*, **12**, 118-207.
- Prigent, S.A., Lemoine, N.R. (1992) The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res*, **4**, 1-24.
- Prives, C., Hall, P.A. (1999) The p53 Pathway. *J.Pathol.*, **187**, 112-126.
- Qui, R.-G., Ravi, L. und Kung, H.J. (1998) Requirement of ErbB2 for signaling by IL-6 in prostate carcinoma cells. *Nature*, **393**, 83-85.
- Qian, Z.R., Sano, T., Asa, S.L., Yamada, S., Horiguchi, H., Tashiro, T., Li, C.C., Hirokawa, M., Kovacs, K., Ezzat, S. (2004) Cytoplasmatic expression of FGFR 4 in human pituitary adenomas: Relation to tumor type, size, proliferation, and invasiveness. *J of Cli Endocrinology & Metabolism*, **89**, 1904-1911.
- Raffiono, S., Zhu, Y-Z., Bradshaw, R.A. und Thompson, L.M. (1998) Effect of Transmembrane and Kinase Domain Mutations on Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Chimera Signaling in PC12 Cells. *J. of Biol. Chem.*, **273**, 35250-35259.
- Reiter, A., Sohal, J., Kulkarni, S., Chase, A., Macdonald, DH., Aguiar, RC., *et al.* (1998) Consistent fusion of ZNF198 to the fibroblast growth factor receptor-1 in the t(8;13)(p11;q12) myeloproliferative syndrome. *Blood*, **92**, 1735-17412.
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., (1994) Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*, **371**, 252-254.
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. und Boetell, D. (1993) The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*, **363**, 83-85.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G., Schlessinger, J. und Pawson, T. (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature*, **360**, 689-692.
- Rubin, I., Yarden, Y. (2001) The basic biology of HER2. *Ann Oncol*, **12** suppl.1:53-58.
- Rudert, H. Maligne Tumoren der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx. Naumann HH, Helms J, Herberholt C, Kastenbauer E (1992) Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis Band 2, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 648-668
- Schneider-Stock, R., Mawrin, C., Motsch, C., Boltze, C., Peters, B., Hartig, R., Buhtz, P., Giers, A., Rohrbeck, A., Freigang, B., Roessner, A. (2004) Retention of the arginine allele in codon 72 of p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *American Journal of Pathology*, **164**, 1233-1242.
- Schweitzer, D.N., Graham Jr, J.M., Lachman, R.S., Jabs, E.W., Okajima, K., Przylepa, K.A., Shanske, A., Chen, K., Neidich, J.A., Wilcox, W.R. (2001) Subtle radiographic findings of achondroplasia in patients with Crouzon syndrome with acanthosis nigricans due to an Ala391Glu substitution in FGFR3. *Am J Med Genetics*, **98**, 75-91.
- Scully, R., Livingston, D.M. (2000) In search of the tumour-suppressor functions of BRCA 1 and BRCA 2. *Nature*, **408**, 429-432.

-
- Shah, R.N.H., Ibbitt, J.C., Alitalo, K., Hurst, H.C. (2002) FGFR 4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1 α . *Oncogene*, **21**, 8251-8261.
- Shaw, G. (1996) The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *BioEssays*, **18**, 35-46.
- Shi, E., Kann, M., Xu, J., Wang, F., Hou, J. und McKeehan, W.L. (1993) Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3907-3917.
- Sidenius, N., Blasi, F. (2003) The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev*, **22**, 205-222.
- Sisk, E.A., Bradford, C.R., Jacob, A., Yian, C.H., Staton, K.M., Tang, G., Harris, M.O., Carey, T.E., Lancaster, W.D., Gregoire, L. (2000) Human papillomavirus infection in "young" versus "old" patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*, 649-657.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. und McGuire, W.L. (1989) Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**, 707-712.
- Slaughter, D.P., Southwick, H.W., Smejkal, W. (1953) Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, **6**, 963-968.
- Sliwkowski, M.X., Schaefer, G., Akita, R.W., Lofgren, J.A., Fitzpatrick, V.D., Nuijens, A., Fendly, B.M., Cerione, R.A., Vandlen, R.L., Carraway, K.L. 3rd (1994) Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem*, **269**, 14661-14665.
- Smedley, D., Hamoudi, R., Clark, J., Warren, W., Abdul-Rauf, M., Somers, G., *et al.*, (1998) The t(8;13)(p11;q11-12) rearrangement associated with an atypical myeloproliferative disorder fuses the fibroblast growth factor receptor 1 gene to a novel gene RAMP. *Hum Mol Genet*, **7**, 637-642.
- Songyang, Z., Cantley, L.C., (1995) Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 470-475.
- Sozzi, G., Miozzo, M., Tagliabue, E., Calderone, C., Lombardi, L., Pilotti, S., Pastorino, U., Pierotti, M.A. und Della Porta, G. (1991) Cytogenetic abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients. *Cancer Research*, **51**, 400-404.
- Spinola, M., Leoni, V.P., Tanuma, J., Pettinicchio, A., Frattini, M., Signoroni, S., Agresti, R., Goivanazzi, R., Pilotti, S., Bertario, L., Ravagnani, F., Dragani, T.A. (2005) FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prognosis of breast and colorectal cancer. *Oncol Rep*, **14**, 415-419.
- Spinola, M., Leoni, V., Pignatiello, C., Conti, B., Ravagnani, F., Pastorino, U., Dragani, T.A. (2005) The functional FGFR4 Gly388Arg Polymorphism predicts prognosis in lung

- adenocarcinoma patients. *Journal of Clinical Oncology*, published Aug2005 online ahead of print.
- Stadler, CR., Knyazev, P., Bange, J., Ullrich, A. (2005) FGFR4 Gly388 isotype suppresses motility of MDA-MB-231 breast cancer cells by EDG-2 gene repression. *Cell Signal*, published online ahead of print.
- Streit, S. (2000) Untersuchungen zur Bedeutung der G388R-Mutation im FGF Rezeptor 4 für die Entwicklung der Krebserkrankung, *Diplomarbeit*
- Streit, S., Bange, J., Fichtner, A., Ihrler, S., Issing, W., Ullrich, A. (2004) Involvement of the FGFR 4 Arg 388 Allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, **111**, 213-217.
- Streit, S. (2004) Relevanz von genetischen Determinanten für die Progression von Krebs, *Dissertation*
- Streuli, M. (1996) Protein tyrosine phosphatases in signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 182-188.
- Strong, M.S., Incze, J., Vaughan, C.W. (1984) Field cancerization in the aerodigestive tract- its etiology, manifestation and significance. *J Otolaryngol*, **13**, 1-6.
- Sun, H. (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 480-485.
- Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S.J., Kakizoe, T., Miyao, N., Sugimura, T., Terada, M., Tsukamoto, T. (1999) Identification of receptor genes in renal cell carcinoma associated with angiogenesis by different hybridisation technique. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 855-859.
- Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Kaneko, S. und Sugimachi, K. (1990) Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Research*, **50**, 7077-80.
- Tavormina, P.L., Bellus, G.A., Webster, M.K., Bamshad, M.J., Fraley, A.E., McIntosh, I., Szabo, J., Jiang, W., Jabs, E.W., Wilcox, W.R. Wasmuth, J.J., Donoghue, D.J., Thompson, L.M., Francomano, C.A. (1999) A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am. J. of Hum. Genetics*, **64**, 722-731.
- Toker, A. und Cantley, L. (1997) *Nature*, **387**, 673-67.
- Tuominen, H., Heikinheimo, P., Loo, B.M., Kataja, K., Oker-Blom, C., Uutela, M., Jalkanen, M., Goldman, A. (2001) Expression and Glycosylation Studies of Human FGF Receptor 4. *Proteinexpression and Purification*, **21**, 275-285.
- Tzahar, E., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Yi, L., Peles, E., Lavi, S., Chang, D., Liu, N., Yayon, A., Wen, D., *et al.* (1994) ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hergulin isoforms. *J Biol Chem*, **269**, 25226-25233.
- Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D. und Seeburg, P.H. (1984) Human epidermal growth factor receptor

- cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**, 418-425.
- Uzcudun, AE., Bravo Fernández, P., Sánchez, JJ., Garcia Grande, A., Rabanal Retolaza, I., González Barón, M., Gavilán Bouzas, J. (2001) Clinical features of oropharyngeal cancer: a retrospective study of 258 consecutive patients. *J Laryngol Otol*; **115**: 112-118
- Vajo, Z., Francomano, C.A., Wilkin, D.J. (2000) the molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrom with acanthosis nigricans. *Endocr Rev*, **21**, 23-39.
- Vainikka, S., Partanen, J., Bellosta, P., Coulier, F., Basilici, C., Jaye, M. und Alitalo, K. (1992) fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structures, ligand binding and signal transduction. *EMBO J.*, **11**, 4273-4280.
- van der Geer, P. und Hunter, T. (1994) Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by electrophoresis and chromatography on thin-layer cellulose plates. *Electrophoresis*, **15**, 544-554.
- van der Geer, P., Wiley, S., Gish, G.D. und Pawson, T. (1996) The Shc adapter protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein protein interactions. *Curr. Biol.*, **6**, 1435-1444.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, **10**, 789-799.
- Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1993) The multistep nature of cancer. *Trens Gen.*, **9**, 138-141.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000), Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Wakulich, C., Jackson-Boeters, L., Daley, T.D., Wysocki, G., P. (2002) Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinomas. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, **93**, 573-579.
- Wallasch, C. (1996) Bedeutung von HER3 für die Signaldefinition von HER2. Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- Wallasch, C., Weiß, F.U., Niederfeller, G., Jallal, B., Issing, W. und Ullrich, A. (1995) Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenetic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J.*, **14**, 4267-4275.
- Wang, Y., Becker, D. (1997) Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat Med*, **3**, 887-893.
- Wang, J., Stockton, DW., Ittman, M. (2004) The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 Allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clinical Cancer Research*, **10**, 6169-6178.
- Webster, M.K. und Donoghue, D.J. (1996) Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.*, **15**, 520-527.

-
- Webster, M.K. und Donoghue, D.J. (1997) FGF α activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends in Genetics*, **13**, 178-182.
- Weidner, K.M., Dicesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J. und Birchmeier, W. (1996) Interaction between Grb1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*, **384**, 173-176.
- Weiss, A. und Schlessinger, J. (1998) Switching Signals On or Off by Receptor Dimerisation. *Cell*, **94**, 277-280.
- Weiß, F.U., Wallasch, C., Campiglio, M., Issing, W. und Ullrich, A. (1997) Distinct Characteristics of Heregulin Signals Mediated by HER3 and HER4. *J.Cell. Physiology*, **173**, 187-195.
- Wollenberg, B., Wiesmeth, A. (2003) Oropharynx-tumoren. *Manual Kopf-Hals-Malignome Tumorzentrum Muenchen*, 191-196.
- Wu, R., Connolly, D., Ngelangel, C., Bosch, FX., Munoz, N., Cho KR. (2000) Somatic mutations of fibroblast growth factor receptor 3 are uncommon in carcinomas of the uterine cervix. *Oncogene*, **19**, 5543-5546.
- Xia, W., Lau, Y., Zhang, H., Liu, A., Kiyokawa, N., Clayman, G.L., Katz, R.L. und Hung, M. (1997) Strong Correlation between c-erbB-2 Overexpression and Overall Survival of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **3**, 3-9.
- Xiao, S., Nalabolu, SR., Aster, JC., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, ES., *et al.*, (1998) FGFR1 is fused with a novel zinc.finger gene. ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nat Genet*, **18**, 84-87.
- Xie, MH., Holcomb, I., Deuel, B., Dowd, P., Huang, A., Vagts, A., Foster, J., Liang, J., Brush, J., Gu, Q., Hillan, K., Goddard, A., Gurney, AL. (1999) FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4 *Cytokine*, **11**, 729-735.
- Yayon, A., Ma, YS., *et al.* (1997) Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase-deficient FGF receptor 1 : evidence for the involvement of Src-family kinases. *Oncogene*, **14**, 2999-3009.
- Yoshomura, N., Sano, H., Hashiramoto, A., Yamada, R., Nakajima, H., Kondo, M., *et al.* (1998) The expression and localization of fibroblast growth factor-1 and FGF receptor-1 in human breast cancer. *Clin Immunol Immunopathol*, **89**, 28-34.
- Yu, D., Wang, S-S., Dulski, K.M., Tsai, C-M., Nicolson, G.L. und Hung, M-C. (1994) c-erbB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res.*, **54**, 3260-3266.
- Yu, J.S., Yang, S.D. (1994) Okadaic acid, a serine/threonine phosphatase inhibitor, induces tyrosine dephosphorylation/inactivation of protein kinase FA/GSK-3 α in A431 cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14341-14344.
- Yu, S., Zheng, L., Asa, S.L., Ezzat, S. (2002) Fibroblast growth factor receptor 4 mediates signaling to the prolactin but not the FGFR 4 promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**, 490-495.
- Yura, Y., Yoshioka, Y., Yamamoto, S., Kusaka, J., Bando, T., Yoshida, H., Sato, M. (2001) Enhancing effects of fibroblast growth factor on the proliferation of salivary gland carcinoma cells and salivary gland carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*, **30**, 159-167.

-
- Zhang, Y., Wang, H., Toratani, S., Denry Sato, J., Kan, M., McKeenan, W.L., Okamoto, T. (2001) Growth inhibition by keratinocyte growth factor receptor of human salivary adenocarcinoma cells through induction of differentiation and apoptosis. *PNAS*, **98**, 11336-11340.
- Zhang, X., Silva, E., Gershenson, D. und Hung, M-C. (1989) Amplification and rearrangement of *c-erbB* proto-oncogenes in cancer of human female genital tract. *Oncogene*, **4**, 985-989.
- Zhou, YX., Xu, X., Chen, L., Li, C., Brodie, SG., Deng, CX. (2000) A Pro250Arg substitution in mouse FGFR1 causes increased expression of Cbfa 1 and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet*, **9**, 2001-2008.
- Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-related cancer*, **8**, 161-173.
- Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. (2002) *Review: Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. Trends in Molecular Medicine*, **8**, 17-23.

7 Abkürzungen

'	Minute
"	Sekunde
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton (relative Molmasse)
DAB	Diaminobenzidin
d. AG	diese Arbeitsgruppe
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds DNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FCS	Fötales Kälberserum
<i>fgf</i>	fibroblast growth factor
<i>fgfR</i>	fibroblast growth factor receptor
Gab1	Grb2-associated binder-1

GDP	G uanosind i phosphat
GPCR	G protein-coupled receptor
Grb2	G rowth factor receptor b inding p rotein 2
GTP	G uanosin t riphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2- H ydroxy e thyl)- p iperazin-N'-2- ethansulfonsäure
HER	h umaner E GFR
Ig	I mmunglobulin
IP	I mmun p räzipitation
kb	K ilobasen
kDa	K ilodalton
LPA	L ysophosphatidylsäure
M	m olar (Mole pro Liter)
MAP-Kinase	von M itogenen a ktiviert e P roteinkinase
Min	M inute
p.a.	zur A nalyse
PBS	P hosphat-gepuffert e S aline
PCR	P olymerase Ketten r eaktion
PDGF	P latelet- d erived g rowth f actor
PH-Domäne	P leckstrin H omologie D omäne
PI 3-Kinase	P hosphatidylinositol 3 - K inase
PMSF	P henyl m ethylsulfonyl- F luorid
PTB	P hosphotyrosine b inding
PTP(n)	P rotein- T yrosin p hosphatase(n)
RNA	R ibonukleinsäure
rpm	Umdrehungen p ro M inute
RT	R aum t emperatur
RTK(n)	R ezeptor t yrosin k inase(n)
SDS	Natrium d odecylsulfat
SDS-PAGE	S DS P olyacrylamid G eleelektrophorese
SH2,3-Domäne	S rc H omologie 2,3 D omäne

Sos	Son of sevenless
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Enzymsaktivitätseinheit (Unit)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen
w/w	Masse pro (Gesamt-) Masse
z.B.	zum Beispiel

CURRICULUM VITAE

Name: Christoph Bergmann
Geburtsdatum/ -ort: 04. Mai 1976 in Alzenau/Unterfranken
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand ledig
Eltern Arnold Bergmann, Dipl.-Ingenieur Maschinenbau
 Karola Bergmann, Bürokauffrau

Schullaufbahn

09/1982 bis 07/1986 Volksschule Karlstein a. Main (Grundschule)
 09/1986 bis 07/1995 Franziskaner Gymnasium Kreuzburg in Großkrotzenburg, Abitur 1995

Staatsdienst

10/1995 bis 10/1996 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Alzenau (Intensivstation)

Akademischer Werdegang

04/1997 bis 03/2001 Medizinstudium an der J.W.-Goethe-Universität Frankfurt
 03/2001 Physikum
 04/2001 bis 06/2005 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität München
 03/2002 1. Staatsexamen
 03/2004 2. Staatsexamen
 04/2004 bis 03/2005 Praktisches Jahr
 05/2005 3. Staatsexamen und Approbation
 05/2002 bis 09/2003 Dissertation an der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der LMU München in Kooperation mit Prof. Dr. Axel Ullrich Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Abteilung für Molekularbiologie, Prof. Dr. Axel Ullrich, unter Betreuung von Prof. Dr. med Wolfgang Issing, Department of ENT, Freeman Hospital, Newcastle Upon Tyne, Grossbritannien:
„Bedeutung des FGFR4 Polymorphismus in der Pathogenese und Progression von Tumorerkrankungen“
 Präsentationen: 20.05.2004, Deutscher HNO-Kongress, Bad Reichenhall
 20.01.2005, 4th International Symposium on Advances in Head and Neck Cancer-Basic and Clinical Research, Marburg

Praktisches Jahr

HNO	04-07/2004	Head and Neck Oncology Center, Abteilung Otorhinolaryngologie, Universitätsklinikum Örebro, Schweden (4 Monate) Leitung: Prof. Dr. Lennard Löfgren
Chirurgie	08-11/2004	Head and Neck Oncology Center, Abteilung für Plastische Chirurgie, Universitätsklinikum Örebro, Schweden (4 Monate) Leitung: Dr. Torbjörn Söderström, Mentorin: Fr. Dr. med. Barbara Lutz
Innere Medizin	12/04 – 03/05	Klinik für Innere Medizin, Kantonsspital St.Gallen, Schweiz (4 Monate) Leitung: Prof. Dr. Peter Greminger

Nachwort

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Issing für die interessante Themenstellung meines Projektes, für die Ratschläge und Hilfestellungen und für die Möglichkeit, diese Arbeit durch eine Kooperation am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich durchführen zu können.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Ullrich für die sehr grosszügige Unterstützung durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und bester Arbeitsbedingungen.

Frau Dr. med. Eva Hilgert möchte ich sehr gerne danken, die mit ihrer sowohl immerwährenden Hilfestellung, als auch hohen fachlichen wie menschlichen Kompetenzen, massgeblich die Durchführung dieses Projektes möglich machten.

Silvia und Jochen möchte ich für die Einführung in das molekularbiologische Arbeiten danken, für ihre Offenheit und Hilfsbereitschaft und die interessanten Diskussionen. Dank gebührt ebenso meinen Laborkollegen Christoph, Christiane, Bea, HaJü und den anderen, die eine kollegiale wie freundliche Atmosphäre im Labor schafften und mir jederzeit mit guten Vor- und Ratschläge zur Seite standen.

Herrn Dr. med. Samuel Henz, MPH, möchte ich für die weiterführende statistische Auswertung der Daten und für die fruchtbaren wie professionellen Diskussionen danken, die dieser Studie u.a. ihre Ausführlichkeit verliehen hat.

Herrn PD Dr. med. Stefan Ihrler möchte ich für seine geduldige Einführung in die praktische Histologie und für die Bereitstellung seiner Zeit und Geräte für die pathologische Evaluierung der Tumorproben danken.

Herrn Dr. med. dent. Alexander Fichtner danke ich für die gelungene Zusammenarbeit der Akquirierung der geeigneten Patientenkohorte für diese Studie.

Ich möchte meiner Partnerin Vanessa Schönau für ihre liebevolle und geduldige Unterstützung und ihre Begleitung durch eine massgeblichen Phase dieser Arbeit danken.

Der grösste Dank gilt meiner Familie, die mich in all den Jahren unterstützt und begleitet haben und mir es möglich gemacht haben, meinem Ziel ein grosses Stück näherzukommen.