

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**Proteinexpression und Genpolymorphismus des
Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors-4 (FGFR4)
bei Patienten mit malignen Melanomen**

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

vorgelegt von
Dominik Sebastian Mestel
aus München
2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Carola Berking

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Friedrich-Wilhelm Kreth

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Burkhard Rolf

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen

Prüfung: 23.10.2008

*Meiner Familie
sowie Jan und Magdalena
aus Dank für ihre nie endende Unterstützung
und für ihre Menschlichkeit !*

Die vorliegende Arbeit wurde in einer Kooperation des Labors Tumorbiologie (Leiterin: Prof. Dr. med. Carola Berking) der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried (Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Axel Ullrich) im Zeitraum von Oktober 2003 bis Februar 2005 erarbeitet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom	1
1.1.1 Epidemiologie – Inzidenz.....	1
1.1.2 Ätiologie	3
1.1.3 Klinische Subtypen	4
1.1.4 Diagnostik.....	6
1.1.5 Therapie	9
1.1.6 Prognose	10
1.2 Rezeptortyrosinkinasen	10
1.2.1 Aufbau von Rezeptortyrosinkinasen	12
1.2.2 Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTKn)	13
1.2.3 Intrazelluläre Substrate der Rezeptortyrosinkinasen	14
1.2.4 Die MAP-Kinasen-Kaskade	15
1.2.5 Die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren	16
1.2.6 Liganden der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren.....	18
1.2.7 Der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 4 (FGFR4).....	19
1.2.8 Krankheitsentstehung durch die Fehlregulation von FGFR-Signalwegen.....	21
1.2.9 Erkrankungen durch Mutationen in den FGFR-Genen	22
1.2.10 FGFR4-Gly388-Arg-388-Polymorphismus.....	23
1.3 Zielsetzung: Einfluss von FGFR4 auf maligne Melanome	23
2. Material und Methoden	26
2.1 Bezugsquellennachweise	26
2.1.1 Chemikalien.....	26
2.1.2 Enzyme.....	26
2.1.3 „Kits“ und Sonstiges.....	26
2.1.4 Stammlösungen und Puffer	27
2.1.5 Antikörper	27
2.1.6 Oligonukleotide.....	27

2.2 Patientenkollektiv.....	28
2.3 Immunhistochemische Untersuchungen an Melanomgeweben.....	29
2.3.1 Aufbereitung der Paraffinschnitte.....	30
2.3.2 Ermittlung der FGFR4-Protein-Expression	31
2.3.3 Ermittlung der Proliferationsrate	32
2.3.4 Ermittlung der Gefäßdichte.....	32
2.4 Analyse des FGFR4-Allels in Melanomgeweben.....	32
2.4.1 Isolierung genomischer DNS aus paraffineingebetteten Geweben.....	33
2.4.1.1 Entparaffinierung	33
2.4.1.2 Digestion, Phenol- und Ethanol-fällung.....	33
2.4.2 PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (PCR-RFLP) .	34
2.5 Statistik	36
3. Ergebnisse	37
3.1.1 FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen.....	37
3.1.2 Ermittlung der Gefäßdichte in Abhängigkeit von der FGFR4-Expression	41
3.1.3 Ermittlung der Proliferationsrate in Abhängigkeit von der FGFR4-Expression	43
3.1.4 FGFR4-Proteinexpression in Assoziation mit verschiedenen Variablen	44
3.1.4.1 FGFR4-Protein-Expression in Assoziation mit klinischen Parametern	45
3.1.4.2 FGFR4-Protein-Expression in Assoziation mit pathologischen Parametern .	47
3.2 PCR-RFLP.....	49
3.2.1 FGFR4-Allel-Verteilung in malignen Melanomen.....	49
3.2.2 FGFR4-Arg-388-Polymorphismus und FGFR4-Protein-Expression, Gefäßdichte (CD-31) und Proliferationsrate (Ki-67)	50
3.2.3 FGFR4-Arg388-Polymorphismus in Assoziation mit verschiedenen Variablen	52
3.2.3.1 FGFR4-Arg388-Polymorphismus in Assoziation mit klinischen Parametern	53
3.2.3.2 FGFR4-Arg388-Polymorphismus in Assoziation mit pathologischen Parametern.....	54
3.3 Auswirkung der FGFR4-Protein-Expression und des FGFR4-Arg388-Polymorphismus auf das Tumor-Stadium und Überleben	57
3.3.1 Tumor-Staging und Überlebenszeitanalyse unter dem Einfluss der FGFR4-Protein-Expression	58
3.3.2 Tumor-Staging und Überlebenszeitanalyse unter dem Einfluss des FGFR4-Arg388-Polymorphismus	62
4. Diskussion	65

4.1 FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen	66
4.2 FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus in malignen Melanomen	71
5. Zusammenfassung	76
6. Literaturverzeichnis.....	78
7. Danksagung	90
8. Curriculum vitae	91

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
aFGF	acid fibroblast growth factor
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	akrolentiginöses malignes Melanom
AMM	amelanotisches malignes Melanom
APAAP	alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arg	Arginin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BRAF	Isoform von RAF
CL	Clark-Level
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK1/2	extracellular signal regulated protein kinase 1/2
FCS	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor-receptor
FRS	FGF receptor substrate
Gab1	Grb2-associated binder-1
Gly	Glycin
Grb2	growth factor receptor binding protein 2
GTP	Guanidin-Tri-Phosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
Ig-D	Immunglobulin-ähnliche Domäne
JÜR	Jahresüberlebensrate
KGF	keratinocyte growth factor
KGFR	keratinocyte growth factor receptor
LK	Lymphknoten
LMM	Lentigo-maligna-Melanom

MAP-Kinase	mitogen activated protein-kinase
MAR	mouse-anti-rabbit
MEK1/2	MAP/ERK-Kinasen ½
Met.(n)	Metastase(n)
MIA	melanoma inhibitory activity
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
MM	Malignes Melanom
MVD	microvessel density
NaOH	Natronlauge
n.s.	nicht signifikant
NZN	Nävuszellnävus
NMM	noduläres malignes Melanom
PCR	polymerase chain reaction
PCR-RFLP	polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PLC-γ	Phospholipase C-gamma
PTB	(phosphotyrosine binding)-Bindungsmotiv
PTK	Proteintyrosinkinase
pTNM	p, postoperativ; T, Tumor; N, Lymphknotenbefall; M, Fernmetastasen
PTP	Proteintyrosinphosphatase
RAM	rabbit-anti-mouse
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen je Minute
SCF	stem-cell-factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLN	Sentinel-Lymphknoten
SH2	src-homology 2-Domäne

SHC	SH2-domain containing
SH3	(src-homology 3)-Domäne
SOS	son of sevenless
SNT-1/FRS2	suc1-associated neurotrophic factor target 1/FGF-Rezeptor Substrat 2
SPSS	Superior Performance Software System
SSM	Superfiziell spreitendes malignes Melanom
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Temed	N,N,N´N´-Tetraethylmethyldiamin
TGF	transforming growth factor
TK1/2	Tyrosinkinase-Domäne
Ulz.	Ulzeration
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Vgl.	Vergleich

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1:** Schätzung der altersspezifischen Inzidenz 2002
- Abbildung 1.2:** Altersverteilung nach Geschlecht
- Abbildung 1.3:** Clark-Level
- Abbildung 1.4:** Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Tumordicke
- Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung der Proteinphosphorylierung
- Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung der RTK-Familien
- Abbildung 1.7:** Strukturmerkmale und Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen
- Abbildung 1.8:** Ras/Map-Kinasen-Mehrkomponentensignalkaskade
- Abbildung 1.9:** Schematische Darstellung von FGFR
- Abbildung 2.1:** Darstellung der Allelverteilung mit Hilfe einer PCR-RFLP
- Abbildung 3.1:** Immunhistochemische Darstellung von FGFR4
- Abbildung 3.2:** Verteilung der verschiedenen Farbintensitäten als Ausdruck der FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.3:** Prozentuale Verteilung der FGFR4-positiven Melanomzellen
- Abbildung 3.4:** Gefäßdichte (MVD = microvessel density) in Melanomen und FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.5:** Immunhistochemische Darstellung der MVD (microvessel density) mit Anti-CD-31
- Abbildung 3.6:** Immunhistochemische Darstellung der Proliferationsrate mit Ki-67
- Abbildung 3.7:** Anzahl primärer Melanome in Abhängigkeit von der FGFR4-Expression
- Abbildung 3.8:** Metastasierung in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.9:** Ulzeration in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.10:** Prozentuale Verteilung der drei Genotypen (I)
- Abbildung 3.11:** Prozentuale Verteilung der drei Genotypen (II) nach Zusammenfassung der homo- und heterozygoten Mutante
- Abbildung 3.12:** FGFR4-Expression in Abhängigkeit von der Allelverteilung

- Abbildung 3.13:** Gefäßdichte (MVD = microvessel density) in Melanomen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Abbildung 3.14:** Tumordicke in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus in malignen Melanomen
- Abbildung 3.15:** Clark-Level in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Abbildung 3.16:** Clark-Level II + III im Vergleich zu Clark-Level IV + V in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Abbildung 3.17:** Verhältnis der histologischen Melanom-Subtypen im Zusammenhang mit dem FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Abbildung 3.18:** UICC-pTNM-Staging in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.19:** AJCC-pTNM-Staging in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.20:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Overall-Survival) in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.21:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Disease-free-Survival) in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.22:** Überlebensstatus in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression
- Abbildung 3.23:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Overall-Survival) in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Abbildung 3.24:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Disease-free-Survival) in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Abbildung 3.25:** Überlebensstatus in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1.1:** Stadieneinteilung von malignen Melanomen nach dem pTNM-Staging-System der AJCC
- Tabelle 2.1:** Patientendaten und Stadieneinteilung
- Tabelle 3.1:** Durchschnittliches Alter zum Diagnosezeitpunkt und FGFR4-Expression
- Tabelle 3.2:** Intensität der Färbung als Ausdruck der FGFR4-Proteinexpression
- Tabelle 3.3:** Intensität der Färbung in Melanomen und Tumorstaging pTNM (UICC)
- Tabelle 3.4:** Intensität der FGFR4-Färbung in Melanomen und Überlebenszeit sowie Disease-Free-Survival
- Tabelle 3.5:** Prozentuale Verteilung der FGFR4-positiv gefärbten Melanomzellen innerhalb der Tumore
- Tabelle 3.6:** Prozentuale Verteilung der FGFR4-positiv gefärbten Melanomzellen und Tumorstaging pTNM (UICC)
- Tabelle 3.7:** Prozentuale Verteilung der FGFR4-positiv gefärbten Melanomzellen und Überlebenszeit sowie Disease-Free-Survival
- Tabelle 3.8:** Gefäßdichte (MVD = microvessel density) in Melanomen und FGFR4-Proteinexpression
- Tabelle 3.9:** Durchschnittliche Gefäßanzahl (CD-31) in Abhängigkeit von der FGFR4-Expression
- Tabelle 3.10:** Durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (Ki-67) in Abhängigkeit von der FGFR4-Expression
- Tabelle 3.11:** Klinische Variablen in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression in malignen Melanomen
- Tabelle 3.12:** Pathologische Variablen in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression in malignen Melanomen
- Tabelle 3.13:** Prozentuale Verteilung der drei Genotypen (I)
- Tabelle 3.14:** Prozentuale Verteilung der drei Genotypen (II) nach Zusammenfassung der homo- und heterozygoten Mutante
- Tabelle 3.15:** FGFR4-Expression in Abhängigkeit von der Allelverteilung

- Tabelle 3.16:** Durchschnittliche Gefäßanzahl (CD-31) in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Tabelle 3.17:** Gefäßdichte (MVD = microvessel density) in Melanomen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Tabelle 3.18:** Durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (Ki-67) in Melanomen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus
- Tabelle 3.19:** Klinische Variablen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus in malignen Melanomen
- Tabelle 3.20:** pTNM-Tumor-Stadien in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression
- Tabelle 3.21:** FGFR4-Expression in Melanomen in Assoziation mit dem Gesamt- und dem rezidivfreien Überleben
- Tabelle 3.22:** FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus in Melanomen in Assoziation mit dem Gesamt- und dem rezidivfreien Überleben

1. Einleitung

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellt Krebs die zweithäufigste Todesursache in den Industrieländern dar. Alle malignen Neoplasien der Haut zusammen sind dabei die häufigsten Krebserkrankungen der Menschheit (Hall *et al.*, 1999, Pons und Quintanilla 2006). Eingeteilt werden sie einerseits in den „weißen“ oder „hellen“ Hautkrebs, wie Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome und andererseits in den „schwarzen“ Hautkrebs, die malignen Melanome (gr. *melan*, schwarz; gr. *-om*, Geschwulst). Letztere wurden bereits von Hippokrates (460-370 v. Chr.) als so genannte „Melasmata“ beschrieben.

1.1 Das maligne Melanom

Das Melanom ist ein hochmaligner Tumor, der zu 90% aus den pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten hervorgeht und zu 10% in der Uvea des Auges, der Schleimhautmukosa oder den Meningen entsteht. Die ausgesprochen hohe Malignität wird durch die frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierungstendenz erklärt. Melanomzellen können, sobald die Basalmembran durchbrochen ist, rasch in die dünnwandigen Lymphspalten und Blutgefäße der Dermis eindringen und in anderen Geweben Tochtergeschwülste bilden (Moll, 2005). Im Stadium der Metastasierung zählt das maligne Melanom zu den aggressivsten und tödlichsten Tumoren überhaupt (Garland *et al.*, 2003; Tucker und Goldstein, 2003; Berwick *et al.*, 2005). Insbesondere konnten in den letzten Jahren und Jahrzehnten kaum Verbesserungen in der konservativen Therapie erzielt werden. Die Prognose (siehe unten) für Melanome in fortgeschrittenen Stadien ist daher mit einer 5-Jahresüberlebens-Wahrscheinlichkeit von 3% nach wie vor sehr schlecht.

1.1.1 Epidemiologie – Inzidenz

In Deutschland werden 3% aller bösartigen Neubildungen und 1% aller Krebstodesfälle dem malignen Melanom zugeschrieben. Im Schnitt erkranken in der

Bundesrepublik Deutschland 13.700 Menschen an einem kutanen malignen Melanom. Davon sind ca. 7.700 Frauen und ca. 6.000 Männer. Abbildung 1.1 zeigt eine Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland für das Jahr 2002 (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, 2006). Die Altersverteilung der Melanompatienten zeigt einen Altersgipfel zum Diagnosezeitpunkt der Erkrankung zwischen 50 und 60 Jahren, der Median liegt bei m/w = 53,9/53,7 Jahren (Abbildung 1.2, Tumorregister München; Schmidt und Hölzel 2000). Dabei wird deutlich, dass auch junge Patienten zu einem nicht unbeträchtlichen Teil betroffen sind.

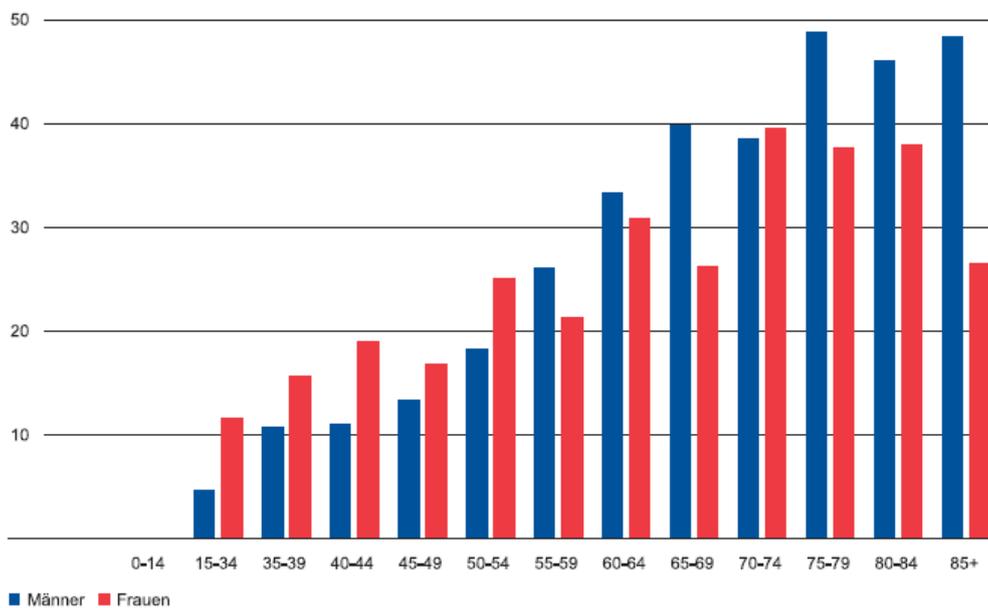


Abbildung 1.1: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2002 (Neuerkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen). * Quelle: Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006.

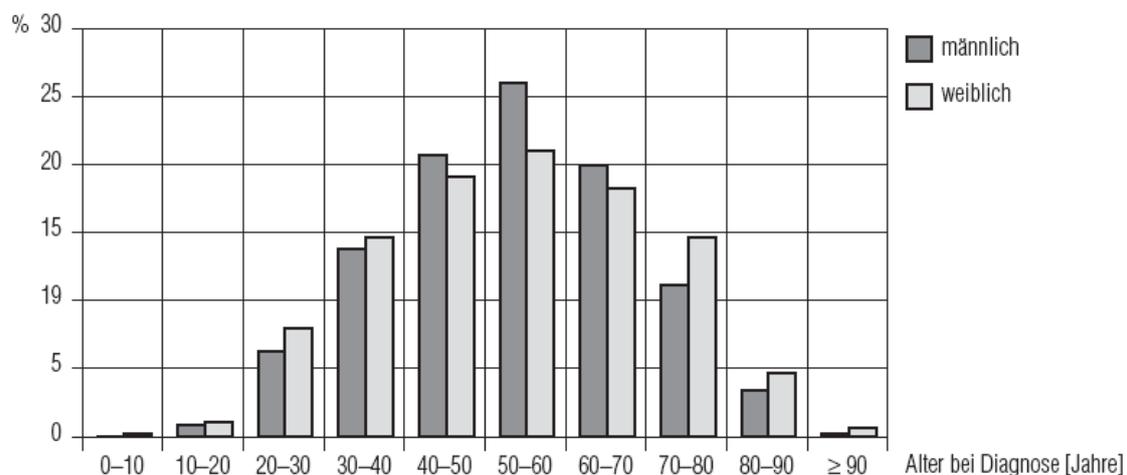


Abbildung 1.2: Altersverteilung nach Geschlecht.* Quelle: Schmidt M. und Hölzel D. (2000) Klinisch epidemiologische Daten zum malignen Melanom aus dem Bereich des Tumorregisters München. *Manual Maligne Melanome*: 2-6.

In den letzten drei Jahrzehnten hat die Diagnose „malignes Melanom“ massiv zugenommen. 1970 waren es noch 3/100.000 Einwohner pro Jahr, 1990 bereits 10-12/100.000, während es in Mitteleuropa mittlerweile ca. 16/100.000 Einwohner sind (Garbe und Blum, 2001). Betrachtet man dagegen die Sterblichkeitsrate, hat sich diese seit den 70er Jahren kaum verändert. Allerdings werden zunehmend Melanome mit geringerer Tumordicke, also in prognostisch günstigeren Stadien, und vermehrt *In-situ*-Melanome diagnostiziert (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, 2006).

1.1.2 Ätiologie

Ultraviolette Strahlung gilt als wichtigster karzinogener Faktor für das maligne Melanom, wobei eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bisher nicht evaluiert werden konnte. Geographische Verteilungen der Melanominzidenz bestätigen jedoch seine Rolle in der Melanom-Entstehung. So zeigt sich innerhalb Europas ein deutliches Nord-Süd-Gefälle, wobei die höchste Inzidenz in den skandinavischen Ländern zu finden ist, während sie in den mediterranen Ländern am niedrigsten liegt (Garbe und Blum, 2001; Jones 1992). Eine weitere Bestätigung ergibt sich bei der Betrachtung verschiedener Hauttypen. Dunkelhäutige und asiatische Menschen erkranken sehr selten an Melanomen und eine Zunahme der Inzidenz ist bei ihnen nicht zu verzeichnen (Gilchrest, 1999; Kalder, 1988; Gloster, 2006). Insbesondere scheint ein keltischer Hauttyp (Lichttyp I und II, rote Haare, blasse Haut, viele Sommersprossen sowie grüne und blaue Augen) für die Entwicklung von Melanomen prädisponiert zu sein (Garbe 1995). Als besonders risikoreich gelten Sonnenbrände in der Kindheit und der Pubertät. Australische Studien belegen, dass hellhäutige Menschen, die vor der Pubertät immigriert sind, eine entsprechend höhere Neigung zur Entstehung von Melanomen entwickeln als die einheimischen Aborigines. Bei Einwanderung nach Abschluss der Pubertät bleibt hingegen das geringere Restrisiko des Heimatlandes bestehen (Fritsch, 2001; Longstreth, 1988). Des Weiteren spielt das in den letzten Jahrzehnten veränderte Freizeit- und Reiseverhalten und damit einhergehend die vermehrte Sonnenexposition eine große Rolle (Walter, 1999).

Da maligne Melanome nicht nur *de novo* auf gesunder Haut entstehen, sondern sich auch aus bestehenden Pigmentmalen entwickeln, sind besonders große und eine

hohe Anzahl an **Nävuszellnävi** (NZN), insbesondere kongenitale und dysplastische Formen, mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert.

Des Weiteren scheint eine genetische Disposition mit familiärer Häufung zu bestehen, wobei ein polygener Erbgang vermutet wird.

Kontroverse Diskussionen werden bezüglich anderer Faktoren geführt, wie beispielsweise virale, medikamentöse oder chemische Karzinogene oder der Einfluss von Geschlechtshormonen und Schwangerschaften.

Obwohl demnach einige Risikofaktoren, an einem malignen Melanom zu erkranken bekannt sind, bleiben die Mechanismen der Pathogenese weiterhin ungeklärt.

1.1.3 Klinische Subtypen

Bei malignen Melanomen handelt es sich um pigmentierte Tumore, deren Farbspektrum von grau über rosa bis tiefbraun und blauschwarz reicht. Durch eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit in horizontaler und vertikaler Richtung sowie sekundäre Veränderungen wie Ulzerationen, Verkrustungen und Regression, entwickeln sich in Farbe und Form völlig unterschiedliche Tumore (Moll, 2005). Es gibt allerdings auch die sehr seltenen, pigmentfreien **amelanotischen malignen Melanome** (AMM, s. unten), die aufgrund des fehlenden Melanins differentialdiagnostisch große Schwierigkeiten bereiten können. Lokalisiert sind Melanome meist im Bereich der Extremitäten und des Rumpfes. Ausnahmen sind hier das **Lentigo-maligna-Melanom** (LMM, s. unten), welches meist im Gesicht auftritt, und das **akrolentiginöse maligne Melanom** (ALM, s. unten), welches im Bereich der Akren, also an den Händen, Füßen, Ohren oder der Nase vorkommt.

Aufgrund ihres klinischen Aussehens und der bevorzugten Lokalisation sowie unterschiedlicher histologischer Bilder können maligne Melanome in folgende Formen unterschieden werden (Moll, 2005; Fritsch, 2003; Sterry, 2004):

Superfiziell spreitendes malignes Melanom (SSM, Häufigkeit 65%)

Das superfiziell spreitende Melanom stellt mit einem Anteil von etwa zwei Dritteln aller Melanome den häufigsten Subtyp dar. Charakteristisch ist die zunächst relativ langsame horizontale Ausbreitungstendenz innerhalb der Epidermis, wobei sich später auch sekundär knotige Anteile bilden können, die dann einem vertikalen

Wachstum entsprechen. Das SSM imponiert typischerweise als unregelmäßig begrenzte, asymmetrische Makula mit in der Regel unterschiedlicher Pigmentierung (blaugrau, rot, hellbraun, dunkelbraun, schwarz). Bisweilen entstehen durch Tumorregression auch pigmentfreie Areale. Meistens sind Menschen um das 50. Lebensjahr betroffen. Wegen seines zunächst langsamen horizontalen Wachstums besteht bei rechtzeitig operativer Entfernung eine gute Heilungschance.

Primär **noduläres malignes Melanom** (NMM, Häufigkeit 20%)

Das noduläre maligne Melanom bildet sich in einem Fünftel aller Melanomfälle aus. Diese Tumorart entsteht meist *de novo* auf gesunder Haut oder durch die Entwicklung aus einem Muttermal vom Typ des Nävuszellnävus. Das Alter der betroffenen Menschen liegt bei durchschnittlich 55 Jahren. Anders als das SSM, wächst die noduläre Variante rasch in vertikaler Richtung und durchbricht somit relativ schnell die dermoepidermale Grenze. Das NMM ist meist braun bis blauschwarz pigmentiert und zeigt eine hohe Neigung zu Blutung und Ulzerationen. Durch das vertikale und aggressivere Wachstumsverhalten bilden sich schneller Metastasen aus, weswegen es eine relativ schlechte Prognose aufweist.

Lentigo-maligna-Melanom (LMM, Häufigkeit 10%)

Die Lentigo maligna ist primär eine gutartige pigmentierte Hautveränderung, die aufgrund eines chronischen Lichtschadens entsteht. Sie äußert sich in flachen, unregelmäßig, eventuell auch unscharf begrenzten und inhomogen braun bis schwarz pigmentierten Makulae. Die Lentigo maligna kann über Jahre unverändert bestehen bleiben. Sie kann aber auch in eine bösartige Wachstumsform übergehen, dem Lentigo-maligna-Melanom (LMM). Dieser Melanom-Typ tritt bevorzugt in den UV-Licht exponierten Hautarealen und daher meist im Gesicht auf. Das oft scharf begrenzte LMM liegt im Hautniveau und hat eine milchkaffee- bis dunkelbraune Färbung mit schwarz pigmentierten Anteilen. Mit ungefähr 10 Prozent ist dies ein eher seltenes Melanom, welches bevorzugt bei Menschen über 60 Jahre auftritt. Wegen des zunächst langsamen horizontalen Wachstums entspricht die Prognose in etwa der des SSM.

Akrolentiginöses malignes Melanom (ALM, Häufigkeit 5%)

Das akrolentiginöse maligne Melanom (ALM) ist der bei dunkelhäutigen Menschen am häufigsten vertretene Melanom-Subtyp. Der Wortteil "akr" bedeutet an den Extremitäten, oder an der Spitze und „Lentigo“ bedeutet pigmentiertes Mal. Das ALM kommt vorwiegend an der Leistenhaut, also den Handinnenflächen und Fußsohlen, aber auch im Bereich der Schleimhäute sowie an Ohren und Nase vor. Bei hellhäutigen Menschen macht diese, hauptsächlich bei Älteren (über 65 Jahre) vorkommende Melanomart in etwa fünf Prozent aller Melanome aus. Das ALM ähnelt in seinem klinischen und histologischen Bild dem Lentigo-maligna-Melanom, wächst jedoch wesentlich aggressiver in vertikaler Richtung, wobei es ähnlich dem NMM die Haut infiltriert. Wegen seines relativ schnellen Wachstums und den oft schlecht einsehbaren und unzugänglichen Lokalisationen, wie den Schleimhäuten oder Fußsohlen, wird es meist erst spät diagnostiziert und hat daher eine sehr schlechte Prognose.

Amelanotisches malignes Melanom (AMM, sehr selten)

Beim amelanotischen malignen Melanom (AMM) handelt es sich um eine sehr seltene Variante des nodulären malignen Melanoms. Die Zellen haben ihre Fähigkeit, Pigment zu bilden, verloren, wodurch die klinische Diagnose oft schwer zu stellen ist und erst histologisch gesichert werden kann. Das AMM wird daher oft zu spät entdeckt und ist mit einer entsprechend schlechten Prognose des Patienten behaftet.

1.1.4 Diagnostik

Bei auffällig pigmentierten Hautveränderungen dient zur ersten differentialdiagnostischen Einschätzung die sogenannte ABCDE-Regel:

A:	Asymmetrie (in ein oder zwei Spiegelachsen)
B:	Begrenzung (unscharf, unregelmäßig)
C:	Farbe (engl. "Colour"; inhomogen, mehrfarbig)
D:	Durchmesser > 5 mm
E:	Erhabenheit (Knotenbildung in einer primär flachen Makula)

Weitere klinische Untersuchungsmethoden sind die Auflichtmikroskopie (Syn.: Dermatoskopie) und die sonographische Messung der Tiefenausdehnung und der Tumordicke. Liegen eine oder mehrere Kriterien der ABCDE-Regel und/oder

Verdachtskriterien in der Dermatoskopie vor, sollte eine Exzisionsbiopsie der Hautveränderung und dessen histologische Beurteilung vorgenommen werden. Bei der histologischen Begutachtung gibt es zwei Kriterien, die zur Bestimmung des Tumor-Stadiums verwendet werden: der Clark-Level und die Tumordicke nach Breslow in Millimetern. Daraus ergeben sich die entsprechenden Therapiemaßnahmen und die Prognoseeinschätzung für die Patienten. Der **Clark-Level** (CL) beschreibt die Eindringtiefe des Melanoms in die unterschiedlichen Hautschichten.

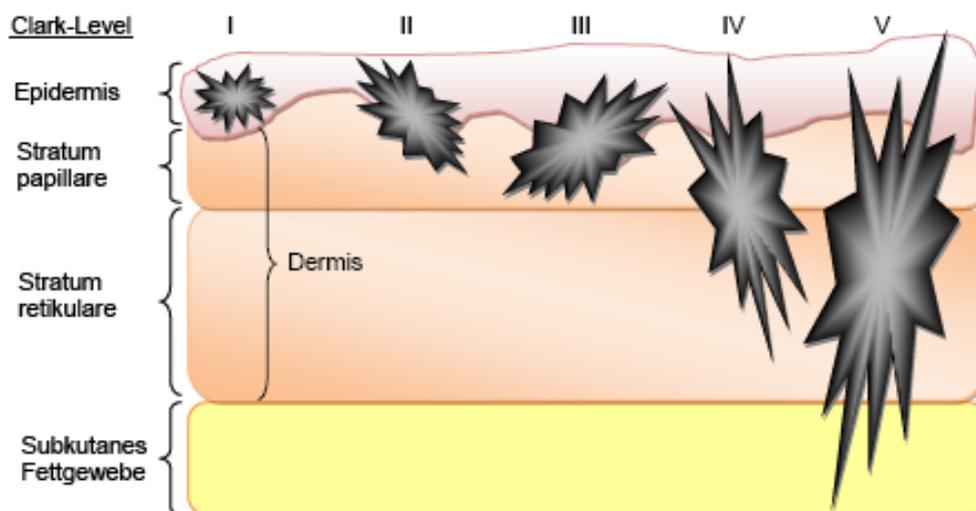


Abbildung 1.3: Eindringtiefe eines Melanoms in die unterschiedlichen Hautschichten nach Clark („Clark-Level“).

Eine stärkere Aussagekraft in Bezug auf Stadium und Prognose hat allerdings die vertikale Tumordicke nach Breslow (mm; Breslow, 1970; Garbe 1997), welche sich für die Stadieneinteilung durchgesetzt hat. Die Dicke wird mittels eines Okularmikrometers am Mikroskop, ausgehend von der Tumoroberfläche oder des Stratum granulosum bis zur am tiefsten gelegenen Melanomzelle ausgemessen. Tabelle 1.1 zeigt die davon abhängige pTNM-Stadieneinteilung nach dem **American Joint Committee on Cancer** (AJCC; Kim *et al.*, 2002), in der zudem noch das Vorliegen von Ulzerationen und Metastasen berücksichtigt wird.

Tabelle 1.1: Stadieneinteilung von malignen Melanomen nach dem pTNM-Staging-System der AJCC.

pTNM-Staging (AJCC)		10-JÜR
T1:	≤ 1 mm a: ohne Ulz., b: mit Ulz. o. CL IV o. V	0: Tis, N0, M0 1a: T1a, N0, M0 97%
T2:	1,01-2,0 mm a: ohne Ulz., b: mit Ulz.	1b: T1b, T2a, N0, M0 90% IIa: T2b, T3a, N0, M0 67%
T3:	2,01-4,0 mm a: ohne Ulz., b: mit Ulz.	IIb: T3b, T4a, N0, M0 43% IIc: T4b, N0, M0 28%
T4:	> 4,0 mm a: ohne Ulz., b: mit Ulz.	IIIa: T1-4b, N1a/2, M0 28% IIIb: T1-4b, N1a-N2c, M0 19%
N1:	eine LK-Met. a: Mikro-Met., b: Makro-Met.	IIIc: T1-4b, N1b-N3, M0 19%
N2:	2-3- LK-Met.(n) a: Mikro-Met.(n), b: Makro-Met.(n) c: In-transit/Satelliten-Met.(n) ohne LK-Met.(n)	IV: jedes T, jedes N, M1 3%
N3:	≥ 4 LK-Met.(n), Satelliten-Met.(n)	
M1:	Fernmet.(n)	

pTNM = p, postoperativ; T, Tumordicke; N, Lymphknotenbefall; M, Fernmetastasen; AJCC, American Joint Committee on Cancer; 10-JÜR, 10-Jahresüberlebensrate; CL, Clark-Level; LK-, Lymphknoten; Met.(n), Metastase(n); Ulz., Ulzeration

An die diagnostische und gleichzeitig therapeutische Exzision schließen sich noch weitere bildgebende Verfahren wie Sonographie, konventionelle Röntgen-Diagnostik, Computer- und Magnet-Resonanz-Tomographie an, um das Staging, also die Stadieneinteilung zu vervollständigen.

Ein weiteres wichtiges Verfahren zur Detektion eines regionären Lymphknotenbefalles, insbesondere von Mikrometastasen stellt die Bestimmung des Wächterlymphknotens oder Sentinel-Lymphknotens (SLN) dar. Die vom Tumorgebiet drainierte Lymphe erreicht in der dazugehörigen Lymphknotenstation einen vorgeschalteten ersten Lymphknoten („Sentinel“, Vorposten) und erst daraufhin die übrigen. Ist der SLN frei von Mikrometastasen, sind mit großer Wahrscheinlichkeit auch die nachgeschalteten Lymphknoten tumorfrei. Ist der SLN befallen, wird in der Regel eine operative Ausräumung, eine sogenannte Lymphknotendisektion der entsprechenden Lymphknotenstation vorgenommen (Fritsch, 2003).

In der serologischen Diagnostik haben sich der Nachweis der Marker S100 und MIA (*melanoma inhibitory activity*) etabliert. Beim Vorliegen eines Melanoms beziehungsweise großer Tumormassen wie Metastasen sind oft beide Proteine nachweisbar (Bossert *et al.*, 1997). Zur Screening-Methode sind diese Marker allerdings nicht geeignet, da sie meist erst bei ausgeprägter Tumorlast erhöht sind (Fritsch, 2003). Aus diesem Grund jedoch kann S100 gut zur Verlaufskontrolle verwendet werden (Jackel *et al.*, 1999).

1.1.5 Therapie

Um ein endgültiges Therapiekonzept einzuleiten, muss ein exaktes Tumorstaging erfolgen. Als kurativer Ansatz gilt beim Primärtumor und bei solitären Metastasen die operative Exzision mit entsprechend großem Sicherheitsabstand. Dieser beträgt bei In-situ-Melanomen 0,5 cm, bei Tumoren < 2 mm 1 cm und bei Melanomen mit einer Tumordicke > 2 mm 2 cm. Bei klinisch nicht eindeutiger Diagnose erfolgt zunächst eine Exzisionsbiopsie, das heißt eine Exzision *in toto* mit geringem Sicherheitsabstand. Bestätigt sich mikroskopisch der Verdacht auf ein Melanom, muss innerhalb von drei Monaten eine Nachexzision mit entsprechendem Sicherheitsabstand erfolgen. Der operative Eingriff reicht von primärer Defektdeckung über plastische Korrekturen mit Hauttransplantaten oder Lappenplastiken bis zu (Teil-) Amputationen bei akraler Lokalisation des Melanoms. Eventuell schließt sich an die Operation eine adjuvante Immuntherapie mit Interferon- α oder Interleukin-2 bei entsprechend hohem Metastasierungsrisiko an.

Bei positivem Sentinel-Lymphknoten (SLN, s. 1.1.4) erfolgt eine Lymphknotendissektion.

Beim Vorliegen von Metastasen kommen Chemotherapeutika in Form von Monotherapien wie Dacarbazin (DTIC, alkylierendes Imidazolderivat), Temozolomid oder Fotemustin (Nitrosoureaderivat) und Paclitaxel zum Einsatz sowie Mehrfachkombinationen aus Platinabkömmlingen (Cis- und Carboplatin) und Vincaalkaloiden (Vindesin, Vincristin und Vinblastin), wie beispielsweise im DVP-Schema (DTIC, Vindesin, Cisplatin). Die Ansprechrate auf diese Chemotherapeutika ist allerdings mit maximal 20% äußerst gering und besitzt meist nur palliativen Charakter.

Darüber hinaus wird, oft in Kombination mit Chemotherapie, ionisierende Strahlung eingesetzt. Sie wird vor allem bei Hirnmetastasen und bei Knochenmetastasen durchgeführt, jedoch ebenfalls meist mit nur palliativem Ansatz. Bei solitären Hirnmetastasen hat sich die stereotaktische Bestrahlung (γ -Knive) bewährt.

In experimenteller Erprobung befinden sich derzeit Tumorvakzinierungen mit polyvalenten oder melanomspezifischen Antigenen (Fritsch, 2001; Sterry, 2004).

1.1.6 Prognose

Die Prognose wird oft in Form der 10-*Jahresüberlebensrate* (10-JÜR) ausgedrückt (Tabelle 1.1). Diese variiert von 97% in Stadium Ia bis 3% in Stadium IV. Die Prognose richtet sich also nach der Ausdehnung des Tumors (Tumordicke in mm, Clark-Level und Ulzeration, Abbildung 1.4) und der Metastasierung. Des Weiteren besitzt auch die Lokalisation des Primärtumors eine prognostische Aussagekraft, da eine Ausbreitung über die Lymphwege an Rumpf und Kopf zu vielen Seiten erfolgen kann und folglich mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Demgegenüber streuen maligne Melanome an den Extremitäten zunächst in die axillären oder in die inguinalen Lymphknotenstationen. Dem Sentinel-Lymphknoten (SLN) oder Wächterlymphknoten kommt ebenfalls eine wichtige prognostische Rolle zu, da die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit (5-JÜR) unabhängig von der Tumordicke bei negativem SLN deutlich günstiger ist als bei positivem SLN (Moll, 2005; Fritsch, 2003, Sterry, 2004).

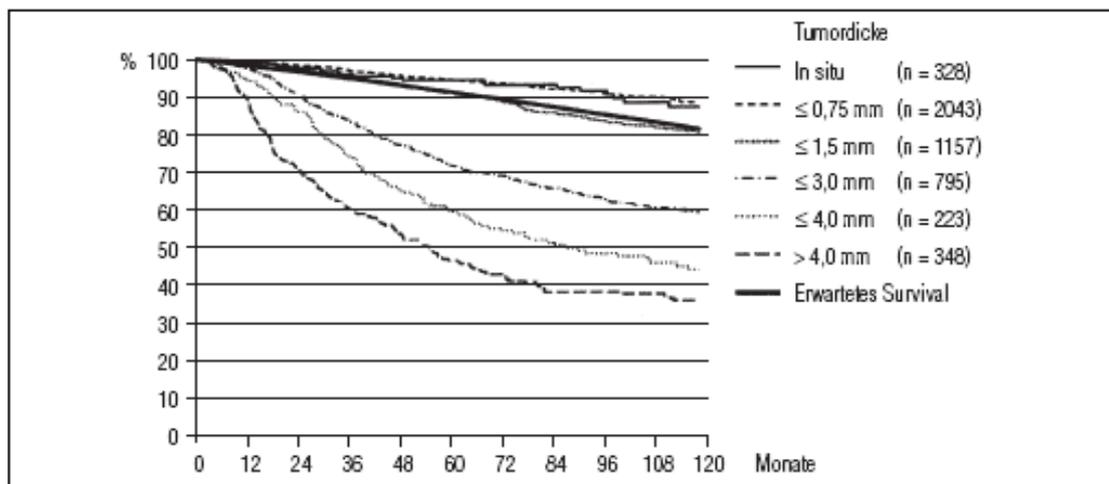


Abbildung 1.4: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Tumordicke (* Quelle: Schmidt M. und Hölzel D. (2000) Klinisch epidemiologische Daten zum malignen Melanom aus dem Bereich des Tumorzentrums München. *Manual Maligne Melanome*: 2-6).

1.2 Rezeptortyrosinkinasen

Um das komplexe Zusammenspiel von Zellen innerhalb eines multizellulären Organismus zu ermöglichen, muss jede Zelle die Fähigkeit besitzen, sich mit ihrer direkten Nachbarschaft oder mit weiter entfernten Zellen und Organen zu verständigen. Somit werden Signale von den Zellen ausgesendet und empfangen,

auf die sie mit entsprechenden intrazellulären Prozessen reagieren, um wichtige Vorgänge wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Apoptose, aber auch Zellmotilität, Zellmigration, Adhäsion und Metabolismus zu steuern. Solche Signale werden dabei häufig durch Botenstoffe ausgelöst, die löslich oder membrangebunden die dazugehörigen Rezeptoren auf Zelloberflächen aktivieren. Das System der **Rezeptortyrosinkinasen** (RTK) gilt dabei als eine der Hauptklassen solcher Oberflächenrezeptoren, die über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität verfügen und damit eine extrazelluläre Signalübertragung ins Zellinnere auslösen (van der Geer *et al.*, 1994).

Einer der wichtigsten Mechanismen dieser intrazellulären Signalübermittlung ist die reversible Phosphorylierung, also die Übertragung von Phosphatgruppen aus **Adenosin-Tri-Phosphat** (ATP) auf die Aminosäure Tyrosin, aber auch auf Serin und Threonin durch entsprechende Proteinkinasen (Hunter und Sefton, 1980; Hunter, 1995). Das Prinzip besteht darin, dass bestimmte Proteine durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung aktiviert oder inaktiviert werden. Kontrolliert wird dieser Vorgang durch zwei Proteinklassen, die sowohl membranständig als auch intrazellulär vorkommen und in einem ausgewogenen Zusammenspiel die Tyrosinphosphorylierung kontrollieren: **Proteintyrosinkinasen** (PTKn) übertragen dabei Phosphatgruppen auf Tyrosinreste und **Proteintyrosinphosphatasen** (PTPn) entfernen diese wieder von den Tyrosinresten (Sun und Tonks, 1994; Streuli, 1996; Abbildung 1.5).

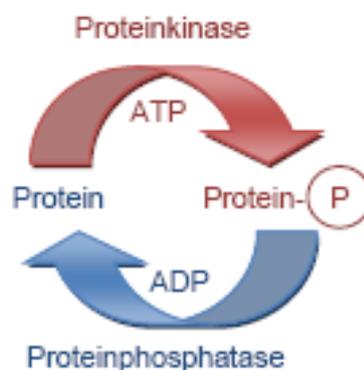


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung.

1.2.1 Aufbau von Rezeptortyrosinkinasen

Die Familie der RTKs besteht aus mehr als 50 bekannten Transmembranproteinen, die alle einen ähnlichen Aufbau aus drei aufeinander folgenden Anteilen aufweisen. Dem extrazellulär gelegenen glykosylierten N-terminalen Anteil folgt eine hydrophobe helikale Transmembrandomäne, welche die Verbindung zum zytoplasmatischen C-terminalen Anteil darstellt, der das aktive Zentrum enthält. Die Ligandenbindung erfolgt an der extrazellulären Domäne, so dass diese aufgrund der Spezifität zu den verschiedenen Liganden die größten strukturellen Ausprägungen innerhalb der verschiedenen Mitglieder der RTKs aufweist.

Diese strukturellen Unterschiede der extrazellulären Domäne dienen als Grundlage zu einer Klassifizierung der mehr als 50 bekannten RTKs in 20 Unterfamilien, welche in Abbildung 1.6 dargestellt sind (van der Geer *et al.*, 1994; Blume-Jensen und Hunter, 2001). Als Beispiel sei hier auf die Mitglieder der FGFRn (*fibroblast growth factor-Rezeptoren*) hingewiesen, die in ihrem extrazellulären Bereich drei Immunglobulin-ähnliche Schleifen und die sogenannte Acid-Box aufweisen.

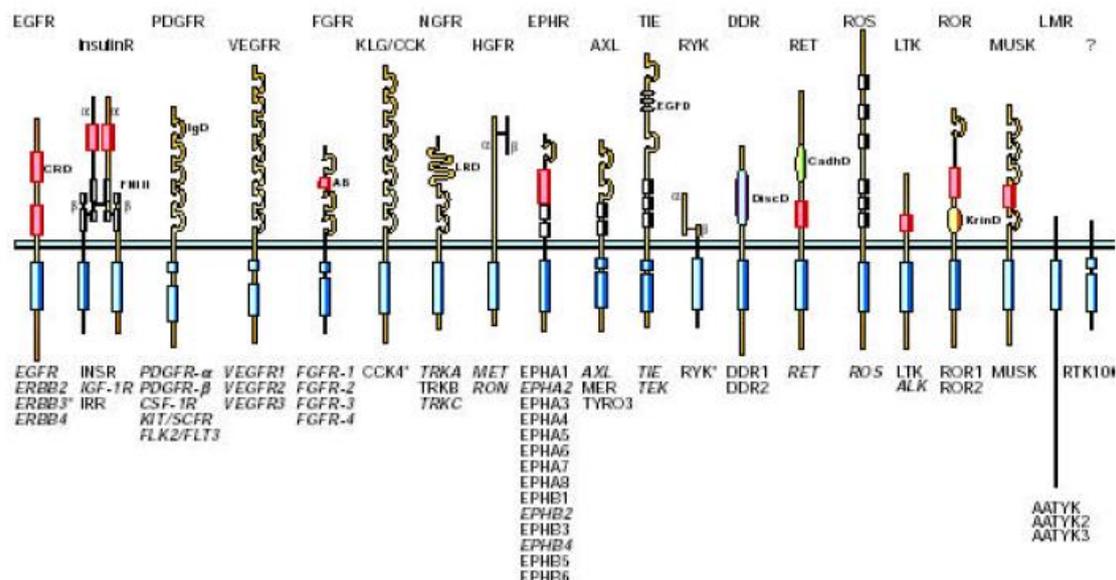


Abbildung 1.6: Einteilung der Rezeptortyrosinkinasen in 20 Unterfamilien auf Grund von Sequenzvergleichen der extrazellulären Domäne (Blume-Jensen und Hunter, 2001).

Die intrazellulären Anteile, die aus einer Juxtamembranregion, der Tyrosinkinasedomäne und dem C-terminalen Bereich bestehen, besitzen deutlich weniger Unterschiede in ihrem Aufbau als die extrazellulären Domänen (Ullrich und Schlessinger, 1990). Die konservierte aus circa 250-300 Aminosäuren aufgebaute

und ATP-Bindungsstellentragende Kinasedomäne stellt das aktive Zentrum dar. Nach extrazellulärer Ligandenbindung katalysiert sie über eine ATP-vermittelte Autophosphorylierung des Rezeptors die Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen Substrate innerhalb der Zelle (Yarden und Ullrich, 1988). Der wenig konservierte C-terminale Anteil der RTKs weist in der Regel mehrere Autophosphorylierungsstellen und hochspezifische Substratbindungsmotive auf, womit sich weitere Funktionen der RTKs definieren lassen.

1.2.2 Aktivierung von Rezeptortyrosinkinase (RTK)

Ausgelöst wird die Signaltransduktion durch die extrazelluläre Bindung eines Liganden an seinen entsprechenden Rezeptor und die damit verbundene Konformationsänderung, die zu einer Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren führt. Diese induziert schließlich eine Transphosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste (Greenfield *et al.*, 1989). Die Phosphorylierungsstellen liegen dabei häufig außerhalb der katalytischen Domäne des C-Terminus und stellen daher potentielle Bindungsstellen für zytoplasmatische Proteine dar. Erfolgt eine Bindung von zytoplasmatischen Proteinen an eine tyrosinphosphorylierte Stelle, ist dies der initiale Schritt zur intrazellulären Signalkaskade (Songyang *et al.*, 1993; Abbildung 1.7).

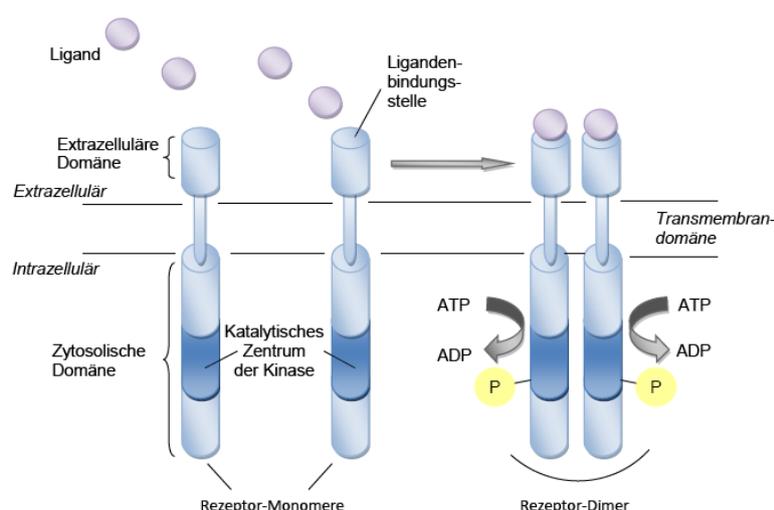


Abbildung 1.7: Allgemeine Strukturmerkmale und Aktivierung von Rezeptortyrosinkinase

Nach einer solchen Autophosphorylierung bietet dann eine zweite Konformationsänderung, nämlich die der katalytischen Domäne, die Möglichkeit,

verschiedene intrazelluläre Substratmoleküle zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Lemmon und Schlessinger, 1994; Ullrich und Schlessinger, 1990).

Neben einer solchen Liganden-induzierten Aktivierung, können RTK auch ligandenunabhängig aktiviert werden. Diese Aktivierung von Transmembranproteinen ist z.B. für PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) (Linseman *et al.*, 1995) und EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Daub *et al.*, 1996) nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nachgewiesen. Weiterhin kann schon allein die Inaktivierung von PTP (*Proteintyrosinphosphatasen*, Abbildung 1.5) ausreichen, um die Tyrosinphosphorylierung von RTK einzuleiten (Jallal *et al.*, 1992).

1.2.3 Intrazelluläre Substrate der Rezeptortyrosinkinasen

Die RTK initiieren nach ihrer Aktivierung durch spezifische Liganden intrazelluläre Signalkaskaden, wodurch die extrazellulären Signale an den Zellkern oder zellkernassoziierte Zielproteine wie Transkriptionsfaktoren weitergeleitet werden. Solche interagierenden Proteine binden dabei spezifische Phosphotyrosinreste an PTB (*phosphotyrosine binding*)-Bindungsmotiven (Kavanaugh *et al.*, 1995) oder auch an SH2 (*src-homology 2*)-Domänen (Mayer und Baltimore, 1993; Pawson, 1995). Die Selektivität dieser Zielproteine wird hierbei durch die Aminosäuren bedingt, welche die SH2- oder PTB-Domänen und das phosphorylierte Tyrosin umgeben (Songyang, 1993; van der Geer und Pawson, 1995). Viele Signalproteine besitzen weiterhin SH3 (*src-homology 3*)-Domänen, welche an prolinreiche Proteine binden können (Yu *et al.*, 1994). Bei dieser mitogenen Signalvermittlung ist das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2*) von großer Bedeutung (Lowenstein *et al.*, 1992). Mittels seiner SH2-Domäne kann Grb2 mit autophosphorylierten RTK, aber auch mit Phosphotyrosinen von anderen Adapterproteinen wie SHC (*SH2-domain containing*) und Gab1 (*Grb2-associated binder-1*) interagieren. Über seine SH3-Motive bindet Grb2 den Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (*son of sevenless*), wodurch dieser zum kleinen G-Protein Ras in der Nähe der Zellmembran wandert (Holgado-Madruga *et al.*, 1996). SOS katalysiert hierbei eine GTPase, wodurch eine Phosphatgruppenübertragung von GTP auf Ras stattfindet. Ras wird aktiviert und spielt somit eine zentrale Rolle in der mitogenen Signalantwort und der Regulation der Zellproliferation (Downard, 1997).

Für die FGF-Rezeptoren spielt unter anderem ein anderes Protein, das myristylierte, membranassoziierte SNT-1/FRS2 (*suc1-associated neurotrophic factor target 1/FGF Rezeptor Substrat 2*) eine wichtige Rolle (Wang *et al.*, 1996; Kouhara *et al.*, 1997). Sobald FGFR1 das SNT-1/FRS2 aktiviert hat, bindet Grb2 an SOS, welches wiederum Ras zum FGFR1 rekrutiert. So wird das durch FGFR1 vermittelte Signal an den Ras/MAP-Kinasen-Signalweg gekoppelt (Kouhara *et al.*, 1997).

1.2.4 Die MAP-Kinasen-Kaskade

Die hochkonservierten MAP-(*mitogen activated protein*)-Kinasen sind Bestandteile von intrazellulären Signalkaskaden, welche durch RTK, also durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren aktiviert werden. Sie vermitteln damit Informationen zwischen Zellmembran und Zellkern.

Die Grb2/SOS-vermittelte Ras-Aktivierung führt zu einer Interaktion mit der Serin-/Threonin-Kinase Raf-1 und somit zu deren Phosphorylierung (Morrison und Cutler, 1997; Barnard *et al.*, 1998). Das aktivierte Raf-1 phosphoryliert daraufhin MEK1 und MEK2 (*MAP/ERK-Kinasen 1 und 2*), also Threonin/Tyrosinkinase an speziellen Serinresten, welche dann wiederum die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (*extracellular signal regulated protein kinase 1 und 2*) aktivieren. Diese wandern schließlich in den Zellkern, phosphorylieren dort wiederum Serinreste an zahlreichen Transkriptionsfaktoren (Robinson und Cobb, 1997) und regulieren somit die Genexpression. Abbildung 1.8 zeigt eine solche Mehrkomponentenkaskade am Beispiel einer RTK-Aktivierung durch FGF (*fibroblast growth factor*) und dessen Rezeptor.

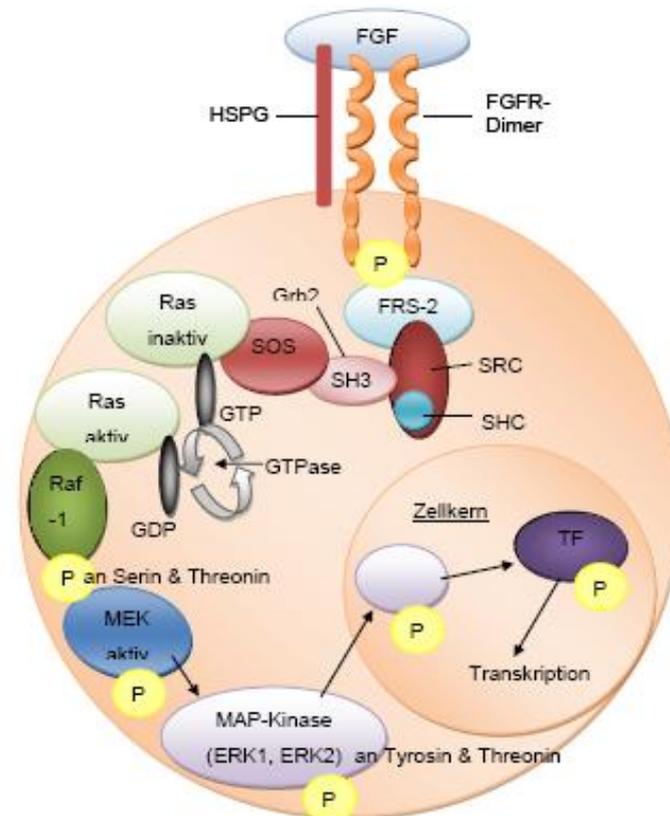


Abbildung 1.8: Ras-MAP-Kinasen-Signalweg nach Aktivierung von FGFR durch seinen Liganden FGF

1.2.5 Die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Die humanen FGF-Rezeptoren (FGFR) stellen eine Untergruppe der RTK dar. Von ihnen konnten bisher vier verschiedene Subtypen ermittelt werden (FGFR1- 4; Dionne *et al.*, 1990; Keegan *et al.*, 1991; Partanen *et al.*, 1991). Die Expression einzelner Transkripte der vier Rezeptoren erfolgt in fast allen Geweben des menschlichen Körpers, wobei auch eine Ko-Expression mehrerer Rezeptoren innerhalb eines Gewebes vorkommen kann, wie beispielsweise in Niere, Lunge und Haut (Nicola, 1994).

Innerhalb der einzelnen Rezeptoren liegt die Homologie der primären Aminosäuresequenz zwischen 55% und 72%, so dass sich die einzelnen Rezeptoren in ihrem Aufbau sehr ähnlich sind. Dieser entspricht dabei dem klassischen Aufbau der RTK und ist schematisch in Abbildung 1.9 dargestellt. Charakteristisch für die FGFR sind allerdings drei schleifenförmige extrazelluläre N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig-D1, Ig-D2 und Ig-D3), die eine typische Abfolge der Aminosäure Cystein aufweisen. Diese Cysteine bilden Disulfidbrücken aus, wodurch

die typische Gestalt der Ig-Domänen bedingt wird. Zwischen Ig-D1 und Ig-D2 findet sich die so genannte „Acid Box“, eine Anhäufung saurer Aminosäuren, wie Glutamin- und Asparaginsäure (Burke et al., 1998). Auf den aus hydrophoben Aminosäuren aufgebauten transmembranösen Teil folgt die zytoplasmatische Region mit den durch 14 Aminosäuren gespaltenen zwei katalytisch wirksamen TK1- und TK2- (*Tyrosinkinase*)-Domänen.

Zusätzliche strukturelle Unterschiede sind durch alternatives Spleißen der mRNA möglich, wodurch weitere Rezeptorformen von FGFR generiert werden können. So kann zum Beispiel Ig-D1 mit oder ohne „Acid Box“ herausgeschnitten werden. Von der zweiten Hälfte der Ig-D3 sind zwei Isoformen bekannt, die von zwei verschiedenen Exons kodiert werden. In FGFR2 kodiert Ig-D3b für KGFR (*keratinocyte growth factor receptor*) und bindet von den Liganden sowohl aFGF (*acid fibroblast growth factor=FGF1*) als auch KGF (*keratinocyte growth factor=FGF7*). Ig-D3c wird ebenfalls in FGFR2 kodiert und bindet aFGF und bFGF (*basic fibroblast growth factor=FGF2*) mit ähnlicher Affinität, nicht aber KGF. Dies sind nur Beispiele für die so entstehenden Rezeptor-Isoformen, die dadurch eine äußerst große Vielseitigkeit an möglichen Signalwegen schaffen (Champion-Arnaud et al., 1991; Miki et al., 1992). Damit können die verschiedenen Liganden gewebespezifisch unterschiedliche Funktionen ausüben, obwohl es vom Grundgerüst her nur vier identifizierte FGFR gibt.

Entscheidend für die Ligandenbindung sind Ig-D2 und Ig-D3, während Ig-D1 eher von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint (Platnikov et al., 1999, Ibrahimi et al., 2004).



Abbildung 1.9: Schematische Darstellung eines FGFR; IG = Immunglobulin-, TM = Transmembran-, JM = Juxtamembran-, TK = Tyrosinkinase-, KI = Kinasedomäne.

1.2.6 Liganden der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren

FGF (*fibroblast growth factor*) sind Polypeptide die erstmals vor etwa 30 Jahren aus Hypophysenpräparaten von Rindern nachgewiesen wurden (Armelin, 1973). Zunächst sind nur zwei der verwandten Proteine isoliert worden: der saure aFGF (*acid fibroblast growth factor*=FGF1) und der basische bFGF (*basic fibroblast growth factor*=FGF2; Johnson *et al.*, 1993; Martin, 1998; Jaye *et al.*, 1986; Abraham *et al.*, 1986). Während aFGF vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem vorkommt, wird bFGF in fast allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Mittlerweile konnten 23 Mitglieder von FGF (FGF1-23) identifiziert werden (Ornitz und Itoh, 2001; Xie *et al.*, 1999), wodurch sie die wohl größte Familie der Peptid-Wachstumsfaktoren bilden.

Eine Besonderheit von FGF besteht darin, dass sie FGFR nur in Anwesenheit des sauren Mukopolysaccharides Heparin beziehungsweise HSPG (*Heparansulfatproteoglykan*) aktivieren können (Ornitz *et al.*, 1996; Rapraeger *et al.*, 1991; Yayon *et al.*, 1991; Spivak-Kroizman *et al.*, 1994). Die Bindung zwischen FGF und Heparin/HSPG erfolgt mit relativ niedriger Affinität, während sie als Ligand-HSPG-Komplex mit FGFR mit sehr hoher Affinität agieren (Nicola *et al.* 1994; Rickwood *et al.*, 1993; Plotnikov *et al.*, 1999).

HSPG kann vom Rezeptor an einer spezifischen Heparinbindungsstelle, welche viele basische Aminosäuren besitzt, ohne Ligand gebunden werden und somit den Rezeptor allein aktivieren. Um dies zu verhindern, bindet sie saure „Acid Box“ des Rezeptors die basische Bindungsstelle und blockiert diese im Sinne einer Autoinhibition (Plotnikov *et al.*, 1999). Wenn durch alternatives Spleißen die Acid Box herausgeschnitten wird, besteht für Heparin eine höhere Bindungsaffinität zum Rezeptor und damit für diesen eine höhere Rezeptor-Aktivität, ohne dass die Ligandenmenge erhöht ist. Plotnikov *et al.* konnten in Studien zur FGF-Heparin-Rezeptor-Kristallstruktur zeigen, dass Heparin nach Bindung eines FGF eine Brücke zwischen zwei FGFR herstellt und somit zwei Rezeptormonomere dimerisiert (Plotnikov *et al.*, 2000; Schlessinger *et al.*, 2000).

Ihrer Funktion nach sind FGF an zahlreichen Prozessen von Zellen und Geweben, wie Proliferation, Adhäsion, Angiogenese und Neovaskularisation beteiligt (Burgess und Maciag, 1989; Folkman und Klagsbrunn, 1987). Mit ihrer mitogenen Aktivität spielen sie allerdings nicht nur in der Zellphysiologie eine große Rolle, sondern auch

in der Zellpathologie. Insbesondere ist dies beim Wachstum und der Motilität von Endothelzellen von Bedeutung (Burgess und Maciag, 1989; Folksman und Klagsbrun, 1987). Da beide Prozesse für die Neubildung von Blutgefäßen essentiell sind, könnte dies eine mögliche Grundlage von wachsenden Tumoren darstellen, um deren Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten.

Andererseits können FGF auch direkt als Onkogene wirksam werden und somit zur Tumorentwicklung beitragen. Belegt wird dies durch die oft erhöhte Gen-Expression von FGF in unterschiedlichen Tumoren oder erhöhten Serum-Spiegel von bFGF, wie beispielsweise bei Patienten mit akuter und chronischer myeloischer und lymphatischer Leukämie (Aguayo *et al.*, 2000; Krejci *et al.*, 2003). So wurden auch in Kaposi-Sarkomen und Magentumoren erhöhte Mengen von FGF-4 und FGF-6 (K-FGF, HAST) nachgewiesen (Taira *et al.*, 1987). FGF-5 wurde als Produkt von Tumorgenen in NIH3T3 transformierenden Zellen gefunden (Zhan *et al.*, 1989), während FGF-8b in Prostata-, Mamma- und Ovarialkarzinomen überexprimiert wird (MacArthur *et al.*, 1995).

1.2.7 Der Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 4 (FGFR4)

Vor 15 Jahren konnte aus der cDNA der Zelllinie K562 (chronisch myeloische Leukämie) der vierte FGFR kloniert werden (Partanen *et al.*, 1991), während das 11,3 kb lange FGFR4-Gen erst nach etwa sieben Jahren auf dem Chromosomenabschnitt 5q35.1qter bestimmt werden konnte (Kostrzewa und Muller, 1998). Der Rezeptor besitzt den strukturell typischen Aufbau von FGFR mit den drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig-D1-3) im extrazellulären Teil und eine zweigeteilte Kinasedomäne im zytoplasmatischen Bereich sowie die hydrophobe Transmembrandomäne. Seine Aminosäuresequenz ist zu 55% mit den zuvor identifizierten FGFR1 und FGFR2 (Dionne *et al.*, 1990) identisch. FGFR4 wird während der Fetalzeit und im Erwachsenenalter im Gastrointestinaltrakt, in den Nieren, der Milz, dem Pankreas und der Leber exprimiert, während er in großen Mengen in der Lunge vorkommt (Hughes, 1997; Partanen *et al.*, 1991). Im Kreislaufsystem findet die Expression des Rezeptors vorwiegend im Bereich der muskelzellreichen Tunica media statt (Hughes, 1996).

Dieser Rezeptor unterscheidet sich jedoch nicht nur durch sein Expressionsmuster von den anderen drei FGFR, sondern auch in seinen funktionellen Besonderheiten: Bei der Expression von FGFR1 in FGFR-negativen L6 Myoblasten von Ratten wird durch aFGF eine Tyrosinphosphorylierung von PLC γ (*Phospholipase C-gamma*), SHC, ERK-1, ERK-2 und FRS (*FGF receptor substrate*) aktiviert. Bei FGFR4-exprimierenden L6 Zellen kommt es dagegen nur zu einer äußerst schwachen oder gar keiner Stimulierung dieser Proteine (Shaoul *et al.*, 1995; Vainikka *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Zudem wachsen L6-FGFR1- und L6-FGFR2-Zellen in „Soft Agar Assays“, wenn sie darin eingebettet werden. L6-FGFR4-Zellen hingegen bilden in solch einem Weichagar keine Kolonien aus (Shaoul *et al.*, 1995).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FGFR4 allein durch die Anwesenheit von Heparin beziehungsweise HSPG aktiviert werden kann. Er stellt somit den ersten Rezeptor dar, bei dem es durch ein saures Mucopolysaccharid anstelle von Liganden zu einer Stimulation kommen kann (Gao und Goldfarb, 1995). Johnston *et al.* konnten *in vitro* belegen, dass es nach einer Stimulierung von Mammakarzinomzellen mit aFGF, nicht aber in gesunden Brustepithelien zu einem so genannten „membrane ruffling“, also einer Umlagerung im Aktin-Zytoskelett kommt, welche durch FGFR4 kontrolliert wird (Johnston *et al.*, 1995). Diese Untersuchung legt nahe, dass FGFR4 bei der Migration von Zellen eine Rolle spielt, was unter anderem bei der Metastasierung von Tumorzellen von Bedeutung ist.

In vivo wurden Untersuchungen an „Knock-out“-Mäusen durchgeführt, das heißt an Mäusen, in denen gezielt Gene ausgeschaltet wurden wie beispielsweise die für FGFR. Hierbei konnte gezeigt werden, welche Rolle FGFR in der Physiologie von Geweben spielen. Die Inhibition von verschiedenen FGFR ergab dabei unterschiedliche Ergebnisse. Die Ausschaltung von FGFR1 ist für die Mäuse mit dem Leben nicht vereinbar (Deng *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1994), während die Ausschaltung von FGFR3 zu verlängerten Knochen der Extremitäten führt. Bei einer Inhibition von FGFR4 zeigt sich lediglich ein erhöhter Cholesterinstoffwechsel bei sonst wenig verändertem Phänotyp (Yu *et al.*, 2000). Werden das FGFR3- und FGFR4-Gen allerdings ko-inhibiert, also gemeinsam ausgeschaltet, kommt es zu einer dramatisch reduzierten Alveogenese und Unreife der Lunge (Weinstein *et al.*, 1998).

Auffällig häufig ist die starke Expression von FGFR4 in Mamma-, Pankreas-, Bronchial- und Nierenkarzinomen (Jaakola *et al.*, 1993; Leung *et al.*, 1994; Penault-

Llorca *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999), was die Vermutung nahelegt, dass FGFR4 eine maßgebliche Rolle in der Genese von Tumoren und deren Progression spielt.

Die Liganden der FGF-Familie, die FGFR4 binden kann, sind: FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF4, FGF6, FGF8-b, FGF8-e, FGF8f, FGF9, FGF13, FGF16, FGF17-b, FGF18, FGF19.

1.2.8 Krankheitsentstehung durch die Fehlregulation von FGFR-Signalwegen

Tumore entstehen aus genetisch veränderten Zellen eines Ursprunggewebes (Bishop, 1991), wobei diese Zellen eine unterschiedliche Anzahl von genetischen Veränderungen haben. Dies führt letztlich zur Manifestation eines transformierten Phänotyps mit morphologischer Verwandtschaft zum ursprünglichen Gewebe, allerdings mit einem losgelösten Wachstumsverhalten von diesem (Hunter, 1997). Die Anzahl der notwendigen genetischen Alterationen für eine Tumormanifestation ist in verschiedenen Organtumoren unterschiedlich und bewegt sich nach bisherigen Schätzungen zwischen zwei und sieben (Waldmann 2002). Der Prozess der Transformation von normalen Zellen zu Tumorzellen läuft in der Regel mehrstufig ab und seine einzelnen pathophysiologischen Schritte sind im Einzelnen noch unverstanden (Vogelstein und Kinzler, 1993). Charakteristisch für maligne Tumore ist allerdings eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate, der Verlust der Kontaktinhibition und der Differenzierungsfähigkeit. Vor allem aber besitzen sie die Fähigkeit, Tochtergeschwülste in andere Organe zu setzen. Die Entstehung eines Tumors ist somit eine Schritt für Schritt entstehende Ansammlung von zellulären Fehlregulationen, welche unter anderem durch Mutationen verursacht werden können. Solche Mutationen entstehen zum Beispiel durch physikalische Noxen wie UV-Licht oder radioaktive Strahlung, durch Infektionen mit onkogenen Viren oder durch genetisch bedingte Fehler der DNA-Replikation.

Die Kontrolle des Zellwachstums wird durch Gene kontrolliert, die man wegen ihrer Funktion in zwei Hauptklassen einteilen kann: Die Tumorsuppressorgene und die Onkogene. Onkogene entstehen dabei häufig aus Mutationen von Protoonkogenen. Zu diesen Protoonkogenen gehören unter anderem Wachstumsfaktoren wie

beispielsweise FGF, Rezeptor- und zytoplasmatische Tyrosinkinase sowie Transkriptionsfaktoren (Hunter, 1991).

Wird ein Protoonkogen zu einem Onkogen aktiviert, kann dadurch die Struktur des kodierten Proteins betroffen sein, wodurch es zu einer Änderung in der Proteinaktivität kommt. Es kann aber auch eine erhöhte Expression des kodierten Proteins resultieren. Solche Proteine können RTK oder deren Liganden sein, wodurch es zu einer kontinuierlichen Aktivierung dieser Proteine kommen kann. Folglich unterliegt die Tyrosinkinaseaktivität nicht mehr der Kontrolle der Liganden. Möglich ist auch die Expression von Proteinen, wie zum Beispiel von FGFR, die von den ursprünglich benignen Zellen normalerweise nicht exprimiert werden.

1.2.9 Erkrankungen durch Mutationen in den FGFR-Genen

Die Beteiligung von RTK bei der Entstehung von Krankheiten wie neoplastischen Erkrankungen oder Fehlbildungen ist schon seit einiger Zeit bekannt. So wurde gezeigt, dass eine Genamplifikation von HER2, aber auch eine Überexpression von anderen RTK eine wichtige Rolle bei der Genese von Tumoren spielt. Somatische Mutationen, also Sequenzveränderungen, die nur in Tumorzellen zu finden sind, konnten unter anderem im TGF (*transforming growth factor*) Rezeptor II (Markowitz *et al.*, 1995) und im FGFR3 (Cappellen *et al.*, 1999; Chesi *et al.*, 1997) nachgewiesen werden.

Es gibt neben solchen somatischen Mutationen allerdings auch Mutationen der Keimbahn, die autosomal vererbte Krankheiten verursachen. Insgesamt wurden mehr als 50 verschiedene Mutationen in FGFR 1-3 gefunden, die mit Veränderungen in der ossären Entwicklung einhergehen. Am bekanntesten ist hierbei wohl ein Polymorphismus im Gen von FGFR3, bei dem in der helikalen Transmembrandomäne ein Austausch der Aminosäure Glycin gegen Arginin stattfindet. Unter dieser Mutation kommt es zum sogenannten Zwergenwuchs beziehungsweise der Achondroplasie. Pathophysiologisch führt vermutlich die stark geladene Aminosäure Arginin in der hydrophoben Transmembrandomäne zu einer verstärkten Signalweiterleitung des Rezeptors (Webster und Donoghue, 1996). Des Weiteren wurden bestimmte craniosynostotische Syndrome (Crouzon, Pfeiffer, Aspert, Jackson-White) mit Mutationen von FGFR 1 und 2 in Verbindung gebracht

(Webster und Donoghue, 1997; Wilkie *et al.*, 1995). Diese Mutationen scheinen ebenfalls eine erhöhte Signaltransduktion zu vermitteln.

In benignen Hautveränderungen, und zwar epidermalen Nävi, die angeboren sind, und seborrhoische Keratosen, sogenannte Alterswarzen, die erst in höherem Alter entstehen, konnten Punktmutationen im FGFR3 nachgewiesen werden. Die mutierte Variante des Rezeptors scheint in der Basalzellschicht der Keratinozyten zu einer gesteigerten Proliferation mit folglich Acanthose und Papillomatose zu führen, ohne dass dem ein maligner Klon oder eine chronische Entzündung zu Grunde liegt. Interessant ist hierbei, dass im Falle von epidermalen Nävi die Mutation im FGFR3 genetisch bedingt zu sein scheint, wohingegen sie bei den seborrhoischen Keratosen erst im Laufe des Lebens durch bislang unbekannte Ursachen erworben wird (Hafner *et al.*, 2006a; Hafner *et al.*, 2006b).

1.2.10 FGFR4-Gly388-Arg-388-Polymorphismus

In der Mammakarzinom-Zelllinie MDA MB 453 wurde durch Sequenzierung der cDNA in dem für FGFR4 kodierenden Gen eine Punktmutation entdeckt (Bange *et al.*, 2002). Dadurch kommt es zu einem Austausch von Guanosin gegen Adenosin an Position 1217, was in der Transmembrandomäne des Rezeptors einen Austausch der hydrophoben Aminosäure Glycin (Codon GGG) gegen die stark hydrophile Aminosäure Arginin (Codon AGG) zur Folge hat. Beim Vergleich klinischer und pathologischer Daten stellte sich heraus, dass dieser Polymorphismus mit einer schlechteren Prognose bei Mamma- und Kolonkarzinomen assoziiert ist. Weitere Untersuchungen an Prostatakarzinomen, bronchialen Adenokarzinomen und oropharyngealen Karzinomen bestätigten ein aggressiveres Verhalten der Tumore bei Vorliegen der Mutante, also zumindest eines Arg-388-Allels (Wang *et al.*, 2004; Spinola *et al.*, 2005; Streit *et al.*, 2004).

1.3 Zielsetzung: Einfluss von FGFR4 auf maligne Melanome

Der Mechanismus, der Transformation von normalen Melanozyten zu malignen Melanomzellen ist bis jetzt nur unzureichend verstanden. Es ist allerdings bekannt,

dass verschiedene Wachstumsfaktoren und ihre korrespondierenden Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Progression von Melanomen spielen (Krasagakis *et al.*, 1995; Shih *et al.*, 1994). Einer der am besten charakterisierten Aktivatoren für Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration in Melanomen ist bFGF (Bikfalvi *et al.*, 1997; Klagsbrun *et al.*, 1991). bFGF ist äußerst mitogen für Melanozyten, die in der Haut parakrin durch benachbarte Keratinozyten und Fibroblasten mit diesem Botenstoff versorgt werden (Halaban *et al.*, 1988a; Halaban *et al.*, 1988b; Root *et al.*, 1991).

Insbesondere in Kombination mit UV-Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass bFGF ein potenter Auslöser für Melanome ist (Berking *et al.*, 2001; Berking *et al.*, 2004; Berking, 2005). Im Gegensatz zu benignen Melanozyten, die bFGF selbst nicht sezernieren können, kann bFGF von Nävus- und Melanomzellen produziert werden und daher auf autokrinem Weg mit FGFR interagieren (Scott *et al.*, 1991; al-Alousi *et al.*, 1996a; al-Alousi, 1996b; Albino *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1994; Halaban *et al.*, 1988c; Halaban *et al.*, 1987; Meier *et al.*, 2003). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen nicht überleben können, wenn bFGF oder FGFR1 blockiert werden (Wang *et al.*, 1997; Graeven *et al.*, 2001; Valesky *et al.*, 2002). Weiterhin berichteten Yayon *et al.*, dass bei der Inaktivierung einer Kinase der Src-Familie ein direkter Zusammenhang zwischen unterdrückter FGFR1-Aktivität und verminderter Zellproliferation sowie dem Überleben von Melanomen besteht (Yayon *et al.*, 1997). Bis jetzt sind bFGF/FGFR1 das am besten charakterisierte ko-exprimierte Wachstumsfaktor/Wachstumsfaktorrezeptor-Paar, welches in primären und metastasierten Melanomen gefunden wurde (Wang *et al.*, 1997; Kaipainen *et al.*, 1994; Giehl *et al.*, 2007). Des Weiteren können bFGF und weitere Wachstumsfaktoren auch mit anderen FGFR-Subtypen interagieren, die für viele Krankheiten und Neoplasien verantwortlich gemacht werden.

Karzinogenesemodelle mit verschiedenen Onkogen- und Tumorsuppressorgen-Mutationen (Langley *et al.*, 1999) werden kontrovers diskutiert. Beschriebene Mutationen in den Genen von Ras, p53, p16 oder PTEN zeigen bei Melanomen nur relativ geringe Prävalenzen bezogen auf alle vorliegenden Melanomerkkrankungen (Waldmann, 2002; Weiß, 1998). Allerdings ist bekannt, dass BRAF-Mutationen in malignen Melanomen zu einer erhöhten Aktivität von BRAF-Kinasen führen können, was mit einer verstärkten ERK-Signal-Weiterleitung im Ras-MAP-Signalkaskadenweg und folglich einer erhöhten Zellproliferation verbunden ist.

Solche BRAF-Mutationen sind relativ häufig (bis zu 80%) in melanozytären Tumoren einschließlich Nävuszellnävi und Melanometastasen zu finden und ihre Ursache ist unklar, da die Mutationen keine UV-typischen Veränderungen aufweisen. (Tsavachidou *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2003; Shinozaki *et al.*, 2004).

Weiterhin sind in malignen Melanomen Mutationen in der Juxtamembran-Region von c-KIT, dem Rezeptor für SCF (*stem cell factor*) beschrieben worden. C-KIT aktiviert ebenfalls Ras-MAP-Signalwege, wobei bestimmte Mutationen zu einer Dimerisierung und damit Aktivierung der intrazellularen Kinasen führen können, ohne dass SCF vorhanden ist (Lennartsson *et al.*, 1999). Daher wird mutiertes c-KIT auch als wichtiges Onkogen in Melanomen betrachtet (Curtin *et al.*, 2006).

Durch diese für Melanome bedeutsamen Mutationen in den Signaltransduktionswegen von Ras-MAP-Kinasen wird deutlich, dass genetisch bedingte Veränderungen von Proteinen wie FGF oder FGFR, die diese Signalwege kontrollieren, bei der Entstehung oder Progression von malignen Melanomen eine Rolle spielen könnten.

In dieser Studie wurde daher in malignen Melanomgeweben der Einfluss der Protein-Expression und des Arg388-Polymorphismus von FGFR4 auf den klinischen Verlauf, beziehungsweise die Überlebenschancen von Melanompatienten untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweise

2.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Hämalaun	Fluka, Schweiz
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen
Temed (N,N,N´N´-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Proteinase	Sigma, Steinheim
Proteinase-K	Roche, Mannheim
Restriktionsenzym Mval (BstN1)	Biolabs, New England

2.1.3 „Kits“ und Sonstiges

Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel-Gläser
DNA-Längenstandards	Eurogentec, Belgien
Objektträger SuperFrost	Menzel-Gläser
Parafilm	American National Can, Chicago
PCR Beads (Ready•To•Go)	Pharmacia, Schweden

2.1.4 Stammlösungen und Puffer

Digestionspuffer	3,42 g Tris-Cl 372 mg EDTA 170 ml bidestilliertes Wasser 20 ml SDS 10% NaOH bis zur Einstellung pH 8,5
TBE	400 mM Tris 10 mM EDTA pH 8,0 890 mM Borsäure
Zitratpuffer	100 mM Zitronensäuremonohydrat pH 6,0 (NaOH) Chemicon, Tamecula, Kanada

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper:

CD-31	Maus, monoklonal	DAKO, Glostrup
FGFR4	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Ki-67	Maus, monoklonal	DAKO, Glostrup

Sekundäre und tertiäre Antikörper:

APAAP	Maus, monoklonal	DAKO, Glostrup
Maus gegen Kaninchen (MAR)	Maus, monoklonal	DAKO, Glostrup
Kaninchen gegen Maus (RAM)	Kaninchen, polyklonal	DAKO, Glostrup

2.1.6 Oligonukleotide

Sequenz	Name
- GACCGCAGCAGCGCCCGAGGCCAGGTATACG	TM(s) FGFR4
<i>Sense</i> Primer für die Amplifizierung der FGFR4	
Transmembrandomäne	
- AGAGGGAAGCGGGAGAGCTTCTGCACAGTGG	TM(as)
<i>Anti-Sense</i> Primer für die Amplifizierung der FGFR4	
Transmembrandomäne	

2.2 Patientenkollektiv

Bei den in dieser Studie verwendeten Geweben handelt es sich um 198 Formaldehyd-fixierte, in Paraffin eingebettete primäre kutane maligne Melanome, die in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München archiviert wurden. Die Gewebe stammen von Patienten, die zwischen 1993 und 1999 an einem histologisch gesicherten malignen Melanom erkrankt waren. Anhand einer zusammengestellten Datenarchivierung des Tumorregisters München konnten die Gewebeproben nach speziellen Kriterien ausgewählt werden (s. unten). Eine Zusammenfassung der Patientendaten und deren Einteilung in die pTNM-Tumor-Stadien nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer) und AJCC (American Joint Committee on Cancer) sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Die Kohorte bestand aus 93 weiblichen und 105 männlichen Patienten, deren durchschnittliches Alter zum Diagnosezeitpunkt 65 Jahre (23-93 Jahre) betrug. Das Alter der weiblichen Patienten lag im Durchschnitt bei 68 Jahren (26-92 Jahre), das der männlichen Patienten bei 62 Jahren (23-93 Jahre). Der Nachsorgezeitraum betrug im Schnitt 59 Monate (2-141 Monate).

In das Kollektiv wurden primäre kutane maligne Melanome eingeschlossen, die bei einer relativen dünnen Tumordicke bereits metastasiert hatten und/oder tumorbedingt zum Tod des Patienten geführt hatten. Im Gegensatz dazu wurden auch relativ dicke Melanome eingeschlossen, die zu keiner Metastasierung und keiner eingeschränkten Überlebenszeit führten.

Von den 198 Patienten hatten 121 keine Metastasen (pTNM Stadium 1 und 2). Von den 77 Patienten mit Metastasen hatten 42 lokal kutane Metastasen (pTNM Stadium 3a) oder einen regionalen Befall von Lymphknoten (pTNM Stadium 3b) und 35 hatten Fernmetastasen (pTNM Stadium 4).

Tabelle 2.1: Patientendaten und Stadieneinteilung nach dem pTNM-Staging-System der UICC und der AJCC.

Patienten	n = 198	
<i>Geschlecht</i>		
männlich	105 (53%)	
weiblich	93 (47%)	
<i>Alter</i>		
zum Diagnosezeitpunkt	65 Jahre (23-93 Jahre)	
männlich	62 Jahre (23-93 Jahre)	
weiblich	68 Jahre (26-92 Jahre)	
<i>Diagnosezeitraum</i>	1993-1999	
<i>Nachsorgezeitraum</i>	59 Monate (2-141 Monate)	
<i>pTNM-Staging (UICC, n = 198)</i>		
T1: ≤ 0,75 mm	0: Tis, N0, M0	0 (0%)
T2: 0,76-1,5 mm	Ia: pT1, N0, M0	57 (29%)
T3a: 1,51-3,0 mm	Ib: pT2, N0, M0	20 (10%)
T3b: 3,01-4,0 mm	IIa: pT3, N0, M0	34 (17%)
T4a: > 4 mm oder CL V	IIb: pT4a, N0, M0	10 (5%)
T4b: Satelliten-Met.(n) 2 cm vom Tumor	IIIa: pT4a/ 4b, N1, M0	29 (15%)
N1: LK-Met.(n) ≤ 3 cm	IIIb: jedes pT, N1/ N2, M0	13 (6%)
N2a: LK-Met.(n) > 3 cm	IV: jedes pT, jedes N, M1	35 (18%)
N2b: In-transit-Met.(n)		
N2c: LK- > 3 cm & In-transit-Met.(n)		
M: Fernmet.(n)		
<i>pTNM-Staging (AJCC, n = 139)</i>		
T1: ≤ 1 mm	0: Tis, N0, M0	0 (0%)
a: ohne Ulz., b: mit Ulz. oder CL IV/V	Ia: T1a, N0, M0	39 (28%)
T2: 1,01-2,0 mm	Ib: T1b, T2a, N0, M0	18 (13%)
a: ohne Ulz., b: mit Ulz.	IIa: T2b, T3a, N0, M0	12 (8%)
T3: 2,01-4,0mm	IIb: T3b, T4a, N0, M0	13 (9%)
a: ohne Ulz., b: mit Ulz.	IIc: T4b, N0, M0	5 (4%)
T4: > 4,0 mm	IIIa: T1-4b, N1a/2, M0	11 (7%)
a: ohne Ulz., b: mit Ulz.	IIIb: T1-4b, N1a-N2c, M0	18 (13%)
N1: eine LK-Met	IIIc: T1-4b, N1b-N3, M0	5 (4%)
a: Mikro-Met., b: Makro-Met.	IV: jedes T, jedes N, M1	22 (16%)
N2: 2-3- LK-Met.(n)		
a: Mikro-Met.(n), b: Makro-Met.(n)		
c: In-transit/Satelliten-Met.(n)		
ohne LK-Met.(n)		
N3: ≥ 4 LK-Met.(n), Satelliten-Met.(n)		
M1: Fernmet.(n)		

pTNM= p, postoperativ; T, Tumor; N, Lymphknotenbefall; M, Fernmetastasen; UICC, Union Internationale Contre le Cancer; AJCC, American Joint Committee on Cancer; CL, Clark-Level; LK-, Lymphknoten; Met.(n), Metastase(n); Ulz., Ulzeration

2.3 Immunhistochemische Untersuchungen an Melanomgeweben

Bei immunhistochemischen Färbungen nutzt man die Fähigkeit von Antikörpern aus, spezifische Antigene in einem Gewebe zu binden und diese durch geeignete Farbstoffe sichtbar zu machen. Die Gewebe sollten dabei möglichst schonend behandelt werden, damit die physiologischen Strukturen und Zellen für die mikroskopische Auswertung erhalten bleiben. Da bei der Aufbereitung der

Gewebeschnitte, insbesondere bei der Antigen-Denaturierung („Antigen-Retrieval“) durch zu starkes Kochen, die Schnitte in ihrer Struktur verändert werden können, wurden zusätzlich **Hämatoxylin-Eosin**-(HE)-Färbungen angefertigt. Somit konnten die Tumore und deren umgebendes Gewebe besser beurteilt werden.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach der **alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase**- (APAAP-) Methode durchgeführt. Für die verschiedenen Primärantikörper (Anti-FGFR4, Ki-67, Anti-CD-31) wurde in mehreren Versuchsreihen die geeignetste Verdünnung getestet. Dabei stellte sich für alle Antikörper die Verdünnung von 1:100 in FCS/Tris 12,5% (FCS, *fetal calf serum*; Tris, *Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer*) als am besten heraus.

Die histologische Auswertung der Färbungen wurde an einem Lichtmikroskop (Axilloskop, Leica) vorgenommen. Bei der Beurteilung der Gefäßdichte und den Mikroulzerationen wurden zunächst die HE-gefärbten Schnitte verwendet. Die Gefäßdichte wurde jeweils im Zentrum und an den Rändern der Tumore bestimmt und im Vergleich zur gesunden Umgebung in geringe, mittlere und hohe Dichte eingeteilt. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die Gefäßdichte zusätzlich in einer Stichprobe von 17 Geweben mit dem Gefäßmarker CD-31 ermittelt. Des Weiteren wurde die Proliferationsrate der Melanomzellen in Assoziation zur Expression von FGFR4 untersucht. Hierbei wurde ebenfalls eine Stichprobe von 17 Geweben verwendet, die mit dem Proliferationsmarker Ki-67 angefärbt wurden. Die Auswertung für CD-31 und Ki-67 erfolgte bei 200-facher Vergrößerung bei einer durchschnittlichen Anzahl von 5 Gesichtsfeldern.

2.3.1 Aufbereitung der Paraffinschnitte

Von den in Paraffin eingebetteten Geweben wurden mit einem Mikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem etwa 40°C warmen Wasserbad geglättet und dann auf Objektträger aufgezogen wurden. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte in zwei Schritten mit Xylol für jeweils 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte in einer absteigenden Serie Isopropanol (100%, 96%, 80% und 70%) für je 4 Minuten rehydriert und einmal in destilliertem Wasser (Aqua_{dest}) gewaschen. Im histologischen Labor der Klinik für Dermatologie und Allergologie wurden zur genaueren histologischen Beurteilung und

Charakterisierung ebenfalls von allen Gewebeproben Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbungen angefertigt.

2.3.2 Ermittlung der FGFR4-Protein-Expression

Die Proteinexpression von FGFR4 wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen FGFR4 ermittelt. Die Denaturierung der Antigene für FGFR4 erfolgte je nach Qualität der aufgezogenen Schnitte durch 20- bis 30-minütiges Kochen in einer Mikrowelle bei 700 Watt in Zitratpuffer bei pH 6,0 (Chemicon IHC Select, Temecula, Kanada). Anschließend kühlten die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur ab. Für jeweils 4 Minuten folgte eine zweimalige Waschung mit Tris-Puffer. Unspezifische Bindungen wurden durch 20-minütige Inkubation mit FCS/Tris 20% blockiert. Nach dieser Inaktivierung wurde der Primär-Antikörper Anti-FGFR4 in einer Verdünnung mit FCS/Tris 12,5% von 1:100 auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur über Nacht statt.

Nach der Inkubation des Primärantikörpers erfolgte eine zweimalige Waschung mit Tris-Puffer für je 4 Minuten. Dieser Waschschrift wiederholte sich nach allen weiteren unten aufgeführten Inkubationsschritten der verschiedenen Antikörper. Der Sekundärantikörper (*mouse-anti-rabbit*, MAR) wurde mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten in einer Verdünnung mit FCS/Tris 12,5% von 1:100 und der Tertiärantikörper (*rabbit-anti-mouse*, RAM) in einer Verdünnung von 1:20 für 30 Minuten auf die Schnitte aufgebracht. In einem letzten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem APAAP-Antikörper für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:50.

Als Substrat des APAAP-Antikörpers wurde zur Darstellung der Rezeptoren Fast-Red verwendet. Um eine Überfärbung mit Fast-Red zu vermeiden, wurde unter mikroskopischer Kontrolle zwischen 6 und 20 Minuten inkubiert. Diesmal erfolgte die Waschung dreimal mit Tris-Puffer. Die Gegenfärbung wurde mit Hämalaun für 2 Minuten durchgeführt. Dieser Farbstoff wurde dreimalig mit warmem Leitungswasser und zum Schluss mit bidestilliertem Wasser (Aqua_{Dest}) abgespült. Das Eindecken der Objektträger mit Deckgläsern erfolgte mit einer in einem Wasserbad aufgewärmten Kaisers-Glyceringelatine (~150 µl/Objektträger).

2.3.3 Ermittlung der Proliferationsrate

Die Proliferationsrate wurde durch Färbung der Melanomschnitte mit Ki-67 ermittelt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte mit FCS/Tris 12,5% in einer Verdünnung von 1:100. Die einzelnen Färbeschritte entsprachen denen von FGFR4 (2.3.2) mit Ausnahme des Sekundärantikörpers. Dieser entsprach dem Tertiärantikörper *Rabbit-anti-Mouse* (RAM) wie in 2.3.2 beschrieben.

2.3.4 Ermittlung der Gefäßdichte

Die Gefäßdichte wurde durch Färbung der Melanomschnitte mit Anti-CD-31-Antikörpern ermittelt. Zur Detektion von CD-31 erfolgte das „Antigen Retrieval“ durch 10-minütigen Verdau mit Proteinase (P8038, SIGMA, Steinheim, Germany). Danach wurden die Objektträger dreimal mit destilliertem Wasser (Aqua_{Dest}) gewaschen. Es folgte wie in 2.3.2 beschrieben eine zweimalige Waschung mit Tris-Puffer. Der Anti-CD-31-Antikörper wurde in einer Verdünnung mit FCS/Tris 12,5% von 1:100 auf die Objektträger gegeben. Die weiteren Inkubationszeiten und Waschschriffe entsprachen denen von Ki-67 (2.3.3).

2.4 Analyse des FGFR4-Allels in Melanomgeweben

In dieser Arbeit wurde ein Gewebekollektiv von 198 malignen Melanomen auf einen Polymorphismus in der Transmembrandomäne des FGFR4 mit Hilfe von PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) analysiert. Die für die Genotypisierung verwendeten Gewebeproben wurden aus paraffineingebetteten Melanomen aufbereitet und in mehreren DNA-Isolierungsschritten (Aufreinigung, Verdau, Phenol- und Ethanol-fällung) hergestellt (siehe Kapitel 2.4).

2.4.1 Isolierung genomischer DNS aus paraffineingebetteten Geweben

2.4.1.1 Entparaffinierung

Zur Isolierung genomischer *Desoxyribonukleinsäure* (DNS) wurden von den in Paraffin eingebetteten Geweben mit einem Mikrotom 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Zwischen den verschiedenen Proben wurden die Instrumente und das Mikrotom mit Ethanol 100% gereinigt, um eine Kreuz-Kontamination zu vermeiden. Die Schnitte wurden jeweils in einem 1 ml großen Reaktionsgefäß aufbewahrt. Alle folgenden Pipettierschritte erfolgten mit gestopften Spitzen, um Verunreinigungen der Gewebeproben möglichst gering zu halten. Die Extraktion der Proben begann mit der Entparaffinierung durch Xylol. Dafür wurde jedes Reaktionsgefäß mit 1 ml Xylol gefüllt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf einem Schütteltisch inkubiert. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei Raumtemperatur mit 14.000 rpm (*rotation per minute*) wurde das Gewebe pelletiert und das überstehende Xylol abpipettiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Zur Entfernung des Lösungsmittels wurden jeweils 500 µl Ethanol in absteigenden Konzentrationen (100%, 90% und 70%) dazu gegeben und durch Pipettieren wieder abgenommen. Die Trocknung der Proben erfolgte anschließend für 60 Minuten in einem Heizblock bei 55°C.

2.4.1.2 Digestion, Phenol- und Ethanol-fällung

Die getrockneten Proben wurden jeweils mit 140 µl Digestions-Puffer und 150 µg/ml Proteinase-K versetzt und über Nacht bei 55°C im Heizblock inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase-K erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation bei 95°C im Heizblock. Auf den Verdau folgte am nächsten Tag die Phenolfällung, wobei zu jeder Probe 150 µl Phenol und 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gegeben wurden. Die Proben wurden für 1 Minute gut gemischt (Vortex) und dann für 10 Minuten bei 14.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die klare obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dieser Schritt wiederholte sich noch zweimal. Nach drei Durchläufen der Phenolfällung folgte zur Dehydrierung der Proben eine Ethanol-fällung. Dabei wurden zu der klaren Phase 16 µl Natrium-Acetat und 400 µl Ethanol 100% gegeben und diese bei -80°C über Nacht

gelagert. Die Proben wurden dann für 30 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das verbliebene rötliche Pellet, die DNS, wurde je nach Pelletgröße mit 20-100 µl destilliertem Wasser resuspendiert und bei 4°C gelagert.

2.4.2 PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (PCR-RFLP)

Durch den Guanidin/Adenosin-Austausch (siehe Kapitel 1.2.10) entsteht ein zusätzliches Erkennungsmotiv für das Restriktionsenzym MvaI im FGFR4-Gen. Dadurch wird es möglich, die PCR-RFLP-Methode anzuwenden. Aufgrund der hohen Anzahl durchgeführter Polymerase-Ketten-Reaktionen (*polymerase-chain-reaction*, PCR) und um mögliche Überkreuzungsreaktionen zu vermeiden, wurden Ready•To•Go™ PCR-Beads (Pharmacia Uppsala, Schweden) verwendet. Diese enthalten für eine 25 µl PCR-Reaktion alle nötigen Reagenzien, außer Primer und DNS. Bei einem Endvolumen von 25 µl enthielt jeder Ansatz:

1,5 U	Taq-DNS-Polymerase
10 mM	Tris-HCl pH9.0
50 mM	KCl
1,5 mM	MgCl ₂
200 µM	je dNTPs (dGTP, dATP, dCTP und dTTP)

Zu diesem Ansatz wurden gegeben:

2 µl	DNS
0,5 µl	Strang („sense“)-Oligomer
0,5 µl	Gegenstrang („anti-sense“)-Oligomer
22 µl	Aqua _{bidest}

Als Negativkontrolle wurde anstelle der DNS 2 µl Aqua_{bidest} verwendet. Die Synthesereaktion fand in einem Thermocytometer „Progen“ der Firma Techne (Cambridge, Großbritannien) statt. In diesem Gerät ist eine Deckelheizung integriert,

so dass zum Schutz vor Verdampfung kein Mineralöl nötig ist. Für die PCR-Reaktionen wurde folgender Reaktionszyklus verwendet:

Erste Denaturierung:	3 Minuten	95°C
Amplifikation 35 Zyklen:	45 Sekunden	72°C
	45 Sekunden	94°C
Letzte Synthese (Amplifikation):	5 Minuten	72°C

Nach Beendigung der PCR-Amplifikation wurde der gesamte Ansatz mit dem Restriktionsenzym MvaI (5E/25µl) versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die dabei entstandenen Produkte des Restriktionsverdau wurden bei 260 V auf einem Polyacrylamidgel über eine Laufzeit von vier Stunden aufgetrennt. Acrylamid ist ein Monomer, das zu langen Ketten polymerisiert. Bei Zugabe von Methylbisacrylamid werden diese Ketten quervernetzt. Das Verhältnis von Methylbisacrylamid zu Acrylamid lag bei 1:3. Nach Zugabe von 1/250 **Ammoniumperoxodisulfat** (APS) 10% und 1/1000 **N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin** (TEMED) wurde die Polymer-Lösung (16,5 ml Methylbisacrylamid 2%; 33,3 ml Polyacrylamid 30% und 5,5 ml 10 x **TRIS-Borat-EDTA-Puffer**, TBE) zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandhalter getrennt waren. Die Größe der linearisierten DNS-Fragmente wurde im Vergleich mit einem Längenstandard (1kb DNS-Leiter, Gibco) ermittelt. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Die aufzutrennende DNS wurde mit 1/5 Volumen eines 6-fachen Laufpuffers (TBE) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 190-270 Volt innerhalb von 3-4 Stunden. Nach 10-minütigem Färben in einer Ethidiumbromidlösung (etwa 12 µl/l einer Stocklösung von 10 mg/ml in 1 x TBE-Puffer) konnten die DNS-Banden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht ($\lambda=302\text{nm}$) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters fotografiert (Polaroid 667) werden.

Im Fall des Wildtyp-Gly388-Allels zeigten sich zwei Schnittstellen, deren amplifizierter Abschnitt mit dem Restriktionsenzym in drei Fragmente der Längen 20, 37, 109 bp endonukleolytisch aufgespalten wurde (Abbildung 3.10: Gly/Gly= G/G). Die mutierte Arg-388-Allel Variante hingegen zeigte drei Schnittstellen für das Restriktionsenzym, wodurch Fragmente mit den Längen 20, 29, 37 und 80 bp sichtbar wurden (Abbildung 3.10. Arg/Arg = A/A). Daraus ergibt sich, dass im Falle einer

Heterozygotie insgesamt fünf Banden sichtbar wurden, da die beiden Fragmente 20 bp und 37 bp bei beiden Allelen vertreten waren (Abbildung 2.1; Gly/Arg = G/A).

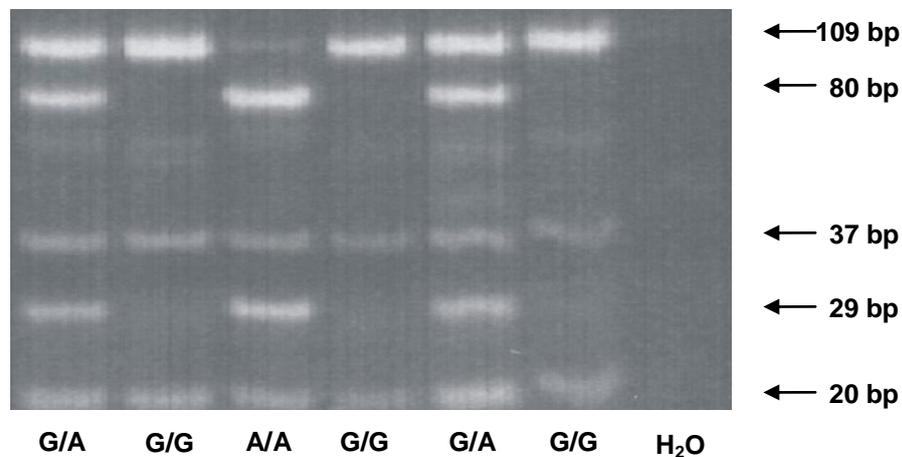


Abbildung 2.1: Darstellung der Allelverteilung mit Hilfe einer PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*). G/G = homozygote Allelverteilung des Wildtyps Gly/Gly; G/A = heterozygote Allelverteilung der Mutante Gly/Arg; A/A = homozygote Allelverteilung der Mutante Arg/Arg.

2.5 Statistik

Für die Erfassung der Daten wurde Microsoft Excel 2003 auf dem Betriebssystem Microsoft Windows XP verwendet. Die statistische Auswertung der erfassten Daten erfolgte mit den Statistik-Programmen SPSS 12.0 (Superior Performance Software System, München, Deutschland), WinStat (R. Fitch Software, Staufen, Deutschland) und MedCalc (MedCalc Software, Belgien). Da die Fallzahl der homozygoten FGFR4-Arg388-Allele (Arg/Arg) relativ klein war, wurden sie für die Auswertung mit den heterozygoten FGFR4-Arg388-Allelen (Gly/Arg) in einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst. Zur Erfassung der Assoziationen zwischen der Expression von FGFR4 und dem Vorliegen zumindest eines Arg388-Allels im Vergleich mit klinischen und pathologischen Variablen wurde der Pearson'sche Chi-Quadrat-Test verwendet. Univariate Überlebensanalysen der Kaplan-Meier-Methode wurden mit einer Log-Rank Statistik verglichen. Die Signifikanz wurde für alle verwendeten Testverfahren mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 198 Gewebeproben von Patienten mit histologisch gesichertem malignem Melanom der Haut untersucht. Die Untersuchung der Gewebe erfolgte immunhistochemisch auf die Proteinexpression des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors-4 (FGFR4) und mit Hilfe einer Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP-PCR) auf eine Punktmutation im FGFR4-Gen im Codon 388. Die hierbei erhobenen Daten wurden mit klinischen und pathologischen Parametern verglichen und auf mögliche Assoziationen hin untersucht.

3.1.1 FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen

Bei der immunhistochemischen Auswertung der Melanomgewebe wurde die Intensität der Färbung, wie in anderen Publikationen bereits beschrieben (Hughes 1996; Janot *et al.*, 1995; Dellacono *et al.*, 1997, Streit *et al.*, 2004), in eine schwache „+“, eine mittlere „++“ und eine starke „+++“ Expression eingeteilt. War keine FGFR4-Expression nachweisbar, wurde der Schnitt mit „0“ bewertet.

Die Melanome wiesen insgesamt eine unterschiedlich stark ausgeprägte zytoplasmatische FGFR4-Expression auf. Die Zellkerne wurden nicht angefärbt. Manche Melanome zeigten interhalb des Tumors eine unterschiedlich stark ausgeprägte Expression (Abbildung 3.1), was die Auswertung etwas erschwerte. In solchen Fällen wurden die Schnitte jeweils der überwiegend vorliegenden Farbtintensität zugeordnet.

Von den 198 in Paraffin eingebetteten malignen Melanomen konnten immunhistochemisch insgesamt 137 Gewebe auf ihre FGFR4-Proteinexpression untersucht werden. In 44% der Fälle (61/137) zeigte sich innerhalb der Melanome eine positive Färbung für FGFR4. Eine sehr starke Expression („+++“) von FGFR4 wurde in 4 Fällen (3%; Abbildung 3.1 C) gefunden, während 51 Tumore (37%) eine mittlere („++“; Abbildung 3.1 D) und 6 Tumore (4%) eine schwache („+“) Farbtintensität aufwiesen. Trotz der gelegentlich heterogenen Farbverteilung innerhalb der Melanome (Abbildung 3.1 E), war keine erhöhte Expression zum

Beispiel im Bereich der Infiltrationsfront des Tumors oder am Rand von Ulzerationen und Nekrosen nachweisbar. Von den 137 auswertbaren Melanomen zeigten 76 (56%) keine FGFR4-Expression („0“; Abbildung 3.1 A).

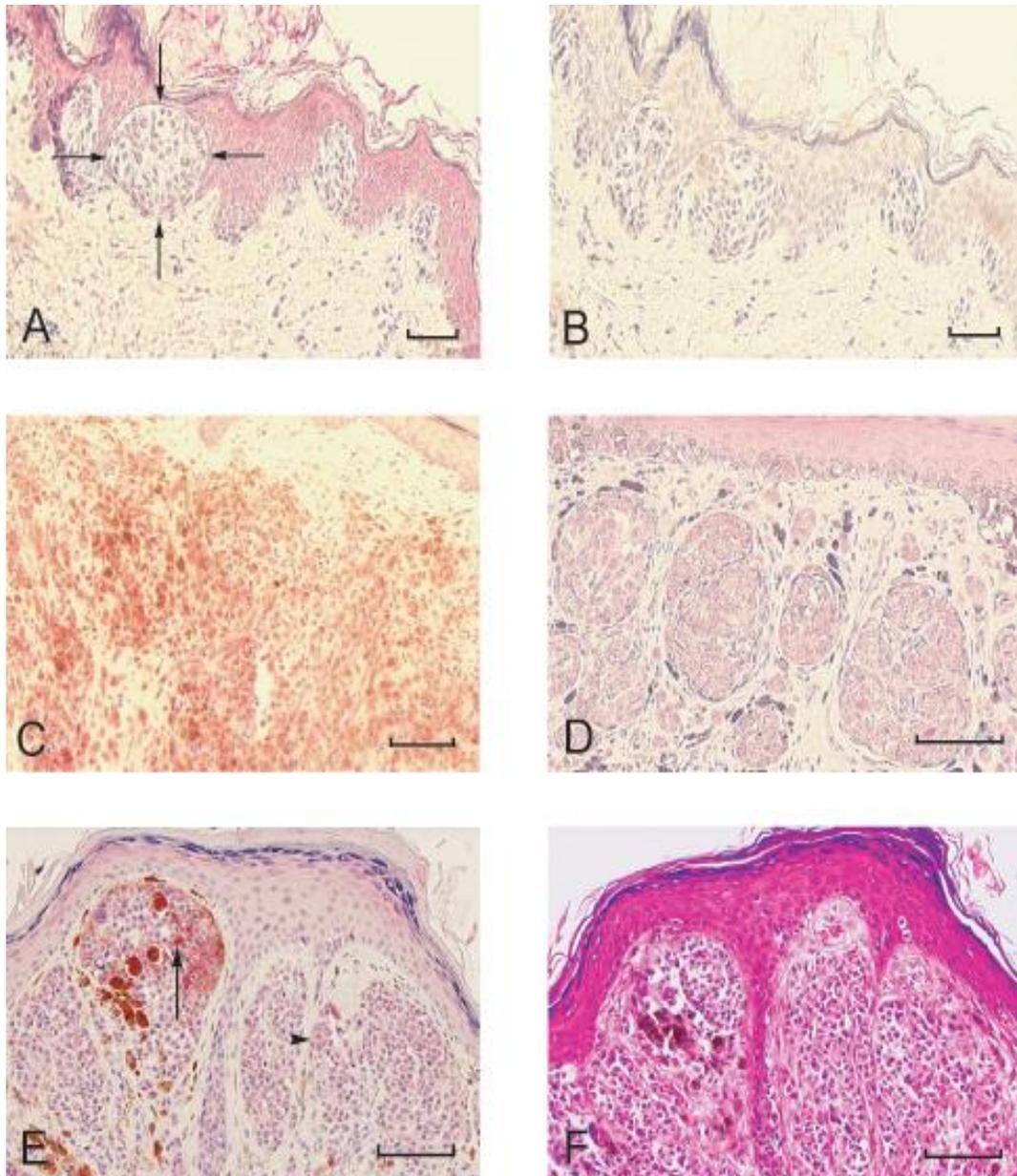


Abbildung 3.1: (A) „0“ keine FGFR4-Expression in einem superfiziell spreitenden Melanom (SSM). (B) Negativ-Kontrolle von A. (C und D) FGFR4-Protein-Expression (rot) in einem nodulären malignen Melanom (NMM) mit starker Intensität „+++“ (C) und mittlerer Intensität „++“ eines SSM (D). (E) Expression von FGFR4 in einem NMM mit starker Intensität (Pfeil) und mittlerer Intensität (Pfeilkopf). (F) HE-gefärbter Schnitt von E

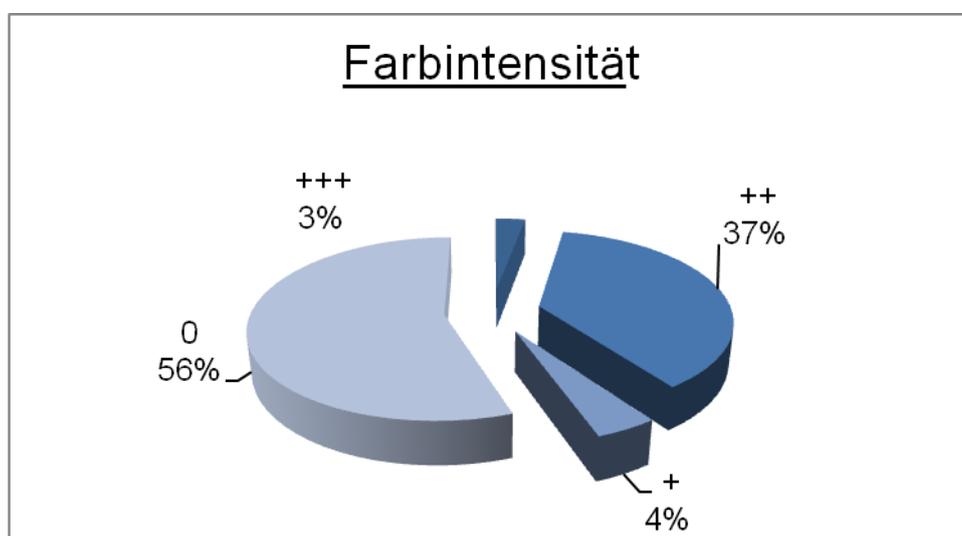
Die unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Expressionsmuster ist in der folgenden Abbildung und Tabelle aufgezeigt (Abbildung 3.2 und Tabelle 3.2).

Tabelle 3.1: Durchschnittliches Alter zum Diagnosezeitpunkt in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression

	<i>FGFR4-positiv</i>	<i>FGFR4-negativ</i>
<i>Alter zum Diagnosezeitpunkt</i>	66,2	61,6

Tabelle 3.2: Intensität der immunhistochemischen Färbung als Ausdruck der FGFR4-Proteinexpression in Melanomgeweben

<i>Farbintensität</i>	„+++“	„++“	„+“	„0“	<i>n</i>
<i>n</i>	4	51	6	76	137
<i>%</i>	3	37	4	56	100

**Abbildung 3.2:** Verteilung der verschiedenen Farbintensitäten als Ausdruck der FGFR4-Protein-Expression

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der FGFR4-Proteinexpression und dem klinischen Verlauf aufzuzeigen, wurden die Ergebnisse der Färbungen mit den jeweiligen Tumorstadien, der durchschnittlichen Überlebenszeit und dem rezidivfreien Überleben („Disease-Free-Survival“) verglichen (Tabelle 3.3 und 3.4). Hierbei zeigte sich keine Assoziation, so dass für die weiteren Auswertungen alle FGFR4-exprimierenden Melanome zusammengefasst und mit den FGFR4-negativen Tumoren verglichen wurden.

Tabelle 3.3: Stärke der FGFR4-Proteinexpression im Verhältnis zum Tumorstadium (pTNM, UICC)

Stadium	+++	++	+	0	n
I	1	17	1	34	53
II	1	8	2	17	28
III	1	14	1	17	33
IV	1	12	2	8	23
n	4	51	6	76	137

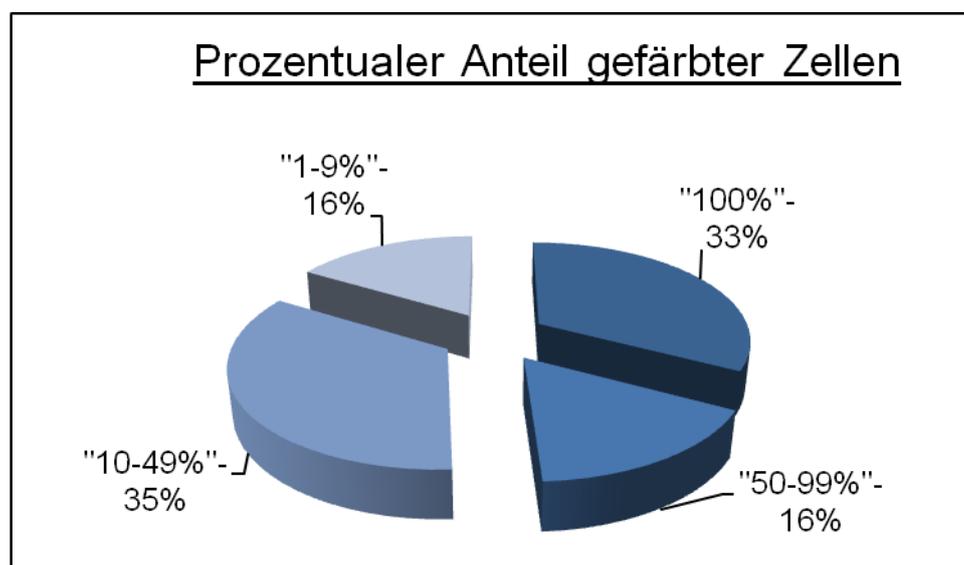
Tabelle 3.4: Intensität der FGFR4-Färbung in Melanomen im Verhältnis zur Überlebenszeit sowie zum rezidivfreien Überleben („Disease-Free-Survival“)

Zeit (Monate)	+++	++	+	0
Überlebenszeit	62,0	50,0	53,2	60,8
Disease-Free-Survival	59,0	40,0	37,3	46,5

Da sich die FGFR4-Proteinexpression häufig innerhalb der einzelnen Tumore als heterogen erwies, wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Melanomzellen abgeschätzt. Der Anteil der FGFR4-exprimierenden Zellen pro Tumor lag in 20 Fällen bei 100%, in 10 Fällen bei 50-99%, in 21 Fällen bei 10-49% und in 10 Fällen bei 1-9% (Abbildung 3.3 und Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Prozentuale Verteilung der FGFR4-positiv gefärbten Melanomzellen innerhalb der Tumore

Gefärbte Zellen pro Tumor	100%	50-99%	10-49%	1-9%	n
n	20	10	21	10	61
%	33	16	35	16	100

**Abbildung 3.3:** Prozentuale Verteilung der FGFR4 positiv gefärbten Melanomzellen innerhalb der Tumore

Auch hierbei zeigte sich im Vergleich mit den Tumorstadien (Tabelle 3.6) und dem durchschnittlichen Überleben (Tabelle 3.7) keine einheitliche Assoziation zu einer starken (100%) oder schwachen (< 10%) FGFR4-Expression. Für die weiteren Auswertungen wurden daher alle FGFR4-exprimierenden Melanome in eine Gruppe zusammengefasst und mit den nicht FGFR4-exprimierenden Tumoren verglichen.

Tabelle 3.6: Prozentuale Verteilung der FGFR4-positiv gefärbten Melanomzellen innerhalb eines Tumores im Verhältnis zum Tumorstadium (pTNM, UICC)

<i>Stadium</i>	<i>100%</i>	<i>50-99%</i>	<i>10-49%</i>	<i>1-9%</i>	<i>n</i>
<i>I</i>	6	5	4	4	19
<i>II</i>	5	2	2	2	11
<i>III</i>	3	1	10	2	16
<i>IV</i>	6	2	5	2	15
<i>n</i>	20	10	21	10	61

Tabelle 3.7: Prozentuale Verteilung der FGFR4-positiv gefärbten Melanomzellen im Verhältnis zur Überlebenszeit sowie zum Rezidivfreien Überleben („Disease-Free-Survival“)

<i>Zeit (Monate)</i>	<i>100%</i>	<i>50-99%</i>	<i>10-49%</i>	<i>1-9%</i>	<i>0</i>
<i>Überlebenszeit</i>	51,0	55,7	52,5	42,2	60,8
<i>Disease-Free-Survival</i>	41,4	44,9	33,6	39,7	46,5

Im gesunden Gewebe fand sich eine FGFR4-Proteinexpression in den Keratinozyten, Nerven, glatten Muskelzellen, Schweiß- und Talgdrüsen sowie im Haarfollikel. Diese Strukturen wurden bei der mikroskopischen Auswertung als Positivkontrolle der Färbung verwendet. In den Melanozyten im Bereich der nicht vom Tumor infiltrierten Epidermis, in Granulozyten und Lymphozyten war keine FGFR4-Proteinexpression nachweisbar.

3.1.2 Ermittlung der Gefäßdichte in Abhängigkeit von der FGFR4-Expression

Für die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren wurde bereits mehrfach gezeigt, dass sie an der Angiogenese und Neovaskularisation in Tumoren maßgeblich beteiligt sind. Daher wurden die 137 immunhistochemisch auswertbaren Melanome in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression auf ihre Gefäßdichte hin untersucht. Diese wurde an HE gefärbten Schnitten ermittelt. Zum Vergleich wurden die Gefäße im gesunden Gewebe in der Umgebung der Tumore ausgezählt.

Anhand der Anzahl der GefäÙe erfolgte eine Klassifizierung in eine starke (+++), mittlere (++) und niedrige (+) GefäÙdichte. Dabei fand sich eine deutlich erhöhte MVD (*microvessel density*) innerhalb der Tumore, die FGFR4 exprimierten, was statistisch signifikant war ($p=0,001$; Tabelle 3.8 und Abbildung 3.4).

Tabelle 3.8: GefäÙdichte (MVD = microvessel density) in Melanomen in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression

GefäÙdichte	FGFR4-positiv	FGFR4-negativ	P-wert:
Gering (+)	24 (18%)	57 (42%)	0,001
Mittel (++)	21 (15%)	12 (9%)	
Hoch (+++)	15 (11%)	8 (6%)	

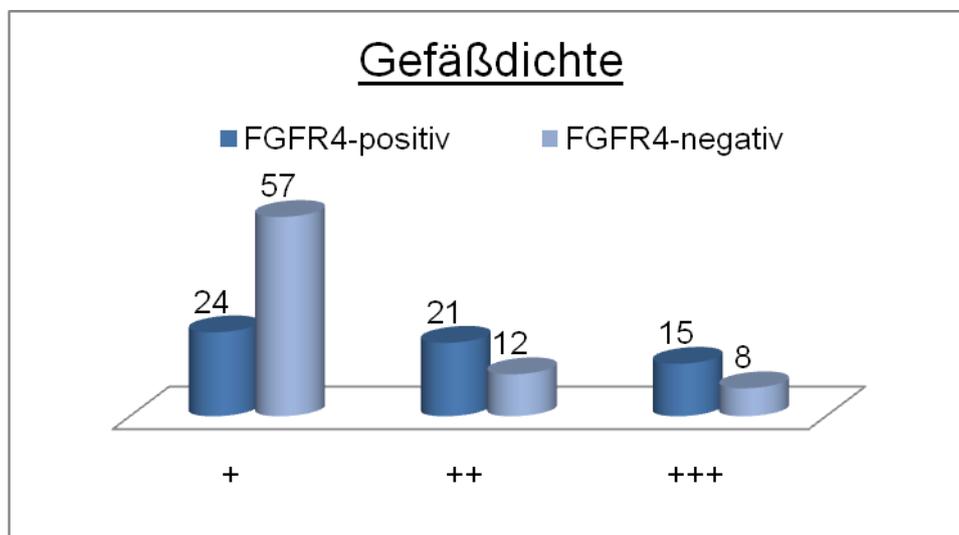


Abbildung 3.4: GefäÙdichte (MVD = microvessel density) in Melanomen in Abhängigkeit der FGFR4-Proteinexpression

Zusätzlich zur lichtmikroskopischen Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte wurde die GefäÙdichte immunhistochemisch mit Hilfe des GefäÙmarkers CD-31 an 17 zufällig ausgewählten Melanomschnitten ermittelt (Abbildung 3.5).

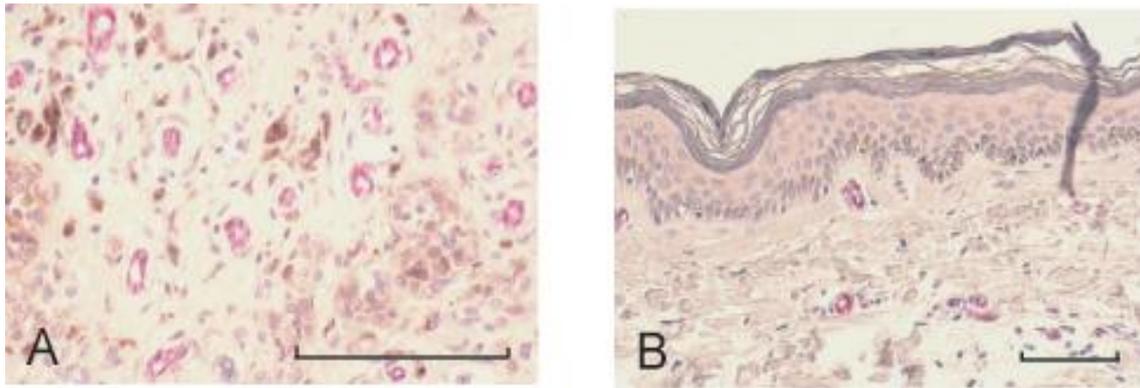


Abbildung 3.5: Immunhistochemische Darstellung der Gefäßdichte/MVD (microvessel density) mit Anti-CD-31. **(A)** Erhöhte MVD in einem nodulären malignen Melanom (NMM) im Vergleich zur Gefäßdichte **(B)** in gesunder peritumorale Haut

Auch hier zeigte sich, dass die Anzahl der Gefäße in FGFR4-positiven Melanomen im Vergleich zu den FGFR4-negativen Tumoren deutlich erhöht war (Tabelle 3.9). Bei 200-facher Vergrößerung waren lichtmikroskopisch in den FGFR4-exprimierenden Tumoren durchschnittlich 44 Gefäße zu sehen, während es bei den FGFR4-negativen Tumoren durchschnittlich nur 28 Gefäße waren.

Tabelle 3.9: Durchschnittliche Gefäßanzahl (CD-31-positiv) in Melanomen in Abhängigkeit von der FGFR4-Protein-Expression an einer Stichprobe von 17 Gewebeproben

Gefäße (CD-31)	FGFR4-positiv	FGFR4-negativ
<i>n</i>	44	28

3.1.3 Ermittlung der Proliferationsrate in Abhängigkeit von der FGFR4-Expression

Rezeptortyrosinkinasen beziehungsweise die dazu gehörende Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren wirken proliferativ auf Zellen. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von FGFR4 auf die Proliferationsrate der malignen Melanome immunhistochemisch untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 an den 17 bereits für die CD-31-Analyse verwendeten Schnitten (Abbildung 3.6).

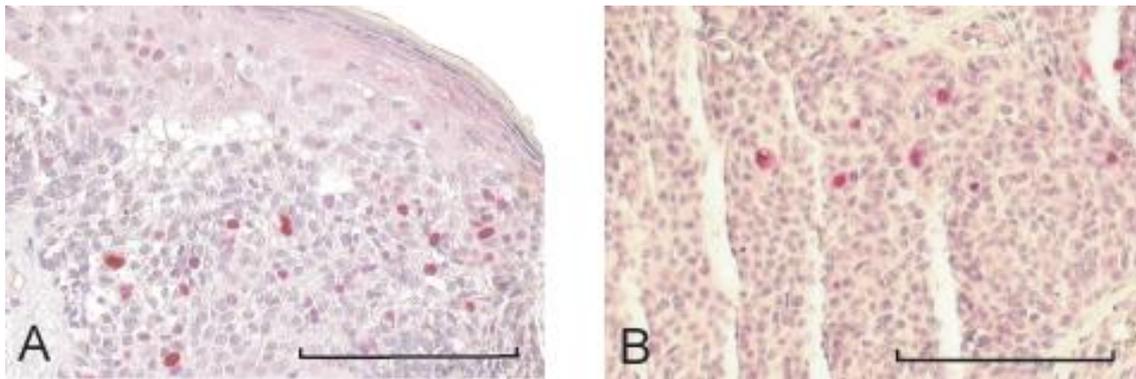


Abbildung 3.6: Immunhistochemische Darstellung der Proliferationsrate mit Ki-67. **(A)** zeigt eine gesteigerte Proliferation in einem FGFR4 exprimierenden nodulären malignen Melanom (NMM). Im Vergleich dazu ist die Proliferationsrate in einem FGFR4 negativen NMM **(B)** geringer ausgeprägt

Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl Ki-67-positiver Zellen in FGFR4-positiven Tumoren im Vergleich zu FGFR4-negativen Tumoren deutlich erhöht war. Bei 200-facher Vergrößerung waren lichtmikroskopisch in den FGFR4-exprimierenden Tumoren durchschnittlich 24 Zellteilungen (Ki-67-positiv) zu sehen, während es bei den FGFR4-negativen Tumoren durchschnittlich 14 Zellteilungen waren (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Durchschnittliche Anzahl Ki-67-positiver in Melanomzellen in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression an einer Stichprobe von 17 Gewebeproben

Zellteilungen (Ki-67)	FGFR4-positiv	FGFR4-negativ
<i>n</i>	24	14

Darüber hinaus war auffällig, dass sich die Ki-67-positiven Zellen vorwiegend an der Infiltrationsfront der Tumoren beziehungsweise den Tumorrändern befanden.

3.1.4 FGFR4-Proteinexpression in Assoziation mit verschiedenen Variablen

Die in 3.1.1 erhobenen Daten zeigten, dass keine Zusammenhänge zwischen der Intensität oder dem prozentualen Anteil der Färbung und pathologischen Tumoreigenschaften oder dem klinischen Verlauf bestehen. Daher wurden für die weiteren statistischen Analysen (s. auch 3.1.1) alle FGFR4-exprimierenden Melanome unabhängig von der Anzahl der gefärbten Tumorzellen oder der jeweiligen Farbtintensität in eine gemeinsame Gruppe zusammengefasst. Die für

FGFR4 immunhistochemisch erhobenen Daten wurden mit klinischen und für Melanome typischen pathologischen Parametern verglichen.

3.1.4.1 FGFR4-Protein-Expression in Assoziation mit klinischen Parametern

Die 137 immunhistochemisch untersuchten Melanome wurden an Hand verschiedener klinischer Variablen ausgewertet (Tabelle 3.11). Hierbei ergab sich keine Korrelation zwischen der FGFR4-Protein-Expression und der Altersverteilung, deren Grenze bei 55 Jahren zum Diagnosezeitpunkt (< 55 versus > 55) festgelegt wurde.

Bei der Geschlechterverteilung zeigte sich ein relativ ausgewogenes Verhältnis mit 75 männlichen (55%) und 62 weiblichen (45%) Patienten.

Tabelle 3.11: Klinische Variablen in Abhängigkeit von der FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen

<i>FGFR4- Expression</i>	<i>ja</i>	<i>nein</i>	<i>P-Wert</i>
<i>Alter</i>			
< 50 Jahre	14 (23%)	25 (33%)	n.s.
> 50 Jahre	47 (77%)	51 (67%)	
<i>Geschlecht</i>			
männlich	33 (24%)	42 (31%)	n.s.
weiblich	28 (20%)	34 (25%)	
<i>Lokalisation</i>			
Extremitäten	29 (21%)	55 (40%)	n.s.
Kopf/Hals/Rumpf	27 (20%)	26 (19%)	
<i>Anzahl primärer Melanome</i>			
1	39 (28%)	64 (47%)	0,022
>1	22 (16%)	12 (9%)	
<i>Metastasierung</i>			
Ja	31 (23%)	25 (18%)	0,025
Nein	30 (22%)	51 (37%)	
<i>Metastasenanzahl</i>			
1	13 (23%)	12 (22%)	n.s.
>1	18 (32%)	13 (23%)	
<i>Art der Metastasierung</i>			
Lokal-	11 (36%)	12 (48%)	n.s.
Regional-	5 (16%)	5 (16%)	
Fern-	15 (48%)	8 (32%)	

Da die Lokalisation des Primärtumors bei malignen Melanomen mit der Prognose des Patienten assoziiert ist, wurde auch diese klinische Variable in die Untersuchungen aufgenommen. Die Einteilung richtete sich zum einen danach, ob ein gerichteter Lymphabfluss von der Lokalisation, wie beispielsweise an den

Extremitäten, besteht, oder ob der Abfluss ungerichtet zu verschiedenen Lymphknotenstationen erfolgen kann, wie dies an Rumpf, Hals oder Kopf möglich ist. Zum anderen war für die Einteilung der Lokalisationen von Interesse, ob möglicherweise eine unterschiedliche FGFR4-Expression in den UV-Licht exponierten Arealen besteht. Bei der statistischen Auswertung fand sich jedoch keine erkennbare Relevanz bezüglich der Lokalisation an Stamm, Hals und Kopf im Vergleich zu den Extremitäten.

Die Anzahl von primären malignen Melanomen gilt als Risikofaktor, an weiteren Melanomen zu erkranken. In dieser Studie zeigte sich, dass Patienten mit mehr als einem malignen Melanom zu einem signifikant höheren Anteil FGFR4 exprimierten ($P = 0,022$; Abbildung 3.7).

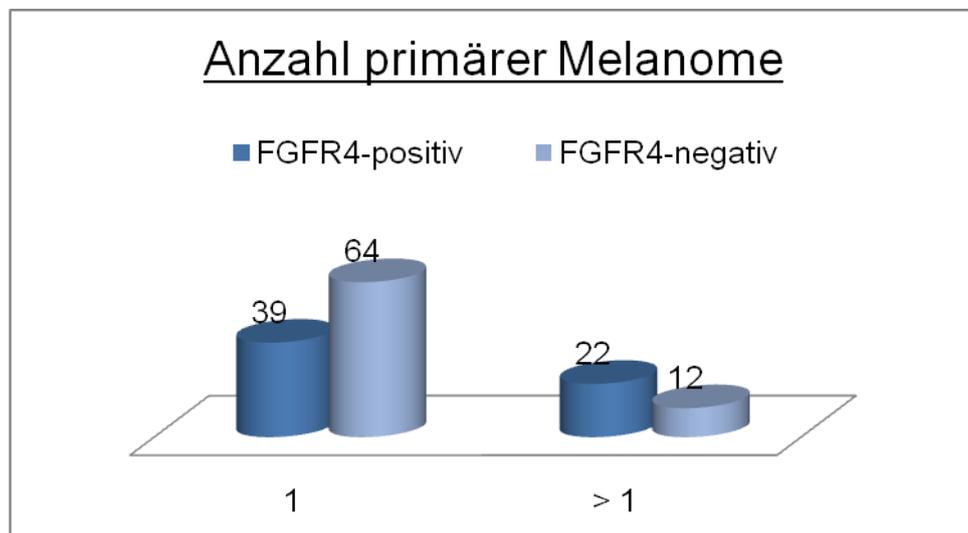


Abbildung 3.7: Anzahl der primären Melanome in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression

Bei Patienten mit nur einem Melanom fanden sich mehr Tumore, die kein FGFR4 exprimierten (64:39), während sich das Verhältnis bei Patienten mit mehr als einem Melanom umkehrte (12:22).

Von den 137 auswertbaren Melanomen wiesen 56 Patienten Metastasen auf. Mehr als die Hälfte dieser Patienten (31/56) hatte FGFR4-positive primäre Melanome. Weiterhin wurde in den Tumoren von Patienten ohne Metastasen mehrheitlich keine FGFR4-Expression beobachtet. Genau umgekehrt verhielt es sich mit den Tumoren von Patienten mit Metastasen, die eine verstärkte FGFR4-Expression zeigten ($P = 0,025$).

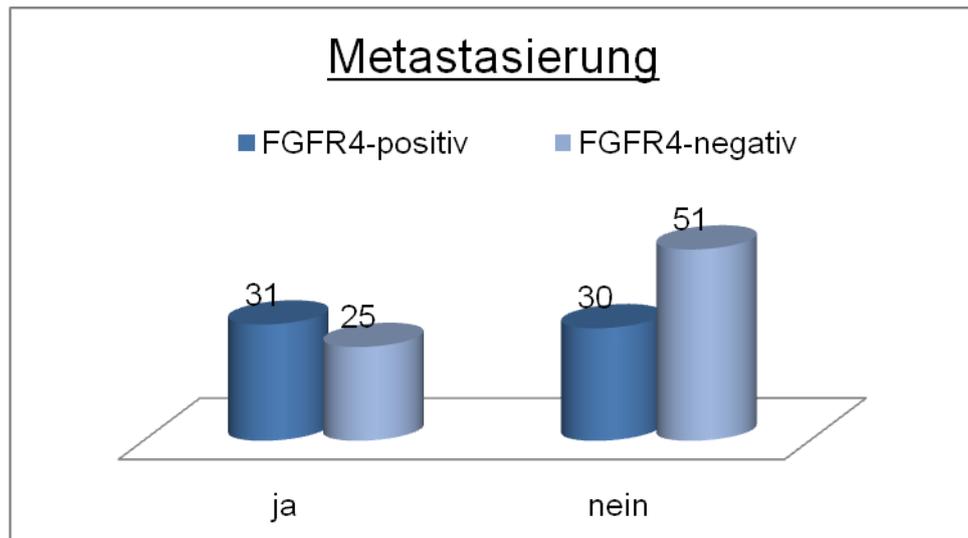


Abbildung 3.8: Metastasierung in Abhängigkeit von der FGFR4-Protein-Expression

Trotz der signifikanten Korrelation zwischen der Metastasierung und der FGFR4-Expression in Melanomen, wurde bezüglich der Metastasenanzahl und der Art der Metastasen (Lokal-, Regional- und Fernmetastasen) keine Assoziation mit der FGFR4-Expression festgestellt.

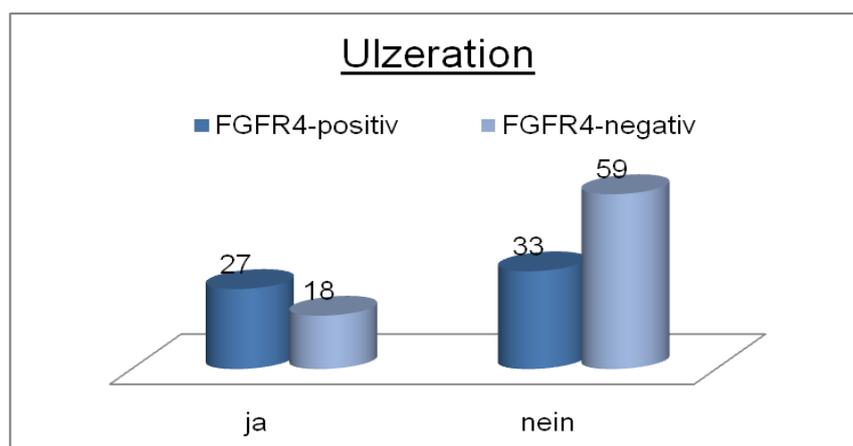
3.1.4.2 FGFR4-Protein-Expression in Assoziation mit pathologischen Parametern

Als typische, für die Prognose und den klinischen Verlauf relevante pathologische Parameter gelten die Tumordicke in Millimetern (Breslow), die Eindringtiefe des Melanoms in die verschiedenen Hautschichten (Clark-Level), histologisch nachweisbare Ulzeration und die in ihrem Wachstumsverhalten unterschiedlichen Melanom-Subtypen. All diese (histo-)pathologischen Parameter wurden in Assoziation zur FGFR4-Proteinexpression der hier untersuchten Melanome betrachtet (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12: Pathologische Variablen in Abhängigkeit von der FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen

FGFR4- Expression	ja	nein	P-Wert
<i>Tumordicke nach Breslow (mm)</i>			
≤ 1	27 (20%)	32 (23%)	n.s.
> 1	34 (25%)	44 (32%)	
<i>Clark-Level</i>			
I	0 (0%)	0 (0%)	n.s.
II	14 (10%)	14 (10%)	
III	18 (13%)	28 (20%)	
IV	26 (19%)	30 (22%)	
V	3 (2%)	4 (3%)	
<i>Ulzeration</i>			
Ja	27 (20%)	18 (13%)	0,009
Nein	33 (24%)	59 (43%)	
<i>Histologischer Subtyp</i>			
SSM	30 (22%)	37 (27%)	n.s.
NMM	25 (18%)	25 (18%)	
Andere	6 (5%)	14 (10%)	

Allein das Vorliegen von Ulzerationen war signifikant mit der FGFR4-Proteinexpression assoziiert ($P = 0,009$). Von insgesamt 45 ulzerierten Melanomen waren 27 positiv für FGFR4 (20%), während die restlichen 18 Melanome den Rezeptor nicht aufwiesen (13%). Bei den nicht-ulzerierten Melanomen verhielt es sich genau umgekehrt, das heißt von den 92 Melanomen ohne Ulzeration waren 33 FGFR4-positiv (24%) und 59 FGFR4-negativ (43%; Abbildung 3.9).

**Abbildung 3.9:** Ulzeration des Tumors in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression in malignen Melanomen

3.2 PCR-RFLP

3.2.1 FGFR4-Allel-Verteilung in malignen Melanomen

Von den 198 Gewebeproben konnten mit Hilfe der PCR-RFLP 185 Melanome analysiert werden. Von den restlichen 13 Proben war die DNS-Menge nicht ausreichend. Von den 185 Proben wurde der Gly/Gly-Genotyp in 101 Fällen (55%), der Gly/Arg-Genotyp in 69 Fällen (37%) und der Arg/Arg-Genotyp in 15 Fällen (8%) nachgewiesen (Tabelle 3.13 und Abbildung 3.10).

Tabelle 3.13: Prozentuale Verteilung der drei Genotypen in 185 Melanomen

<i>FGFR4-Allel</i>	<i>Gly/Gly</i>	<i>Gly/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>	<i>n</i>
	101 (55%)	69 (37%)	15 (8%)	185 (100%)

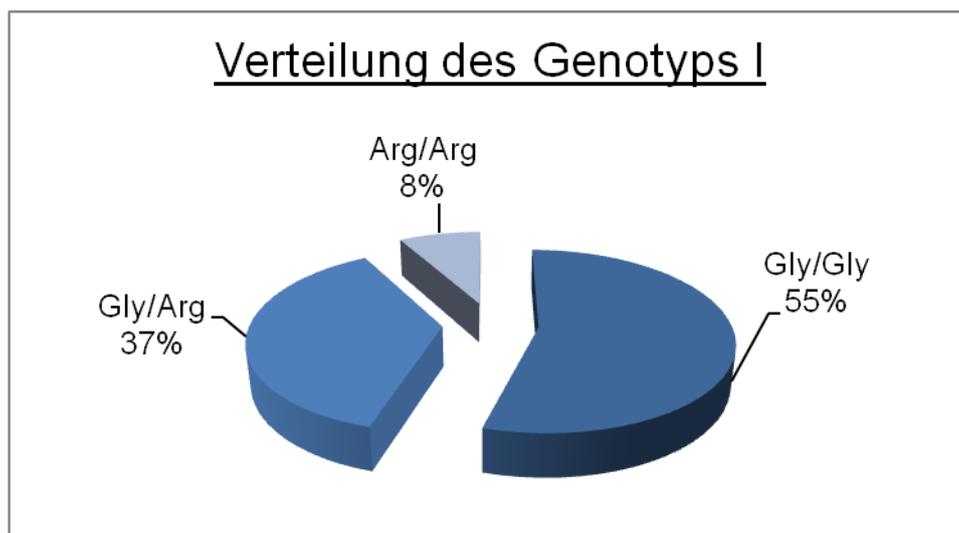
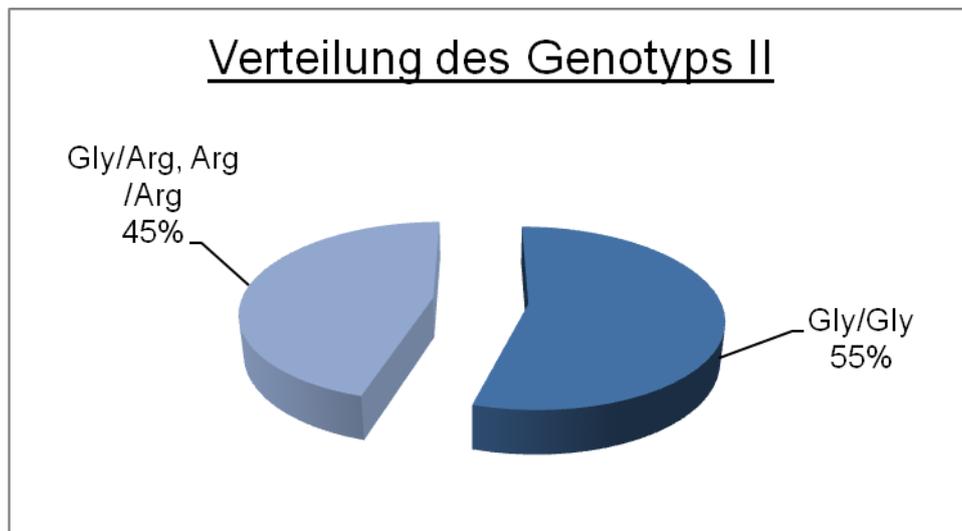


Abbildung 3.10: Prozentuale Verteilung der drei Genotypen in 185 Melanomen

Aufgrund der geringen Fallzahl der homozygoten Verteilung des Arg388-Allels wurden für die statistische Auswertung, wie in der Literatur bereits beschrieben (Bange et al., 2001), die homozygoten (Arg/Arg) und heterozygoten (Gly/Arg) Träger in eine gemeinsame Gruppe zusammengefasst (Tabelle 3.14 und Abbildung 3.11).

Tabelle 3.14: Prozentuale Verteilung des Genotyps in 185 Melanomen nach Zusammenfassung der heterozygoten Mutante (Gly/Arg) und der homozygoten Mutante (Arg/Arg) in eine Gruppe

<i>FGFR4</i> -Allel	<i>Gly/Gly</i> (= Wildtyp)	<i>Gly/Arg</i> bzw. <i>Arg/Arg</i> (=Mutante)	<i>n</i>
	101 (55%)	84 (45%)	185 (100%)

**Abbildung 3.11:** Prozentuale Verteilung des Genotyps in 185 Melanomen nach Zusammenfassung der heterozygoten Mutante (Gly/Arg) und der homozygoten Mutante (Arg/Arg) in eine Gruppe

3.2.2 *FGFR4*-Arg-388-Polymorphismus und *FGFR4*-Protein-Expression, Gefäßdichte (CD-31) und Proliferationsrate (Ki-67)

Zwischen dem Arg388-Genotyp und einer verstärkten *FGFR4*-Protein-Expression ist ein möglicher Zusammenhang beschrieben worden (Streit et al, 2004). Deshalb wurde auch in dieser Arbeit die Allelverteilung mit der Expressionsrate von *FGFR4* verglichen. Bei den Melanomen zeigte sich allerdings keine Assoziation zwischen dem Genotyp und der *FGFR4*-Expression (Tabelle 3.15 und Abbildung 3.12).

Tabelle 3.15: *FGFR4*-Expression in Abhängigkeit von der Allelverteilung

	<i>Gly/Gly</i> (= Wildtyp)	<i>Gly/Arg</i> bzw. <i>Arg/Arg</i> (=Mutante)	<i>n</i>
<i>FGFR4</i> -positiv	30 (24%)	25 (20%)	55 (44%)
<i>FGFR4</i> -negativ	36 (28%)	35 (28%)	71 (56%)
<i>n</i>	66 (52%)	60 (48%)	126 (100%)

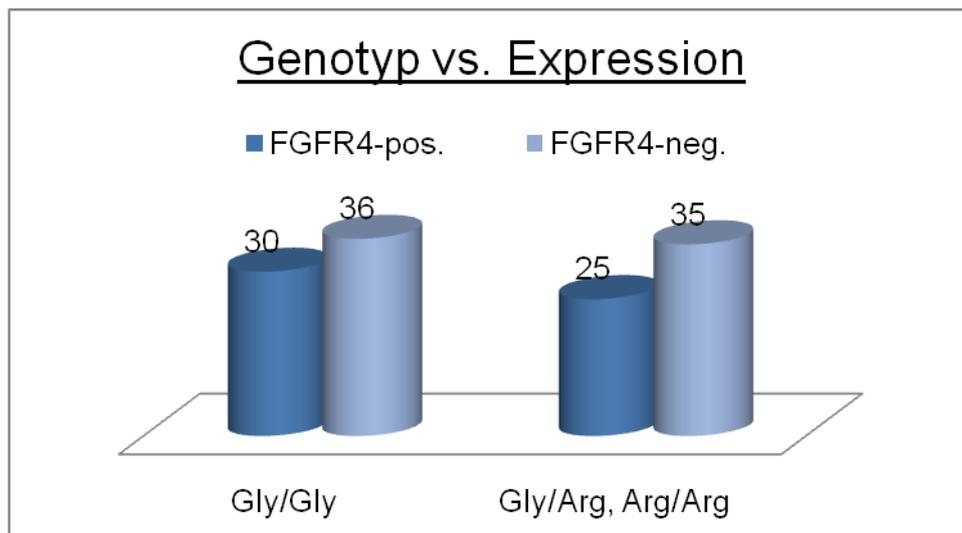


Abbildung 3.12: FGFR4-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Allelverteilung

In dieser Arbeit wurde dargelegt, dass die Expression von FGFR4 in malignen Melanomen mit der Gefäßdichte assoziiert ist (siehe 3.1.2). Daher war es von Interesse, ob der Polymorphismus ebenfalls einen Einfluss auf die Gefäßproliferation beziehungsweise auf die Gefäßdichte hat. Wie in 3.1.2 für die FGFR4-Expression beschrieben, wurden der Gly388- und der Arg388-Genotyp mit den 17 CD-31-gefärbten Schnitten verglichen. Die mittlere Anzahl der Gefäße lag bei dem Arg388-Allel niedriger als bei dem Gly388-Allel. Während bei 200-facher Vergrößerung beim Wildtyp (Gly388) durchschnittlich 38 Gefäße pro Gesichtsfeld gezählt wurden, waren es bei der Mutante (Arg388) lediglich 29 Gefäße (Tabelle 3.16).

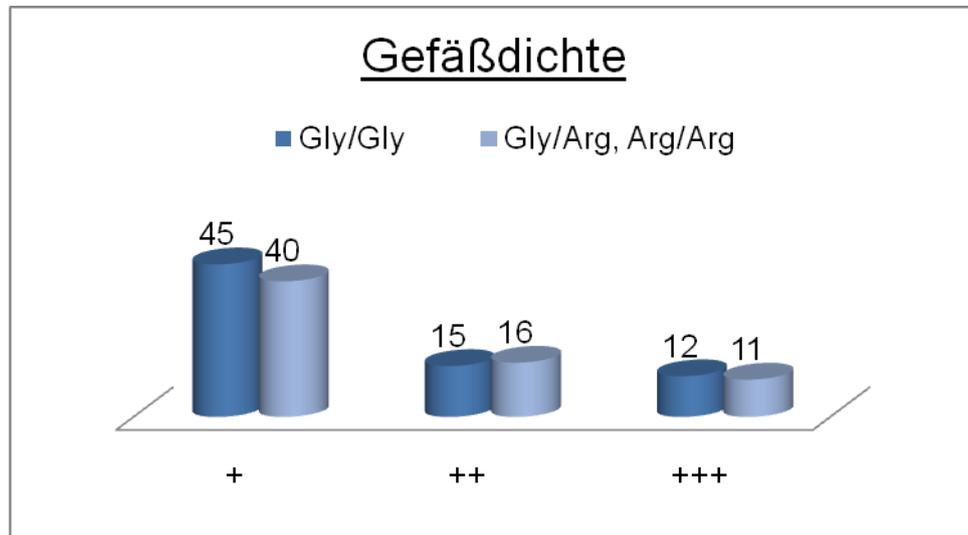
Tabelle 3.16: Durchschnittliche Gefäßanzahl (CD-31-positiv) in Melanomen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus an einer Stichprobe von 17 Gewebeproben

Gefäße (CD-31)	Gly/Gly	Gly/Arg, Arg/Arg
<i>n</i>	38	29

Bezüglich der Gefäßdichte (+, ++, +++) zeigte sich innerhalb der verschiedenen Gruppen eine relativ homogene Verteilung der unterschiedlichen Genotypen (Tabelle 3.17 und Abbildung 3.13).

Tabelle 3.17 Gefäßdichte (MVD = microvessel density) in Melanomen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus

Gefäßdichte	Gly/Gly	Gly/Arg ; Arg/Arg	P-Wert:
Gering (+)	45 (32%)	40 (29%)	n.s.
Mittel (++)	15 (11%)	16 (11%)	
Hoch (+++)	12 (9%)	11 (8%)	

**Abbildung 3.13:** Gefäßdichte (MVD = microvessel density) in Melanomen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus

Weiter oben wurde gezeigt, dass die Zellproliferation in den Melanomen signifikant mit der FGFR4-Proteinexpression korrelierte (siehe 3.1.3). Die Verteilung der FGFR4-Genotypen war in Bezug auf die Ki-67-Expression nicht mit der Proliferationsrate assoziiert (Tabelle 3.18).

Tabelle 3.18: Durchschnittliche Anzahl proliferierender Melanomzellen pro Gesichtsfeld in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus an einer Stichprobe von 17 Gewebeproben

Zellteilungen (Ki-67)	Gly/Gly	Gly/Arg, Arg/Arg
<i>n</i>	18	19

3.2.3 FGFR4-Arg388-Polymorphismus in Assoziation mit verschiedenen Variablen

Der Arg388-Genotyp von FGFR4 wurde wie die Protein-Expression von FGFR4 mit verschiedenen pathologischen und klinischen Variablen verglichen (Tabelle 3.19).

Wie bereits in 3.2.2 erwähnt, wurden die homozygoten oder heterozygoten Träger des Arg388-Allels zu einer Entität zusammengefasst.

3.2.3.1 FGFR4-Arg388-Polymorphismus in Assoziation mit klinischen Parametern

Die 185 mit Hilfe einer PCR-RFLP genotypisierten Melanome wurden anhand verschiedener klinischer Variablen in je zwei Gruppen eingeteilt und statistisch miteinander verglichen (Tabelle 3.19).

Bezüglich des Alters zum Diagnosezeitpunkt wurde deutlich, dass Träger mindestens eines Arg388-Allels jünger waren als Träger des Gly388-Allels. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Gly388-Wildtyp ein Altersunterschied von vier Jahren bei heterozygotem Arg388-Allel und von 13 Jahren bei homozygotem Arg388-Allel. Statistisch war allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter (≤ 55 versus > 55 Jahre) und dem Genotyp nachweisbar. Weiterhin konnte keine signifikante Assoziation zwischen dem Geschlecht (männlich versus weiblich), der Tumorlokalisation (Extremitäten versus Rumpf/Hals/Kopf), dem Vorhandensein von Metastasen (ja versus nein), der Anzahl von Metastasen (1 versus > 1) und der Lokalisation von Metastasen (Lokal- versus Regional- versus Fernmetastasen) gefunden werden. Ebenso war keine Korrelation zwischen dem Arg388-Allel und einem vermehrten Auftreten von Primärtumoren (1 versus > 1) zu erkennen.

Tabelle 3.19: Klinische Variablen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus in malignen Melanomen

<i>FGFR4-Allel</i>	<i>Gly/Gly</i>	<i>Gly/Arg; Arg/Arg</i>	<i>P-Wert</i>
<i>Alter zum Diagnose-Zeitpunkt (Jahre)</i>	68	64	55
<i>Alter</i>			
≤ 50 Jahre	28 (15%)	27 (14%)	n.s.
> 50 Jahre	73 (39%)	57 (32%)	
<i>Geschlecht</i>			
Männlich	53 (29%)	45 (24%)	n.s.
Weiblich	48 (26%)	39 (21%)	
<i>Lokalisation</i>			
Extremitäten	64 (35%)	54 (29%)	n.s.
Kopf/Hals/Rumpf	37 (20%)	30 (16%)	
<i>Anzahl primärer Melanome</i>			
1	75 (41%)	69 (37%)	n.s.
>1	26 (14%)	15 (8%)	
<i>Metastasierung</i>			
Ja	39 (21%)	31 (17%)	n.s.
Nein	62 (34%)	53 (28%)	
<i>Metastasenanzahl</i>			
1	19 (27%)	10 (14%)	n.s.
>1	20 (29%)	21 (30%)	
<i>Art der Metastasierung</i>			
Lokal-	14 (20%)	13 (19%)	n.s.
Regional-	4 (6%)	7 (10%)	
Fern-	21 (29%)	11 (16%)	

n.s., nicht signifikant

3.2.3.2 FGFR4-Arg388-Polymorphismus in Assoziation mit pathologischen Parametern

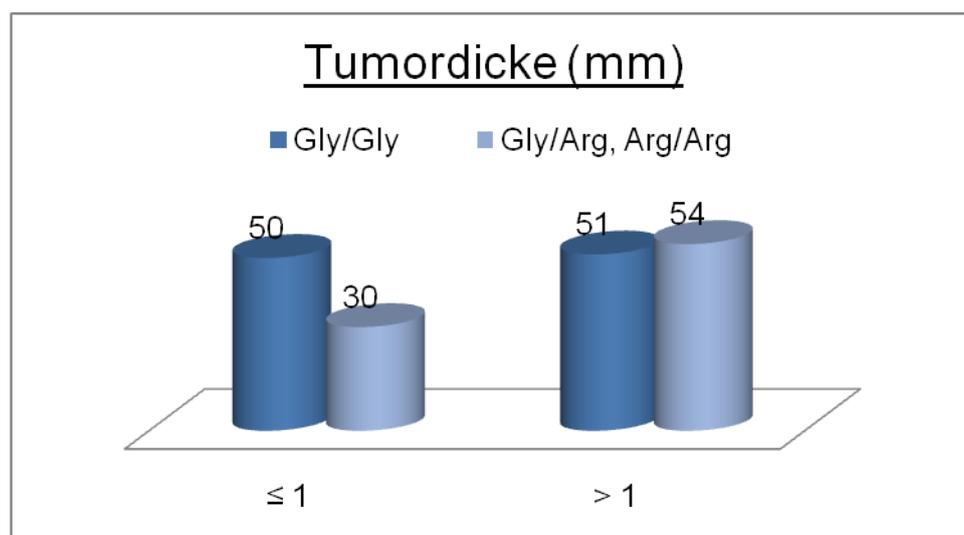
Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden wie in 3.1.4.2 für die FGFR4-Proteinexpression beschrieben mit pathologischen Variablen verglichen und statistisch untersucht (Tabelle 3.20).

Tabelle 3.20: Pathologische Variablen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus in malignen Melanomen

<i>FGFR4-Allel</i>	<i>Gly/Gly</i>	<i>Gly/Arg, Arg/Arg</i>	<i>P-Wert</i>
<i>Tumordicke nach Breslow (mm)</i>			
≤ 1	50 (27%)	30 (16%)	0,02
> 1	51 (28%)	54 (29%)	
<i>Clark-Level</i>			
I	0 (0%)	0 (0%)	0,004 (beim Vergleich IV + V vs. II + III)
II	24 (12%)	19 (10%)	
III	39 (20%)	16 (8%)	
IV	37 (19%)	41 (21%)	
V	1 (1%)	8 (4%)	
<i>Ulzeration</i>			
Ja	23 (17%)	22 (16%)	n.s.
Nein	51 (37%)	43 (30%)	
<i>Histologischer Subtyp</i>			
SSM	56 (30%)	31 (17%)	0,002
NMM	27 (15%)	41 (22%)	
Andere	18 (10%)	12 (7%)	

n.s., nicht signifikant; mm, Millimeter; SSM, superfiziell spreitendes Melanom; NMM, noduläres malignes Melanom; n.s., nicht signifikant

Eine signifikante Korrelation wurde zwischen dem Arg388-Allel und dem wichtigsten prognostischen pathologischen Parameter, der Tumordicke nach Breslow in Millimetern (≤ 1 mm versus > 1 mm) gefunden. Es zeigte sich eine deutliche Diskrepanz, da in 30 Fällen (16%) bei einer Dicke von weniger oder gleich einem Millimeter mindestens ein Arg388-Allel vorkam, während es in 54 Fällen (29%) bei einer Dicke von mehr als einem Millimeter nachgewiesen wurde ($P = 0,02$; Tabelle 3.20 und Abbildung 3.14).

**Abbildung 3.14:** Tumordicke von malignen Melanomen in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus

Entsprechend zur Tumordicke in mm fand sich auch eine Assoziation mit dem Clark-Level. Die Primärmelanome der Träger des FGFR4-Arg388-Allels waren häufiger den Clark-Leveln IV und V zugeordnet, während die Clark-Level II und III häufiger bei Trägern des Gly388-Allels zu finden waren. Allerdings ergab sich trotz des deutlichen Trends kein signifikantes Ergebnis, wenn alle fünf Level miteinander verglichen wurden (Abbildung 3.15). Daher wurden jeweils Clark-Level II + III und IV + V kombiniert und anschließend diese Gruppen miteinander verglichen. Hierbei ergab sich eine signifikante Assoziation (II + III versus IV + V; $p = 0,004$; Abbildung 3.16).

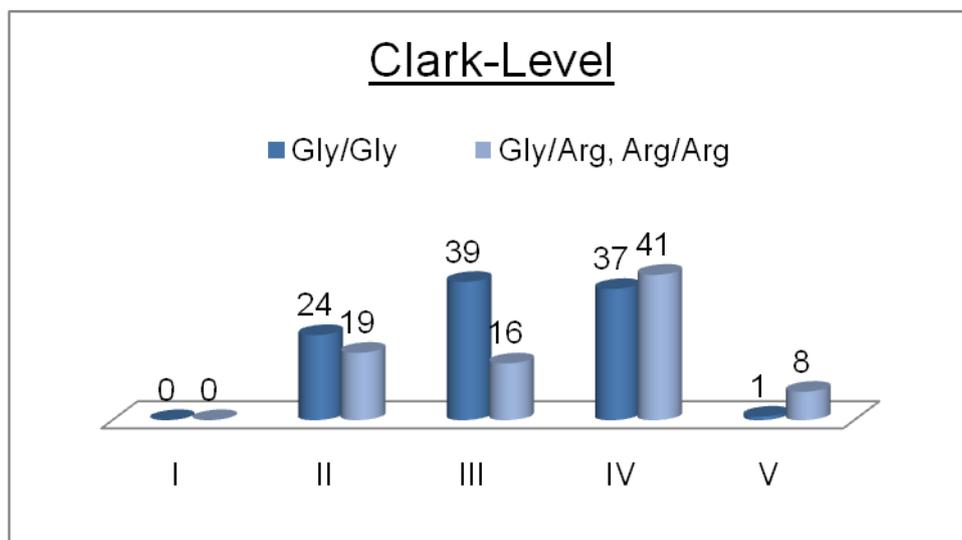


Abbildung 3.15: Verteilung des FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus bezogen auf den Clark-Level

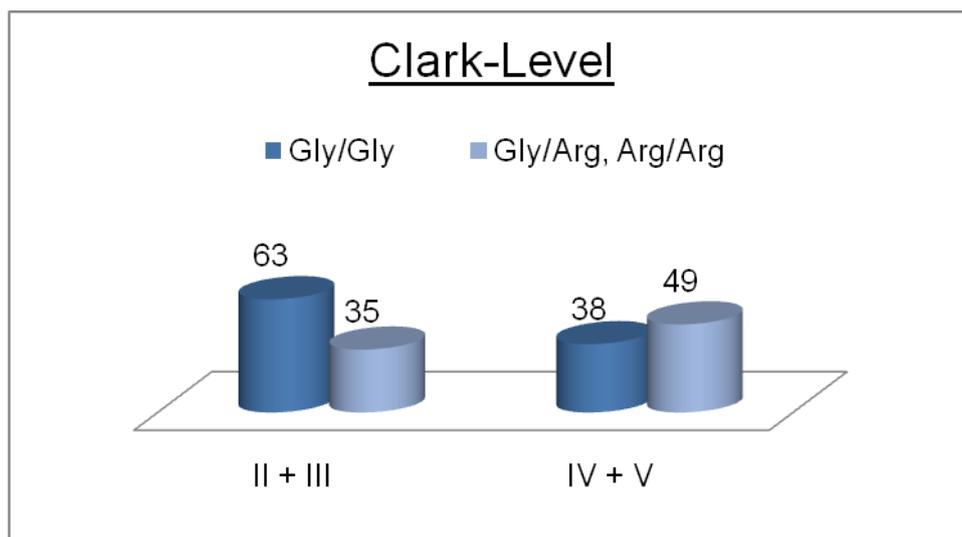


Abbildung 3.16: Clark-Level II + III im Vergleich zu den Clark-Leveln IV + V in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus

Bei dem Vergleich der histologischen Melanom-Subtypen waren 41 Patienten (60%) mit der Diagnose eines NMM Träger des Arg388-Allels, während 27 Patienten (40%)

den Gly388-Genotyp besaßen. Genau umgekehrt verhielt es sich beim SSM und den anderen Subtypen; hier überwog der Gly388-Wildtyp ($p = 0,002$; Abbildung 3.17).

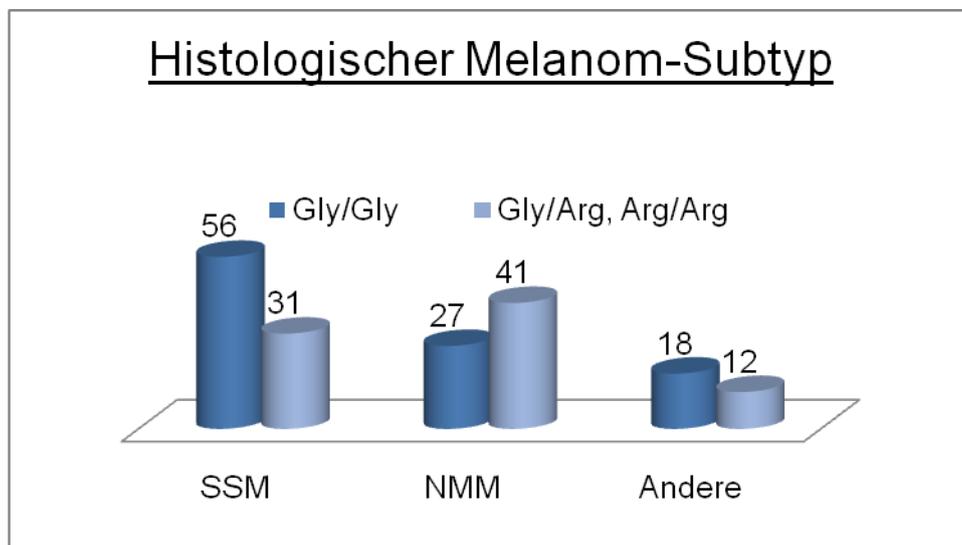


Abbildung 3.17: Verhältnis der histologischen Melanom-Subtypen (noduläres malignes Melanom, NMM; superfiziell spreitendes Melanom, SSM; andere Melanome) zum FGFR4-Gly388-Arg388-Polymorphismus

Im Gegensatz zur FGFR4-Protein-Expression war beim Genotyp ein signifikanter Zusammenhang zu erkennen.

3.3 Auswirkung der FGFR4-Protein-Expression und des FGFR4-Arg388-Polymorphismus auf das Tumor-Stadium und Überleben

Die Auswertung der Daten der FGFR4-Protein-Expression und des Arg388-Allels in Bezug auf klinische und pathologische Variablen ergab einige signifikante Zusammenhänge (siehe 3.1 und 3.2). Daher wurde der Einfluss von FGFR4 und seinem Genotyp auf die Überlebenszeit, das sogenannte Overall-Survival, und auf die Tumorprogression, das sog. Disease free-Survival, untersucht. Beim Overall-Survival galt als Ereignis der Tod eines Patienten, beim Disease free-Survival ein Lokalrezidiv oder das Auftreten von Metastasen.

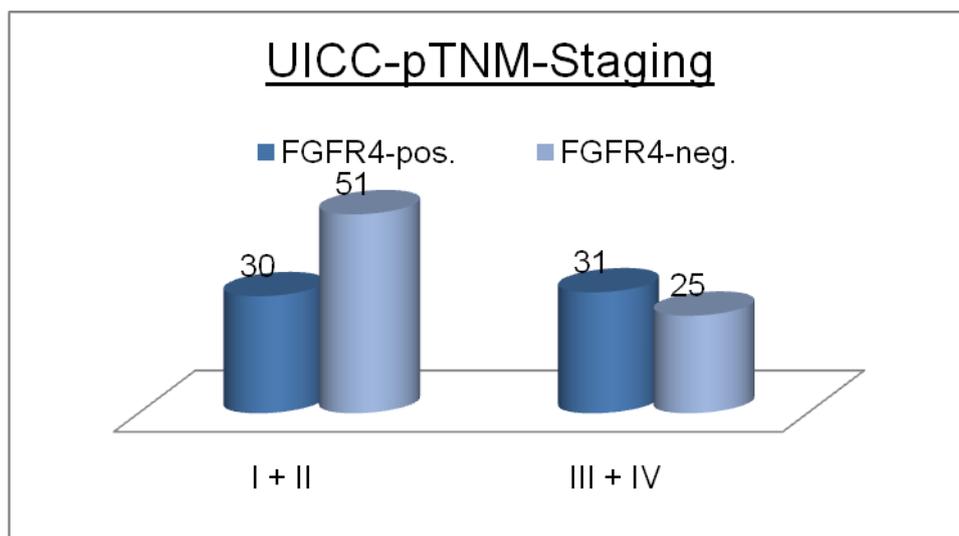
3.3.1 Tumor-Staging und Überlebenszeitanalyse unter dem Einfluss der FGFR4-Protein-Expression

Wie die Daten aus 3.1 zeigen, besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der FGFR4-Proteinexpression und der Metastasierung sowie der Ulzeration eines Melanoms. Beide Parameter sind für die Einordnung eines Melanompatienten in ein bestimmtes Tumorstadium von Bedeutung. Aus dem entsprechenden Stadium leiten sich die weiteren Therapie- und die Nachsorgeempfehlungen ab. Daher wurden die Ergebnisse der immunhistochemisch untersuchten FGFR4-Expression mit den beiden TNM-Staging-Systemen UICC (*union internationale contre le cancer*) und AJCC (*american joint committee on cancer*) verglichen. Bei der Untersuchung der Tumorstadien untereinander ergab sich zunächst keine Korrelation zur Rezeptor-Expression. Wurden allerdings jeweils die Stadien I und II sowie die Stadien III und IV zusammengefasst und miteinander verglichen, konnte eine signifikante Assoziation zwischen der FGFR4-Proteinexpression und den Tumorstadien nachgewiesen werden (**UICC, $P = 0.023$** ; Tabelle 3.20 und Abbildung 3.18; **AJCC $P = 0.046$** ; Tabelle 3.20 und Abbildung 3.19).

Tabelle 3.20: pTNM-Tumor-Stadien nach der UICC- und AJCC-Klassifikation in Abhängigkeit von der FGFR4-Protein-Expression.

FGFR4- Expression	ja	nein	P-Wert
pTNM-Staging (UICC, n = 137)			
la	15 (11%)	23 (17%)	n.s.
lb	4 (3%)	11 (8%)	
IIa	8 (6%)	12 (9%)	
IIb	3 (2%)	5 (4%)	
IIIa	11 (8%)	12 (9%)	
IIIb	5 (4%)	5 (4%)	
IV	15 (11%)	8 (6%)	
pTNM-Staging (AJCC, n = 137)			
la	14 (10%)	23 (17%)	n.s.
lb	6 (4%)	10 (7%)	
IIa	3 (2%)	8 (6%)	
IIb	5 (4%)	8 (6%)	
IIc	3 (2%)	2 (1%)	
IIIa	5 (4%)	6 (4%)	
IIIb	8 (6%)	9 (7%)	
IIIc	3 (2%)	2 (1%)	
IV	14 (10%)	8 (6%)	
pTNM-Staging (UICC, n = 137)			
I + II	30 (22%)	51 (37%)	0,023
III+ IV	31 (23 %)	25 (18%)	
pTNM-Staging (AJCC, n = 137)			
I + II	31 (23%)	51 (37%)	0,046
III+ IV	30 (22%)	25 (18%)	

pTNM= p, postoperativ; T, Tumor; N, Lymphknotenbefall; M, Fernmetastasen (UICC, Union Internationale Contre le Cancer; AJCC, American Joint Committee on Cancer); n.s., nicht signifikant

**Abbildung 3.18:** UICC-pTNM-Staging: Stadien III + IV zeigten im Vergleich zu den Stadien I + II eine signifikant häufigere FGFR4-Proteinexpression

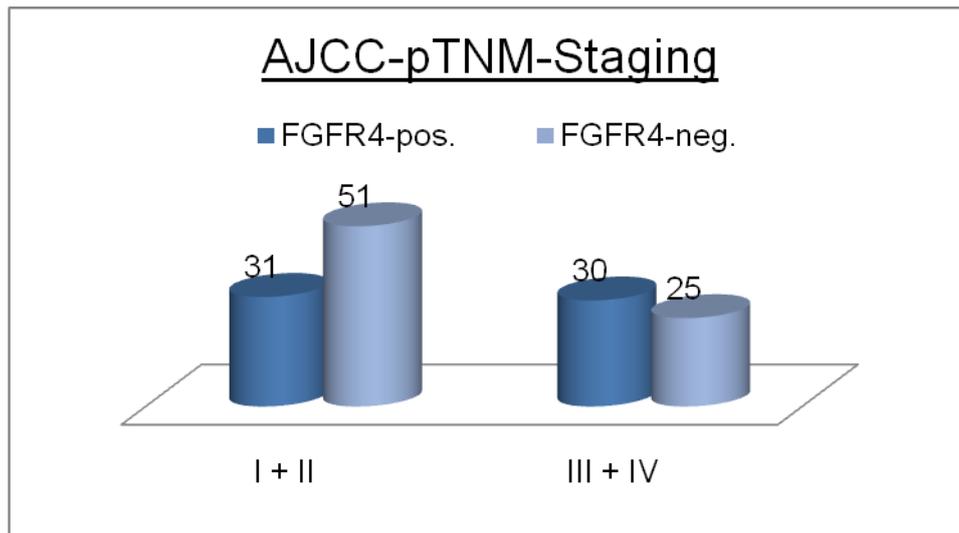


Abbildung 3.19: AJCC-pTNM-Staging: Stadien III + IV zeigten im Vergleich zu den Stadien I + II eine signifikant häufigere FGFR4-Proteinexpression

Tabelle 3.21: Durchschnittliche Überlebenszeit und Disease-Free-Survival in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression

Zeit (Monate)	FGFR4-positiv	FGFR4-negativ
Überlebenszeit	52,1	60,8
Disease-Free-Survival	39,9	46,5

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse konnte entsprechend gezeigt werden, dass bei Expression von FGFR4 sowohl das Overall-Survival als auch das Disease-free-Survival in den ersten fünf Jahren deutlich reduziert war. Dies bestätigte sich statistisch in einem Log-Rank-Test mit $P = 0,047$ für das Overall-Survival (Abbildung 3.20) und $P = 0,024$ für das Disease-free-Survival (Abbildung 3.21).

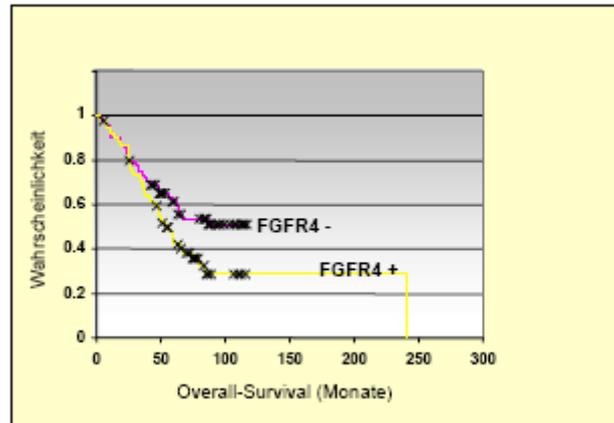


Abbildung 3.20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Bezug auf das Overall-Survival in Abhängigkeit von der FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen

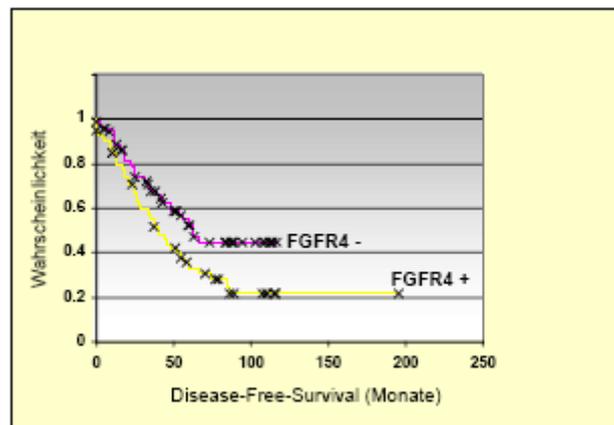


Abbildung 3.21: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Bezug auf das Disease-free-Survival in Abhängigkeit von der FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen

In Abbildung 3.22 ist der Überlebensstatus in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression aufgezeigt. Patienten mit Tumoren ohne Rezeptorexpression (43/77; 56%) überleben durchschnittlich häufiger als mit Rezeptorexpression (17/62; 27%).

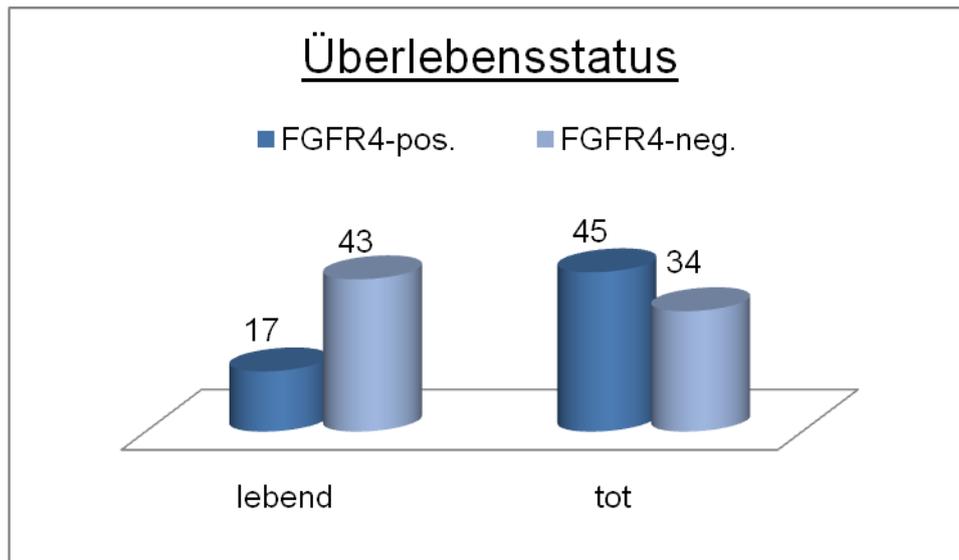


Abbildung 3.22: Anzahl der lebenden und verstorbenen Melanompatienten in Abhängigkeit von der FGFR4-Proteinexpression

3.3.2 Tumor-Staging und Überlebenszeitanalyse unter dem Einfluss des FGFR4-Arg388-Polymorphismus

Aus früheren Studien (Bange *et al.*, 2001; Streit *et al.*, 2004) geht hervor, dass sich das Vorliegen von mindestens einem FGFR4-Arg388-Allel negativ auf das Tumorstadium auswirkt und somit einen aggressiveren Phänotyp darstellt. Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Tabelle 3.22).

Tabelle 3.22: pTNM-Tumor-Stadien (UICC und AJCC) in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus

FGFR4-Allel	Gly/Gly	Gly/Arg, Arg/Arg	P-Wert
<i>pTNM-Staging (UICC, n = 185)</i>			
<i>Ia</i>	32 (16%)	22 (12%)	n.s.
<i>Ib</i>	11 (6%)	7 (4%)	
<i>IIa</i>	13 (7%)	20 (11%)	
<i>IIb</i>	6 (3%)	4 (2%)	
<i>IIIa</i>	14 (7%)	13 (7%)	
<i>IIIb</i>	4 (2%)	7 (4%)	
<i>IV</i>	21 (11%)	11 (6%)	
<i>pTNM-Staging (AJCC, n = 139)</i>			
<i>Ia</i>	21 (15%)	18 (13%)	n.s.
<i>Ib</i>	13 (9%)	5 (4%)	
<i>IIa</i>	4 (3%)	8 (6%)	
<i>IIb</i>	6 (4%)	7 (5%)	
<i>IIc</i>	2 (1%)	3 (2%)	
<i>IIIa</i>	4 (3%)	7 (5%)	
<i>IIIb</i>	10 (7%)	8 (6%)	
<i>IIIc</i>	0 (0%)	3 (2%)	
<i>IV</i>	14 (10%)	6 (4%)	

n.s., nicht signifikant

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven verdeutlichen, dass der Gly388Arg-Polymorphismus beim malignen Melanom keinen Einfluss auf das Overall-Survival (Abbildung 3.23) und das Disease free-Survival (Abbildung 3.24) hat.

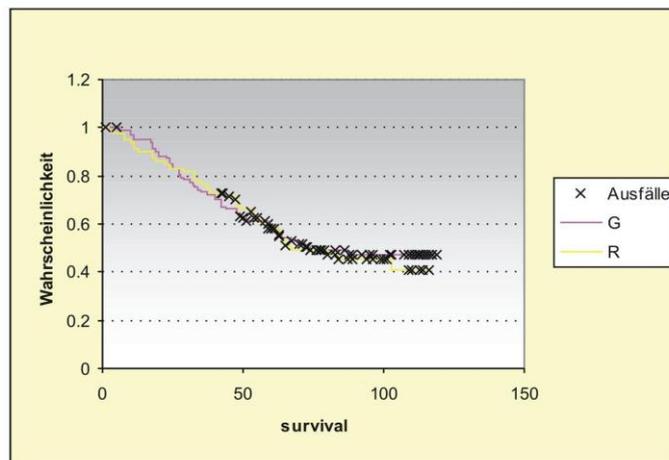


Abbildung 3.23: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Bezug auf das Overall-Survival in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus in malignen Melanomen

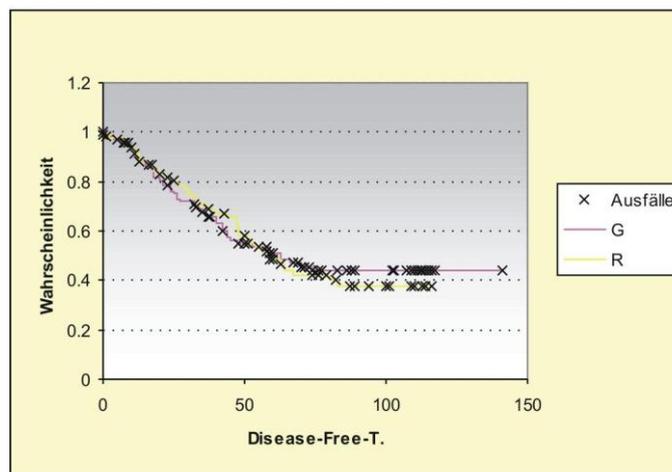


Abbildung 3.24: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Bezug auf das Disease-free-Survival in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus in malignen Melanomen

Dementsprechend zeigt sich bei der Anzahl der lebenden und verstorbenen Patienten kein Unterschied in Bezug auf das Vorliegen des Gly388- oder Arg388-Allels (Abbildung 3.25).

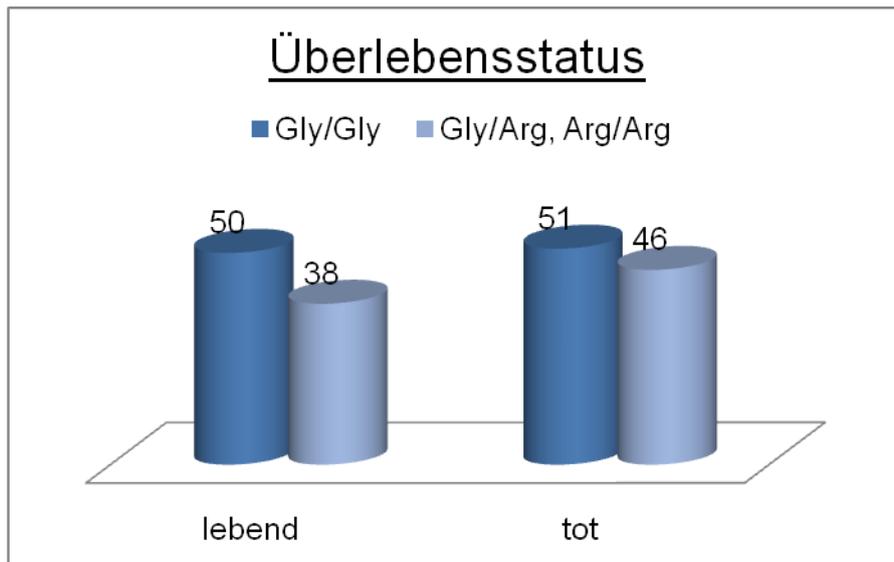


Abbildung 3.25: Lebende und verstorbene Melanompatienten in Abhängigkeit vom FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus (Beobachtungszeitraum von 2 bis 141 Monaten)

4. Diskussion

Das Verhalten von Zellen in Bezug auf Teilung, Migration und Untergang wird den jeweils unterschiedlichen Lebensumständen des dazugehörigen Organismus angepasst. Dabei greifen verschiedene intra- und extrazelluläre Mechanismen ein und steuern das komplexe System von exogenen und endogenen Faktoren. Störungen in dem Gleichgewicht von Zellerneuerung und Zelluntergang aber auch dem programmierten oder dem ungewollten Zelltod können zu einem unkontrollierten nicht mehr beeinflussbaren Wachstum von Zellen, Zellkomplexen oder Organen führen. Im äussersten Fall erhalten diese Gewebe eine eigene Autonomie und die Fähigkeit, Tochtergeschwülste in andere Organe zu setzen. Eines dieser vielen regulierenden Systeme ist die Familie der RTK, deren Aktivität unter physiologischen Bedingungen streng kontrolliert abläuft. Eine Fehlfunktion dieser Kontrollmechanismen, beispielsweise durch eine von der Norm abweichende Expression der RTK/Liganden-Systeme oder durch mutierte Varianten der Botenstoffe beziehungsweise deren Rezeptoren kann in eine reduzierte oder erhöhte intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität münden. Insbesondere Alterationen in diesem System sind häufig mit Krebs oder anderen strukturellen Veränderungen von Geweben assoziiert (Hafner *et al.*, 2006a; Webster und Donoghue, 1997; Wilkie *et al.*, 1995).

In einer Studie von Bange *et al.* (2002) hat man sich mit dem Rezeptor-Subtyp-4 der Fibroblastenwachstumsfaktoren auseinandergesetzt und entdeckt, dass ein Polymorphismus im Bereich der Transmembrandomäne einen negativen Einfluss auf den klinischen Verlauf von Patienten mit Mamma- und Kolonkarzinomen besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Keimbahnmutation zu einem Austausch des normalerweise vorkommenden Glycin zu der stärker geladenen Aminosäure Arginin in Position 388 führt. Dies bedingt wahrscheinlich eine stärkere Interaktion zwischen dem entsprechenden Liganden und dem Rezeptor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der von Bange *et al.* (2002) beschriebene Einfluss von FGFR4 und seines Gly388Arg-Polymorphismus auf maligne Melanome charakterisiert werden. Dazu wurde ein Kollektiv von 198 Melanompatienten mit einem Nachsorgezeitraum von bis zu 141 Monaten untersucht. Die immunhistochemisch ermittelte Expression von FGFR4 und der mit einer PCR-RFLP-

Analyse ermittelte Genotyp sollten dabei Aufschluss über mögliche Zusammenhänge zwischen der Tumorentwicklung und dem Tumorverhalten demonstrieren.

4.1 FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen

Die immunhistochemische Analyse von 137 histologisch auswertbaren malignen Melanomen zeigte, dass FGFR4 in 44% der Fälle (61/137) exprimiert wurde. Erhöhte Expressionsraten von FGF-Rezeptoren beziehungsweise eine Amplifikation des FGFR4-Gens wurden bereits für Brustkrebs (32%) (Penault-Llorca, 1995, McLeskey, 1994), Ovarialkarzinome (etwa 20%) (Jaakkola *et al.*, 1993; Lehtola *et al.*, 1992), Bauchspeicheldrüsenkrebs (50-70%) (Shah *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 1994) und Nierenzell-Karzinome (Takahashi *et al.*, 1999) beschrieben. Die Expression von FGFR1 in malignen Melanomen liegt mit 86% (24/28) im Vergleich zur FGFR4-Protein-Expression deutlich höher (Giehl *et al.*, 2007). Allerdings wird FGFR1 bereits in normalen Melanozyten exprimiert (Becker *et al.*, 1992) und scheint physiologisch eine Rolle bei der Melanozytenfunktion zu spielen. Welchen Einfluss eine erhöhte FGFR1-Expression auf maligne Melanome hat, konnte in einer Arbeit gezeigt werden, bei der es durch Inaktivierung einer Kinase der Src-Familie zu unterdrückter FGFR1-Aktivität mit folglich verminderter Zellproliferation kam (Yayon *et al.*, 1997). Eine 100%-ige FGFR4-Expression findet sich in Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen von Hodgkin-Lymphomen, während normale Lymphozyten FGFR4 offensichtlich nicht exprimieren. Welchen pathologischen Einfluss FGFR4 auf Hodgkin-Lymphome hat, wurde allerdings nicht beschrieben (Khnykin *et al.*, 2006).

Normale Melanozyten waren im Gegensatz zu Melanomzellen nicht mit dem anti-FGFR4-Antikörper anfärbbar, was darauf schließen lässt, dass Melanomzellen die Fähigkeit zur FGFR4-Expression erst während ihrer malignen Transformation entwickeln. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Patientinnen mit Brustkrebs gemacht, wobei gezeigt werden konnte, dass FGFR4 nicht in gesundem Brustgewebe, aber in Mammakarzinomen exprimiert wird (Bange *et al.*, 2002; Hughes, 1997). Anders scheint es sich bei Prostatakarzinomen zu verhalten, da in einer Studie demonstriert wurde, dass FGFR4 sowohl in benignem als auch malignem Prostatagewebe vorkommt. Die Expressionsstärke von FGFR4 in

Prostatakarzinomen nahm allerdings im Vergleich zur benignen Prostatahyperplasie deutlich zu (Sahadevan *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit konnte in Bezug auf die Expressionsstärke beziehungsweise die Färbeintensität (schwach = „+“: 4%; mittel = „++“: 37%; stark = „+++“: 4%) und auch auf den Anteil positiv gefärbter Tumorzellen (100% n = 20; 50-99% n = 10; 10-49% n = 21; 1-9% n = 10) im Vergleich zu Prostatakarzinomen (Sahadevan *et al.*, 2007) und Plattenepithelkarzinomen (Streit *et al.*, 2004) kein Zusammenhang zum klinischen Verlauf oder zu pathologischen Veränderungen gezeigt werden. Aus diesem Grund wurden für die statistische Auswertung alle FGFR4 exprimierenden Melanome zu einer Entität zusammengefasst. In Übereinstimmung mit anderen Studien, die sich mit der Expression von FGFR4 beschäftigten, färbt sich bei FGFR4 nur das Zytoplasma an (Mawrin C *et al.*, 2006; Gowardhan B *et al.*, 2005), wohingegen beispielsweise in Gliomzellen bei FGFR1 auch eine nukleäre Färbung zu finden ist (Maher PA *et al.*, 1996; Stachowiak EK *et al.*, 1997).

Welchen Einfluss die FGFR4-Protein-Expression auf maligne Melanome besitzt, wird bei dem Vergleich mit klinischen Parametern deutlich. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der FGFR4-Protein-Expression und den Tumorstadien der UICC- ($p = 0,023$; Tabelle 3.20 und Abbildung 3.18) und AJCC- ($p = 0,046$; Tabelle 3.20 und Abbildung 3.19) pTNM-Staging-Systeme. In den frühen Stadien (I und II) exprimierte nur die Minderheit der malignen Melanome FGFR4, während die Expressionsrate bei den höheren Stadien (III und IV) deutlich zunahm. Entsprechend den Stadien III und IV korrelierte die FGFR4-Protein-Expression mit der Metastasierung ($p = 0,025$; Tabelle 3.11, Abbildung 3,8), wobei kein Unterschied zwischen den Metastasierungswegen (lokal, regional, fern) gefunden werden konnte. Allerdings zeigten die Primärmelanome der metastasierten Patienten überdurchschnittlich häufig eine positive Färbung für FGFR4, sodass vermutet werden kann, dass die Expression dieses Rezeptors eine wichtige Rolle in der Progression und insbesondere der Metastasierung von malignen Melanomen spielt. Entscheidend für die Ausbreitung eines Tumors, im Sinne von Tochtergeschwüren, ist einerseits die Fähigkeit von Zellen, sich über Migration und Motilität aus ihrem Zellverband zu lösen, andererseits müssen die Zellen Anschluss an Lymph- oder Blutgefäße bekommen, um forttransportiert werden zu können. Wegen seiner hohen Wachstumsgeschwindigkeit ist ein Tumor auf neu gebildete Blutgefäße angewiesen, damit ein ausreichendes Angebot an Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet wird.

Es ist gut bekannt, dass die RTK und ihre Liganden, vor allem bFGF und FGFR1, ein hohes angiogenetisches Potential besitzen und damit an der Neovaskularisation von Melanomen maßgeblich beteiligt sind (Rak und Kerbel, 1997; Straume und Akslen, 2002; Wang und Becker, 1997; Burgess und Maciag, 1989; Folkman und Klagsbrunn, 1987). Compagni et al. verwendeten einen Adenovirus, durch den lösliche FGF-Rezeptoren exprimiert werden, die mit den Liganden in Zellkulturen interferieren. In einem Kollagengel, in welchem Endothelzellen mit Tumorbiopsien kultiviert wurden, zeigte sich daraufhin eine verminderte Proliferation der endothelialen Zellen und folglich auch der Tumorzellen (Compagni et al., 2000). Somit wird deutlich, dass die Gefäßdichte in Tumoren und damit die Wege zu einer Verschleppung von Tumorzellen unter anderem durch bFGF und seine Rezeptoren begünstigt wird. Kashani Sabet et al. untersuchten in einer Studie den Einfluss der Gefäßdichte in malignen Melanomen und verglichen vier Dichte-Stufen mit dem klinischen Verlauf der Patienten. Es wurde deutlich, dass Patienten aus der Gruppe mit der höchsten Gefäßdichte die schlechteste Prognose und die kürzeste Überlebenszeit aufwiesen und dass eine erhöhte Gefäßdichte mit verstärkter Mikro-Ulzeration von Melanomen einherging (Kashani Sabet et al., 2002). Entsprechend der Ergebnisse von Kashani Sabet et al. und dem beschriebenen Einfluss von FGFR4 auf die Tumorstadien und die Metastasierung konnte in dieser Studie ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,001$; Tabelle 3.8 und Abbildung 3.4) zwischen der FGFR4-Protein-Expression und einer deutlich erhöhten Gefäßdichte (MVD = *microvessel density*) in malignen Melanomen beobachtet werden. Kashani Sabet et al. beschrieben zudem einen Zusammenhang zwischen starker Gefäßdichte und Ulzeration von Melanomen (Kashani Sabet et al., 2002). Diese gilt nach der pTNM-Stadieneinteilung des AJCC 2002 (Kim et al., 2002) als eine der histologisch prognosebestimmenden Variablen. Bei einer Ulzeration kann es leichter zu einem Einbrechen von Tumorzellen in die Gefäße kommen, was zu einer Aussaat der Tumorzellen in andere Organe führen kann. Des Weiteren ist eine Ulzeration oft ein Marker für ein sehr schnelles Tumorstadium, wobei die neugebildeten Gefäße nicht ausreichen, um den Tumor mit entsprechenden Nährstoffen zu versorgen. Dadurch kann er teilweise nekrotisch werden und aufbrechen. Ein solch schnelles Wachstum ist gleichzeitig als Zeichen für ein aggressives Verhalten eines Tumors zu sehen, was ebenfalls wichtig für die Prognose und den klinischen Verlauf ist. Beim Vergleich der FGFR4-exprimierenden Melanome und mikroskopisch nachweisbaren

Ulzerationen zeigte sich in dieser Arbeit ein Zusammenhang mit signifikant relevantem Ergebnis ($P = 0,009$; Tabelle 3.12 und Abbildung 3.9), was daraufhin deutet, dass die Expression von FGFR4 zu einem aggressiveren Phänotyp und schnellerem Tumorwachstum prädisponiert.

Ein zweiter Mechanismus, der eine Metastasierung begünstigen kann, ist die Migration von Zellen. aFGF und bFGF spielen insbesondere in Interaktion mit dem FGFR4 eine bedeutende Rolle, die von Johnston *et al.* beschrieben wurde. Es konnte *in vitro* belegt werden, dass nach einer Stimulation von Mammakarzinomzellen mit aFGF, nicht aber in gesundem Brustgewebe ein so genanntes „membrane ruffling“, eine Umlagerung im Aktin-Zytoskelett stattfindet, was als ein Vorgang der Zellmigration zu werten ist (Johnston *et al.*, 1995). Bemerkenswert ist hierbei, dass nur die FGFR4-exprimierenden Brustkrebszellen, nicht allerdings Tumorzellen die diesen Rezeptor nicht exprimieren, zu einem „membrane ruffling“ befähigt sind. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der FGFR4-Proteinexpression und einem verstärkten Metastasierungsverhalten von Tumorzellen besteht.

In verschiedenen Zelllinien wurde gezeigt, dass FGFR4 im Vergleich zu FGFR1 und KGFR (*keratinocyte growth factor receptor*) nur eine geringe mitogene Aktivität aufweist (Shaoul *et al.*, 1995; Vainikka *et al.*, 1994). Vergleichende Untersuchungen, welche die unterschiedlichen mitogenen Potentiale der verschiedenen FGFR beschreiben, wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Allerdings konnte in einer Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 belegt werden, dass Melanome, die FGFR4 exprimierten, auch eine höhere Proliferationsrate zeigten. Die Beobachtungen aus anderen Studien von einer kaum verstärkten Mitose unter FGFR4 (Shaoul *et al.*, 1995; Vainikka *et al.*, 1994) decken sich damit nicht mit den Ergebnissen in dieser Arbeit. Lichtmikroskopisch wurden im Durchschnitt 24 Zellteilungen pro Gesichtsfeld (Ki-67-positive Zellen) in den FGFR4-exprimierenden Tumoren gesehen, während es bei den FGFR4-negativen Tumoren nur 14 Zellteilungen waren (Tabelle 3.10 und Abbildung 3.6).

Unter den klinischen Kriterien gelten eine vermehrte Anzahl an malignen Melanomen in der Vergangenheit oder solche, die sich in der Nachsorge entwickeln, als prognostisch ungünstig. Nicht geklärt ist, ob sich die Melanome in solchen Fällen auf bereits bestehenden, sogenannten dysplastischen Nävi entwickeln oder *de-novo* in gesunder Haut entstehen. Da sich in dieser Studie eine signifikante Korrelation

zwischen der Expression von FGFR4 und mindestens einem weiteren histologisch gesicherten Melanomen belegen ließ ($p = 0,022$), ist anzunehmen, dass FGFR4 eine bedeutende Rolle in der Entstehung von malignen Melanomen spielen könnte, auch wenn der Mechanismus hierfür unklar ist. Interessant wären Untersuchungen, in denen es möglicherweise im Sinne eines Mehrphasenmodelles bei bestimmten Nävuszellnävi zu einer Expression des Rezeptors kommt, die dann nach den oben beschriebenen Daten zu malignen Melanomen mit schlechterer Prognose entarten. Bekannt ist, dass dysplastische Nävi die Fähigkeit erwerben, bFGF in unterschiedlich starkem Ausmaß zu exprimieren und sich somit möglicherweise auf autokrinem Weg selbst im Wachstum zu stimulieren (Scott *et al.*, 1991; Reed JA *et al.*, 1994). Als korrespondierender Rezeptor wird beispielsweise FGFR1 in dysplastischen Nävi zu 64% und in nicht-dysplastischen Nävi zu 68% exprimiert. Eine Koexpression von FGFR1 und bFGF in dysplastischen Nävi konnte allerdings nur in 18% der Fälle gefunden werden (Giehl *et al.*, 2007). Von Interesse wäre daher eine Untersuchung, die eine Koexpression von bFGF und FGFR4 in melanozytären Läsionen beschreiben würde.

Die Datenlage dieser Arbeit bezüglich der FGFR4-Protein-Expression in malignen Melanomen und den statistisch signifikanten Korrelationen im Vergleich mit den Tumorstadien und dem gesteigerten Metastasierungspotential sowie den mehrfach diagnostizierten Tumoren in einer Person bei positiver Rezeptor-Expression wird zusätzlich durch die Überlebensanalysen nach der Kaplan-Meier-Methode gestützt. Es zeigte sich mit signifikantem Ergebnis im Log-Rank-Test sowohl für die Überlebenszeit („Overall survival“, $p = 0,047$; Abbildung 3.20), als auch für das rezidivfreie Überleben („Disease-free-Survival“, $p = 0,024$; Abbildung 3,21) jeweils ein Unterschied von etwa 20% zugunsten der Patienten, deren Melanome keine FGFR4-Protein-Expression aufwiesen. Dies verdeutlicht den Einfluss von FGFR4 auf die Tumorprogression und auf die Prognose von Patienten mit malignen Melanomen.

4.2 FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus in malignen Melanomen

Die Analyse des Genotyps in Bezug auf die Gly388Arg-Allel-Verteilung in malignen Melanomen konnte in 185 von 198 Fällen durchgeführt werden. Der FGFR4-Arg388-Polymorphismus ist dabei eine relativ häufige Sequenzvariante, die homozygot oder zumindest heterozygot in bis zu 50% der Fälle auch in gesunden Kontrollgruppen vorkommt (Bange *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte in malignen Melanomen das mutierte Arg388-Allell mit 45% (84 von 185) in ähnlicher Verteilung wie bei Mammakarzinomen (50%) (Bange *et al.*, 2002), (51%) (Thussbas *et al.*, 2006), Weichteilsarkomen (37%) (Morimoto *et al.*, 2003) und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen (45%) (da Costa Andrade VC *et al.*, 2007) gefunden werden. Da das mutierte Allel auch in der gesunden Bevölkerung vorkommt (55% in der Kontrollgruppe von Bange *et al.*) spricht man auch von einem *susceptibility polymorphism*, also einem Prädispositions-Polymorphismus. Dies bedeutet, dass das Arg388-Allel Krebs wahrscheinlich nicht induzieren, allerdings den Verlauf von malignen Erkrankungen, insbesondere den Prozessen der Metastasierung entscheidend beeinflussen kann (Stadler *et al.*, 2005; Bange *et al.*, 2002; Streit *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Die Tumorentstehung könnte also durch exogene oder endogene Noxen wie UV-Licht oder Hormone induziert werden, wobei die weitere Progression durch einen erblichen Parameter wie den FGFR4-Arg388-Genotyp bestimmt würde. In molekularbiologischen Studien von Rezeptortyrosinkinasen, vor allem von FGFR4, konnte demonstriert werden, dass die veränderte Polarisierung der Transmembrandomäne des Rezeptors über den Einbau der hydrophilen Aminosäure Arginin anstelle des neutralen Glycins in Position 388 nur eine schwache Erhöhung der Rezeptoraktivität bewirkt (Jiang *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 2000; Bange *et al.*, 2002). Dies könnte die Erklärung dafür sein, warum gesunde Arg388-Allel-Träger keinem negativen Einfluss des Arg388-Allels unterliegen. In verschiedenen Studien wurde postuliert, dass das Arg388-Allel zum Beispiel bei Mamma- und kolorektalen Karzinomen (Bange *et al.*, 2002), Prostatakarzinomen (Wang *et al.*, 2004) und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen (da Costa Andrade VC *et al.*, 2007; Streit *et al.*, 2004) zu einem aggressiveren Verhalten der Tumoren mit verstärkter Lymphknotenmetastasierung führt und mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergeht (Bange *et al.*, 2002; da Costa Andrade VC *et al.*, 2007). Des Weiteren zeigte eine Studie über Adenokarzinome der Lunge einen verstärkten hilären

Lymphknotenbefall, ein jüngeres Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose (medianes Alter 60,2 Jahre beim Arg388-Allel versus 63,4 Jahre beim Gly388-Allel) und ein verkürztes Gesamtüberleben beim Vorliegen eines homo- oder heterozygoten Arg388-Allels. Ein unterschiedlicher klinischer Verlauf zwischen homo- (Arg/Arg) und heterozygoten (Gly/Arg) Trägern konnte allerdings nicht gezeigt werden, so dass bereits das Vorliegen nur eines Arg-Allels die Prognose verschlechtert (Spinola *et al.*, 2005a). Auch die Prävalenz zumindest eines Arg388-Allels zeigte bei Adenokarzinomen der Lunge eine ähnliche Verteilung wie bereits oben beschrieben (46% bei den Krebspatienten $n = 274$; 52% in der Kontrollgruppe $n = 401$). In Annäherung zu der Arbeit von Spinola *et al.* konnte bei der Untersuchung des Arg388-Allels in malignen Melanomen in dieser Arbeit ebenfalls ein Zusammenhang mit einem jüngeren Alter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt im Vergleich zum Gly388-Allel aufgezeigt werden. Das durchschnittliche Patientenalter beim Gly388-Genotyp lag mit 68 Jahren über dem heterozygoten Arg388-Genotyp mit 64 Jahren und sogar deutlich über dem homozygoten Arg388-Genotyp mit 55 Jahren.

Bange *et al.* beschrieben in ihrer Studie ein verstärktes Migrationsverhalten und eine erhöhte Zellmotilität der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, wenn diese über die Infektion eines Retrovirus das Arg388-Allel exprimierten, im Vergleich zu Tumorzellen derselben Zellenreihe, die das Gly388-Allel aufwiesen (Bange *et al.*, 2002). Hiermit könnte die verstärkte Lymphknotenmetastasierung und damit einhergehend die verschlechterte Prognose der Patienten durch die Arg388-Mutante erklärt werden.

In der hier durchgeführten Studie zum malignen Melanom konnten die bereits publizierten Ergebnisse für andere Krebsformen zumindest teilweise bestätigt werden. Klinisch und vor allem histologisch gibt es verschiedene Subtypen maligner Melanome (s. Einleitung 1.1.3), mit unterschiedlicher Prognose. Das Arg388-Allel wurde vorwiegend in nodulären malignen Melanomen (NMM) gefunden, die sich im Vergleich zu den superfiziell spreitenden Melanomen (SSM) und anderen Melanom-Subtypen durch ein vorwiegend vertikales Wachstumsverhalten mit erhöhtem Metastasierungsrisiko und schlechterer Prognose auszeichnen ($p = 0,002$; Tabelle 3.20 und Abbildung 3.17). Da noduläre maligne Melanome in der Regel eine größere Tumordicke aufweisen, korrelierte der Genotyp ebenfalls mit der Tumordicke sowohl nach Breslow in Millimetern ($p = 0,02$; Tabelle 3.20 und Abbildung 3.14) als auch

nach dem Clark-Level in I-V ($p = 0,004$; Tabelle 3.20 und Abbildung 3.16). Während der Clark-Level zwar prognostisch von Bedeutung ist, geht vornehmlich die Tumordicke nach Breslow in die pTNM-Stadieneinteilung ein und ist daher sowohl für die Prognose, als auch für die weitere Therapie und die Nachsorge von größter Bedeutung. Diese Daten deuteten zunächst auf einen Einfluss des FGFR4-Arg388-Allels auf die Melanomprogression und ließen vermuten, dass sich der klinische Verlauf entsprechend verhalten würde. Allerdings zeigte sich, obwohl bei dem entscheidenden prognostischen Parameter, nämlich der Tumordicke nach Breslow, ein signifikantes Ergebnis vorlag, bezüglich der TNM-Tumorstadien keine Tendenz zu einem der beiden Gly388Arg-Genotypen. Ebenso war im Gegensatz zur Protein-Expression von FGFR4 in Bezug auf die Metastasierung der Melanome, wie beispielsweise dem Vorhandensein von Metastasen (ja vs. nein), der Anzahl an Metastasen (1 vs. > 1) und der Lokalisation der Metastasen (Lokal- vs. Regional- vs. Fernmetastasen) kein Zusammenhang zum Genotyp ersichtlich. Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in den graphischen Kaplan-Meier-Überlebensanalysen wider, bei denen sowohl im Gesamtüberleben („Overall survival“), als auch im rezidivfreien Überleben („Disease-free-Survival“) kein Unterschied zwischen den Genotypen aufgedeckt werden konnte. Die Kurven zwischen dem Arg-Allel und dem Gly-Allel verliefen sogar nahezu gleich. Bei Bange *et al.* wurde dagegen in der Überlebenskurve nach Kaplan-Meier ein signifikant reduziertes rezidivfreies Überleben bei Mammakarzinomen mit Lymphknotenmetastasierung ermittelt ($p = 0,01$; Bange *et al.*, 2002). Thusbas *et al.* beschrieben in einer anderen Studie, die sich mit dem Einfluss des Arg388-Allels auf den klinischen Verlauf von Brustkrebspatientinnen beschäftigte, ebenfalls eine verschlechterte Prognose für das rezidivfreie Überleben ($p = 0,02$) und das Gesamtüberleben ($p = 0,04$; Thusbas *et al.*, 2006). Des Weiteren schien bei Patientinnen, die das Arg388-Allel aufweisen, eine schlechtere Ansprechrate auf adjuvante Chemotherapien zu bestehen, da sie im Gegensatz zu Patientinnen mit dem Gly388-Allel keinen Vorteil aus der Therapie ziehen konnten und sich die Überlebensdaten trotz adjuvanter Therapie kaum von Patientinnen ohne Chemotherapie unterschieden (Thusbas *et al.*, 2006). Der Arg388-Genotyp bei Adenokarzinomen der Lunge korrelierte signifikant mit einem reduziertem Gesamtüberleben ($p = 0,008$; Spinola *et al.*, 2005a). Weiterhin wurde in Weichteilsarkomen ein inverser Zusammenhang zwischen dem FGFR4-Arg388-

Polymorphismus und dem Gesamtüberleben ($p = 0,029$) sowie dem rezidivfreien Überleben ($p = 0,045$) gefunden, welcher bei Osteosarkomen in derselben Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte (Morimoto *et al.*, 2003). Im Falle der Weichteilsarkome konnte zudem demonstriert werden, dass Patienten mit dem nicht-mutierten Gly388-Genotyp signifikant länger rezidiv- und metastasierungsfrei überlebten ($p = 0,045$; Morimoto *et al.*, 2003). Ohne den genauen molekularen Mechanismus zu kennen, scheint der FGFR4-Arg388-Polymorphismus in diesen Arbeiten zu einem aggressiveren Phänotyp zu führen, was sich allerdings in unserer Arbeit bei malignen Melanomen nicht zeigte. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Arbeitsgruppen, die sich mit dem Gly388Arg-Polymorphismus von FGFR4 in verschiedenen Tumoren beschäftigten. Spinola *et al.* beschrieben zwar einen negativen Einfluss des Arg388-Allels auf Adenokarzinome der Lunge (Spinola *et al.*, 2005a), widerlegten aber im Gegensatz zu Bange *et al.* und Thussbas *et al.* einen prognoseverschlechternden Einfluss des Polymorphismus bei Patienten mit Mamma- und kolorektalen Karzinomen (Bange *et al.*, 2002; Thussbas *et al.*, 2006). Sie konnten weder bei Patientinnen mit Brustkrebs ($n = 142$) einen Zusammenhang zwischen Rezeptormutation und dem Gesamtüberleben finden, noch konnten sie bei Patienten mit Dick- und Enddarmkrebs ($n = 179$) Einflüsse des Arg388-Genotyps auf Lymphknoten- oder Fernmetastasierung, auf das Patientenalter zum Diagnosezeitpunkt oder auf die Dukes-Stadien aufzeigen (Spinola *et al.*, 2005b). Weiterhin berichteten zwei Arbeitsgruppen, eine aus Frankreich ($n = 234$) und eine aus Deutschland ($n = 706$), dass für Brustkrebspatientinnen kein erhöhtes Risiko für eine Lymphknotenmetastasierung bei Vorliegen des Arg388-Allels bestand (Jezequel *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2003).

Es wurde postuliert, dass ein Zusammenhang zwischen dem Arg388-Genotyp und einer verstärkten FGFR4-Protein-Expression besteht, so dass das Vorliegen der Mutante eine erhöhte Rezeptordichte von FGFR4 bedingt (Streit *et al.*, 2004; Bange *et al.*, 2002). Auch Wang *et al.* nahmen an, dass bei Prostatakarzinomen ein synergistischer Effekt zwischen dem Vorhandensein des FGFR4-Arg388-Allels, einer erhöhten Ligandenexpression von FGFR4 und einer verstärkten FGFR4-Protein-Expression besteht und dies zu einem aggressiveren Verhalten und Tumorprogression führt (Wang *et al.*, 2004). Allerdings konnte in unserer Arbeit keine Kausalität zwischen dem FGFR4-Gly388Arg-Polymorphismus und der FGFR4-Protein-Expression, die wie oben beschrieben (Diskussion 4.1) tatsächlich einen

aggressiveren Phänotyp bedingt, hergestellt werden. Unserer Datenlage nach, erfolgt die FGFR4-Protein-Expression unabhängig vom untersuchten Genotyp.

Es konnte gezeigt werden, dass Krebszellen, die mindestens heterozygot für das FGFR4-Arg388-Allel sind, eine erhöhte Zellmotilität und Invasivität besitzen (Bange *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein, dass maligne Melanome bei Trägern des Arg388-Genotyps höhere Tumordicken und Eindringtiefen aufweisen. Andererseits konnte keine Korrelation zwischen dem Arg388-Genotyp und dem klinischen Verlauf gefunden werden. So zeigte sich in den Kaplan-Meier-Überlebenskurven kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Arg388- und dem Gly388-Allel. Somit könnte man annehmen, dass der FGFR4-Arg388-Polymorphismus zwar nicht als prognosebestimmender Faktor, aber in Hinblick auf die Invasion, als zusätzlicher Risikofaktor für eine verstärkte Tumorprogression bei malignen Melanomen verwendet werden kann. Es mag spekuliert werden, ob eine größere Kohorte von Melanompatienten oder eine längere Beobachtungsperiode die Ergebnisse der Überlebensdaten verändern würde.

Die unterschiedlichen Ergebnisse von Untersuchungen in Bezug auf den Arg388-Polymorphismus von FGFR4 in verschiedenen Tumoren zeigt, dass diese Mutation des Rezeptors nur für wenige Krebsarten von prognostischer Bedeutung ist. Insgesamt bestehen in der Literatur sehr große Diskrepanzen, sogar innerhalb derselben Erkrankungen, so dass der Stellenwert des Gly388Arg-Polymorphismus für die Progression von Tumoren kritisch beurteilt werden muss.

5. Zusammenfassung

Im Jahr 2002 wurde ein Polymorphismus im Gen der Rezeptortyrosinkinase FGFR4 entdeckt, wodurch innerhalb der Transmembrandomäne des Rezeptors ein Austausch der neutralen Aminosäure Glycin gegen das geladene hydrophile Arginin in Position 388 erfolgt. Dadurch kommt es zu einer veränderten Proteinstruktur sowie scheinbar zu einer verstärkten Rezeptor-Liganden-Interaktion. In mehreren Studien, die verschiedene Krebsformen hinsichtlich dieser Keimbahnmutation untersuchten, wurden Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus und der Tumorprogression sowie einem verstärkten Metastasierungsverhalten beschrieben. Da Fibroblastenwachstumsfaktoren, insbesondere bFGF, zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren in malignen Melanomen zählen, wurden in dieser Arbeit 198 Melanomgewebeproben, auf den Gly388Arg-Genotyp von FGFR4 und auf die FGFR4-Protein-Expression untersucht. Die Analysen erfolgten mittels PCR-RFLP und Immunhistochemie und die Ergebnisse wurden mit klinischen und pathologischen Parametern verglichen und statistisch ausgewertet. Es zeigte sich eine FGFR4-Protein-Expression in 44% von 137 immunhistochemisch auswertbaren Melanomen (61/137). Signifikante Ergebnisse bezüglich des Einflusses von FGFR4 auf das Tumorverhalten konnten hinsichtlich der Gefäßdichte ($p = 0,001$), dem Vorliegen von Mikroulzerationen ($p = 0,009$), der Anzahl an primären malignen Melanomen ($p = 0,022$) sowie dem Vorliegen von Metastasen ($p = 0,025$) gefunden werden. Darüberhinaus zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der FGFR4-Expression und den pTNM-Tumorstadien (UICC, $p=0,023$ and AJCC, $p=0,046$) sowie den Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier, sowohl für das Gesamtüberleben (Overall-Survival, $p = 0,047$), als auch für das rezidivfreie Überleben (Disease-free Survival, $p = 0,024$).

Weiterhin konnten 185 der 198 Gewebeproben auf ihren Gly388Arg-Genotyp untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass das mutierte Arg388-Allel in 45% der Fälle vorlag (84/185). Die statistischen Auswertungen ergaben signifikante Zusammenhänge zwischen dem Arg388-Polymorphismus und dem Subtyp der nodulären malignen Melanome (NMM, $p = 0,002$) sowie der Tumordicke nach Breslow in Millimetern ($p = 0,02$) und der Eindringtiefe in die verschiedenen Hautschichten nach Clark (Clark-Level, $p = 0,004$). Allerdings ergaben sich trotz

dieser prognosebestimmenden Faktoren keinerlei Hinweise auf ein verkürztes Gesamt- und rezidivfreies Überleben sowie auf eine verstärkte Metastasierung, wie sie bei anderen Tumoren beschrieben worden waren. Auch zeigte sich trotz des Zusammenhanges zur Tumordicke keine Korrelation zu den pTNM-Tumorstadien, so dass der Einfluss des FGFR4-Arg388-Allels auf die Tumorprogression im Vergleich zu anderen Krebsformen nur zum Teil beim malignen Melanom demonstriert werden konnte. Unabhängig des spezifischen Polymorphismus scheint jedoch der Rezeptor FGFR4 selbst, angesichts der hohen Expressionsrate in fortgeschrittenen Tumorstadien und der statistisch positiven Korrelationen in Bezug auf einen aggressiveren klinischen Verlauf eine wichtige prognostische Rolle bei malignen Melanomen zu spielen.

6. Literaturverzeichnis

Abraham JA, Whang JL, Tumoli A, Mergia A, Friedmann J, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986) Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *Embo J* **5**:2523-2528

Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M (2000) Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* **96**:2240-2245

Albino AP, Davis BM, Nanus DM (1991) Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation. *Cancer Res* **51**:4815-4820

al-Alousi S, Barnhill R, Blessing K, Barksdale S (1996a) The prognostic significance of basic fibroblast growth factor in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* **23**:506–510

al-Alousi S, Carlson JA, Blessing K, Cook M, Karaoli T, Barnhill RL (1996b) Expression of basic fibroblast growth factor in desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol* **23**:118-125

Armelin HA (1973) Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci* **70**:2702-2706

Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, Knyazeva T, Muller S, Gartner S, Sures I, Wang H, Imyanitov E, Haring HU, Knayzev P, Iacobelli S, Hofler H, Ullrich A (2002) Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res* **62**:840-847

Barnard D, Diaz B, Clawson D, Marshall M (1998) Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene* **17**:1539-1547

Becker D, Lee PL, Rodeck U, Herlyn M (1992) Inhibition of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene* **7**:2303-2313

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 Epidemiol Biomarkers Prev* **12**:582-583

Bell CA, Tynan JA, Hart KC, Meyer AN, Robertson SC, Donoghue DJ (2000) Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Mol Biol Cell* **11**:3589-3599

Berking C (2005) Bedeutung von Strahlung beim malignen Melanom. *Hautarzt* **56**:687-696

- Berking C, Takemoto R, Satyamoorthy K, Elenitsas R, Herlyn M (2001) Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. *Am J Pathol* **158**:943-953
- Berking C, Takemoto R, Satyamoorthy K, Shirakawa T, Eskandarpour M, Hansson J, VanBelle PA, Elder DE, Herlyn M (2004) Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. *Cancer Res* **64**:807-811
- Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricke A, Eberle C, Barnhill R (2005) Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst* **97**:195-199
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* **18**:26-45
- Bishop J (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**:235-248
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**:355-365
- Bosserhoff AK et al. (1997) Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* **57**:3149-3153
- Breslow A (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* **172**:902-908
- Burgess WH, Maciag T (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* **58**:575-606
- Burke D, Wilkes D, Blundell TL, Malcolm S (1998) Fibroblast growth factor receptors: lessons from genes. *TIBS* **23**:59-62
- Champion-Arnaud P, Ronsin C, Gilbert E, Gesnel MC, Houssaint E, Breathnach R (1991) Multiple mRNAs code for proteins related to the BEK fibroblast growth factor receptor. *Oncogene* **6**:979-987
- Compagni A, Wilgenbus P, Impagnatiello MA, Cotten M, Christofori G (2000) Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res* **60**:7163-7169
- da Costa Andrade VC, Parise O Jr, Hors CP, de Melo Martins PC, Silva AP, Garicochea B (2007) The fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) Arg388 allele correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* **82**:53-57
- Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC (2006) Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* **24**:4340-4346
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C and Ullrich A (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**:5557-5560

Dellacono FR, Spiro J, Eisma R, 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

Deng CX, Wynshaw-Boris A, Shen MM, Daugherty C, Ornitz DM, Leder P (1994) Murine FGFR1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev* **8**:3045-3057

Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J (1990) Cloning and expression of two distinct high affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *Embo J* **9**:2685-2692

Dong J, Phelps RG, Qiao R, Yao S, Benard O, Ronai Z, Aaronson SA (2003) BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res* **63**:3883-3885

Downard J, (1997) Cell cycle: routine role for Ras. *Curr Biol* **7**:258-260

Fritsch P (2003) Dermatologie, Venerologie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*

Folkman J, Klagsbrun M (1987) Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature* **329**:671-672

Gao G and Goldfarb M (1995) Heparin can activate a receptor tyrosine kinase. *Embo J* **14**:2183-2190

Garbe C (1995) Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome und Identifikation von Risikopersonen im deutschsprachigen Raum. *Hautarzt* **46**:309-314.

Garbe C (1997) Epidemiologie des Hautkrebses. In: Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W (Hrsg) Dermatologische Onkologie. Springer, Berlin Heidelberg New York, 40-56

Garbe C (2000) Ansteigende Inzidenz von malignen Melanomen. *Hautarzt* **51**:518

Garbe C, Blum A (2001) Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14**:280-290

Garland CF, Garland FC, Gorham ED (2003) Epidemiologic evidence for different roles of ultraviolet A and B radiation in melanoma mortality rates. *Ann Epidemiol* **13**:395-404

Giehl KA, Nägele U, Volkenandt M, Berking C (2007) Protein expression of melanocyte growth factors (bFGF, SCF) and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma. *J Cutan Pathol* **34**:7-14

Gilchrist BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M (1999) The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* **340**:1341-1348

- Gloster HM Jr, Neal K (2006) Skin cancer in skin of color. *J Am Acad Dermatol* **55**:741-760
- Goldstein, A. M. und M. A. Tucker (1995) Genetic epidemiology of familial melanoma. *Dermatol Clin* **13**:605-612
- 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. *Br J Cancer* **92**:320-327
- Graeven U, Rodeck U, Karpinski S, Jost M, Philippou S, Schmiegel W (2001) Modulation of angiogenesis and tumorigenicity of human melanocytic cells by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* **61**:7282-7290
- Greenfield C, Hiles I, Waterfield MD, Federwisch M, Wollmer A, Blundell TL, McDonald N (1989) Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *Embo J* **8**:4115-4123
- Hafner C, van Oers JM, Hartmann A, Landthaler M, Stoehr R, Blaszyk H, Hofstaedter F, Zwarthoff EC, Vogt T (2006a) High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol* **126**:2404-2407
- Hafner C, van Oers JM, Vogt T, Landthaler M, Stoehr R, Blaszyk H, Hofstaedter F, Zwarthoff EC, Hartmann A (2006b) Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest* **116**:2201-2207
- Halaban R, Ghosh S, Baird A (1987) bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* **23**:47-52
- Halaban R, Kwon BS, Ghosh S, Delli Bovi P, Baird A (1988b) bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res* **3**:177-186
- Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J (1988a) Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol* **107**:1611-1619
- Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J (1988c) Paracrine stimulation of melanocytes by keratinocytes through basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* **548**:180-190
- Hall H, Miller D, Rogers J, Bewerse B (1999) Update on the incidence and mortality from melanoma in the united states. *J Am Acad Dermatol* **40**:35-42
- Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ (1996) A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* **379**:560-564
- Hughes SE (1996) Localisation and differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc Res* **32**:557-569

Hughes SE (1997) Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem* **45**:1005-1019

Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**:225-236

Hunter T (1997) Oncoprotein-networks. *Cell* **88**:333-346

Hunter T, Sefton BM (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:1311-1315

Ibrahimi OA, Zhang F, Lang Hrstka SC, Mohammadi M, Linhardt RJ (2004) Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry* **43**:4724-4730

Jakkola 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

Jäckel A, Deichmann M, Waldmann V, Bock M, Näher H (1999) S-100 β -Protein im Serum als Tumormarker beim malignen Melanom Aktueller Kenntnisstand und klinische Erfahrungen. *Hautarzt* **50**:250-256

Jallal B, Schlessinger J, 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 AK, Morrison RS, Liu TJ, Clayman GL (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 GA, Chiu IM, Ravera MW, O'Brien SJ, Modi WS, Macaig T, Drohan WN (1986) Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* **233**:541-545

Jézéquel P, Champion L, Joalland MP, Millour M, Dravet F, Classe JM, Delecroix V, Deporte R, Fumoleau P, Ricolleau G (2004) G388R mutation of the FGFR4 gene is not relevant to breast cancer prognosis. *Br J Cancer* **90**:189-193

Jiang WG (1995) Membrane ruffling of cancer cells: a parameter of tumour cell motility and invasion. *Eur J Surg Oncol* **21**:307-309

Johnson D, Williams LT (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* **60**:1-41

Johnston 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

- Jones ME, Shugg D, Dwyer T, Young B, Bonett A (1992) Interstate differences in incidence and mortality from melanoma. A re-examination of the latitudinal gradient. *Med J Aust* **157**:373-378
- Jones WO, Harman CR, Ng AK, Shaw JH (1999) Incidence of malignant melanoma in Auckland, New Zealand: highest rates in the world. *World J Surg* **23**:732-735
- Jung, E. (1991). Dermatologie. *Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart*
- Kaipainen A, Vlaykova T, Hatva E, Bohling T, Jekunen A, Pyrhonen S, Alitalo K (1994) Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase messenger RNA in the vascular endothelium of metastatic melanomas. *Cancer Res* **54**:6571-6577
- Halder RM, Bang KM (1988) Skin cancer in blacks in the United States. *Dermatol Clin* **6**:397-405
- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR 3rd (2002) Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **20**:1826-1831
- Kavanaugh WM, Turck CW, Williams LT (1995) PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science* **268**:1177-1179
- Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ (1991) Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc Natl Sci U S A* **88**:1095-1099
- Khnykin D, Troen G, Berner JM, Delabie J (2006) The expression of fibroblast growth factors and their receptors in Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* **208**:431-438
- Kim CJ, Reintgen DS, Balch CM (2002) The new melanoma staging system. *Cancer Control* **9**:9-15
- Klagsbrun M, Baird A (1991) A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* **67**:229-231
- Kostrzewa M, Muller U (1998) Genomic structure and complete sequence of the human FGFR4 gene. *Mamm Genome* **9**:131-135
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signalling pathway. *Cell* **89**:693-702
- Krasagakis K, Garbe C, Zouboulis CC, Orfanos CE (1995) Growth control of melanoma cells and melanocytes by cytokines. *Recent Results Cancer Res* **139**:169-182
- Krebs in Deutschland (2006). 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken

Krejci P, Faitova J, Laurell H, Hampl A, Dvorak P (2003) FGF-2 expression and its action in human leukemia and lymphoma cell lines. *Leukemia* **17**:818-820

Lanley R, Bernhill R, Mihm R (1999) Neoplasms: Cutaneous Melanoma. In: Fritzpatrick's Dermatology in General Medicine Eds. Freedberg I, Eisen A, Wolff K, McGraw-Hill, Inc., New York:1080-1116

Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Pontén E, Carlberg M, Rönstrand L (1999) Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* **18**:5546-5553

Leung HY, Gullick WJ, Lemoine NR (1994) Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer* **59**:667-675

Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA (1995) Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **270**:12563-12568

Longstreth J (1988) Cutaneous malignant melanoma and ultraviolet radiation: a review. *Cancer Metastasis Rev* **7**:321-333

Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**:431-442

MacArthur CA, Lawshe A, Xu J, Santos-Ocampo S, Heikinheimo M, Chellaiah AT, Ornitz DM (1995) FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. *Development* **121**:3603-3613

Maher PA (1996) Identification and characterization of a novel, intracellular isoform of fibroblast growth factor receptor-1(FGFR-1). *J Cell Physiol* **169**:380-390

Martin GR (1998) The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes & Development* **12**:1571-1586

Mayer BJ, Baltimore D (1993) Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol* **3**:8-13

Mawrin C, Kirches E, Dietsch S, Wiedemann FR, Schneider T, Firsching R, Kropf S, Bogerts B, Vorwerk CK, Krüger S, Dietzmann K (2005) Analysis of a single nucleotide polymorphism in codon 388 of the FGFR4 gene in malignant gliomas. *Cancer Letters* **239**:239-245

McLeskey SW, Ding IY, Lippman ME, Kern FG (1994) MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res* **54**:523-530

- Meier F, Caroli U, Satyamoorthy K, Schittek B, Bauer J, Berking C, Moller H, Maczey E, Rassner G, Herlyn M, Garbe C (2003) Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. *Exp Dermatol* **12**:296-306
- Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM, Aaronson SA (1992) Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:246-250
- Moll I (2005) Dermatologie. *Georg Thieme Verlag KG Stuttgart*
- Morimoto Y, Ozaki T, Ouchida M, Umehara N, Ohata N, Yoshida A, Shimizu K, Inoue H (2003) Single nucleotide polymorphism in fibroblast growth factor receptor 4 at codon 388 is associated with prognosis in high-grade soft tissue sarcoma. *Cancer* **98**:2245-2250
- Morrison DK, Cutler RE (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**:174-179
- Olson DC, 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
- Ornitz DM, Itoh N (2001) Fibroblasts growth factors. *Genome Biol* **2**: REVIEWS3005
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **271**:154292-15427
- Partanen J, Mäkelä TP, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Claesson-Welsh L, Alitalo K (1991) FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *Embo J* **10**:1347-1354
- Pawson T (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**:573-580
- Penault-Llorca F, Bertucci F, Adelaide J, Parc P, Coulier F, Jacquemier J, Birnbaum D, deLaeyriere O (1995) Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int J Cancer* **61**:170-176
- Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, Mohammadi M (2000) Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinates of ligand-receptor specificity. *Cell* **101**:413-424
- Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M (1999) Structural basis for FGF receptor dimerization and Activation. *Cell* **98**:641-650
- Pons M, Quintanilla M (2006) Molecular biology of malignant melanoma and other cutaneous tumors. *Clin Transl Oncol* **8**:466-474

- Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD (1997) Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res.* **57**:842-845
- Rak J, Kerbel RS (1997) bFGF and tumor angiogenesis-back in the limelight? *Nat Med* **3**:1083-1084
- Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* **252**:1705-1708
- Reed JA, McNutt NS, Albino AP (1994) Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. *Am J Pathol* **144**:329-336
- Robinson MJ, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**:180-186
- Root LL, Shipley GD (1999) Human dermal fibroblasts express multiple bFGF and aFGF proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* **27**:815 - 822
- Sahadevan K, Darby S, Leung HY, Mathers ME, Robson CN, Gnanapragasam VJ (2007) Selective over-expression of fibroblast growth factor receptors 1 and 4 in clinical prostate cancer. *J Pathol* **213**:82-90
- Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* **6**:743-750
- Schmidt M und Hölzel D (2000) Klinisch epidemiologische Daten zum malignen Melanom aus dem Bereich des Tumorzentrums München. *Manual Maligne Melanome*:2-6
- Scott G, Stoler M, Sarkar S, Halaban R (1991) Localization of basic fibroblast growth factor mRNA in melanocytic lesions by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* **96**:318-322
- Shah RN, Ibbitt JC, Alitalo K, Hurst HC (2002) FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1alpha. *Oncogene* **21**:8251-826
- Shaoul ER, Reich-Slotky R, Berman B, Ron D (1995) Fibroblasts growth factor receptors display both common and distinct signalling pathways. *Oncogene* **19**:1553-1561
- Shih IM, Herlyn M (1994) Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma. *In Vivo* **8**:113-123
- Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS (2004) Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin Cancer Res* **10**:1753-1757

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**:767-778

Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U, Dragani TA (2005a) The functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol* **23**:7307-7311

Spinola M, Leoni VP, Tanuma J, Pettinicchio A, Frattini M, Signoroni S, Agresti R, Giovanazzi R, Pilotti S, Bertario L, Ravagnani F, Dragani TA(2005b) FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prognosis of breast and colorectal cancer. *Oncol Rep* **14**:415-419

Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* **79**:1015-1024

Stachowiak EK, Maher PA, Tucholski J, Mordechai E, Joy A, Moffett J, Coons S, Stachowiak MK (1997) Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells-association with cell proliferation. *Oncogene* **14**:2201-2211

Stadler CR, Knyazev P, Bange J, Ullrich A (2006) FGFR4 Gly388 isotype suppresses motility of MDA-MB-231 breast cancer cells by EDG-2 gene repression. *Cell signal* **18**:783-794

Sterry W, Paus R (2004) Checkliste Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Phlebologie, Andrologie. *Georg Thieme Verlag KG Stuttgart – New York*

Straume O, Akslen LA (2002) Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression. *Am J Pathol* **160**:1009-1019

Streit S, Bange J, Fichtner A, Ihrler S, Issing W, Ullrich A (2004) Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **111**:213-217

Streuli M (1996) Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol* **8**:182-188

Sun H, Tonks NK (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* **19**:480-485

Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Kakizoe T, Miyao N, Sugimura T, Terada M, Tsukamoto T (1999) Identification of receptor genes in renal cell carcinoma associated with angiogenesis by differential hybridization technique. *Biochem Biophys Res Commun* **257**:855 -859

Thussbas C, Nahrig J, Streit S, Bange J, Kriner M, Kates R, Ulm K, Kiechle M, Hoefler H, Ullrich A, Harbeck N (2006) FGFR4 Arg388 allele is associated with resistance to adjuvant therapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol* **24**:3747-3755

Tsavachidou D, Coleman ML, Athanasiadis G, Li S, Licht JD, Olson MF, Weber BL. (2004) SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer Res* **64**:5556-5559

Tucker MA, Goldstein AM (2003) Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* **22**:3042-3052

Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**:203-212

Vainikka S, Joukov V, Wennstrom S, Bergman M, Pelicci PG, Alitalo K (1994) Signal transduction by fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4). Comparison with FGFR-1. *J Biol Chem* **269**:18320-18326

Valesky M, Spang AJ, Fisher GW, Farkas DL, Becker D (2002) Noninvasive dynamic fluorescence imaging of human melanomas reveals that targeted inhibition of bFGF or FGFR-1 in melanoma cells blocks tumor growth by apoptosis. *Mol Med* **8**:103-112

van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* **10**:251-337

van der Geer P, Pawson T (1995) The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* **20**:277-280

van Heumen WR, Claxton C, Pickles JO (1999) Fibroblast growth factor receptor-4 splice variants cause deletion of a critical tyrosine. *IUBMB Life* **48**:73-78

Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**:138-141

Waldmann V (2002) Sind Mutationen der Proteinkinase B (PKB/AKT) bei der Entstehung und Progression von Hauttumoren beteiligt? *Z. Hautkrankheiten* **77**:64-69

Walter SD, King WD, Marrett LD (1999) Association of cutaneous malignant melanoma with intermittent exposure to ultraviolet radiation: results of a case-control study in Ontario, Canada. *Int. J Epidemiol* **28**:418-427

Wang J, Stockton DW, Itmann M (2004) The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res* **10**:6169-6178

Wang JK, Gao G, Goldfarb M (1994) Fibroblast growth factor receptors have a different signaling and mitogenic potentials. *Mol Cell Biol* **14**:181-188

Wang JK, Xu H, Li HC, Goldfarb M (1996) Broadly expressed SNT-like proteins link FGF receptor stimulation to activators of Ras. *Oncogene* **13**:721-729

- 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
- Webster MK, Donghue DJ (1996) Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J*, **15**:520-527
- Webster MK, Donghue DJ (1997) FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends genet* **13**:178-182
- Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX (1998) FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development* **125**:3615-3623
- Weiß J (1998) Tumorgenetik des malignen Melanoms. In: *Dermatologie – Leitlinien und Qualitätssicherung für Diagnostik und Therapie*. Hrsg: Garbe C & Rassner G pp. 267-270, Springer, Berlin
- Wilkie AO, Morriss-Kay GM, Jones EY Heath JK (1995) Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr Biol* **5**:500-507
- Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J (1994) fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev* **8**:3032-3044
- Yarden Y, Ullrich A (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* **57**:443-478
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64**:841-848
- Yayon A, Ma YS, Safran M, Klagsbrun M, Halaban R (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
- Yu C, Wang F, Kan M, Jin C, Jones RB, Weinstein M, Deng CX, MCKeehan WL (2000) Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J Biol Chem* **275**:15482-15489
- Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**:933-945
- 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

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen Dank aussprechen, die zum direkten und indirekten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Carola Berking für ihre großzügige Unterstützung und beispielhafte Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen. Weiterhin danke ich ihr für die besonderen Freiräume und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der beste Arbeitsbedingungen lieferte und mit einer wunderbaren Atmosphäre im Labor und vielen schönen Erlebnissen verbunden war.

Ein großes Dankeschön gilt auch allen Mitarbeitern des Labors Tumorbilogie der Klinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München, insbesondere Ursula Nägele, die mich in die immunhistochemischen Laborarbeiten eingeführt hat und mich bei unüberwindbar erscheinenden Laborproblemen immer wieder tatkräftig unterstützte. Großer Dank gebührt Erika Müller-Sander, die mir die DNS-Isolierung gezeigt hat und mir immer hilfsbereit zur Seite stand.

Dr. rer. nat. Sylvia Streit und Prof. Dr. rer. nat. Axel Ullrich vom Max-Planck-Institut für Biochemie möchte ich für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeiten, insbesondere in die PCR-RFLP danken sowie für ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen, auch wenn dies über die Distanzen München-Singapur und Kapstadt-Singapur nicht immer ganz einfach war.

Herrn Martin Schmidt möchte ich für die Unterstützung und die guten Ratschläge bei den statistischen Berechnungen, die Bereitstellung der Patientendaten und die fruchtbaren Diskussionen danken, die dieser Arbeit ihre Ausführlichkeit verliehen haben.

Herrn Dr. med. Michael Flaig und seinen medizinisch technischen Assistenten/-innen danke ich dafür, dass ich in seinem histologischen Labor die von ihm gestellten Tumorproben an den Mikrotomen aufarbeiten konnte und für die HE-Färbungen der Melanomschnitte.

Ein großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Gerd Plewig, durch den meine Begeisterung für die Dermatologie und damit für diese Arbeit erst geweckt wurde.

Der größte Dank gilt meiner wunderbaren Familie für ihre nie endende Unterstützung.

8. Curriculum vitae

<i>Name</i>	Dominik Sebastian Mestel
<i>Geburtsdatum/-ort</i>	12.09.1977 in München
<i>Staatsangehörigkeit</i>	Deutsch
<i>Familienstand</i>	Ledig
<i>Eltern</i>	Dr. med. dent. Peter Mestel (Zahnarzt) Renate Mestel, geboren Lambertz (MTA)
<i>Bruder</i>	Christian Mestel (Zahnarzt)
<u><i>Schulbildung</i></u>	
1984-1988	Grundschule Emmering
1988-1989	Graf-Rasso Gymnasium Fürstfeldbruck
1989-1998	Nymphenburger Gymnasium
Mai 1998	Allgemeine Hochschulreife
<u><i>Studium</i></u>	
05/1999-05/2006	Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08-12/2005	Gaststudium der Humanmedizin an der University of Cape Town/ Südafrika
03/2002	Ärztliche Vorprüfung
03/2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/2005	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2005-03/2006	Praktisches Jahr <i>04-08/2006 Innere Medizin:</i> Abteilung für Nieren- und Bluthochdruck-Krankheiten, Städtisches Krankenhaus München-Harlaching Leitung: Prof. Dr. med. Jürgen Scherberich <i>08-12/2006 Chirurgie:</i> Chris-Barnard-Division of Cardio-Thoracic-Surgery, University of Cape Town/Südafrika Leitung: Prof. Dr. med. Peter Zilla <i>12/06-03/07 Dermatologie:</i> Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Ludwig-Maximilians-Universität München Leitung: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Gerd Plewig
05/2006	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
06/2006	Approbation als Arzt
<u><i>Beruflicher Werdegang</i></u>	
07-10/2006	Wissenschaftlicher Assistent, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie (Prof. Dr. med. Heinz Höfler) und Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik (Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Wester) des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
Seit 11.2006	Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin (Prof. Dr. med. Wolfram Sterry)