

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Untersuchungen zur Funktion der
Rezeptortyrosinkinase FGFR4 in der
Tumorentwicklung**

Johannes Bange

aus

Köln

2001

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw 4 der Promotionsordnung
Vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Horst Domdey betreut

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 02.07.2001

Johannes Bange

Dissertation eingereicht am: 02.07.2001

1. Gutachter Prof. Dr. Horst Domdey

2. Gutachter Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Mündliche Prüfung am 12.12.2001

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Transiente Tyrosinphosphorylierung zur Weiterleitung von Signalen	1
1.1.1 Signalübertragung durch Rezeptortyrosinkinasen	2
1.1.2 Die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (RTK)	4
1.1.3 Substrate von Rezeptortyrosinkinasen	5
1.1.4 MAP-Kinase Kaskaden und die Regulation der Genexpression	6
1.1.5 Liganden der Fibroblasten-Wachstums-Faktor Rezeptoren	6
1.1.6 Der Fibroblasten Wachstums Faktor Rezeptor 4	8
1.2 Tumorentstehung durch unkontrollierte Signalübertragung	9
1.2.1 Unkontrollierte Expression von Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) und ihrer Liganden in der Tumorentwicklung	10
1.2.2 Die Rolle von Mutationen der RTKn bei der Entstehung von Krankheiten	13
1.3 Zelladhäsion	14
1.4 Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Bezugsquellennachweis	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Enzyme	18
2.1.3 Radiochemikalien	18
2.1.4 Kits und Sonstiges	18
2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden	19
2.1.6 Medien und Puffer	19
2.1.7 Zellkulturmedien	19
2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	20
2.1.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	21
2.1.9.1 Bakterienstämme	21
2.1.9.2 Zelllinien	21
2.1.9.3 Antikörper	22
2.1.10 Plasmide und Oligonukleotide	23
2.1.10.1 Ausgangsvektoren	23
2.1.10.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren	23
2.1.10.3 Wichtige Oligonukleotide	24

2.2 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke	25
2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke	25
2.2.3 Enzymatische Behandlung von DNA	25
2.2.3.1 <i>Verdau von DNA-Fragmenten</i>	25
2.2.3.2 <i>Dephosphorylierung von 5'-Enden</i>	25
2.2.3.3 <i>Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase</i>	25
2.2.4 Gelelektrophorese von DNA	26
2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten	26
2.2.6 DNA-Transfer in <i>E.coli</i> Bakterien	26
2.2.6.1 <i>Herstellung kompetenter E.coli Bakterien</i>	26
2.2.6.2 <i>Transformation von kompetenten E.coli Bakterien</i>	26
2.2.6.3 <i>Dauerkulturen von E.coli Bakterien</i>	26
2.2.7 Gezielte Mutagenese	27
2.2.7.1 <i>Herstellung von Uracilhaltiger, einzelsträngiger pcDNA3 DNA</i>	27
2.2.7.2 <i>Synthese des mutierten Stranges</i>	27
2.2.8 Sequenzierung	27
2.2.9 Arbeiten mit RNA	28
2.2.9.1 <i>Präparation von RNA</i>	28
2.2.9.2 <i>RT-PCR</i>	28
2.2.10 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [α -33P]-dATP	28
2.2.11 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	29
2.2.11.1 <i>PCR-Amplifikation von DNA und cDNA Fragmenten</i>	29
2.2.11.2 <i>Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	30
2.2.12 FGFR4 Allel Bestimmung in Tumorproben	30
2.2.12.1 <i>Isolierung von genomischer DNA aus Paraffinschnitten</i>	30
2.2.12.2 <i>FGFR4 Allel Bestimmung durch PCR Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (PCR-RFLP)</i>	30
2.2.13 cDNA Array Hybridisierung	31
2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	32
2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	32
2.3.2 Mykoplasmentest	33
2.3.3 Kalziumphosphat-Transfektion	33
2.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz	33
2.3.5 Retroviraler Gentransfer in L6 Myoblasten und humane Brust-Brustkrebszellen (MDA-MB-231)	33
2.4 Proteinanalytische Methoden	34
2.4.1 Expression und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins	
2.4.1.1 <i>Expression eines GST-Fusionsproteins in 293 HEK Zellen</i>	34

2.4.1.2 <i>Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose</i>	34
2.4.2 Triton X100-Lyse von Zellen	35
2.4.3 Proteinbestimmung	35
2.4.4 Immunpräzipitation von Proteinen	35
2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.4.6 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	36
2.4.7 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	36
2.4.8 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)	37
2.5 Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen	37
2.5.1 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine	37
2.5.2 Bestimmung der katalytischen Aktivität der MAP Kinase durch <i>in vitro</i> Kinase-Test	38
2.5.3 Zell-Adhäsions-Assay	38
2.5.3.1 <i>Photometrische Bestimmung von lebenden Zellen (MTT-Assay)</i>	38
2.6 Statistik	39
3. Ergebnisse	40
3.1 Die Funktion einer neuen Sequenz-Variante Arg388 des FGFR4 in der Tumorentwicklung	40
3.1.1 Identifizierung einer Mutation in der Transmembran-Domäne des FGFR4 in MDA-MB-453 Zellen	40
3.1.2 Bestimmung des FGFR-4 Genotyps in verschiedenen Tumor-Zelllinien	43
3.1.3 Verteilung des FGFR4 Arg388 Alleles in Tumorpatienten	46
3.1.3.1 <i>FGFR4 Arg388 ist eine Keimbahnmutation</i>	46
3.1.3.2 <i>Funktion von FGFR4 Arg388 bei der Tumorentstehung</i>	47
3.1.3.3 <i>Einfluss von FGFR4 Arg388 auf die Tumor-Progression</i>	49
3.1.3.4 <i>FGFR4 Arg388 korreliert mit klinischen Tumor-Parametern bei Brustkrebspatienten</i>	49
3.1.3.5 <i>Assoziation zwischen FGFR4 Gly388Arg und der HER2 Expression</i>	52
3.1.4 FGFR4 Arg388 ist ein prognostischer Faktor Darmkrebs	54
3.2 Die Funktion der FGFR4 Arg388 Mutation	57
3.2.1 Tyrosin-Kinase Aktivität von FGFR4 Gly388 und FGFR4 Arg388	58
3.2.2 Die ERK2 Aktivität nach Stimulation von FGFR4 Arg388 und FGFR4 Gly388	60
3.2.3 Effekt der Glycin→Arginin Mutation in der FGFR4 TMD auf die Rezeptorinternalisierung	61

3.2.4 FGFR4 beeinflusst die Motilität der Brust-Krebs Zelllinie MDA-MB-231	62
3.2.5 Die Expression von FGFR4 Gly388 und FGFR4 Arg388 beeinflusst die Expression anderer Gene in MDA-MB-231 Zellen	64
3.2.6 FGFR-4 inhibiert das Wachstum von MDA-MB-231 Zellen <i>in vivo</i>	68
3.3 Die extrazelluläre Domäne des FGFR4 vermittelt heterophile Zelladhäsion	69
3.3.1 Zellen binden an ein GST-FGFR4 (extrazelluläre Domäne) Fusionsprotein	71
3.3.2 Cos7, NIH3T3 und PC12 Zellen adherieren an Δ FGFR4-GST	73
3.3.3 Die Δ FGFR4-GST vermittelte Zelladhäsion ist abhängig von 2-wertigen Kationen	75
3.3.4 Heparin hat keinen Einfluss auf die Zelladhäsion	76
3.3.5 Die Adhäsion an Δ FGFR4-GST steuert verschiedene Signalkaskaden in COS7 Zellen	77
3.3.6 Zelladhäsion aktiviert die MAP-Kinase JNK, aber nicht p38	79
3.3.7 Focal Adhesion Kinase (FAK) wird während der Zelladhäsion auf Δ FGFR4-GST aktiviert	81
3.3.8 Interaktion von biotynilierten Membran-Proteinen in einem <i>in vitro</i> Pull-down Assay mit Δ FGFR4-GST	83
3.3.9 Die vollständige extrazelluläre Domäne des FGFR4 ist nicht notwendig für die Zelladhäsion	84
4. Diskussion	87
4.1 FGFR4 und im besonderen das neue Arg388 Allel trägt zu einer beschleunigten Tumorprogression bei	87
4.2 Die Funktion der FGFR4 Arg388 Mutation bei der Rezeptor-Aktivierung	92
4.3 FGFR4 beeinflusst die Migration von MDA-MB-231 Brustkrebs-Zelllinien	94
4.4 cDNA Array Analyse von MDA-MB-231 Zellen	95
4.5 FGFR4 vermittelte Zelladhäsion	97
5. Zusammenfassung	102
6. Literaturverzeichnis	104
7. Abkürzungen	117

1. Einleitung

Für die Entwicklung eines multizellulären Organismus und den Erhalt seiner funktionalen Integrität, muss jede Zelle die Möglichkeit haben, mit ihrer mittelbaren und unmittelbaren Umgebung zu kommunizieren und auf verschiedenste Signale mit den entsprechenden intrazellulären Programmen zu reagieren. Auf diese Weise werden wichtige Prozesse wie z.B. die Zell-Proliferation, -Differenzierung und Apoptose, aber auch Zellbewegung (Motilität), Adhäsion und Zell-Stoffwechsel reguliert. Die Signale werden hierbei häufig durch lösliche, diffundierende Liganden, aber auch durch membranständige Liganden, die Zelloberflächerezeptoren aktivieren, vermittelt. Die Rezeptortyrosinkinasen (RTKn), deren intrinsische Tyrosinkinaseaktivität bei der Signalübertragung in die Zelle eine außerordentlich wichtige Rolle spielt, bilden eine der Hauptklassen der Zelloberflächenrezeptoren (van der Geer *et al.*, 1994). Diese leiten durch reversible Tyrosinphosphorylierungen von Adapterproteinen oder zytoplasmatischen Tyrosinkinasen extrazelluläre Signale in die Zelle bis zum Zellkern weiter. Die reversiblen Phosphorylierungsreaktionen stellen insgesamt ein wichtiges regulatorisches Prinzip bei der Kontrolle der Gen-Aktivität und den davon abhängigen physiologischen Prozessen dar.

1.1 Transiente Tyrosinphosphorylierung zur Weiterleitung von Signalen

Transiente Phosphorylierungen finden in der Zelle hauptsächlich an Serin, Threonin und Tyrosinresten statt. Die Tyrosinphosphorylierungen sind dabei nur mit einem Anteil von 0.05% bis 0.1% an der Gesamtphosphorylierung in der Zelle beteiligt. Trotzdem ist die reversible Tyrosinphosphorylierung einer der wichtigsten Mechanismen zur Signalübertragung in intrazellulären Signalwegen (Hunter und Sefton, 1980; Hunter, 1995). Zwei Klassen von Proteinen sind notwendig, um die reversible Tyrosinphosphorylierung zu kontrollieren. Proteintyrosinkinasen (PTKn) übertragen Phosphat auf Tyrosinreste, während Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) Phosphat von Tyrosinresten entfernen (Sun, 1994; Streuli, 1996). In beiden Proteinklassen gibt es sowohl membranständige als auch zytosolische Vertreter .

1.1.1 Signalübertragung durch Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen setzen sich aus einer glykosilierten, extrazellulären Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil zusammen, die durch eine helikale Domäne, die einspännig in der Membran verankert ist, verbunden sind. Der extrazelluläre Anteil der verschiedenen RTKn ist für die Ligandenbindung verantwortlich und zeichnet sich durch eine Vielfalt unterschiedlicher Sequenzmotive aus. Diese strukturellen Unterschiede werden zur Einteilung und Zusammenfassung der bislang 50 bekannten RTKn in 19 verschiedene Unterfamilien verwendet (van der Geer *et al.*, 1994; Plowman *et al.*, 1994), die in Abb. 1 gezeigt sind. Die Familie der FGF (Fibroblast Growth Factor)-Rezeptoren besitzt drei Immunglobulin ähnliche Domänen in ihrem extrazellulären Bereich, während Mitglieder der EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor Familie sich durch zwei Cystein-reiche Regionen in ihrer extrazellulären Domäne auszeichnen.

Der zytoplasmatische Bereich der RTKn wird durch drei verschiedene Abschnitte definiert. Die Juxtamembranregion, die sich unmittelbar an die Transmembrandomäne anschließt, die Kinasedomäne und der carboxyterminale Bereich (Ullrich und Schlessinger, 1990). Die ca. 250-300 Aminosäuren lange, bei allen RTKn konservierte Kinasedomäne, besitzt eine ATP-Bindungsstelle und katalysiert die Autophosphorylierung des Rezeptors und die Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen Substrate (Yarden und Ullrich, 1988; Schlessinger, 1988).

Bei den Mitgliedern der FGF- und PDGF (Platelet derived Growth Factor)-Rezeptor Familien ist die Kinasedomäne durch eine Insertionssequenz, die mehrere Autophosphorylierungs- und Substratbindungsmotive aufweist (Malarky *et al.*, 1995), unterbrochen. Der carboxyterminale Bereich dagegen ist nur wenig konserviert zwischen den einzelnen Rezeptoren. Auch hier finden sich in der Regel eine Reihe von Autophosphorylierungsstellen und Substratbindungsmotiven. Bei diesen Motiven handelt es sich um hochspezifische Bindungsstellen, über die sich die verschiedenen Funktionen der RTKn definieren können.

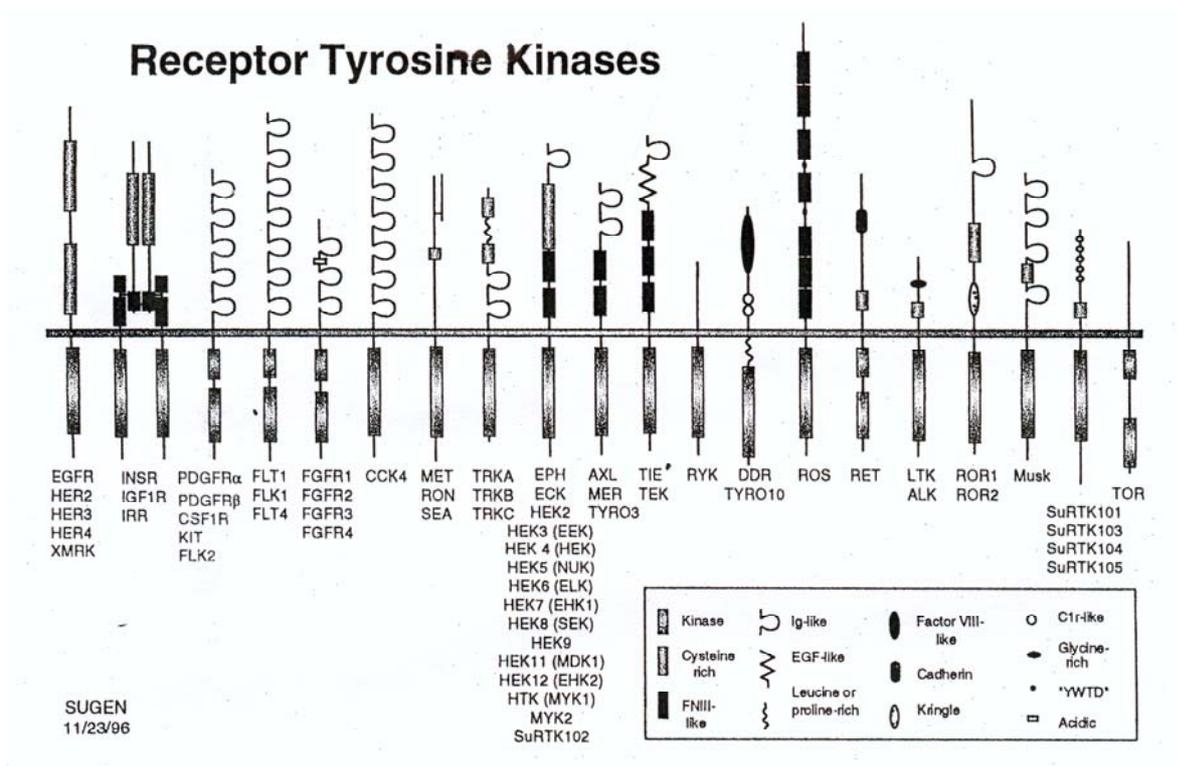


Abb. 1: Die Receptor Tyrosinkinase Unterfamilien. Die Abbildung zeigt die 20 Subklassen, in welche Rezeptortyrosinkinase auf Grund von Sequenzvergleichen der extrazellulären Domäne eingeteilt wurden (SUGEN, 1996).

Weiterhin kann die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste auch zur Regulierung der Tyrosinkinaseaktivität des jeweiligen Rezeptors beitragen (Margolis *et al.*, 1989; Margolis *et al.*, 1990).

Vier Mitglieder der Familie der humanen FGF-Rezeptoren sind in der Zwischenzeit identifiziert worden (Dionne *et al.*, 1990; Keegan *et al.*, 1991; Partanen J. *et al.*, 1991). Die Homologie der primären Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Rezeptoren liegt zwischen 55-72%. Durch alternatives Spleißen der mRNA der FGFRn 1, 2 und 3 werden zusätzliche strukturelle Unterschiede möglich. So sind sowohl lösliche als auch membrangebundene FGF-Rezeptoren mit einer, zwei oder drei Immunglobulin (IG)-Domänen oder einer veränderten C-terminalen Hälfte der dritten IG-Domäne beschrieben worden (Johnson und Williams, 1993). Im Gegensatz dazu existieren vom FGFR4 nur intrazelluläre Spleiß-Varianten ohne Transmembrandomäne oder mit einem verkürzten Carboxy-Terminus (van Heumen *et al.*, 1999).

Die EGF-Rezeptor Familie besteht aus vier Mitgliedern, dem EGF-Rezeptor (HER, ErbB1; Ullrich *et al.*, 1984), HER2 (ErbB2/neu; Coussens *et al.*, 1985), HER3 (ErbB3; Kraus *et al.*, 1989) und HER4 (ErbB4; Plowman *et al.*, 1994).

Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie sind häufig mit der Entstehung von Krebs beim Menschen in Zusammenhang gebracht worden (Ullrich *et al.*, 1984; Pierce *et al.*, 1991; Lemoine *et al.*, 1992). So findet sich eine erhöhte Gen-Aktivität der EGFRs bei Brust-, Blasen-, Magen- und Lungenkarzinomen (Prigent und Lemoine, 1992). Eine besonders wichtige Rolle spielt die Amplifikation und/oder erhöhte Aktivität des *HER2* Genes in Ovarial- und Brustkarzinomen, in denen sie mit einer schlechten Überlebensprognose der betroffenen Patienten in Verbindung steht (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989).

1.1.2 Die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (RTKn)

Der Aktivierung von RTKn liegt in der Regel die Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren zu Grunde. Obwohl bereits vor mehr als 10 Jahren die Dimerisierung des EGF-Rezeptors nach Stimulation durch monomere EGF-Liganden beschrieben worden ist (Yarden und Schlessinger, 1987), ist der exakte Mechanismus immer noch umstritten. Das bisher wichtigste Modell beschreibt eine Liganden-induzierte Konformationsänderung, die die Rezeptor-Dimerisierung ermöglicht (Greenfield *et al.*, 1989). Bivalente Liganden, wie z.B. PDGF oder EGF, binden zwei Rezeptormoleküle und bilden so Rezeptorkomplexe (Gullick, 1994; Tzahar *et al.*, 1997). In jedem Fall führt die Rezeptor-Dimerisierung zur *trans*-Phosphorylierung der Rezeptoren durch deren intrinsische Tyrosinkinaseaktivität (Ullrich und Schlessinger, 1990).

Die Gruppe der FGF-Liganden gehört zu einer Klasse von monovalenten Molekülen, die nur jeweils ein Rezeptor-Molekül binden können (Schlessinger *et al.*, 1995). Es hat sich gezeigt, dass FGF seine entsprechenden Rezeptoren nur aktivieren kann, wenn lösliches oder membrangebundenes Heparin zusätzlich vorhanden ist (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994). Studien zur Kristall-Struktur des FGF-Heparin-Rezeptor Komplexes haben ergeben, dass Heparin FGF-Moleküle binden kann und auf diese Weise eine Brücke zwischen zwei FGF-Rezeptoren hergestellt wird (Plotnikov *et al.*, 1999). Aber nicht nur die Homodimerisierung von RTKn spielt eine Rolle bei der Signal-Vermittlung, sondern auch die Bildung von Heterodimeren, wie am Beispiel der EGF-Rezeptor Familie gezeigt wurde (Wallasch *et al.*, 1995). Auch für die Familie der FGF-Rezeptoren konnte Heterodimerisierung gezeigt werden. Allerdings ist die Bedeutung der Heterodimere noch weitgehend ungeklärt (DiGabriele *et al.*, 1998).

1.1.3 Substrate von Rezeptortyrosinkinasen

Nach ihrer Aktivierung initiieren RTKs durch die Assoziation mit spezifischen Proteinen intrazelluläre Signalkaskaden und geben dadurch den externen Stimulus an zytoplasmatische oder Zellkern-lokalisierte Zielproteine weiter. Die Bindung von interagierenden Proteinen erfolgt dabei vielfach an spezifische Phosphotyrosinreste durch SH2 (src-homology 2)-Domänen (Mayer und Baltimore, 1993; Pawson, 1995) oder auch durch PTB (phosphotyrosine binding)-Bindungsmotive (Kavanaugh *et al.*, 1995). Die Selektivität dieser Interaktionen wird hierbei durch die SH2- oder PTB-Domäne und die das phosphorylierte Tyrosin umgebenden Aminosäuren bedingt (Songyang, 1993; van der Geer *et al.*, 1995). Weiterhin besitzen viele Signalproteine auch SH3 (src homology 3)-Domänen, welche an Prolinreiche Bereiche in Proteinen binden können (Yu *et al.*, 1994). Ein wichtiger Vertreter der Signalproteine, die zum Beispiel bei der mitogenen Signalübertragung von Bedeutung sind, ist das Adapterprotein Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) (Lowenstein *et al.*, 1992). Mit Hilfe seiner SH2-Domäne kann Grb2 mit autophosphorylierten RTKs wie z.B. dem EGFR aber auch mit Phosphotyrosinen von anderen Adapterproteinen wie SHC und Gab1 interagieren. Über seine SH3 Motive bindet Grb2 den Guaninnukleotidaustauschfaktor Sos (son of sevenless), wodurch nach Rezeptoraktivierung eine Translokation von Sos zur Zellmembran in die Nähe des kleinen G-Proteins Ras hervorgerufen wird (Holgado-Madruga *et al.*, 1996). Der von Sos katalysierte GTP/GDP-Austausch von Ras führt zu dessen Aktivierung, was eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Zellproliferation hat (Downward, 1997).

Ein anderes Adapterprotein, das besonders in der Signaltransduktion durch FGF Rezeptoren eine wichtige Funktion besitzt, ist das myristylierte, membranassoziierte SNT-1/FRS2 (Wang *et al.*, 1996; Kouhara *et al.*, 1997). Aktivierung von SNT-1/FRS2 durch den FGFR1 bindet Grb2-SOS, das umgekehrt Ras zum FGFR1 rekrutiert. Auf diese Weise wird das FGFR vermittelte Signal an den Ras/MAP-Kinase Signalweg gekoppelt (Kouhara *et al.*, 1997). Die Phosphatidyl-Phosphatase PLC γ ist ein weiteres Signalmolekül, das in der FGFR Signalkaskade von Bedeutung ist. Aktivierte PLC γ hydrolysiert Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphate, so dass die „second messenger“ IP₃ und DAG entstehen. Die PLC γ wurde als ein 150 kDa Phosphoprotein identifiziert, das spezifisch nach Simulation durch FGF-1 an den FGFR1 bindet (Burgess *et al.*, 1990). Die Bedeutung der PLC γ Aktivierung durch FGF ist aber noch nicht genau bekannt, da eine FGFR Mutante, die nicht mehr mit PLC γ interagieren kann, keine veränderten biologischen Eigenschaften zeigt (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994).

1.1.4 MAP-Kinase Kaskaden und die Regulation der Genexpression

Nach der Stimulation von RTKs spielt die Grb2/Sos-vermittelte Aktivierung von Ras eine zentrale Rolle in der mitogenen Signalantwort (Downward *et al.*, 1997). Membranassoziiertes und aktiviertes Ras führt zur Interaktion mit der Serin-/Threoninkinase Raf-1 und somit zur Translokation von Raf-1 zur Plasmamembran, wodurch Raf-1 phosphoryliert und aktiviert wird (Morrison und Cutler, 1997; Barnard *et al.*, 1998). Anschließend werden die Threonin/Tyrosinkinasen MEK1 und MEK2 (MAP/ERK Kinasen 1 und 2) durch aktiviertes Raf-1 an bestimmten Serinresten phosphoryliert, wodurch diese aktiviert werden und nachfolgend die MAP Kinasen (mitogen activated protein) ERK1 und ERK2 aktivieren. Diese werden durch Tyrosin- und Threoninphosphorylierung des regulatorisch wichtigen TEY-Motivs modifiziert (Robinson und Cobb, 1997) und wandern daraufhin in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren an Serinresten phosphorylieren (Robinson und Cobb, 1997).

Parallel zur ERK/MAP Kinase Kaskade gibt es in höheren eukaryontischen Systemen noch andere MAP Kinase Kaskaden, die je nach Stimulus die Signalübertragung in den Zellkern übernehmen. Es handelt sich dabei um die zu den ERK1 und ERK2 homologen Kinasen JNK1 und JNK2 (c-jun N-terminal Kinase 1 und 2), und die nach ihrer scheinbaren Molekülmasse bezeichneten p38-Kinasen (Dhanasekaran und Reddy, 1998). Die Aktivierung der ERK und JNK MAP Kinase Kaskaden führt innerhalb kürzester Zeit zur Transkription der sogenannten „immediate early“ Gene c-fos und c-jun, welche bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen von großer Bedeutung sind.

1.1.5 Liganden der Fibroblasten-Wachstums-Faktor Rezeptoren

In den letzten Jahren hat sich die Familie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren (FGF) als die wahrscheinlich größte Familie unter den Peptid-Wachstumsfaktoren herausgestellt. Bis heute konnten 19 verschiedene Mitglieder dieser Familie in menschlichen Geweben identifiziert werden (Xie *et al.*, 1999). Die Funktionen der FGFs reichen von der Stimulierung des Wachstums einer großen Menge von Zelltypen bis zur Wirkung als Angiogenese Faktoren und neurotrophische Liganden.

Die beiden wichtigsten Vertreter der FGF Familie, die auch als erste entdeckt wurden, sind FGF-1 (aFGF) und FGF-2 (bFGF). Sie zeigen die größte Expressionsbreite in den verschiedenen menschlichen Gewebetypen. Beide Faktoren wurden aufgrund ihres mitogenen

Potentials gegenüber Fibroblasten aus der Hirnanhangdrüse und Gehirngewebe gewonnen. In der Zwischenzeit ist sowohl FGF-1 als auch FGF-2 aus einer Reihe von verschiedenen Geweben isoliert worden und es konnte gezeigt werden, dass sich das mitogene Potential beider Faktoren auf eine große Anzahl verschiedener Zelltypen erstreckt (Burgess und Maciag, 1989). Besonders interessant ist, dass beide Faktoren sowohl beim Wachstum als auch bei der Steuerung der Wanderungseigenschaften von Endothelzellen eine wichtige Rolle spielen (Burgess und Maciag, 1989; Folkam und Klagsbrun, 1987). Beides sind Prozesse, die der Neubildung von Blutgefäßen zu Grunde liegen, und daher für die Versorgung eines wachsenden Tumors essentiell sind. Weiterhin besitzen weder FGF-1 noch FGF-2 ein Signalpeptid, das für die klassischen sekretorischen Prozesse in der Zelle notwendig ist (Jaye *et al.*, 1986; Bugler *et al.*, 1991). Ein weiterer Unterschied zu anderen Liganden der RTK Familie sind außerdem nukleäre Translokationssignale in der Aminosäuresequenz von FGF-1 und FGF-2 (Imamura *et al.*, 1990; Bugler *et al.*, 1991), die für die mitogenen Eigenschaften von FGF-1 von essentieller Bedeutung sind (Imamura *et al.*, 1990). Weitere FGFs sind FGF-3 (INT-2), dessen Gen ursprünglich als bevorzugte Insertionsstelle für den MMTV-Virus identifiziert wurde (Goldfarb *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1986). FGF-3 scheint hauptsächlich während der Entwicklung exprimiert zu werden und konnte noch nicht in normalem, adulten Geweben nachgewiesen werden (Stamp *et al.*, 1993). FGF-4 und FGF-6 (K-FGF, HST) wurden bei der Suche nach Genen aus Magentumoren und Karposi-Sarkomen, die NIH3T3 Zellen transformieren können, entdeckt (Taira *et al.*, 1987). Die genaue biologische Rolle ist noch nicht bekannt. Auch FGF-5 wurde auf der Suche nach Tumorgenen gefunden, die NIH3T3 Zellen transformieren können (Zhan *et al.*, 1988), während FGF-7 (KGF) als wichtiges Mitogen für Keratinozyten identifiziert wurde (Finch *et al.*, 1989). FGF-7 ist außerdem, zusammen mit dem erst kürzlich identifizierten FGF-19, das einzige Mitglied der FGF-Familie, das nur einen spezifischen FGF-Rezeptor aktivieren kann (Ornitz *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1999). Mitglieder der FGF-Familie spielen häufig eine herausragende Rolle bei der Tumorentwicklung, da sie sowohl als Onkogene zur Tumorentstehung beitragen, wie auch als Angiogenese Faktoren die weitere Versorgung des Tumors mit Nährstoffen positiv beeinflussen können. Dieses belegt auch die häufig erhöhte Expression von Genen der FGFs in verschiedenen Tumortypen, wie zum Beispiel in Nieren-, Brust- und Harnblasenkrebs.

1.1.6 Der Fibroblasten-Wachstums-Faktor Rezeptor 4 (FGFR4)

Der FGFR4 wurde vor zehn Jahren aus der cDNA der Zelllinie K562 (multiple myelomische Leukemie) kloniert (Partanen *et al.*, 1991). Seine Aminosäuresequenz ist zu 55% homolog zu den vorher bereits identifizierten FGFR1 und FGFR2 (Dionne *et al.*, 1990) und besitzt die charakteristischen strukturellen Komponenten der FGFR Proteinfamilie, wie z.B. drei Immunglobulindomänen im extrazellulären Teil und eine zweigeteilte Kinasedomäne (siehe auch 1.1.1). Die Chromosomenlokalization ist nicht eindeutig für den FGFR4 geklärt. Armstrong und Mitarbeiter (1992) haben den FGFR4 durch *in situ* Hybridisierungen im Chromosomabschnitt 5q33-qter lokalisiert, ein Bereich der durch Chromosomentranslokationen eine Funktion bei Lymphomen und Leukämien zu haben scheint. Andererseits wurde durch die Untersuchung von 18 Genen im Chromosomabschnitt 5q gezeigt, dass der FGFR4 mit hoher Wahrscheinlichkeit in unmittelbarer Nachbarschaft zum Gen DRD1 angesiedelt ist (Warrington *et al.*, 1992) und sich damit im Chromosomabschnitt 5q35-qter befindet.

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

Auch funktionelle Besonderheiten, die den FGFR4 von den anderen Mitgliedern der FGFR Proteinfamilie unterscheiden, sind in den letzten Jahren gefunden worden. Expression von FGFR1 in FGFR-negativen L6 Ratten Myoblasten induziert nach Stimulation mit FGF-1 die Tyrosinphosphorylierung von PLC γ , SHC, ERK-1, ERK-2 und FRS2, während in FGFR4 exprimierenden L6 Zellen nur sehr schwache oder gar keine Aktivierung dieser Proteine zu beobachten ist (Shaoul *et al.*, 1995; Vainikka *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Auch die Fähigkeit der Rezeptoren die Zellproliferation in BaF3 Zellen zu aktivieren unterscheidet sich deutlich. Während die Proliferation von BaF3/FGFR1 Zellen sehr stark und von BaF3/FGFR3 Zellen etwas schwächer durch FGF1 aktiviert wird (Ornitz und Leder, 1992; Wang *et al.*,

1994), ist in BaF3/FGFR4 Zellen keine Zellproliferation gefunden worden (Wang *et al.*, 1994). Weiterhin können L6/FGFR1- und L6/FGFR2-Zellen in Weichagar eingebettet wachsen („Soft Agar Assay“; Parameter für die Zelltransformation), wogegen L6/FGFR4-Zellen keine Kolonien in Weichagar bilden (Shaoul *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite wird FGFR4 durch Heparin aktiviert und ist damit das erste Beispiel für eine RTK, die durch ein Polysaccharid stimuliert werden kann (Gao und Goldfarb, 1995).

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

Eine andere Möglichkeit die Funktion von Genen *in vivo* zu untersuchen ist die Generierung von Mäusen, in denen das Gen ausgeschaltet wird (Knock-Out Mäuse). Während die Blockierung des FGFR1 lethal ist (Deng *et al.*, 1994; Yamagouchi *et al.*, 1994) und die des FGFR3 zu verlängerten Extremitäten-Knochen in Mäusen führt, erzeugt die Inhibierung des FGFR4 Genes einen „milden“ Phänotyp, der durch einen verstärkten Cholesterin Stoffwechsel charakterisiert ist (Yu *et al.*, 2000). Eine Doppelmutante, in der das FGFR4 und das FGFR3 Gen ausgeschaltet ist, resultiert dagegen in einer dramatisch reduzierten Alveogenese in der Lunge (Weinstein *et al.*, 1998).

Die häufig beobachtete starke Expression von FGFR4 in Brust-, Pankreas- und Nieren-Karzinomen (Penault-Llorca *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1994; Jaakola *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1999) lässt auf eine wichtige Funktion des FGFR4 in der Tumorgenese schließen. Allerdings haben Experimente mit einem *in vivo* Pankreas-Karzinom Modell ergeben, dass weder die Überexpression noch die Blockierung des *FGFR4* Gens einen Einfluss auf die Entstehung von Pankreaskarzinomen hat (Olson *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der FGFR4 nicht in der Tumorentstehung, sondern in der weiteren Progression von Bedeutung ist. Interessanterweise haben Olson und Mitarbeiter gezeigt, dass in dem Pankreas-Karzinom der FGFR4 erst in einem späten Tumorstadium aktiviert wird.

1.2 Tumorentstehung durch unkontrollierte Signalübertragung

Tumorzellen zeichnen sich gegenüber normalen Zellen durch eine erhöhte Zellteilungsrate, den Verlust der Differenzierungsfähigkeit und der Kontakt-Inhibition und der Fähigkeit zur

Metastatisierung aus. Diese Eigenschaften werden während der Tumorentwicklung in einem mehrstufigen Prozess, der durch die Akkumulation von sowohl angeborenen als auch im Laufe der Zeit hinzugekommenen Gen-Defekten ausgelöst wird, erworben (Kinzler und Vogelstein, 1996). In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Gene, die in der positiven als auch negativen Regulation des Zellwachstums eine entscheidende Rolle spielen. Gen-Defekte sind Veränderungen der Chromosomen z.B. durch Translokationen ganzer Chromosom-Abschnitte, Verlust von Chromosomenabschnitten, aber auch die Vervielfältigung von Genen oder die Veränderung der Nukleotidsequenz einzelner Gene durch Punktmutationen, Insertionen oder Verlust von Nukleotiden. Alle diese Gen-Veränderungen verursachen Störungen in der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle, indem sie entweder die Aktivität von Proteinen der Signalketten erhöhen oder deren negative Regulatoren blockieren.

Häufig sind die Phosphotyrosinkinase, die Wachstum-stimulierende Signale in die Zelle weiterleiten, die zentralen Punkte, an denen die Regulation versagt (Hanahan und Weinberg, 2000).

1.2.1 Die Rolle der unkontrollierten Expression von Rezeptortyrosin-kinasen (RTK) und ihrer Liganden in der Tumorentwicklung

Die Überexpression von Tyrosinkinase und im besonderen von RTK kann eine Krebszelle hypersensitiv gegenüber sehr geringen Mengen eines bestimmten Wachstumsfaktors machen, die normalerweise nicht ausreichen, um die Zell-Proliferation zu stimulieren (Fedi *et al.*, 1997). Zum Beispiel wurde in Brust- und Blasen-Karzinomen (Neal *et al.*, 1990; Nicholson *et al.*, 1991) und Glioblastomen (Hiesinger *et al.*, 1993) eine stark erhöhte Menge des EGF Rezeptors gefunden und mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert. Das gleiche gilt für die Gen-Amplifikation eines anderen Mitglieds der EGF Rezeptor Familie, HER2, in Brust-Karzinomen (Slamon *et al.*, 1987). Die Überexpression des PDGF-Rezeptors wurde in astrozytischen Hirn-Tumoren gefunden (Hermanson *et al.*, 1992) und beeinflusst hier die Neuentwicklung von Blutgefäßen (Fleming *et al.*, 1992). Daneben führt die Überexpression von Tyrosinkinase zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von Signalketten (DiFiore *et al.*, 1987). Dies ist dadurch zu erklären, dass auf der Zelloberfläche jederzeit ein dynamisches Gleichgewicht zwischen inaktiven Rezeptor-Monomeren und aktiven Rezeptor-

Dimeren vorliegt. Dieses Gleichgewicht wird entweder durch stabilisierende Liganden oder durch die Überproduktion von Rezeptoren zum Dimer verschoben.

Neben der unkontrollierten Bildung von Rezeptoren wird aber oft auch die Überexpression von Liganden beobachtet. Dieses gilt sowohl für die Liganden der EGF Familie, EGF und TGF β , als auch für PDGF (Tateishi *et al.*, 1990; Rusch *et al.*, 1993; Hermanson *et al.*, 1992).

Auch die unkontrollierte Bildung von FGFs und FGF Rezeptoren ist in vielen Tumorarten beschrieben worden. In Karzinomen gibt es im einfachsten Fall zwei mögliche Quellen für FGFs: die Tumorzellen selber, oder das sie umgebende Stromagewebe. FGFs können also sowohl in einem parakrinen als auch einem autokrinen Prozess auf beide Zellarten einwirken. Dabei gibt es drei denkbare Mechanismen: erstens, FGFs werden von den Tumorzellen überexprimiert; zweitens, die Stromazellen werden durch den Tumor angeregt FGFs zu produzieren; drittens, die Tumorzellen werden durch das Stroma zur vermehrten FGF Expression angeregt. Ein Beispiel für eine parakrine und autokrine Wirkung von FGFs kann man in Glioblastomen finden. FGF-2 wird von 94% aller Glioblastome aber nicht im normalen Gehirn exprimiert, und korreliert mit der Ausprägung der Erkrankung (Takahashi *et al.*, 1992). Da FGF Rezeptoren sowohl in den Tumorzellen als auch in den Stromazellen gefunden wurden (Takahashi *et al.*, 1991) ist es nicht überraschend, dass in diesem Fall FGF-2 sowohl autokrin das Tumorwachstum stimulieren kann als auch parakrin die Angiogenese durch das umgebende Gewebe beschleunigt. Daneben sind aber auch FGF-Rezeptoren in vielen Tumortypen stärker exprimiert als in den korrespondierenden normalen Geweben. Zum Beispiel in Melanomen (Ahmed *et al.*, 1997), in Hirn- (Morrison *et al.*, 1994), in Brust- (Yoshimura *et al.*, 1998), in Prostata- (Giri *et al.*, 1999) und in Schilddrüsen-Tumoren (Shingu *et al.*, 1998). Interessanterweise können FGFs und ihre Liganden aber auch eine negative Wirkung auf die Tumorentwicklung haben, so dass sie nicht immer eindeutig als Onkogene oder Tumorsuppressorgene bezeichnet werden können. Zum Beispiel ist in vielen Brusttumoren ein stark erhöhtes FGF-2 Niveau gegenüber dem normalen Brustgewebe gefunden worden. Innerhalb der Gruppe der Patienten zeigte sich aber, dass erhöhte FGF-2 und FGFR Spiegel mit einer guten klinischen Prognose und verlängerten Überlebenszeiten korreliert (Colomer *et al.*, 1997; Yiangou *et al.*, 1997). In anderen Tumortypen dagegen ist eine erhöhte FGF-2 oder FGFR1 Expression mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert (Salven *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1995; Bredel *et al.*, 1997).

1.2.2 Die Rolle von Mutationen der RTKs bei der Entstehung von Krankheiten

Schon seit einigen Jahren ist die wichtige Funktion von RTKs bei der Entstehung von Krankheiten, wie z.B. Krebs, bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. die Gen-Amplifikation von HER2 aber auch die Überexpression anderer RTK einen wichtigen Schritt während der Tumorentstehung darstellt. Auch Sequenzveränderungen, die nur in den Tumorzellen zu finden sind (somatische Mutationen) konnten unter anderem im TGF Rezeptor II (Markovitz *et al.*, 1995) und im FGF Rezeptor 3 nachgewiesen werden (Capellen *et al.*, 1999; Chiesi *et al.*, 1997). Neben dieser wichtigen Rolle von somatischen Mutationen während der Tumorentwicklung wurden in vielen RTK-Familien auch Keimbahn-Mutationen identifiziert, die zu schweren Krankheitsbildern führen. So ist besonders die Familie der FGF Rezeptoren ein markantes Beispiel für RTKs, deren Veränderungen zu dominanten, autosomal vererbten Krankheiten führen. Es sind über 50 Mutationen in den drei FGF Rezeptoren 1-3 gefunden worden, die krankhafte Veränderungen in den Skelettknochen auslösen (Fig.2).

90 Prozent aller zwergwüchsigen Menschen (Achondroplasie) besitzen z.B. eine Punktmutation im FGFR3 Gen, die zu einem Austausch von Glycin gegen Arginin in der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne des Rezeptors führt. Es wird angenommen, dass diese stark geladene Aminosäure in der sonst hydrophoben Umgebung der Zellmembran zu einer verstärkten Signalbildung durch den Rezeptor beiträgt (Webster und Donoghue, 1996).

Andere Mutationen in den FGFR 1 und 2 konnten in Patienten mit craniosynostotischen Syndromen, wie z.B. Apert, Jackson-Weiss, Crouzon und Pfeiffer gefunden werden (Webster und Donoghue, 1997). Alle diese Veränderungen in der Nukleotidsequenz der entsprechenden Gene haben eine verstärkte Signal-Kapazität durch die Rezeptoren zur Folge. Ein anderes Beispiel für eine RTK, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von vererblichen Krankheiten spielt, ist RET. In zwei verschiedenen Syndromen wurden Veränderungen im RET Gen gefunden. MEN2 ist eine autosomal vererbte Krankheit, die durch die Entstehung von medulären Thyroid-Karzinomen definiert ist und sich durch Mutationen, die die Aktivität des RET Rezeptors erhöhen, auszeichnet. Andererseits besitzen 50% aller Patienten der Hirschsprung Krankheit Punktmutationen, die die Rezeptor-Aktivität von RET blockieren, oder zeigen einen totalen Verlust des *RET* Genes (Ebery *et al.*, 1997). In diesem Fall führt also die Aktivierung oder Inhibierung einer RTK zu zwei völlig unterschiedlichen Krankheitsbildern.

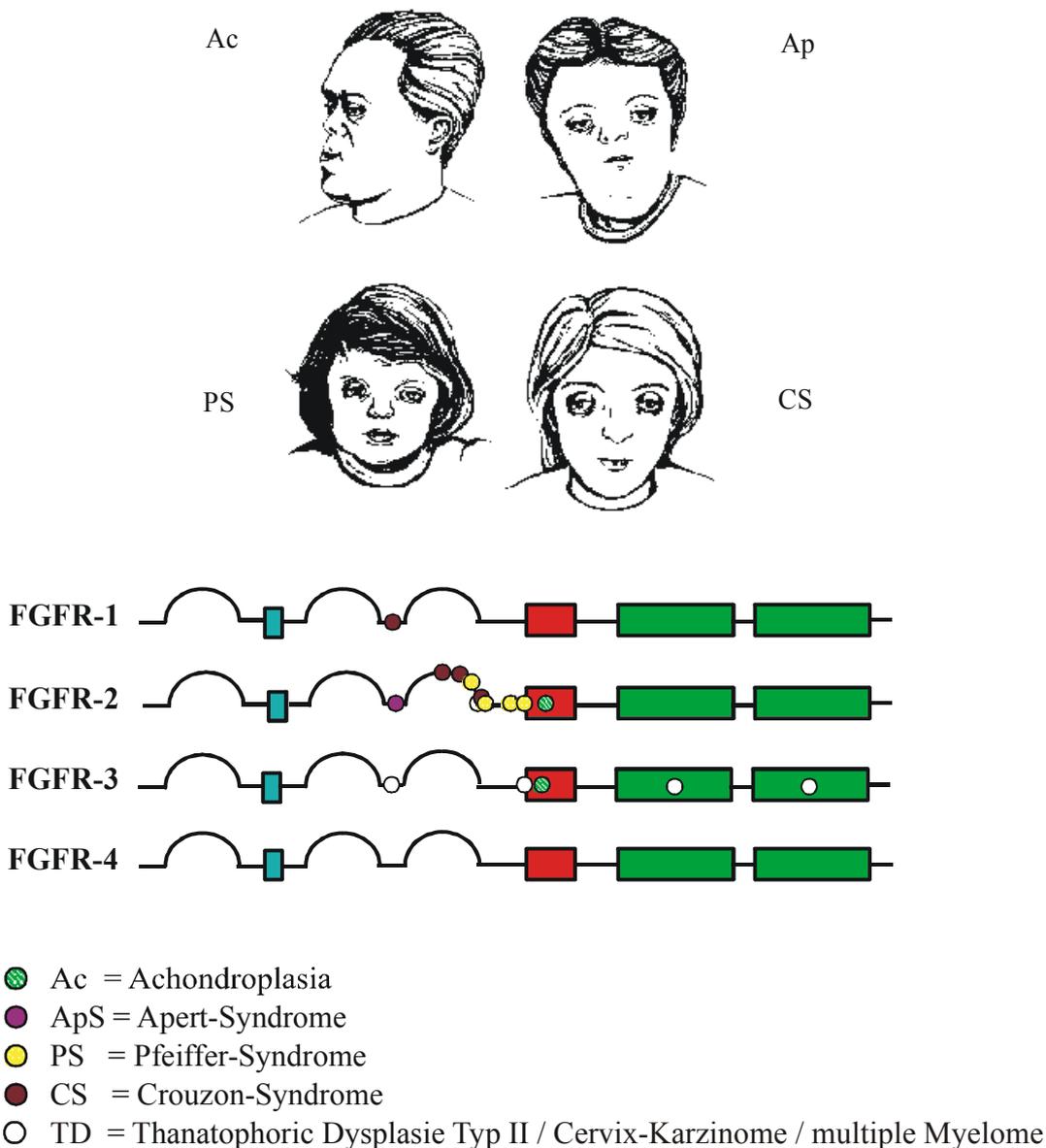


Abb. 2 Keimbahn-Mutationen in den FGF-Rezeptoren 1, 2 und 3. Schematisch ist die Struktur der vier FGF-Rezeptoren dargestellt. Mutationen im FGFR3, die in der neonatal lethalen Thanatophorischen Dysplasie TypII vorkommen, werden selten auch somatisch in Cervix-Karzinomen und multiplen Myelomen gefunden. Weiterhin ist eine Zuordnung der FGFR Genotypen mit den durch sie verursachten Entwicklungsstörungen dargestellt (nach Muenke & Williams; 1995).

Alle bisher beschriebenen Veränderungen von Genen sind äußerst selten und die Krankheiten, die durch sie hervorgerufen werden betreffen nur einen kleinen Teil der Bevölkerung. Die sehr zahlreichen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) dagegen sind die häufigsten genetischen Variationen zwischen Individuen. Sie treten mit einer statistischen Häufigkeit von mindestens 1/1000 auf, d.h., dass sich die Nukleotidsequenz zweier nicht verwandter Individuen in etwa drei Millionen Positionen unterscheidet. SNPs sind evolutionär alte und

stabile Mutationen und in menschlichen Populationen weit verbreitet. Ihre Verteilung ist unterschiedlich und wird mit etwa 1 pro 500 Nukleotide für extragenetische und mit 1 pro 2000 Nukleotiden für intragenetische Regionen angegeben (Halushka *et al.*, 1999).

Es wird vermutet, dass die individuelle Verteilung der SNPs unter anderem für Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber Krankheiten und unterschiedliche Therapieerfolge innerhalb der Bevölkerung verantwortlich ist, da das Vorhandensein bestimmter SNPs mit einem erhöhten Risiko für eine Reihe von Krankheiten, wie z.B. Alzheimer, Diabetes usw. (Brookes *et al.*, 1999) korreliert. Weiterhin ist seit langem bekannt, dass SNPs und andere DNA Variationen in Genen für Medikamente-metabolisierende Enzyme (z.B. die Familie der Cytochrom P450-Proteine) Nebenwirkungen, Verträglichkeit und Effizienz von zahlreichen Medikamenten beeinflussen können (Lindner *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1999). Deshalb ist die Kenntnis dieser SNPs essentiell für das Verständnis der an der Krankheitsgenese beteiligten Gene und deren (Fehl)-Funktionen.

1.3 Die Zelladhäsion

Die durch Tyrosinphosphorylierung vermittelten Signalwege sind nicht nur auf die Weitergabe von externen Stimuli durch lösliche Faktoren beschränkt, sondern schließen ebenso die Übertragung von Informationen ein, die durch direkten Kontakt von Zellen miteinander oder mit der extrazellulären Matrix ausgelöst werden. Umgekehrt kann die Organisation und Integrität von Zell-Zell und Zell-Matrix Bindungen durch intrazelluläre Prozesse reguliert werden (Inside-outside signaling) (Clark und Brugge, 1995; Zhang *et al.*, 1996).

Integrine stellen die wesentlichen Verbindungen mit der extrazellulären Matrix dar und nehmen durch Wechselwirkungen mit deren Komponenten in Prozessen wie der Zellproliferation, Differenzierung und Migration eine zentrale Rolle ein (Rouslahti 1988, Clark und Brugge, 1995). Integrine besitzen keine eigene intrinsische Enzymaktivität, sondern bilden vielmehr das Zentrum eines Netzwerkes aus Proteinen des Zytoskeletts und Molekülen der Signalketten. Die Rekrutierung von Proteinen verleiht ihnen somit die Möglichkeit, sowohl den Aufbau und Umbau des Zytoskeletts zu steuern als auch synergetisch und additiv in andere Signalkaskaden einzugreifen (Clark und Brugge, 1995). Dabei nimmt in der Integrin-induzierten Signalweiterleitung neben den Kinasen der Src-Familie vor allem die

zytoplasmatische Tyrosinkinase FAK (focal adhesion kinase; Lipfert *et al.*, 1992; Hanks *et al.*, 1997) eine zentrale Rolle ein.

Eine weitere Klasse von Adhäsionsmolekülen bilden die Cadherine, die sich als transmembrane Glykoproteine präsentieren und Ca^{2+} -abhängig Zell-Zell Verbindungen durch homophile Bindung herstellen. Sie spielen dadurch eine besondere Rolle bei der Bildung und Erhaltung der normalen Gewebestruktur. Die intrazelluläre Domäne der Cadherine interagiert mit der Familie der Catenine, die die Cadherine an das Zytoskelett binden (Review: Morin *et al.*, 1996). Die besondere Rolle der Cadherine wurde in der Vergangenheit durch viele Studien belegt. So konnte gezeigt werden, dass Inhibierung der E-Cadherin Aktivität die Morphologie von MDCK Zellen verändert und ihre Fähigkeit beeinflusst, durch eine Collagen Matrix zu wandern (Behrens *et al.*, 1989; Chen und Öbrink, 1991). Auf der anderen Seite konnten invasive Karzinom Zellen durch die Expression von E-Cadherin in einen nicht-invasiven Zelltyp umgewandelt werden (Frixen *et al.*, 1991).

Zelladhäsion spielt eine wichtige positive Rolle bei der Tumorentwicklung und im besonderen bei der Metastasierung. Während dieses Vorgangs werden durch die Tumorzellen sowohl ständig neue Verbindungen zu dem sie umgebenden Gewebe gebildet als auch wieder aufgelöst. Während der frühen Phase der Metastasenbildung müssen die Tumorzellen sich aus dem sie umgebenden Gewebe lösen, während sie im Laufe der weiteren Schritte neue Bindungen z.B. zu den vaskulären Endothelzellen in den Zielorganen eingehen, um dort Tochtergeschwülste zu bilden. Alle diese Prozesse werden durch Moleküle gesteuert, die Zelladhäsion vermitteln können.

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass eine Reihe von Proteinen der Signalketten, wie die RTKn, direkt mit Integrinen, Cadherinen und anderen Proteinen die Zell-Zell Kontakte ermöglichen, interagieren können. So wird z.B. der FGFR1 durch N-CAM, ein Protein der Immunglobulin Superfamilie und N-Cadherin aktiviert (Williams *et al.*, 1994). Dieser Prozess spielt besonders bei der neuronalen Entwicklung eine entscheidende Rolle. Der EGF Rezeptor wird durch die Bindung des Integrin Rezeptors $\alpha\text{v}\beta\text{1}$ an Fibronectin stimuliert (Moro *et al.*, 1998) und auch in der Aktivierung des PDGF- und des VEGF-Rezeptors übernehmen Integrine eine wichtige Funktion (Soldi *et al.*, 1999; Schneller *et al.*, 1997). Daneben gibt es RTKn, wie z.B. DDR1, DDR2 und AXL, die direkt als Zelladhäsions Moleküle dienen und während dieser Prozesse aktiviert werden (Vogel *et al.*, 1997; Bellosta *et al.*, 1995).

1.4 Zielsetzung

Die Überexpression von Tyrosinkinasen, die häufig in wichtige Zell-Wachstum regulierende Signalkaskaden eingebunden sind, kann schwere Krankheiten, insbesondere Krebs auslösen. In früheren Untersuchungen (Y. Cherburkein, P. Knayzev; diese Arbeitsgruppe), wurde mit Hilfe von cDNA Array Analysen in Brustkrebszelllinien ein sehr heterogenes Expressionsmuster besonders für Mitglieder der FGF-Rezeptor und der EGF-Rezeptor Familie gefunden. Diese Befunde lassen eine Rolle dieser Moleküle in der Tumorentstehung vermuten. Aus diesem Grunde sollte die funktionelle Untersuchung der FGF Rezeptoren in Brust-Krebszelllinien in dieser Arbeit im Vordergrund stehen. Da besonders der FGFR4, ähnlich wie HER2 in 30% der Brustkrebszelllinien eine starke Expression zeigte und über die physiologische Funktion dieses Rezeptors noch wenig bekannt ist, war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise des FGFR4 sowohl in pathologischen wie auch in normalen Geweben zu erarbeiten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
ATP (Adenosintriphosphat)	Pharmacia, Freiburg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP)	Boehringer, Mannheim
Didesoxynukleotide (ddG/A/T/CTP)	Pharmacia, Freiburg
Dimethyldichlorsilan	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Heringsperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine®	Gibco, Eggenstein
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
MBP (myelin basic protein)	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	Biomol, Haub
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Poly-Lysine	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg

2. Material und Methoden

Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tween 40	Sigma, Taufkirchen
W-7	Calbiochem, Bad Soden
Xylol	Merck, Darmstadt

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

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
ProteinaseK	Sigma, Taufkirchen
PCR-Beats	Pharmacia, Freiburg
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Freiburg
	Boehringer, Mannheim
	Biolabs, England
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim

2.1.3 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-dATP}$, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	>5000 Ci/mmol
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$	>1000 Ci/mmol

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma NEN (Brüssel) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

2.1.4 „Kits“ und Sonstiges

ECL Kit	NEN, Brüssel
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm MB	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Poly Prep [®] Chromatographiesäulen	Bio-Rad, München
Dowex AG1-X8	Bio-Rad, München
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2. Material und Methoden

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Pharmacia, Freiburg
Roti-Quick-Kit	Roth, Karlsruhe
Sephadex G-50 (DNA Qualität)	Pharmacia, Freiburg
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
T7 Sequencing Kit	Pharmacia, Freiburg
Zellulosenitrat 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

FGF-1	Pepr Tech, USA
Heparin	Sigma, Taufkirchen

2.1.6 Medien und Puffer

Medium für *E.coli* Bakterien

LB-Medium	1,0	%	Trypton
	0,5	%	Hefeextrakt
	1,0	%	NaCl
			pH 7,2

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin	100	µg/ml
Kanamycin	100	µg/ml
Chloramphenicol	30	µg/ml

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5% Agar zugesetzt.

2.1.7 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen, fötales Kälberserum stammte von der Firma Sigma (Taufkirchen).

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose 10% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat.

RPMI 1640, 10% FCS, 2mM Glutamin

McCoy's 5°, 10% FCS, 2mM Glutamin

Einfriermedium: 90% FCS, 10% DMSO.

2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BBS (2x)	50	mM	BES
	280	mM	NaCl
	1,5	mM	Na ₂ HPO ₄
			pH 6.96 (NaOH)
Denhardt (100x)	2,0	%	Polyvinylpyrrolidon
	2,0	%	Ficoll
	2,0	%	BSA
DNA-Auftragspuffer (6 x)	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
	30,0	%	Glyzerin
	100,0	mM	EDTA pH 8,0
Laemmli-Puffer (2x)	187,5	mM	Tris/HCl pH 6,8
	6,0	%	SDS
	30,0	%	Glyzerin
	0,01	%	Bromphenolblau
	5,0	%	β-Mercaptoethanol
NET (10x)	150,0	mM	NaCl
	5	mM	EDTA
	50	mM	Tris
	0,05	%	Triton X-100 pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragspuffer (2x)	48,0	%	Formamid
	17,0	%	Formaldehyd
	11,0	%	Glyzerin
	0,1	%	Bromphenolblau
SD-Transblot	50,0	mM	Tris/HCl pH 7,5
	40,0	mM	Glycin
	20,0	%	Methanol
	0,004	%	SDS
SSC (20x)	3,0	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat

2. Material und Methoden

TAE (10x)	400 mM	Tris/Acetat
	10 mM	EDTA
		pH 8,0 (Eisessig)
TE	10,0 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1,0 mM	EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1918,0 mM	Glycin
	1,0 %	SDS

2.1.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

Im folgenden sind die verwendeten Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper unter Angabe ihrer Eigenschaften und von Referenzen tabellarisch aufgeführt.

2.1.9.1 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E.coli</i> 298 F'	F+, Kanr, Lambdar, recA-, tonA-lacI-	Genentech, San Francisco
<i>E.coli</i> CJ236	dut-, ung-, thi-, relA-	Kunkel, 1985
<i>E.coli</i> XL-1 Blue	F':Tn10 proA+B+ lacIq D(lacZ) M15/RecA1 end/A1 gyr 96 (Nalr) thi hsdR17 (rk-mk+) supE44	Bullock <i>et al.</i> , 1987

2.1.9.2 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
Phoenix A	modifizierte HEK293 Linie zur Produktion von helfervirusfreien, amphotrophen Retroviren	Nolan Lab, Stanford
Phoenix E	modifizierte HEK293 Linie zur Produktion von helfervirusfreien, trophen Retroviren	Nolan Lab, Stanford
L6	immortalisierte Ratten-Myoblasten	CRL-1458
Cos7	immortalisierte Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze	ATCC CRL-1651
PC12	Ratten-Phäochromocytomazellen	P. Cohen, Dundee

NIH3T3 cl7	immortalisierte Mausfibroblasten	ATCC CRL-1658
MDA-MB-231	Brust-Adenokarzinom	ATCC HTB-26
MDA-MB-453	Brust-Karzinom	ATCC HTB-131
ZR 75-1	Brust-Karzinom	ATCC CRL-1500
K562	Chronische myelomische Leukemie	CCL-243

2.1.9.3 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper zur Detektion in der Immunoblot-Analyse eingesetzt.

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
4G10	Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste	UBI, Lake Placid
ERK2	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Ratten-ERK2	Santa Cruz
Phospo-JNK	Kaninchen, polyklonal gegen aktivierte JNK	NEB
JNK	Kaninchen, polyklonal gegen JNK	Santa Cruz
Phosph-p38	Kaninchen polyklonal gegen aktivierte p38	NEB
p38	Kaninchen polyklonal gegen p38	NEB
FAK	Kaninchen polyklonal gegen FAK	diese Arbeitsgruppe
FGFR-4	Kaninchen polyklonal gegen Peptid im Carboxy-Terminus	Santa Cruz

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerretichperoxidase (HRP) konjugiert

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1 : 20000	BioRad (München)

Ziege gegen Maus	1 : 10000	Sigma (Taufkirchen)
Ziege gegen Kaninchen	1 : 20000	BioRad (München)

2.1.10 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.10.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pBluescript	ColE1 ori, Amp ^r , LacZ, fl (+) IG, SK (MCS)	Stratagene, Kalifornien
pcDNA3	Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Ampr, Neor, ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor	Miller und Rosman, 1989
pcDNA3GST	Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA modifiziert von C.Cant (diese AG)

2.1.10.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

Vektoren	Eigenschaften	Referenz
pLXSN FGFR4 WT	der gesamte FGFR4 mit Glycin an Position 388	diese Arbeit
pLXSN FGFR4 MT	der gesamte FGFR4 mit Arginin an Position 388	diese Arbeit
pcDNA3GSTΔFGFR4	die gesamte Extracelluläre (As:1-360) Domäne des FGFR4 mit c-terminalen GST	diese Arbeit
pcDNA3GST FGFR4 D1	Aminosäure 1-140 der extrazellulären Domäne des FGFR4 mit c-terminalen GST	diese Arbeit
pcDNA3GST FGFR4 D2	Aminosäure 1-205 der extrazellulären	diese Arbeit

	Domäne des FGFR4 mit c-terminalen GST	
pcDNA3GST FGFR4 D3	Aminosäure 1-247 der extrazellulären Domäne des FGFR4 mit c-terminalen GST	diese Arbeit

2.1.10.3 Wichtige Oligonukleotide

Sequenz	Name
GGAATTCGCCACCATGCGGCTGCTGCTGGC Sense-Primer zur Amplifizierung der gesamten FGFR4 codierenden cDNA	FL (s) FGFR4
CCTCGAGCAGCCTTGAGCCTTGCT Anti-Sense zur Amplifizierung der gesamten FGFR4 codierenden cDNA	Fl (as) FGFR4
GACCGCAGCAGCGCCCGAGGCCAGGTATACG Sense-Primer für die Amplifizierung der FGFR4 Transmembran Domäne	TM (s) FGFR4
AGAGGGAAGCGGGAGAGCTTCTGCACAGTGG Anti-Sense Primer für die Amplifizierung der FGFR4 Transmembran-Domäne Primer zum Sequenzieren der codierenden FGFR4 cDNA:	TM (as) FGFR4
GAGGAAGTGGAGCTTGAG	Seq1 131-148 FGFR4
GGCACGAGGCTCCATGAT	Seq2 361-378 FGFR4
GCGCCATCAGCACTGGAG	Seq3 661-678 FGFR4
GCAAGTCCTAAAGACTGC	Seq4 961-978 FGFR4
TGTATCGAGGGCAGGCGC	Seq5 1221-1238 FGFR4
GCCAGGTAGTACGTGCAG	Seq6 1491-1508 FGFR4
GCCCCGACCTCAGCCCCG	Seq7 1761-1778 FGFR4
TGACCGGGTGTACACACA	Seq8 2041-2058 FGFR4
GCTGGACAAGGTCCTGCT	Seq9 2281-2298 FGFR4

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen von DNA (2-10 µg) nach der Methode von Lee und Rasheed (1990) präpariert.

2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion von HEK293, Phoenix A, Phoenix E Zellen wurden größere und DNA Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.2.3 Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.3.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1-2 Stunden oder ü.N. beim Temperaturoptimum des Enzyms.

2.2.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg gespaltene Vektor DNA wurde in einem Reaktions-volumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1% Agarose) aufgereinigt und eluiert.

2.2.3.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5fachen Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragments, 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamt-volumen 10 µl) und ü.N. bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kbp wurden in 0,6-2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h. Danach wurde das Gel für 10 min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TAE entfärbt.

2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QIAex II Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.6 DNA-Transfer in *E.coli* Bakterien

2.2.6.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Es wurde die Methode von Chung und Miller (1993) verwendet. Die Transformations-effizienz war größer als 5×10^6 Klone/µg DNA.

2.2.6.2 Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂), 70 µl H₂O und 100 µl kompetente, auf Eis aufgetauter Bakterien pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 400 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.2.6.3 Dauerkulturen von *E.coli* Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0,5 ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0,5 ml einer 50%igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturen können längere Zeit bei -70°C gelagert werden.

2.2.7 Gezielte Mutagenese von DNA

Mit Hilfe dieser Methode (nach Messing, 1983 und Kunkel, 1985) ist es möglich, Punktmutationen, Insertionen und Deletionen in eine bekannte DNA-Sequenz einzuführen.

2.2.7.1 Herstellung von Uracilhaltiger, einzelsträngiger pcDNA3 DNA

Mit 100 µl einer CJ236 ü.N.-Kultur wurden 5 ml LB-Medium mit Chloramphenicol angeimpft und bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Phase bei 37°C geschüttelt. Diese Kultur wurde mit 1×10^8 Phagen infiziert (MOI 20) und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Danach enthielten die zur Infektion verwendeten M13 Phagen die einzelsträngige DNA, an der die Mutagenese durchgeführt werden sollte. Nachdem die Bakterien durch zweimaliges Abzentrifugieren von 1,2 ml Kulturmedium gründlich aus dem Überstand entfernt worden waren, wurden die Phagen aus dem Überstand durch Zugabe von 300 µl 20% PEG/NaCl bei RT für 20 min präzipitiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der Überstand voll-ständig entfernt. Das Phagensediment wurde in 300 µl TE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl puffergesättigtem Phenol/Chloroform mehrfach extrahiert. Nach der Abtrennung der wässrigen Phase wurde die einzelsträngige DNA durch Zugabe von 200 µl 7,5 M NH_4Ac (pH 7,5) und 800 µl absolutem Äthanol gefällt und bei 4°C mit 13000 rpm 10 min abzentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H_2O aufgenommen. Die Qualität der einzelsträngigen DNA wurde auf einem 1,5%igem Agarosegel ermittelt. Als Kontrolle auf Kontamination mit doppelsträngiger DNA wurde 100 ng unverdautes Plasmid mit auf das Agarosegel aufgetragen.

2.2.7.2 Synthese des mutierten Stranges

Die Hybridisierung des phosphorylierten Oligonukleotids zum uracilhaltigen DNA-Einzelstrang erfolgte folgendermaßen: 200 ng einzelsträngige DNA, 2-3 pmol phosphoryliertes Oligomer, 1 µl 10x Hybridisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 2 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl) in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden in einem 70°C warmen Heizblock 2 min zur Temperaturequilibration inkubiert. Danach wurde der Heizblock ausgeschaltet und bis zum Erreichen von 30°C abgekühlt. Zur Synthese des komplementären Stranges wurden dem Ansatz auf Eis 1 µl 10x Synthesepuffer (5 mM dNTP-Mix, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl_2 , 20 mM DTT), 5 E T4-DNA Ligase (1µl), 1 µg T4-Gen 32 Protein (0,5 µl) und 3 E T4-DNA Polymerase (1 µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 min auf Eis, 5 min bei 25°C und anschließend 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 µl TE gestoppt. 10 µl Aliquots wurden zur Transformation kompetenter *E. coli*. Bakterien genutzt.

2.2.8 Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse wurde das T7 Sequencing Kit von Pharmacia nach Herstellerangaben genutzt.

2.2.9 Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNasen-freier Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in MilliporeTM-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNA-Präparation ist das Tragen von Handschuhen zum Schutz vor RNasen der Haut unverzichtbar, ebenso empfiehlt sich das häufige Wechseln der Handschuhe.

2.2.9.1 Präparation von RNA

Die Präparation von RNA aus Zellen und Geweben erfolgte mit Hilfe des Roti-Quick-Kits für die RNA Isolation nach Herstellerprotokoll. Nach Extraktion wurden die RNA-Präzipitate getrocknet und in H₂O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

2.2.9.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wurde die cDNA-Synthese nach der Hybridisierung der RNA mit einem spezifischen Oligomer, und die PCR-Amplifikation der synthetisierten cDNA, in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Um eventuelle Kontaminationen mit DNA auszuschließen, wurde jeder Versuchsansatz mit zwei Negativkontrollen durchgeführt, wobei bei der einen die RNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt wurde (zur Kontrolle auf Kontaminationen), während bei der anderen die Reverse Transkriptase durch 1 µl H₂O ersetzt wurde.

Die RT-PCR wurde nach folgendem Schema angesetzt:

0,6 µl	dNTP-Mix (10mM)
0,6 µl	„sense“-Oligomer (20 pmol)
0,6 µl	„anti-sense“-Oligomer (20 pmol)
2,5 µl	10 x Taq-Polymerase Puffer
0,3 µl	RNAse Inhibitor (40 E/ µl)
16,5 µl	H ₂ O
1,0 µl	AMV-Reverse Transkriptase, ca 0,3E (0,7 µl AMV-RT in 50 µl 1x Taq-Puffer)
1,0 µl	RNA (1 µg/µl)

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden nach Pipettieren des Ansatzes 10 min bei 50°C inkubiert. In dieser Zeit findet die cDNA Synthese statt. Anschließend wurden 2 µl Taq-Polymerase (0,5E) in den Reaktionsansatz pipettiert und die Amplifikationsreaktion gestartet.

2.2.10 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [α -³²P]-dATP

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde das „Random Primed Labeling Kit“ der Firma Boehringer verwendet, das auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984) beruht. 100 ng DNA wurden zusammen mit 2,5 µl Hexanukleotiden in einem Volumen von 10 µl für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gebracht. Zum Reaktionsansatz wurden je 0,5 mM dTTP, dCTP und dGTP, 2 µl Reaktions-Mix, 5 µCi [α -³²P]-dATP, 1 E Klenow-DNA-Polymerase zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die

Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumen Dextranblau (0,04% Dextranblau, 1 mM EDTA pH 8,0) beendet. Die radioaktive Sonde wurde chromatographisch (Sephadex G50, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,02% SDS) vom überschüssigen, nicht eingebauten [α - 33 P]-dATP befreit und mit H₂O eluiert. Der Farbstoff markiert die ungefähre Position der Sonde in der Chromatographiesäule.

2.2.11 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

2.2.11.1 PCR-Amplifikation von DNA und cDNA Fragmenten

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNA Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l angesetzt:

1 μ l Matrizen-DNA
1 μ l "sense" Oligomer, 10 pmol
1 μ l "antisense" Oligomer, 10 pmol
5 μ l 10x Taq Polymerase Puffer
(20 mM Tris/Cl, pH 8,0, 0.1 mM KCl, 20 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v))
1 μ l dNTP-Mix, 10 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
1 μ l Taq-Polymerase (0,1-0,5 E)
ad 50 μ l H₂O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt. Die Synthesereaktion in dem Thermocycler „Progene“ der Fa. Techne durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

erste Denaturierung:	3 min 94°C
Amplifikation 25-30 Zyklen:	1 min 94°C (Denaturierung)
	1 min 52°C (Hybridisierung)
	1 min 72°C (Synthese)
letzte Synthese:	3 min 72°C

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes auf Amplifikation per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war,

wurde es wie unter 2.2.11.2 beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

2.2.11.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „ PCR Purification Kit“ (Quiagen) entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

2.2.12 FGFR4 Allel Bestimmung in Tumorproben

Von den in Paraffin eingebetteten Geweben wurden 8µm dicke Schnitte zur Isolierung von genomischer DNA verwendet. Die Schnitte wurden in den jeweiligen Laboratorien angefertigt aus denen die Proben stammten.

2.2.12.1 Isolierung von genomischer DNA aus Paraffinschnitten

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Pipettierschritte mit gestopften Spitzen durchgeführt. Jede Probe wurde 2x mit Xylol extrahiert um das Paraffin zu entfernen. Dazu wurde 1ml Xylol in jedes Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Das Gewebe wurde durch Zentrifugation (5min, RT, 13000rpm) pelletiert und das Xylol entfernt. Nach dieser organischen Extraktion folgten zwei Waschschrte mit 100% Ethanol um das Lösungsmittel zu entfernen. Die Proben wurden anschließend in einem Heizblock getrocknet.

Zu den getrockneten Proben wurden je 200µl ProteinaseK-Puffer, der 200 µg/ml Proteinase K enthält, gegeben und für 3 Stunden bei 55°C inkubiert, oder ü.N. bei 37°C. Um die Proteinase zu inaktivieren erfolgte danach eine 10 minütige Inkubation bei 95°C. Zur Aufbewahrung wurden die Proben bei –20°C eingefroren.

2.2.12.2 FGFR4 Allel Bestimmung durch PCR Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (PCR-RFLP)

Aufgrund der hohen Anzahl der durchgeführten PCR-Reaktionen und um mögliche Überkreuzkontamination zu vermeiden, wurden Ready►To►Go™ PCR-Beats (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Diese enthalten bereits alle nötigen Reagentien, außer Primer und DNA, für eine 25µl PCR-Reaktion.

Bei einem Endvolumen von 25µl enthält jeder Reaktionsansatz:

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

Dazu wurden zugegeben:

2µl	DNA
0,5µl	„sense“ Oligomer (µM)
0,5µ	„antisense“ Oligomer (µM)
22µl	H ₂ O _{bidest.}

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

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

Für die PCR-Reaktion wurde der folgende Reaktionszyklus verwendet:

erste Denaturierung:	3min	95°C
Amplifikation 35-40 Zyklen:	45sek	72°C
	45sek	94°C
letzte Synthese:	5min	72°C

Nach Beendigung der PCR-Amplifikation wurde der gesamte Ansatz mit dem Restriktionsenzym BstNI (5E/25µl) versetzt und 1h bei 65°C inkubiert. Die dabei entstandenen Produkte des Restriktionsverdaus wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Acrylamid ist ein Monomer das zu langen Ketten polymerisiert. Bei Zugabe von Methylbisacrylamid werden die Ketten quervernetzt. Nach Zugabe von 1/250 10% APS und 1/1000 TEMED wurde die Polymer-Lösung (16,5 ml 2%iges Methylbisacrylamid; 33,3 ml 30%iges Polyacrylamid; 5,5 ml 10xTBE) zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandhalter (Spacer) getrennt waren. Die Größe der linearisierten DNA-Fragmente wurde im Vergleich zu einem Längenstandard (1kb DNA Leiter, Gibco) ermittelt. Als Laufpuffer diente 1xTBE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen eines 6x Laufpuffers versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 190-270 Volt innerhalb von 3-4 Stunden. Nach 10 minütigem Färben in einer Ethidiumbromidlösung (etwa 12µl/l einer Stocklösung von 10mg/ml in dest. Wasser) konnten die DNA Banden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht ($\lambda = 302\text{nm}$) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters photographiert (Polaroid 667) werden.

2.2.13 cDNA Array Hybridisierung

Die cDNA Array Membranen wurden von der Firma Axxima Pharmaceuticals (Martinsried) zur Verfügung gestellt. Zur Prehybridisierung wurden die Membranen in einem Hybridisierungsgefäß mit 15 ml Prehybridisierungslösung + 150 µl tRNA (Roche, 10mg/ml) versetzt und in einem Hybridisierungssofen (MWG-Biotech, Ebersberg) mindestens 16h bei 68°C unter ständigem durchmischen inkubiert.

2x Prehybridisierungslösung:

100x Denhardt	50 ml
20x SSC	250 ml
0,5M NaPO ₄ , pH 6.8	100 ml
100mM Na ₄ P ₂ O ₇	10 ml
Bidest. H ₂ O	90 ml

Dann wurde 15 ml Hybridisierungs-Puffer + 150 µl tRNA (Roche, 10 mg/ml) auf 70°C im Wasserbad erhitzt und die radioaktiv markierte und gereinigte cDNA Probe (siehe 2.2.10) 10 min bei 100°C denaturiert.

Hybridisierungs-Puffer:

20x SSC	250 ml
10% SDS	10 ml
Bidest. H ₂ O	740 ml

Die cDNA Probe und der Hybridisierungs-Puffer wurden vermischt und gegen die Prehybridisierungslösung ausgetauscht. Dabei musste dringend darauf geachtet werden, dass die Temperatur in der Hybridisierungslösung konstant bleibt.

Die Hybridisierungsreaktion erfolgte ü.N. bei 68°C. Um den radioaktiven Hintergrund der Filter zu minimieren, wurden sie zweimal in 2x SSC, 0,1% SDS (2x 20 min, 42°C) und zweimal in 0,2x SSC, 0,1% SDS (20 min, 42°C; 60 min 65°C) gewaschen. Danach wurden sie noch 3x kurz mit Bidest. H₂O gespült und getrocknet.

2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5-7% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im sog. Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer.

PC12 Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten Platten kultiviert. Hierzu wurden die Platten mit Kollagen (in Äthanol gelöst, isoliert aus Ratten-Schwänzen, Sigma) beschichtet und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Vor Verwendung wurden die Platten 3 x mit sterilem PBS gewaschen.

2.3.2 Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6 cm Schalen wurden mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.

2.3.3 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalzium-phosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird eine Mischung der DNA mit CaCl_2 und einer BES gepuffereten Phosphatlösung (BBS) ein Kalziumphosphatpräzipitat der DNA gebildet, das nach einem noch unbekanntem Mechanismus von den Zellen aufgenommen wird (Graham und van der Eb, 1973). Die DNA liegt als Transgenom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilungen verloren (Scangos und Ruddle, 1981) Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressions-maximum bei etwa 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale (8 ml Medium) ausgesät. Pro Transfektion wurden 6 μg DNA mit H_2O zu einem Volumen von 260 μl verdünnt, mit 40 μl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Schütteln 400 μl BBS (2x) zugetropft. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese ü.N. bei 37°C und 3% CO_2 inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und eventuell mit serumfreien Medium bis zur Verwendung für 24 h gehungert.

2.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test werden Säugerzellen mit Expressionsplasmid der β -Galaktosidase wie unter 2.3.4 beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden dann 48 h nach Transfektionsbeginn mit PBS gewaschen, und 10 min bei RT mit 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS 10 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und zur Blaufärbung transfizierter Zellen 60 min bei 37°C mit X-Gal-Lösung (4 mg/ml) inkubiert.

2.3.5 Retroviraler Gentransfer in L6 Myoblasten und humanen Brust- Brustkrebszellen (MDA-MB-231)

Zu Herstellung von Zelllinien, welche einen bestimmten Rezeptor stabil exprimieren, wurden Phoenix A oder Phoenix E Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und mit der zu exprimierenden Rezeptor-cDNA in einem retroviralen Expressionsvektor pLXSN nach der unter 2.3.4 beschriebenen Kalziumphosphat-Methode transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen zum Sammeln von Virusüberstand ü.N. mit 5 ml Medium kultiviert. Das Medium wurde dann durch einen 0,45 μm Filter sterilfiltriert. Zur Infektion

wurden die jeweiligen Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet und auf 6 cm Kulturschalen ausgesät. 3 ml des gesammelten Virusüberstands der transfizierten Phoenix A oder Phoenix E Zellen wurde auf die zu infizierenden Zellen gebracht und in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren bei 37°C für 4-16 h inkubiert. Bei Mehrfachinfektionen wurde jeweils nach 4 h erneut infiziert. Nach Abschluß der Infektionen wurde das Medium gewechselt und die Zellen zur Herstellung stabiler Zelllinien in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion von infizierten Zellen erfolgt mit Geneticin (G418), einem Aminoglykosid-Antibiotikum (3-Desoxystreptamin), das am 80S Ribosom wirkt und die eukaryontische Proteinbiosynthese blockiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, für die ein Gen im Transposon Tn5 (Neo-Resistenzgen) kodiert, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen sterben innerhalb weniger Tage ab.

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Expression und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren können bakterielle Systeme genutzt werden, um fremde, z.B. eukaryontische Proteine als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) zu exprimieren. Oft sind solche Fusionsproteine wasserlöslich und können nach der Lyse der Bakterienzellen über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose (Pharmacia) gereinigt werden.

2.4.1.1 Expression eines GST-Fusionsproteins in 293 HEK Zellen

293 HEK Zellen wurden mit der jeweiligen Plasmid-DNA (pcDNA3 Insert) entsprechend der Kalziumphosphat Methode transfiziert (siehe). Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und durch Medium + G418 (1mg/ml) zur Selektionierung ersetzt. Als positiv Kontrolle für die Wirkung des G418 wurden nicht-transfizierte 293 HEK Zellen verwendet, die keine G418 Resistenz besitzen. Nachdem alle nicht-resistenten Zellen abgestorben waren (ca. 2 Wochen) wurden die resistenten transfizierten Zellen noch 7 Tage weiter in Medium + G418 (1mg/ml) inkubiert. Die übrig gebliebenen Zellen wurden dann im Hinblick auf ihre Expressionseigenschaften analysiert und positive eingefroren.

2.4.1.2 Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose

Zur Aufreinigung des gewünschten Proteins wurden die Zell-Überstände durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schüll) von Zelltrümmern befreit und mit 1ml Glutathion-Sepharose 16h bei 4°C bei leichtem Rühren inkubiert. Während dieser Zeit binden die Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose Matrix. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose Matrix in eine Chromatographie-säule (BioRad, München) überführt und dreimal mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (15 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0). Dabei wurde die Glutathion-Sepharose mit 10 ml

Elutionspuffer 10 min bei RT inkubiert und danach das Eluat in 1 ml Fraktionen gesammelt. Zur Kontrolle wurden 20 µl aus allen Fraktionen entnommen und mit 20 µl 3 x Lämmli-Puffer versetzt. Alle Proben wurden dann mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

2.4.2 Triton X100-Lyse von Zellen

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden frisch zugegeben: 10,0 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 2 mM NaOrthovanadat (pH 10). Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zellysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C), wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzellysate weiterverarbeitet.

2.4.3 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode der Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört, und ist in Mikrotiterplatten durchführbar. Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-1200 µg Protein/ml) eingesetzt.

2.4.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Zellysate dienen spezifische, an Protein A-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sog. Immunpräzipitation durchgeführt werden kann.

Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes, Antikörper und Protein, erleichtert (Chenais et al., 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30 µl Protein A-Sepharose und 1-5 µg monoklonaler Antikörper oder 3-10 µl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM EDTA, pH 8,0, 0,1% Triton X-100) versetzten Zellysaten gegeben und für 2-3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-

PAGE Gel wurden die Proben für 3 min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen.

2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, sodaß ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, ferner Gradientengele mit einen kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 15% nach 7,5% bzw. 11% nach 6%. Auf die Trenngele wurde in Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook *et al.* (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt, oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

Protein:	MG (in kD):	Protein:	MG (in kD):
Myosin	205,0	Ovalbumin	42,7
β-Galaktosidase	116,25	Carboanhydrase	29,0
Phosphorylase b	97,4	Trypsin-Inhibitor	21,5
BSA	66,2	Lysozym	14,4

2.4.6 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 5 min gefärbt und dann mit 40% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele auf 3 MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Falls die aufgetrennten Proteine radioaktiv markiert waren, wurden die getrockneten Gele auf einen Röntgenfilm aufgelegt und abhängig von der Signalstärke 12 h bis 1 Woche bei -80°C exponiert.

2.4.7 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni und Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 2 h bei 0,8 mA/cm² Nitrozellulosemembran auf einer "Semidry"-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2% TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt.

2.4.8 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, daß in einem ersten Schritt die spezifischen Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch Antikörper erkannt werden, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Durch diese enzymatische Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Kit“ der Firma NEN.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Immundetektion wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörper-lösungen auf 1 µg/ml in NET, 0,25% Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt. Der Filter wurde 3 h oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach zweimal 5 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60 min bei RT mit dem zweiten Antikörper in 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Spezies-spezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (NEN) wurde der Blot schließlich mindestens dreimal 15 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1 min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in einer spezifischen Lösung (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 1 h entfernt werden.

2.5 Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen

2.5.1 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen und die damit einhergehende Zu- oder Abnahme der Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 18 bis 24 h in serumfreien Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse (2.4.1) wurden die Zellen für 2 bis 10 min mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Liganden G Protein-gekoppelter Rezeptoren oder einer Isotonischen KCl-Lösung zur Induktion der Membrandepolarisation stimuliert. Wurden die Auswirkungen von Inhibitoren verschiedener Proteine auf die Tyrosinphosphorylierung zu untersuchender Proteine getestet, so wurden die Zellen vor der Stimulation mit den Inhibitoren oder den entsprechenden Kontrollsubstanzen für 10 bis 30 min vorbehandelt. Nach der Zellyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation (2.4.3) isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.4.4) aufgetrennt und der Phosphorylierungszustand mit Hilfe eines Phosphotyrosin (αPY)-spezifischen Antikörpers im Immunoblot (2.4.7) analysiert.

2.5.2 Bestimmung der katalytischen Aktivität der MAP Kinase durch *in vitro* Kinase-Test

Die endogene MAP Kinase wurde aus 30 bis 90 µg Zellysat immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit 0,25 ml HNTG-Puffer und einmal mit 0,4 ml Äquilibriumspuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 200 µM Orthovanadat) gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Immunpräzipitaten je 30 µl Reaktionspuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 200 µM Orthovanadat, 5 mM p-Nitrophenylphosphat, 0,5 mg/ml MBP, 50 µM ATP) mit 1 µCi [γ -³²P]-ATP gegeben und 10 min bei RT im Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von je 30 µl 2x Lämmli-Puffer wurde dann die Kinasereaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele in der Mitte durchgetrennt. Die unteren Hälften, in denen sich das MAP Kinase Substrat MBP befand wurden mit Coomassielösung angefärbt, getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert bzw. mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet. Die obere Gelhälfte wurden wie unter 2.4.6 und 2.4.7 beschrieben auf Expression der MAP Kinasen hin analysiert.

2.5.3 Zell-Adhäsions-Assay

Je 500 µl Nitrozellulose (Schleicher & Schüll) in Methanol gelöst (1,7 µl / 0,8 cm²) wurde in ein Loch einer 6-Loch Zellkulturplatte gegeben und 5 min inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde abgenommen und die Platten bei RT getrocknet. Auf die so vorbehandelten Platten wurden dann in jedes Loch 400 µl (5 µg/ml) der Proteine bzw. p.-Lysine gegeben und 1h auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Danach wurden die Platten 2x mit BSA Lösung (5mg/ml) gewaschen und 1h die nicht abgesättigten Bindungsstellen mit BSA blockiert. Zuletzt wurden die Platten kurz mit dem jeweiligen Zellkulturmedium gewaschen.

Zur Bestimmung der Zelladhäsionskompetenz der einzelnen Substrate wurden je 150.00 Zellen ausgesät und unterschiedlich lang bei 37°C inkubiert. Wahlweise wurden die Zellen vorher noch 24h mit FCS-freien Medium gehungert. Die nichtadherierten Zellen wurden gewaschen und die adherierten Zellen entweder lysiert (für Immunpräzipitationen) oder deren Anzahl und Vitalität durch einen modifizierten MTT-Assay bestimmt.

2.5.3.1 Photometrische Bestimmung von lebenden Zellen (MTT-Assay)

Zur Bestimmung der adherierten lebenden Zellen wurde die von Mosmann (Mosmann, 1983) beschriebene Methode für Zellen des Immunsystems auf adherente Zellen übertragen. Der Test misst die Aktivität eines mitochondrialen Enzyms und reflektiert daher die Gesamtmenge der lebenden Zellen. Das Substrat MTT (Thiazolblau; 3-[Dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) dringt in die Zellen ein und wird durch Aufbrechen des Tetrazoliumringes von den Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien in ein alkohollösliches Formazanprodukt umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Zum Test wurden die adherierten Zellen mit einer MTT/PBS-Lösung (2,5 mg/ml) versetzt, so dass eine Konzentration von 0,6 mg/ml MTT vorlag und für 3h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1,5 ml Isopropanol/0,04 N HCl lysiert und der Formazanfarbstoff aufgelöst. Die Messung des gelösten Farbstoffs erfolgte bei 570 nm (OD₅₇₀) gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm (OD₆₉₀).

2.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mit den Programmen MedCalc (Belgien), SPSS (USA) und Winstat (Zierenberg) durchgeführt. Die Gültigkeit der Null-Hypothese zur Verteilung der Genotypen in den einzelnen Subgruppen wurde durch den Chi-Test untersucht. Aufgrund der kleinen Anzahl der Homozygoten FGFR4 Arg388 Träger wurden diese mit den heterozygoten FGFR4 Arg388 Trägern zusammengefasst. Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier aufgetragen und mit einer Log-Rank Statistik verglichen. Allen Tests wurde ein Signifikanz-Level von $\alpha=0.05$ zu Grunde gelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Funktion einer neuen Sequenz-Variante Arg388 des FGFR4 in der Tumorentwicklung

Die Fehlregulation von Tyrosinkinasen und –phosphatasen, die sowohl durch die erhöhte Expression als auch durch Genveränderungen hervorgerufen werden kann, spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krankheiten. Ein Beispiel ist die RTK HER2, deren Gen in 30% aller Brustkarzinome in mehr als einer Kopie vorkommt. Diese Gen-Amplifikation führt zu einem erhöhten Spiegel an HER2 mRNA in den Tumorzellen. Untersuchungen ergaben, dass Patienten mit einer HER2 Gen-Amplifikation früher ein Tumorrezidiv bilden und eine verkürzte Überlebenszeit haben (Slamon *et al.*, 1987).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die systematische Untersuchung der mRNA Mengen von Tyrosinkinasen und –phosphatasen in Tumorzellen wichtige Informationen über die Entstehung der Tumoren und ihre weitere Entwicklung liefern kann. Aus diesem Grunde wurde von P. Knayzew und Y. Cherburkin (diese Arbeitsgruppe) die Expressionsstärke von Tyrosinkinasen und -phosphatasen in 18 Brusttumor- und 3 Brustepithel-Zelllinien mit Hilfe von cDNA Arrays untersucht. Sie konnten zeigen, dass neben anderen RTKs besonders der FGFR4 in 30% der Tumor-Zelllinien stark bis sehr stark exprimiert ist, während keine FGFR4 mRNA in den drei nichttransformierten Brustepithel-Zelllinien gefunden wurde. Diese Beobachtungen legen eine Rolle für den FGFR4 bei der Entstehung von Brusttumoren nahe. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde diese Hypothese geprüft.

3.1.1 Identifizierung einer Mutation in der Transmembran-Domäne des FGFR4 in MDA-MB-453 Zellen

Die Aktivierung von RTKs geht einher mit der Dimerisierung von Rezeptormonomeren, welche sich gegenseitig an zytoplasmatischen Tyrosinen transphosphorylieren (siehe 1.1.1). Wenn eines der Rezeptormonomere dagegen eine inaktive Kinase ist, können zwar noch Dimere gebildet werden, aber es erfolgt keine Transphosphorylierung mehr.

Zelluläre Überexpression einer dominant negativen Mutante des FGFR1, bei der die gesamte intrazelluläre Domäne fehlt (Δ FGFR1), blockiert dadurch zum Beispiel spezifisch die FGF

3. Ergebnisse

induzierte Signaltransduktion. NIH3T3 Zellen, die durch den löslichen Ligand FGF4 transformiert werden, verlieren diese Eigenschaften, wenn sie Δ FGFR1 exprimieren (Li et al., 1994).

Um eine dominant negative Mutante des FGFR4 herzustellen, wurde in einem ersten Schritt die cDNA des Rezeptors mit Hilfe einer PCR Reaktion vervielfältigt. Als Ausgangsmaterial wurde mRNA aus der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-453 gewählt, da diese Zelllinie die stärkste FGFR4 Expression zeigt (Knayzev & Cherburkin, diese Gruppe). Nachdem in einer PCR Reaktion mit Hilfe entsprechender Oligonukleotide die cDNA des FGFR4 gebildet worden war, wurde diese in den Vektor pcDNA3 kloniert.

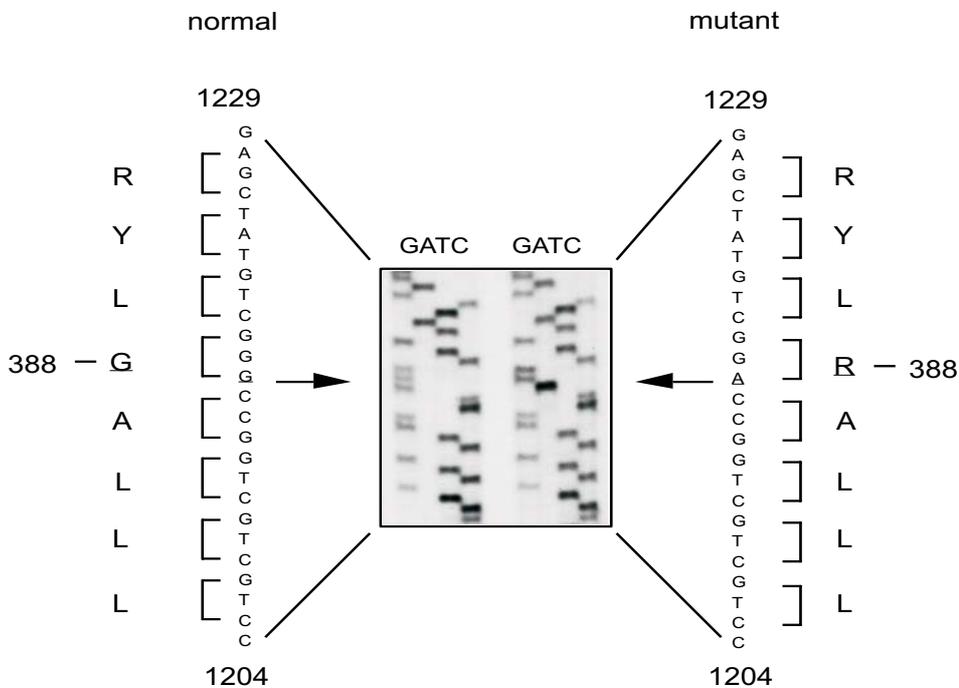


Abb. 3 Die Punktmutation an Position 1217 der FGFR4-Sequenz. Die Abbildung zeigt einen 25 Basenpaar langen Sequenzabschnitts des FGFR4 Wildtyp und der FGFR4 Mutante. Die PCR-Produkte der cDNA Amplifikation mit FGFR4 spezifischen Oligonukleotiden wurden in den pcDNA3-Vektor kloniert. Die Sequenzierung der Plasmid DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt und die Produkte auf einem denaturierenden 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch Exposition auf einen Röntgenfilm wurden die Produkte sichtbar gemacht.

Um die Vollständigkeit der erhaltenen Klone zu überprüfen, wurde die Sequenz von zehn unabhängigen Klonen bestimmt. Dabei wurden in allen zehn Klonen zwei Punktmutationen identifiziert.

Bei einer der Mutationen handelt es sich um einen Austausch von Thymidin zu Adenosin an Position 943 der Nukleotidsequenz des FGFR4. Dadurch wird das Codon 297 von Aspartat zu Valin geändert. Diese Änderung in der Aminosäuresequenz wurde erstmals durch Ron *et al.*, (1993) beschrieben. Allerdings wurden keine weiterführenden funktionellen Untersuchungen durchgeführt. Die zweite Punktmutation ändert an Position 1217 ein Guanidin zu einem Adenosin. Diese führt zu einem Austausch des für die hydrophobe Aminosäure Glycin stehenden Codons GGG gegen das für die stark hydrophile Aminosäure Arginin stehenden Codons AGG in der Transmembrandomäne des Rezeptors (Abb. 3).

Ähnliche Punktmutationen sind in der Vergangenheit in der Transmembrandomäne des FGFR2 und FGFR3 identifiziert worden. Sie sind äußerst selten und mit schweren Entwicklungsstörungen der Skelettknochen verbunden (Wilkie *et al.*, 1995).

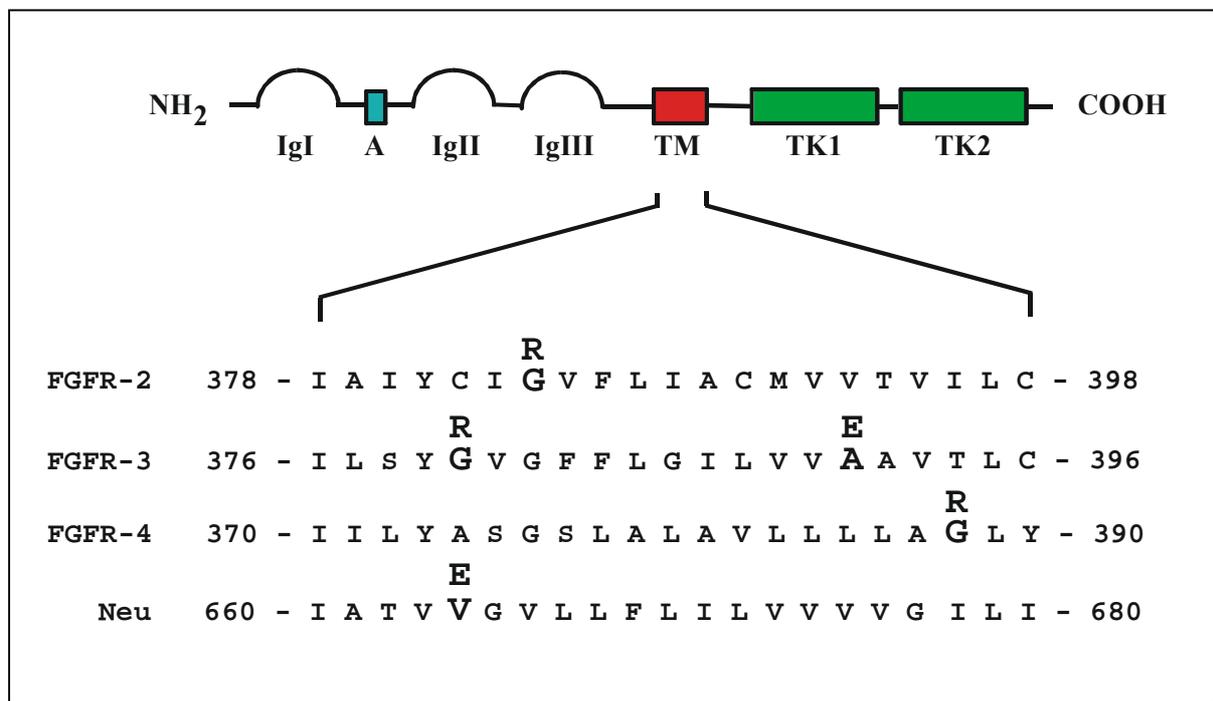


Abb 4. Schematische Darstellung von RTK Transmembrandomänen. Punktmutationen, die zu nicht konservierten Veränderungen der Aminosäuresequenz und zu schweren Entwicklungsstörungen oder Krebs führen, sind hervorgehoben und die jeweilige neue Aminosäure angegeben.

Eine weitere Punktmutation in der Transmembrandomäne einer RTK ist der Austausch von Alanin gegen Glutamat in Neu/ErbB2, einem Mitglied der EGF Rezeptor Familie, die in Glioblastomen von Ratten gefunden wird. Alle diese Veränderungen haben mit dem FGFR4

Arg388 Allel die Einführung einer stark geladenen Aminosäure in die hydrophobe Umgebung der Zellmembran gemeinsam (Abb. 4).

3.1.2 Bestimmung des FGFR4 Genotyps in verschiedenen Tumor-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob das FGFR4 Arg388 Allel nur in der Zelllinie MDA-MB-453 vorkommt oder ein wichtiger Faktor bei der Tumorentstehung ist, sollte der FGFR4 Genotyp in weiteren Zelllinien bestimmt werden. Dazu wurde mRNA aus den 18 Brusttumor- und 3 Brustepithelzelllinien isoliert und zur Synthese der entsprechenden cDNA verwendet. Die genotypische Untersuchung wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion-Restriktions Längen-Polymorphismus Analyse durchgeführt (2.2.12.2). Diese Art der Analyse ist möglich, da durch die Guanidin/Adenosin Mutation ein zusätzliches Erkennungsmotiv für das Restriktionsenzym BstN1 im FGFR4 Gen gebildet wird (Abb. 5).

Mit Hilfe spezifischer Primer wurde ein 168 Basenpaar großes Fragment, welches die Transmembrandomäne des FGFR4 einschliesst, in einer PCR Reaktion amplifiziert und das PCR Produkt mit der Restriktions-Endonuklease BstN1 verdaut. Aufgrund der spezifischen Bandenmuster nach Auftrennung über ein 12%iges Polyacrylamidgel konnten die beiden Allele identifiziert werden.

Die Zelllinie K562 zeigt das Bandenmuster des homozygot nichtmutierten FGFR4. Das Enzym BstN1 kann an zwei Positionen innerhalb des PCR-Produktes schneiden und erzeugt dadurch drei Fragmente mit einer Größe von 22, 37 und 109 Basenpaaren. Die Zelllinie MDA-MB-453 dagegen zeigt das Bandenmuster für den FGFR4 mit Arg388 in beiden Allelen. Die Mutation an Position 1217 der Nukleinsäuresequenz erzeugt eine zusätzliche BstN1 Schnittstelle (CCAGG) in dem 109 Basenpaarfragment. Dadurch verschwindet das 109 Basenpaar Fragment und zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von 29 und 80 Basenpaaren werden gebildet. Die Zelllinie ZR 75-1 besitzt sowohl ein mutiertes als auch ein nichtmutiertes FGFR4 Allel. Die Analyse durch Restriktionsverdau ergibt fünf Banden, die auf das Vorhandensein beider Allele schliessen lassen.

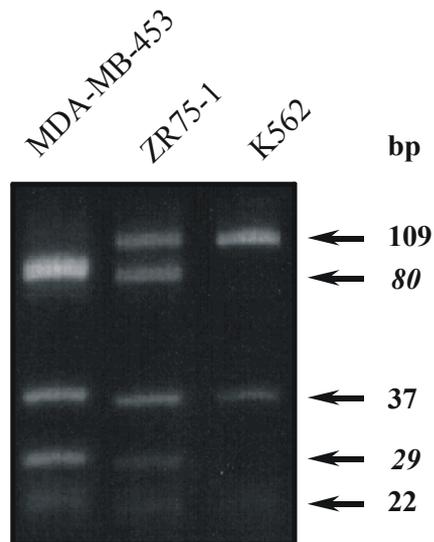


Abb 5. Analyse des FGFR4 Genotypes durch Restriktionsverdau. cDNA der jeweiligen Zelllinien wird als Template in den entsprechenden PCR-Reaktionen verwendet, um ein 168 bp großes PCR-Produkt zu bilden. Das so erhaltene PCR-Produkt wird 1 h mit 0.5 U der Restriktions-Endonuklease BstN1 bei 65°C inkubiert. Die entstandenen Fragmente werden durch ein 12%iges nicht-denaturierendes Poly-Acrylamid Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Von den 18 so getesteten Brusttumor-Zelllinien enthielten acht ein FGFR4 Gen mit einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle. Zwei Zelllinien zeigten eine Guanidin/Adenosin Mutation in beiden FGFR-4 Allelen, während in den sechs übrigen Zelllinien eine Guanidin/Adenosin Mutation im FGFR4 Gen in einem Allel gefunden wurde (Tab. 1).

Interessanterweise zeigte sich, dass in allen drei nichttransformierten Brustepithel-Zelllinien kein FGFR4 Allel mutiert war. Der Vergleich der FGFR4 Expression mit den FGFR4 Genotypen ergab weiterhin, dass das FGFR4 Arg Allel mit einer starken FGFR4 Expression korreliert ($p < 0.01$; Man-Whitney Test).

	MCF-10A	HBL-100	Ac-745	BT-20	MDA-MB-435S	MDA-MB-231	MDA-MB-436	MDA-MB-415	BT-549	MDA-MB-468
FGFR4 Expression	-	-	-	-	-	-	2	4	16	19
FGFR4 Allel	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly

	ZR 75-30	DAL	BT-474	MCF-7	T-47D	Du4475	BT-483	ZR 75-1	MDA-MB-361	MDA-MB-453	SK-Br-3
	82	350	1170	22	68	200	930	1810	3460	1270	97
	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Gly	Gly/Arg	Gly/Arg	Gly/Arg	Gly/Arg	Gly/Arg	Gly/Arg	Arg/Arg	Arg/Arg

Tab.1 FGFR4 Allel Verteilung und Expression in Brustkrebs-Zelllinien und nicht-transformierten Brustepithel-Zelllinien. Die FGFR4 Expression wurde durch cDNA Array Analyse untersucht (Y. Cherburkin u. P. Knayzev). Die Werte beziehen sich auf Pixel / mm². Die FGFR4 Allele wurden mit Hilfe genomischer DNA bestimmt.

Um festzustellen, ob die Guanidin/Adenosin Mutation auch in anderen Tumortypen eine Rolle spielen kann, wurden auf die gleiche Weise auch in zehn Tumor-Zelllinien aus der Bauchspeicheldrüse, in 17 Plattenepithelkarzinom-, in acht Glioblastom- und fünf Neuroblastom-Zelllinien der FGFR4 Genotyp bestimmt. Dabei ergab sich folgendes Bild: Die FGFR4 Guanidin/Adenosin Mutation konnte in Zelllinien jedes Tumortyps identifiziert werden, wobei der Anteil von Homozygoten und Heterozygoten FGFR4 Genotypen unterschiedlich war und sich teilweise erheblich von den aus der Analyse der Brusttumor-Zelllinien bekannten Ergebnissen unterschied (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der geringen, nicht signifikanten Anzahl von Proben konnte aber noch keine abschließende Aussage über die Verteilung der FGFR4 Genotypen in den jeweiligen Tumortypen gemacht werden.

3.1.3 Verteilung des FGFR4 Arg388 Alleles in Tumorpatienten

Das häufige Auftreten des FGFR4 388Arg Alleles in den getesteten Tumor-Zelllinien und die Ähnlichkeit dieser Sequenz-Variante zu früher beschriebenen Mutationen in RTKn (siehe Abb. 4) lassen vermuten, dass FGFR4 Arg388 eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung übernimmt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden in weiteren Untersuchungen der FGFR4 Genotyp in drei verschiedenen Brustkarzinom Kollektiven aus München (Klinik der Technischen Universität), St. Petersburg (N.N. Petrov Institut für Onkologie, Russland) und Chieti (Institut für Pathologie der Universität Chieti, Italien), sowie in einem Kollektiv Darmkrebs Patienten (Institut für Pathologie der Universität Chieti, Italien), bestimmt.

3.1.3.1 FGFR4 Arg388 ist eine Keimbahnmutation

Es wurde cDNA aus 61 primären Brustkarzinomen am N.N. Petrov Institut für Onkologie in St. Petersburg, Russland, isoliert, und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Untersuchung der Verteilung der FGFR4 Genotypen in diesen primären Tumorproben wurde mit Hilfe einer PCR-RFLP Analyse (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) durchgeführt. (siehe 2.2.12.2). Dabei zeigte sich, dass in 26 Tumoren (44%) kein FGFR4 Arg388 Allel gefunden werden konnte, wogegen 28 Patienten (45%) ein mutiertes FGFR4 und ein normales FGFR4 Allel und sieben Patienten (11%) nur ein FGFR4 Arg388 Allel aufwiesen. Um festzustellen, ob die FGFR4 Mutation nur in Tumorgewebe zu finden ist, es sich also um eine somatische Mutation handelt, wurde cDNA aus Leukozyten von 22 Patienten isoliert und in Bezug auf die FGFR4 Allel Verteilung untersucht.

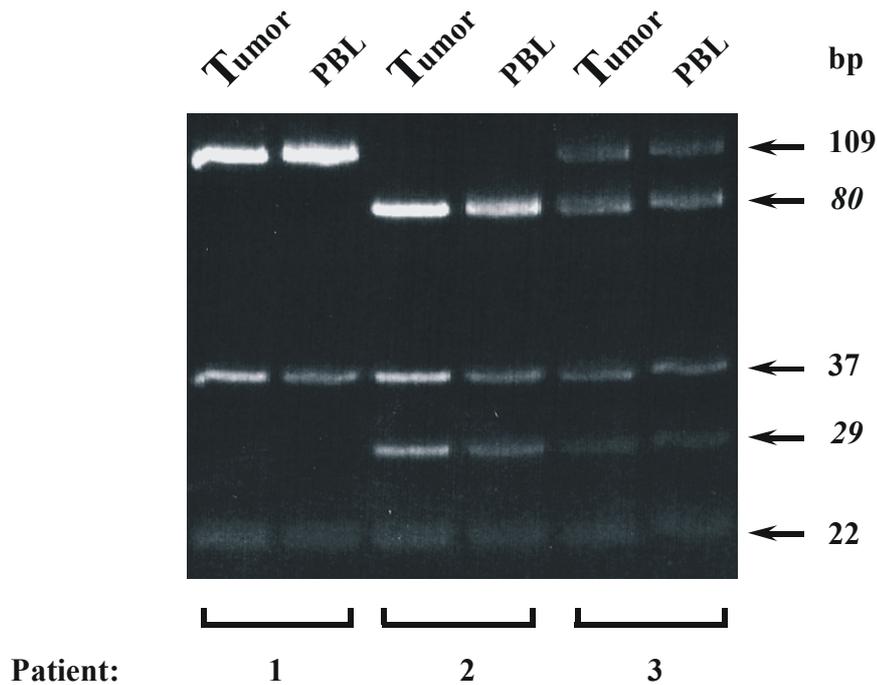


Abb. 7 FGFR4 Arg388 ist eine Sequenzvariante in der Keimbahn der Patienten. Genomische DNA aus Tumorgewebe (Tumor) und den peripheren Lymphozyten (PBL) des gleichen Patienten wurde als Vorlage zur Amplifikation des 168 Basenpaar großen PCR-Produktes verwendet. Nach Restriktionsverdau mit BstNI wurden die erhaltenen Fragmente in einem 12%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Größe der Fragmente, die das Gly Allel repräsentieren, sind fett gedruckt, die des Arg Allel kursiv. bp=Basenpaare

Abbildung 7 zeigt das Bandenmuster der Restriktionsfragmente für drei repräsentative Patienten. In allen untersuchten Fällen stimmt das Bandenmuster, das sich aus der PCR-RFLP an cDNA aus Tumorgewebe und Leukozyten des gleichen Patienten ergab, überein. Dieses Ergebnis belegt, dass es sich bei der FGFR4 Arg388 um eine Keimbahnmutation handelt.

3.1.3.2 Funktion von FGFR4 Arg388 bei der Tumorentstehung

Die bisherigen Untersuchungen belegen, dass das Arg388 Allel im FGFR4 nicht nur auf die Zelllinie MDA-MB-453 beschränkt ist, sondern in vielen verschiedenen Tumortypen vorkommt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieses neue FGFR4 Allel nicht somatisch in Tumorgeweben auftritt, sondern in der Keimbahn der Patienten zu finden ist. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Frage, ob FGFR4 Arg388 eine Ursache für die Tumorentstehung bei diesen Patienten ist und zu einer erblichen Prädisposition führt.

Um diese Fragen zu beantworten, sollte zum einen der FGFR4 Genotyp in den zwei weiteren Brustkarzinom Kollektiven, die aus den Archiven zweier Kliniken stammen, bestimmt werden und mit 123 DNA Proben von unabhängigen Individuen ohne einen familiären Krebs-Hintergrund verglichen werden.

FGFR4 Allele	Primäre Brustkarzinome			Kontrollen
	Deutschland	Russland	Italien	Deutschland
Gly/Gly	40 ^a (47%)	26 (44%)	28 (47%)	55 (45%)
Gly/Arg	36 (42%)	28 (46%)	29 (46%)	60 (49%)
Arg/Arg	9 (11%)	7 (11%)	3 (5%)	8 (6%)
N=	85	61	60	123

Tab. 2 FGFR4 Allel Verteilung in Brustkarzinomen und Kontrollen. Die Allel-Verteilung wurde durch PCR-RFLP an genomischer DNA aus Tumorgewebe bestimmt. Bei den Kontrollen wurde genomische DNA aus Blutproben gewonnen. a: Anzahl der Patienten; N = Gesamtzahl der Proben in der jeweiligen Gruppe

Die Untersuchungen wurden wieder mit Hilfe der PCR-RFLP Analyse durchgeführt. Die erste Gruppe von 85 Brustkarzinom Proben wurde aus dem Gewebe-Register der Abteilung für Pathologie des “Klinikums Rechts der Isar” ausgewählt. In diesem Kollektiv und in einem weiteren, das aus der Tumorbank der Universitätsklinik Chieti, Italien, stammte, ergab die Analyse der FGFR4 Genotypen ähnliche Ergebnisse wie zuvor schon die Gruppe der Brustkarzinom Proben aus St. Petersburg (Tab. 2).

Auch in der Gruppe der 123 Kontroll cDNA Proben wurde die gleiche Allel-Verteilung gefunden (Tab. 2). 55 Proben (45%) waren homozygot für das Gly Allel, 60 Proben (49%) waren heterozygot Gly/Arg und 8 (6%) homozygot Arg/Arg. Da in diesem Kollektiv die Allelfrequenz von Gly388 deutlich höher als die von Arg388 ist, repräsentiert FGFR4 Gly388 den Rezeptorwildtyp.

Es ergaben sich also keine statistisch bedeutsamen unterschiedlichen Verteilungen der FGFR4 Allele zwischen den Brustkarzinom-Patienten und den Kontrollindividuen ($\chi^2=0.93$; $p=0.6$). Dieses Ergebnis zeigt, dass die FGFR4 Arg388 Sequenz-Variante nicht mit der

Tumorentstehung verknüpft ist und nicht das Risiko erhöht, an einem Brusttumor zu erkranken.

3.1.3.3 Einfluss von FGFR4 Arg388 auf die Tumor-Progression

Veröffentlichungen in der jüngsten Vergangenheit haben gezeigt, dass Tumorwachstum und Tumorprogression, die sich durch starke Metastasierung und Invasivität des Tumors auszeichnet, von unterschiedlichen Faktoren gesteuert werden können. Zum Beispiel haben Clark *et al.*, (2000), die GTPase RhoC als einen wichtigen zentralen Punkt bei der Metastasierung von murinen Melanomen identifiziert, der keine beschleunigende Wirkung auf das Wachstum von Melanom-Zellen *in vitro* besitzt.

Um die Rolle des FGFR-4 Arg Allel in der Progression von Brusttumoren zu bestimmen, wurden die Tumorresektionen der 85 Brustkrebspatienten aus dem Tumorregister der Universitätsklinik der TU München im Hinblick auf die verschiedenen FGFR4 Genotypen untersucht. Die Ergebnisse der genotypischen Analyse wurden dann mit den klinischen Patientendaten, die sich aus dem TNM Status (Tumorgröße; Nodalstatus; Metastasenstatus), der rezidivfreien Überlebenszeit und der Überlebensdauer zusammensetzen, verglichen.

3.1.3.4 FGFR4 Arg388 korreliert mit klinischen Tumor-Parametern bei Brustkrebs-Patienten

Klinische und pathologische Faktoren werden in der Tumordiagnostik schon seit vielen Jahren genutzt, um Vorhersagen über den Krankheitsverlauf eines einzelnen Patienten machen zu können. Diese Informationen sind sowohl für die Planung von Therapiestrategien als auch für die Überprüfung von therapeutischen Ergebnissen wichtig und nützlich.

FGFR4 Allele		Brustkrebs			p-Value
		Gly/Gly	Gly/Arg	Arg/Arg	
Alter		62,2	58,4	58,3	
pN	0	21 (51%)	12 (35%)	2 (22%)	n.s.
	1	19 (46%)	17 (50%)	5 (56%)	
	2	1 (3%)	5 (16%)	2 (22%)	
pT	1	15 (37%)	11 (32%)	3 (33%)	n.s.
	2	22 (54%)	18 (53%)	4 (44%)	
	3	2 (5%)	1 (3%)	1 (11%)	
	4	2 (5%)	4 (12%)	1 (11%)	
Er	>0	18 (58%)	22 (71%)	4 (50%)	n.s.
	=0	13 (42%)	9 (31%)	4 (50%)	
Pg	>0	18 (56%)	18 (69%)	2 (25%)	n.s.
	=0	14 (44%)	8 (31%)	6 (75%)	
HER2	=0	11 (37%)	7 (29%)	0	p=0.0034
	=1	9 (30%)	2 (8%)	0	
	=2	4 (13%)	10 (42%)	1 (20%)	
	=3	6 (20%)	5 (21%)	4 (80%)	

Tab. 3 Zusammenhang zwischen den FGFR4 Genotypen und klinischen Parametern. pT, Tumorstadium gemäß UICC ; pN, Lymphknotenstatus gemäß UICC; Er, Östrogenrezeptor (IHC) (=0 negativ, >0 positiv); Pg, Progesteronrezeptor (IHC) (=0 negativ, >0 positiv); HER2 (IHC) siehe auch 3.1.3.5; p-Values wurden mit Hilfe des Chi-Square Tests berechnet. n.s. nicht signifikant

Neben vielen anderen prognostischen Faktoren, wie z.B. der Tumorgröße (Leitner *et al.*, 1995), dem Differenzierungsgrad (Grading) (Henson *et al.*, 1991) und dem Hormonrezeptor-Status (Allred *et al.*, 1998), spielt der Befall der axiliären Lymphknoten durch Tumormetastasen eine wichtige Rolle bei der Diagnostik von Brustkarzinomen. Nur 20-30% der Patienten ohne Lymphknoten-Metastasen entwickeln ein Rezidiv, dagegen 70% der Patienten mit Lymphknoten-Metastasen (Fitzigbbons *et al.*, 1999).

In dem Kollektiv der TU München (85 Patienten) entwickelten von 35 Patienten ohne Lymphknoten-Metastasen 17% ein Rezidiv, während unter den 48 Patienten mit Lymphknoten-Metastasen bei 63% ein Rezidiv gefunden wurde.

Tabelle 3 zeigt die Verteilung der FGFR4 Genotypen in den Brusttumoren in Abhängigkeit zu den verschiedenen klinischen Prognosefaktoren, deren Bestimmung an der Klinik rechts der Isar, Gynaekologische Abteilung, gemäß den Richtlinien der UICC durchgeführt wurde.

Allerdings konnte in dem Kollektiv der TU München keine statistisch bedeutsamen Übereinstimmungen zwischen Anzahl und Art der Lymphknoten-Metastasen, Tumorstadium und der Expression von Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor gefunden werden (Tab.3). Dagegen zeigte sich eine statistisch bedeutsame Verbindung zwischen dem FGFR4 Allel und der HER2 Expression. Auf diese wird aber unter 3.1.3.5 noch näher eingegangen.

In einer weiteren Untersuchung sollte deshalb festgestellt werden, welchen Einfluss das FGFR4 Arg388 und das FGFR4 Gly388 Allel auf die Rezidiv Entstehung und die damit verbundene Tumorprogression haben. Zu diesem Zweck wurde die FGFR4 Allel Verteilung in den nodalpositiven und -negativen Patienten in Abhängigkeit zum zeitlichen Auftreten eines Rezidives in einem Diagramm nach Kaplan-Meier aufgetragen und die statistische Signifikanz durch den Log-Rank Test berechnet.

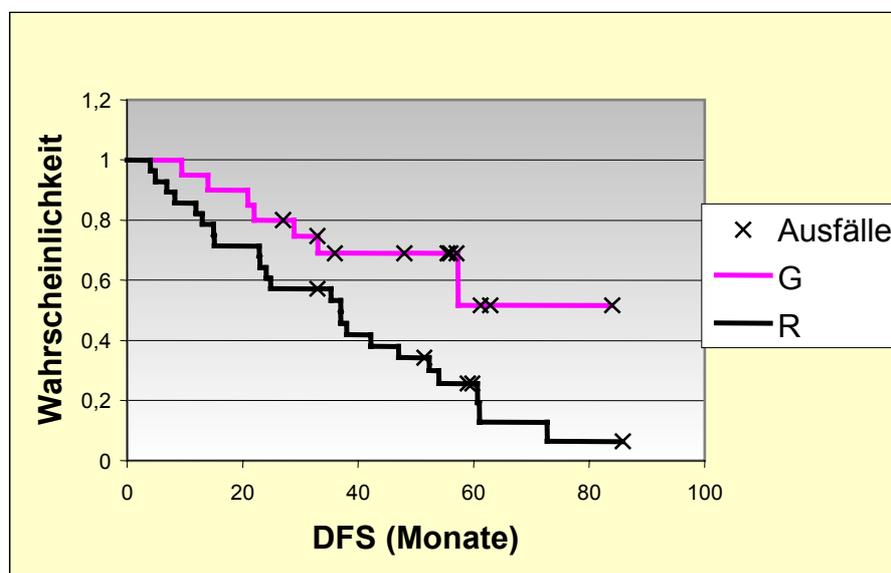


Abb. 8 Kaplan-Meier Diagramm: Die Beziehung zwischen FGFR4 Allelen und dem rezidivfreien Überleben. 48 Patienten mit Lymphknoten-Metastasen wurden für die Log-Rank Statistik verwendet. In der Gruppe der Patienten mit Arg388 erlitten 23 Patienten einen Rückfall (DFS) innerhalb des Beobachtungszeitraumes, während in der Gruppe mit Gly388 sieben Patienten wieder einen Tumor entwickelten ($p=0.01$) G: FGFR4 Gly Allel, $n=20$; R: FGFR4 Arg Allel, $n=28$.

Es zeigte sich, dass das Arg388 Allel in der Gruppe der Patienten mit Lymphknoten Metastasen mit einer deutlich reduzierten rezidivfreien Zeit korreliert ($\chi^2=6.1$; $p=0.01$) (Abb. 8). Von 28 Patienten mit einem Arg388 Allel in dieser Gruppe wurde in 23 Patienten (82%) ein Rezidiv gefunden, während dieses in den 20 Patienten mit einem Gly388 Allel nur in sieben Patienten (32%) der Fall war. In den Patienten ohne Befall der Lymph-Knoten wurde dagegen keine direkte Beziehung zwischen den FGFR4 Allelen und der rezidivfreien Überlebenszeit der Patienten gefunden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3.5 Assoziation zwischen FGFR4 Gly388Arg und der HER2 Expression

In den Brustkarzinom-Zelllinien, deren RTKn und PTKn Expressionsmuster durch P. Knayzew und Y. Cherburkin untersucht wurden, korreliert eine erhöhte HER2 Expression mit dem neuen FGFR4 Arg388 Allel. Da eine stark erhöhte HER2 Expression in Brustkarzinomen in der Vergangenheit durch Patientenstudien mit einer verkürzten Überlebenszeit in Verbindung gebracht werden konnte (Slamon *et al.*, 1987), und diese Ergebnisse auch durch *in vitro* Experimente untermauert wurden (Baasner *et al.*, 1996), lag die Vermutung nahe, daß auch FGFR4 Arg388 eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression einnimmt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Höhe der HER2 Expression in 60 von 85 Tumorproben aus München durch immunhistochemische Methoden bestimmt.

Die Färbung und Auswertung wurde zusammen mit Dr. Prechtel in der Abteilung für Pathologie an der "Klinik Rechts der Isar", TU München, durchgeführt. Die Kriterien, die in Tabelle 4 aufgeführt sind, wurden zur Klassifizierung der beobachteten Probenfärbungen verwendet.

In der Gruppe der Patienten mit einem Befall der axilliären Lymphknoten ($n=43$) konnten in 69% ($n=18$) der Patienten mit einem FGFR4 Arg388 Allel eine starke immunhistochemische Anfärbung (Stärke 2 u. 3) von HER2 gezeigt werden. Im Unterschied dazu wurde eine starke HER2 Expression in Patienten mit dem Gly388 Allel nur in 25% ($n=5$) der Fälle nachgewiesen ($p=0.01$) (Abb.9).

Intensitätsstärke	Art der Färbung
0	Keine Anfärbung oder in weniger als 10% der Tumorzellen
1	Eine sehr schwache nur teilweise membranständige Anfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen
2	eine schwache bis mittelstarke, komplett membranständige Anfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen
3	Eine mittlere bis starke, komplett membranständige Anfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen

Tab. 4 Kriterien zur Klassifizierung von immunhistochemischen Untersuchungen zum HER2 Expressions Status in primären Brust-Tumoren

Im Gegensatz dazu wurde in Patienten ohne axiliaren Lymphknotenbefall keine Beziehung zwischen den FGFR4 Allelen und der HER2 Expression entdeckt ($p=0.6$) (Abb. 9). Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie mit 61 Patientenproben der Universität Chieti bestätigt werden. Auch hier wurde eine erhöhte HER2 Expression in der Mehrzahl in Patienten mit einem Arg388 Allel und Lymphknoten Metastasen beobachtet ($p=0.03$)(Daten nicht gezeigt).

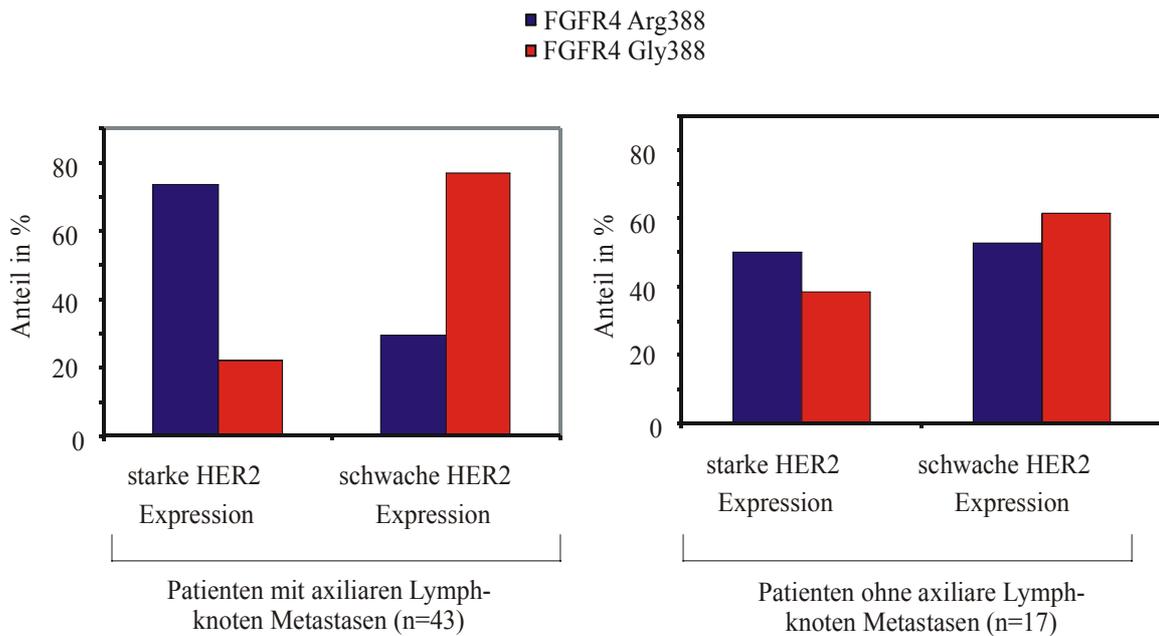


Abb. 9 Das FGFR4 Arg388 Allel steht in Beziehung zu einer starken HER2 Expression in Brustkarzinomen mit Lymph-Knoten Metastasen. In Paraffinschnitten von 60 primären Tumoren wurde immunhistochemisch die HER2 Expression untersucht. Die angefärbten Proben wurden in vier Klassen eingeteilt (siehe oben). Zur Auswertung wurden je zwei Gruppen zu einer Gruppe von schwach HER2 exprimierenden Tumoren (0 + 1) und stark exprimierenden Tumoren (2 + 3) und sowie mit einem oder zwei FGFR4 Arg388 Allelen zur Gruppe „Arg388“ zusammengefasst.

Die hier präsentierten Untersuchungsergebnisse belegen, dass die neue Sequenzvariante Arg388 in der Transmembrandomäne des FGFR4 mit einer deutlich beschleunigten Tumorprogression und einer schlechten klinischen Prognose für die betroffenen Patienten einhergeht. Diese Befunde konnten in Bezug auf eine Assoziation zwischen FGFR4 Arg388 und der HER2 Überproduktion in einer zweiten Studie noch belegt werden. Dieses macht deutlich, dass die hier gezeigten Beobachtungen nicht auf einen methodischen Fehler bei der Probenauswahl zurückzuführen sind. Weiterhin wurde die Beurteilung der immunhistochemischen Befunde in den primären Tumoren von verschiedenen Pathologen vorgenommen, so dass auch hier Fehler auszuschliessen sind.

3.1.4 FGFR4 Arg388 ist ein prognostischer Faktor in Darmkrebs

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass der mutierte FGFR4 in Brustkarzinomen die Tumorprogression beeinflusst, aber keine Rolle in der Tumorentstehung spielt. Eine

weitere wichtige Frage ist daher, ob das neue Allel auch in anderen Tumortypen zu einer stärkeren Tumorprogression beitragen kann. Um diese Frage beantworten zu können, wurde genomische DNA aus Parafinschnitten von 123 primären kolorektalen Karzinomen isoliert und durch PCR-RFLP (siehe 2.2.12.2) der FGFR4 Genotyp bestimmt. Die Parafinschnitte wurden von der Universität Chieti, Italien, zur Verfügung gestellt. Bei 82 Proben konnte erfolgreich ein PCR Fragment vervielfältigt und durch den Restriktionsverdau analysiert werden.

		Darmkrebs			
FGFR4 Allele		<u>Gly/Gly</u>	<u>Gly/Arg</u>	<u>Arg/Arg</u>	<u>p-Value</u>
Age		61,9	64,5	58,6	
Sex	m	22 (59%)	20 (53%)	3 (43%)	n.s.
	f	15 (41%)	18 (47%)	4 (57%)	
pN	=0	21 (57%)	11 (29%)	1 (14%)	p=0.0016
	<5	6 (16%)	21 (55%)	2 (29%)	
	>5	10 (27%)	6 (16%)	4 (57%)	
pT	1	7 (19%)	0 (0%)	1 (14%)	p=0.03
	2	13 (35%)	10 (26%)	0 (0%)	
	3	12 (32%)	17 (45%)	3 (43%)	
	4	5 (14%)	11 (29%)	3 (43%)	
Grade	1	25 (68%)	30 (79%)	4 (57%)	n.s.
	2	12 (32%)	8 (21%)	3 (43%)	

Tab. 5 Zusammenhang zwischen den FGFR4 Genotypen und klinischen Parametern. pT, Tumorstadium gemäß AJCC/UICC; pN, Lymphknotenstatus (=0 negativ, <5 weniger als 5 Lymphknoten befallen, >5 mehr als Lymphknoten befallen); Grade, Differenzierungsgrad des Tumors (numerisch); p-Values wurden mit Hilfe des Chi-Square Tests berechnet. n.s. nicht signifikant

Tabelle 5 zeigt die Verteilung von klinisch, prognostischen Parametern in Abhängigkeit zu den FGFR4 Allelen, in den untersuchten kolorektalen Karzinomen. Ähnlich wie bei Brustkarzinomen ist der Status der Lymphknoten-Metastasen ein sehr wichtiger prognostischer Parameter bei Darmkrebs. Daneben gilt auch der TNM-Status (gemäß dem TNM Status System der AJCC/UICC) als aussagekräftiger Faktor. Neben anderen wurden diese Parameter an der Universität Chieti in den 82 Patienten bestimmt und konnten für eine

Analyse verwendet werden. Die Verteilung der beiden FGFR4 Allele in den Patienten im Verhältnis zu den vier Tumorstadien ist in Abbildung 10 graphisch abgebildet.

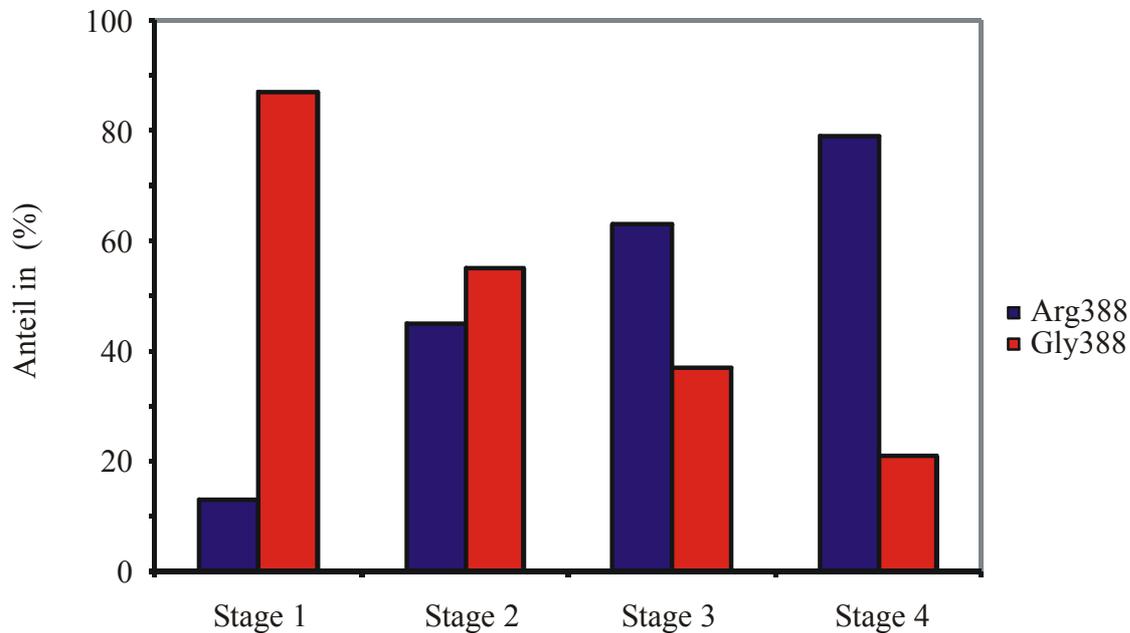
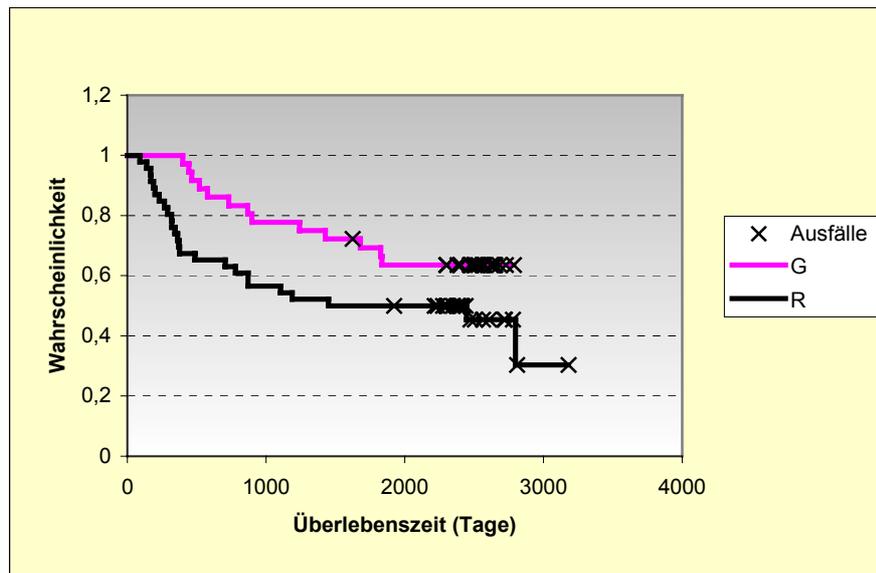


Abb. 10 FGFR4 Allel Verteilung in den vier unterschiedlichen Stadien von Darmkrebs. Der TNM-Status von 83 primären Tumoren wurde an der Universität Chieti gemäß den Richtlinien der ALCC/UICC bestimmt. Zur statistischen Analyse der gefundenen Allel-Verteilung wurde der Chi-Test verwendet. Tumore mit einem oder zwei FGFR4 Arg388 Allelen wurden zur Gruppe „Arg388“ zusammengefasst.

In Patienten mit Tumor-Stadium 1 besitzt nur einer von acht (12.5%) das Arg388 Allel. In Patienten mit Tumorstadium 4, welches die aggressivsten Tumore mit der schlechtesten klinischen Prognose bezeichnet, wurden dagegen in 19 Patienten 14 Träger (79%) des Arg388 Alleles identifiziert (Abb. 10). Die statistische Bedeutsamkeit dieser unterschiedlichen Verteilung besitzt ein Signifikanz-Niveau von $p=0.03$ (χ^2 -Test) (Tab. 5). Weiterhin zeigte sich, dass auch die An- oder Abwesenheit von Lymphknoten-Metastasen mit den beiden FGFR4 Allelen korreliert. Von 49 Patienten mit Lymphknoten-Metastasen trugen 33 (69%) das Arg388 Allel (Tab. 5). Auch diese Beobachtung ist statistisch signifikant, was durch das Signifikanz-Niveau von $p=0.0016$ dokumentiert wird.

Die Übereinstimmungen zwischen dem Auftreten der FGFR4 Allele in den Patienten und den beiden prognostischen Parametern legen die Vermutung nahe, dass Patienten mit einem FGFR4 Arg388 Allel eine deutlich reduzierte Überlebenszeit haben. Durch eine Kaplan-Meier Kurve und einen Log-Rank Test wurde diese Hypothese überprüft.



p=0.1

Abb 11. Log-Rank Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Kolonkarzinomen in Abhängigkeit zur FGFR4 Allel Verteilung. In der Gruppe der 46 Patienten mit FGFR4 Arg388 gab es 24 Ereignisse, während in der Gruppe der 35 Patienten mit einem FGFR4 Gly388 Allel 13 Ereignisse vorgekommen sind. G: FGFR4 Gly Allel, n=35; R: FGFR4 Arg Allel, n=46

Das Ergebnis ist in Abbildung 11 wiedergegeben. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem FGFR4 Arg388 eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit haben (p=0.1). Der Unterschied zwischen den Patienten mit einem FGFR4 Gly388 Allel und einem oder zwei FGFR4 Arg388 Allelen ist in den ersten 18 Monaten der Beobachtungszeit besonders ausgeprägt. Während in der Gruppe der Patienten mit den FGFR4 Arg388 Allelen bereits 12 Patienten verstorben waren, gab es in der Gruppe mit dem FGFR4 Gly388 Allel bis zu diesem Zeitpunkt noch keinen Todesfall. Allerdings erreicht die statistische Analyse der 82 Patienten nicht die Signifikanz-Grenze von 0.05. Um eine statistisch signifikante Aussage machen zu können, muss daher die Anzahl der untersuchten Patienten erhöht werden. Diese Ergebnisse belegen aber, dass FGFR4 Arg388 auch in anderen Tumortypen zur Tumorprogression und Metastasenbildung beitragen kann.

3.2 Die Funktion der FGFR4 Arg388 Mutation

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass FGFR4 mit einem Arginin an Position 388 in der Transmembrandomäne (TMD) einen beschleunigenden Einfluss auf die Tumorprogression in Brust- und Darmkrebs hat. Mit den folgenden Experimenten wurden die

molekularen Konsequenzen aufgeklärt, die sich aus dem stark geladenen Arginin innerhalb der FGFR4 TMD ergeben. Wie Abbildung 4 zeigt, sind Mutationen, die zu stark geladenen Aminosäuren in der TMD führen, schon in anderen RTKs gefunden worden. In der RTK Neu/ErbB2, einem Mitglied der EGF Rezeptor Familie, führt der Austausch von Valin zu Glutamat zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase-Aktivität. (Bargman *et al.*, 1986). Weiterhin zeigen auch die humanen EGFR und HER2 mit den gleichen Aminosäuren Veränderungen eine erhöhte Kinase-Aktivität (Segatto *et al.*, 1988; Miloso *et al.*, 1995).

3.2.1 Tyrosinkinase Aktivität von FGFR4 Gly388 und FGFR4 Arg388

Um festzustellen, ob auch die Glycin → Arginin Substitution in FGFR4 zu einer erhöhten Tyrosinkinase Aktivität führt, wurde die TMD des mutierten Rezeptors mit dem Arg388 gegen die TMD des Rezeptorwildtyp mit Gly388 ausgetauscht und in Zellen exprimiert. Hierzu wurden Ratten L6 Myoblasten, die keine endogenen FGF Rezeptoren bilden, durch retroviralen Gentransfer mit den cDNAs von FGFR4 Arg388 und FGFR4 Gly388 infiziert. Die generierten Zellen wurden vor Verwendung für die weiteren Experimente auf ihre Rezeptor-Expression untersucht (Abb.13).

Zur Ermittlung der Tyrosinkinase Aktivität sollten dann jeweils L6 FGFR4 Arg388 und Gly388 Zellen mit dem Liganden FGF-1 stimuliert und die Stärke der Tyrosin-Phosphorylierung durch eine Immundetektion (Western-Blot) bestimmt werden.

Gleiche Mengen Protein aus den Zelllysaten o. g. Zelllinien wurden vor und nach Stimulation mit α FGFR4 Antikörpern präzipitiert und mit Hilfe der Immundetektion von immobilisierten Proteinen analysiert. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, sind beide Rezeptoren durch FGF-1 stimulierbar. Auch in der Stärke der Tyrosin-Phosphorylierung konnten keine bedeutsamen Veränderungen zwischen dem mutierten und dem wildtyp Rezeptor festgestellt werden.

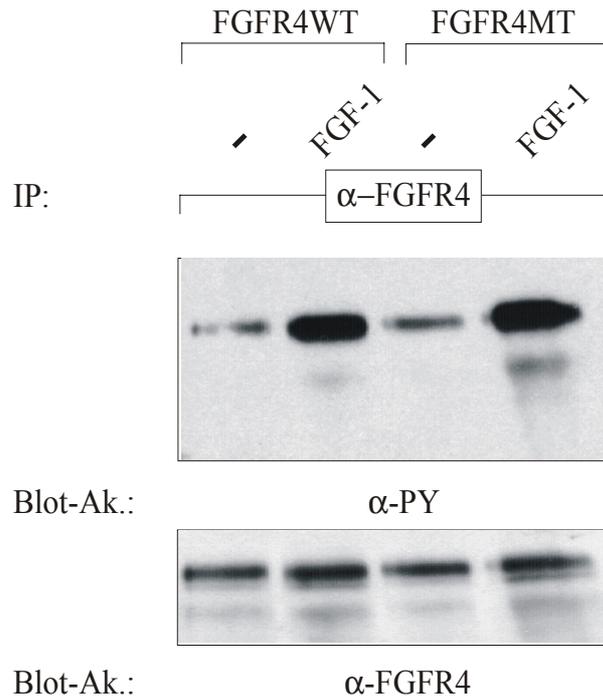


Abb. 13 FGFR4 Phosphorylierung in L6 Myoblasten. L6 Myoblasten wurden durch retroviralen Gentransfer mit der FGFR4 Gly388 (WT) und der FGFR4 Arg388 (MT) cDNA infiziert. Die Zellen wurden 24 h in serum-freien Medium gehungert, mit 10 ng / ml FGF-1 10 min lang stimuliert, lysiert und die Zelllysate mit α FGFR4 Antikörpern präzipitiert. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine durch 7.5%ige SDS-Page und Transfer auf Nitrocellulose, wurden phosphorylierte durch α PY Antikörper immundetektiert (oben). Nach Entfernen der PY Antikörper wurde die Nitrozellulose mit polyklonalem α FGFR4 analysiert (unten)

Weiterhin gab es keine detektierbaren Unterschiede in der basalen Aktivität zwischen dem FGFR4 Arg388 und dem FGFR4 Gly388. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß es keine signifikante Veränderung in der Stimulierbarkeit durch Liganden und in der basalen Tyrosinkinaseaktivität, wie sie durch die veröffentlichten Daten für andere RTKs zu erwarten gewesen wären, zwischen den beiden FGFR4 Rezeptor Varianten gibt.

3.2.2 Die ERK2 Aktivität nach Stimulation von FGFR4 Arg388 oder FGFR4 Gly388

In dem vorhergehenden Experiment konnten keine signifikanten Unterschiede in der Tyrosin-Phosphorylierung der beiden FGFR4 Varianten festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Veröffentlichungen in Bezug auf Punktmutationen in der TMD von RTKs. Neben den unter 3.2.1 bereits genannten konnten Webster & Donoghue (1996) im besonderen für die Aminosäure-Substitution Glycin → Arginin in der TMD des FGFR3 eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung zeigen. Allerdings war diese deutlich schwächer als bei Neu/c-ErbB2 und EGFR. Um die bisher erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf FGFR4 Gly388Arg Substitution noch einmal zu bestätigen, wurde die Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 nach Stimulation mit FGF-1 gemessen. Diese Aktivierung kann mit Hilfe eines in vitro Kinaseassays identifiziert werden, bei dem nach Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern die katalytische Aktivität von ERK2 an Hand der Phosphorylierung des exogenen Substrates MBP (myelin basic protein) bestimmt wird. Die bei der Kinasereaktion auf MBP übertragene radioaktive γ -[PO₄³⁻]-Gruppe von γ^{32} -ATP wurde nach SDS-PAGE durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

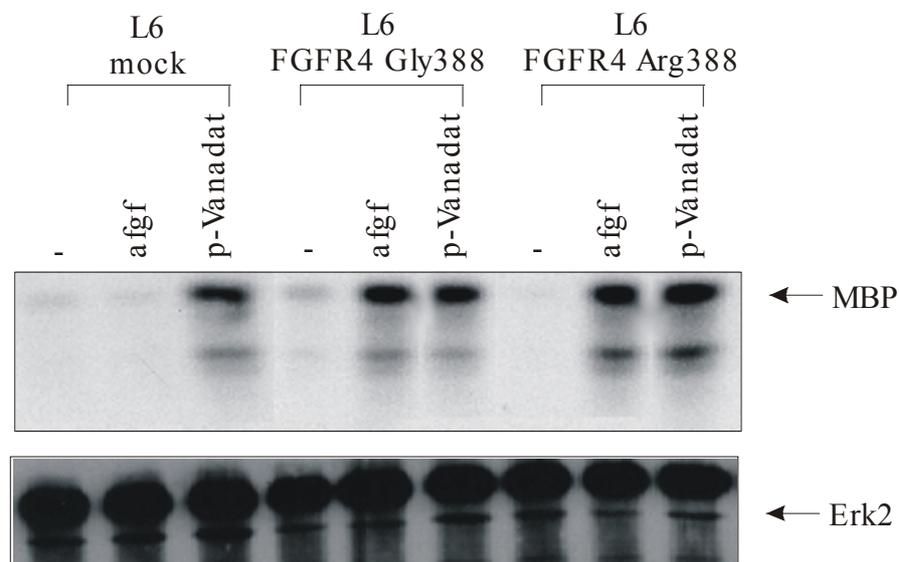


Abb. 14 Die Glycin → Arginin Substitution in der TMD des FGFR4 hat keinen Einfluss auf die ERK2 Aktivität nach FGF-1 Stimulation. L6 Myoblasten wurden 24h mit Serum-freien Medium gehungert und 10 min mit FGF-1 oder Per-Vanadat stimuliert. Nach der Zellyse wurde endogenes ERK2 mit polyklonalem ERK2-Antikörper immunpräzipitiert und ein in vitro Assay mit MBP als Substrat durchgeführt. Nach 15%iger SDS-PAGE wurde phosphoryliertes MBP autoradiographisch sichtbar gemacht (oben) und parallel dazu ERK2 mit polyklonalem ERK2 immundetektiert (unten).

Wie Abb. 14 zeigt, führt die Stimulierung von L6 Myoblasten mit FGF-1, die entweder die mutierte oder die wildtyp FGFR4 Variante exprimieren, zu vergleichbarer ERK2 Aktivierung. In den parentalen L6 Myoblasten, die mit dem leeren Retrovirus infiziert worden waren, führt die FGF-2 Stimulation dagegen nicht zu einer ERK2 Aktivierung.

Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen aus dem Experiment 3.2.1, in dem keine detektierbaren Unterschiede in der Aktivierung beider FGFR4 Varianten gefunden wurden. Weiterhin konnte bewiesen werden, daß die hier verwendeten L6 Myoblasten tatsächlich keine endogenen FGF Rezeptoren exprimieren. Diese Beobachtung war für spätere Experimente von besonderer Bedeutung.

3.2.3 Effekt der Glycin→Arginin Mutation in der FGFR4 TMD auf die Rezeptorinternalisierung

Zelloberflächenrezeptoren einschließlich der RTKn werden von der Zelloberfläche internalisiert, wenn sie durch Liganden stimuliert werden (Sorkin *et al.*, 1992).

Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung über die molekularen Auswirkungen der Glycin → Arginin Substitution in der FGFR3 TMD hat ergeben, daß in diesem Fall diese Mutation wahrscheinlich nicht, wie früher angenommen, zu einer verstärkten Tyrosinkinase Aktivität führt, sondern zu einer erhöhten Lokalisation des Rezeptors an der Zelloberfläche (Monsonigo-Ornan *et al.*, 2000). Durch „Pulse-Chase“ Experimente und dem Markieren von Zelloberflächenproteinen konnten die Autoren dieser Studie weiterhin demonstrieren, daß Arginin in der FGFR3 TMD zu einer verzögerten Rezeptor Internalisierung führt.

Aus diesem Grunde wurde im folgenden Experiment die Internalisierungsrate von biotynilierten Rezeptoren nach Stimulation mit Liganden gemessen.

Dazu wurden die Zelloberflächenproteine durch Biotin markiert und dann die Zellen unterschiedlich lang mit FGF-1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, FGFR4 mit polyklonalen Antikörpern aus den Lysaten präzipitiert und die Menge an markierten FGFR4 durch Immundetektion von immobilisierten Proteinen bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß die Internalisierung beider FGFR4 Varianten vergleichbar schnell verläuft. Nach drei Stunden Stimulation mit FGF-1 konnten nur noch wenige markierte Rezeptoren nachgewiesen werden (Abb. 15).

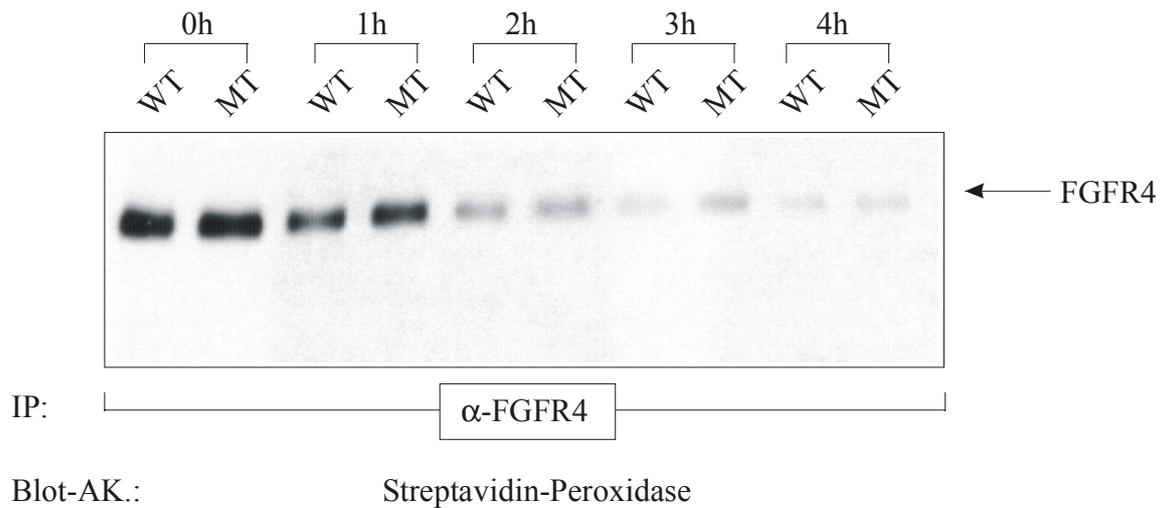


Abb. 15 Oberflächen-Markierung des WT und MT FGFR4 mit Biotin. L6 Myoblasten, die FGFR4 Gly388 (WT) oder FGFR4 Arg388 (MT) exprimieren, wurden 45 min mit Membran-impermeablen Biotin markiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und anschließend mit α -FGFR4 Antikörper immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch 7.5%ige SDS-Page aufgetrennt, auf Nirozellulose transferiert und mit Streptavidin gekoppelter Peroxidase detektiert.

Das bedeutet, dass in dieser Zeit die Mehrzahl aller zu Beginn markierten FGFR4 Rezeptoren in die Zelle internalisiert und dann proteolytisch abgebaut worden sind. Der proteolytische Abbau kann angenommen werden, da sonst weiterhin biotynilierte Rezeptoren im Zytosol nachgewiesen werden könnten.

Die Ergebnisse der bisher gezeigten Experimente belegen also, daß die Ursache für die verstärkte Tumorprogression bei Patienten mit einem FGFR4 Arg388 Allel nicht in einer unterschiedlichen Signalaktivität beider FGFR4 Varianten zu suchen ist. Andererseits ist es möglich, daß die Unterschiede nur sehr gering und deshalb mit den angewendeten Methoden nicht zu detektieren sind.

3.2.4 FGFR4 beeinflusst die Motilität der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231

Ein außerordentlich wichtiger Aspekt bei der Tumorprogression ist die Bildung von Tochtergeschwulsten (Metastasen) und die Infiltration des den Tumor umgebenden Gewebes (Invasion). Diese beiden Vorgänge sind die häufigsten Ursachen für ein unheilbares Tumorleiden, das zum Tod des Patienten führt. Ein zentraler Punkt während der Metastasierung eines Tumors ist die Lösung der Tumorzellen aus dem Zellverband. Dafür

müssen die Zellen einerseits die Bindungen zu den Nachbarn unterbrechen und andererseits die Fähigkeit besitzen, sich fortbewegen zu können. Deshalb sollte in dem folgenden Experiment untersucht werden, welchen Einfluss die Expression von FGFR4 Gly388 und FGFR4 Arg388 auf die Migration von Brustkrebszellen haben kann.

Hierzu wurden die Brustkrebszellen MDA-MB-231, die nur sehr wenig endogene FGF-Rezeptoren exprimieren, durch retroviralen Gentransfer mit den cDNAs von FGFR4 Arg388 und FGFR4 Gly388 infiziert.

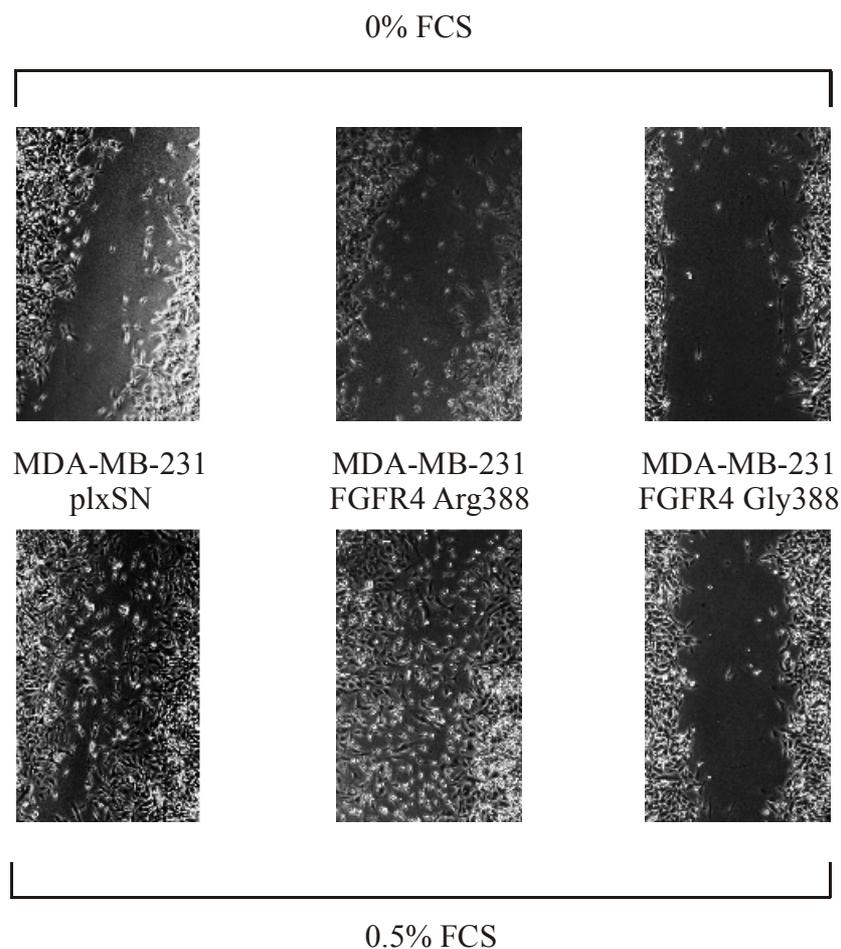


Abb. 16 Motilität von MDA-MB-231 Zellen, die beide FGFR4 Varianten exprimieren. In eine Schicht konfluenter Zellen auf 6 cm Zellkulturschalen wurde mit einer Pipettenspitze eine Lücke geritzt und dann die abgelösten Zellen gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 12h mit 0% / 0.5% FCS inkubiert und die migrierten Zellen unter einem Mikroskop photographiert. Die Experimente wurden mit je zwei verschiedenen Zellklonen durchgeführt und 3x wiederholt.

Die Zellen wurden mit G418 selektioniert und durch Verdünnung monoklonale Zelllinien hergestellt, deren FGFR4 Expression durch Western-Blot Analyse getestet wurde (Daten nicht gezeigt). Vier Klone, die vergleichbare FGFR4 Expressionsstärken zeigten, wurden für die

weiteren Experimente verwendet. Die Migrationsfähigkeit der genetisch veränderten Zellen wurde mit Hilfe eines sogenannten „Wound-Healing“-Assays bestimmt. In eine Schicht dicht gewachsener Zellen wurde dazu mit einer Pipettenspitze eine Lücke geritzt (Wunde) und anschließend unter einem Mikroskop die Migration der Zellen in die Wunde beobachtet. Auf diese Weise kann sowohl die Migrationsfähigkeit aller Zellen gemessen werden, als auch die Beweglichkeit einzelner Zellen. Dies ist besonders gut mit einem Mikroskop möglich, das automatisch zu definierten Zeitpunkten Bilder mit einer Kamera aufnehmen kann (time-lapse videomicroscopy). Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass MDA-MB-231 FGFR4 Arg388 Zellen und MDA-MB-231 Kontrollzellen (plxSN) ein ähnliches Wanderungsverhalten aufweisen (Abb. 16). Nach 16h war die „Wunde“ fast vollständig wieder mit Zellen bedeckt, die keine Zell-Zell Kontakte mehr aufwiesen. Dies deutet darufhin, dass die Zellen unabhängig voneinander in die Lücke gewandert waren. Im Gegensatz dazu wurde bei MDA-MB-231 Zellen, die den FGFR4 Gly388 exprimieren, nur eine geringe Verkleinerung der „Wunde“ beobachtet. Zusätzlich hatten die Zellen, die sich am Wundrand befanden, noch enge Kontakte zu ihren Nachbarn (Abb. 16). Daraus kann gefolgert werden, dass die geringe Wundschliessung auf die Proliferation der MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 Zellen und nicht auf eine Migration zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass FGFR4 eine inhibierende Funktion auf die Zellmigration von MDA-MB-231 hat, die durch die Glycin→Arginin Substitution in der TMD aufgehoben wird.

3.2.5 Die Expression von FGFR4 Gly388 und FGFR4 Arg388 beeinflusst die Expression anderer Gene in MDA-MB-231 Zellen

Das vorhergehende Experiment hat gezeigt, dass eine Ursache für die Assoziation zwischen den FGFR4 Allelen und der Tumorprogression die unterschiedliche Wirkung auf die Zellmigration sein kann. In einem weiteren Experiment sollte daher untersucht werden, ob Gene, die an den Prozessen Migration und Invasion beteiligt sind, durch eine ektopische FGFR4 Expression reguliert werden können. Dazu wurde mRNA aus den Zelllinien MDA-MB-231 Zellen plxSN, MDA-MB-231 FGFR4 Arg388 und MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 isoliert, die auch für die Migrationsexperimente verwendet worden waren, und mit Hilfe der cDNA Array Technik Gen Expressions-Analysen durchgeführt. Grundlage der Array-Technologie ist eine Matrix, auf der Hunderte von Gensonden, d.h. einzelsträngige DNA-Moleküle bekannter Sequenz, in hoher Dichte angeordnet sind. Durch spezifische Hybridisierung dieser

Gensonden mit radioaktiv markierter cDNA ermöglicht so die Array-Technologie die simultane Analyse von einer großen Anzahl von Genen, im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden, die nur einen sehr geringen Probendurchsatz haben.

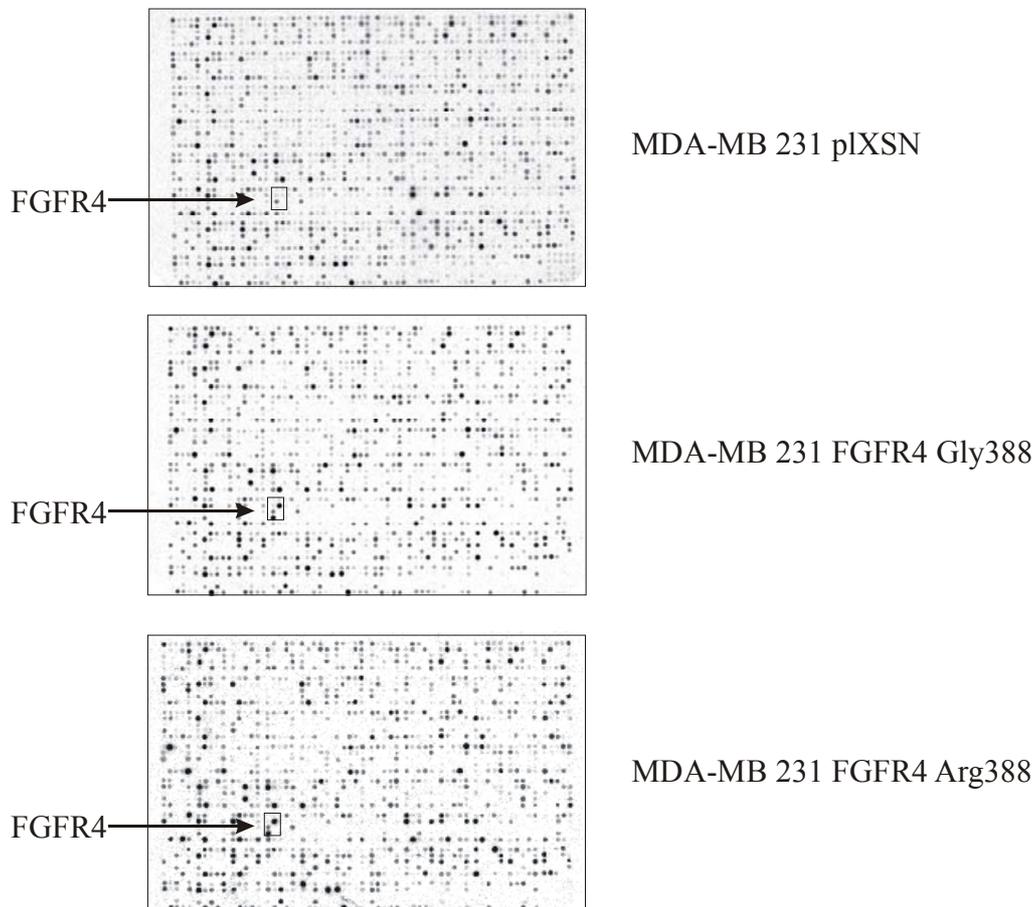


Abb. 17 cDNA Microarray Analyse von Veränderungen der Gen-Expression in Zellen die die verschiedenen FGFR4 Varianten exprimieren. cDNA Arrays wurden mit radioaktiv markierten cDNA Proben hybridisiert, die aus den Zelllinien MDA-MB-231 plxSN, MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 und MDA-MB-231 FGFR4 Arg388 isoliert worden waren. Die Felder, in denen FGFR4 cDNA aufgetragen ist, sind durch Kästchen und Pfeile gekennzeichnet.

Abbildung 17 zeigt drei repräsentative Hybridisierungsexperimente. Nach der Hybridisierung mit den radioaktiv markierten cDNA-Proben wurden die Arrays 16h auf Phosphorimager Platten exponiert und diese dann in einem FujiBas 2500 System gescannt. Die so gewonnenen Hybridisierungsdaten wurden im weiteren Verlauf mit der Software Array Vision 5.1 ausgewertet.

3. Ergebnisse

Zur Auswertung wurden in einem ersten Schritt die aus der Hybridisierung erhaltenen Daten normalisiert. Dazu wurden die Zahlenwerte der einzelnen Hybridisierungssignale eines Array durch die Summe aller Signale dividiert. Das Normalisieren der Arrays ist notwendig, um die verschiedenen experimentellen Ergebnisse vergleichbar und von methodischen Fehlern unabhängig zu machen. Zum Beispiel werden so Schwankungen in der Radioaktivität des γ - ^{33}P -ATP ausgeglichen. Dabei zeigte sich, dass das Verhältnis der Summe der einzelnen Signale nicht kleiner 0.3 oder größer 3 sein durfte, damit die Ergebnisse der Hybridisierungen noch verglichen werden konnten.

Nach der Normalisierung der einzelnen Arrays konnten dann durch Berechnung der Verhältnisse für jedes einzelne Gen gemäß der Formel:

$$\text{Ratio}(\text{GenX}) = \text{Signal GenX Array1} / \text{Signal GenX Array2}$$

die relativen Unterschiede in der Expression für die einzelnen Gene bestimmt werden.

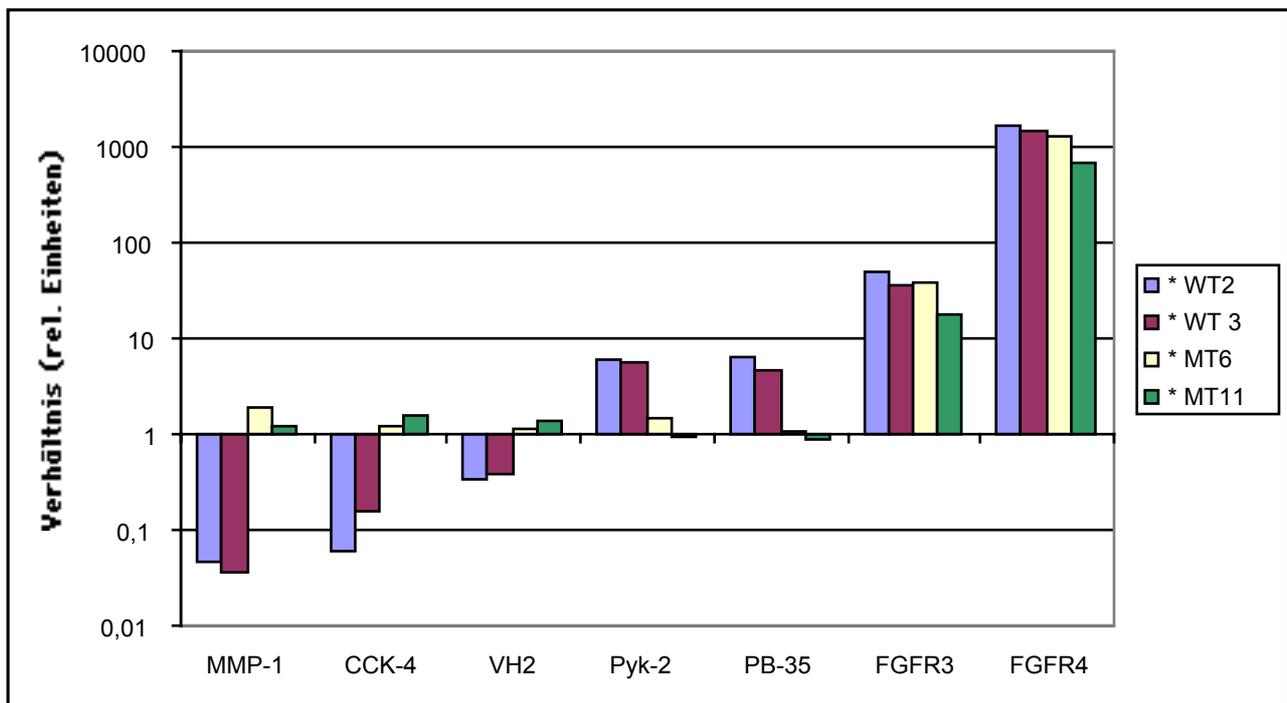


Abb. 18 Expression von sieben verschiedenen Genen in MDA-MB-231 Zellen mit FGFR4 WT/MT und Kontrollzellen. Die relativen Expressionsstärken wurden mit einem Phosphoimagersystem bestimmt und mit Hilfe der Gesamt-Intensität pro Array normalisiert (Array Vision 5.1). Dargestellt sind die Verhältnisse in logarithmischer Form, zwischen der jeweiligen Genexpression in den Kontrollzellen und den FGFR4 WT und MT Zellen (z.B. (Gen-Expression WT/ Gen- Expression Kontrolle). * = MDA-MB-231 X / MDA-MB-231 plxSN

Hierbei zeigte sich, dass Gene, deren mögliche Funktion in der Migration und Invasion von Tumorzellen durch Veröffentlichungen in der Vergangenheit teilweise bereits belegt worden ist, in den MDA-MB-231 Zellen abhängig von der FGFR4 Expression unterschiedliche Expressionsstärken besitzen (Abb. 18). Es wurden nur Gene als unterschiedlich exprimiert gewertet, die in je zwei der Klone, die den wildtyp FGFR4 oder den mutierten FGFR4 exprimieren, vergleichbare Signalstärken zeigten.

Zum Beispiel wird die Matrix-Metalloprotease-1 (MMP-1) in ähnlichen Mengen sowohl in Zellen, die mit dem mutierten FGFR4 infiziert worden waren als auch in den Kontrollzellen exprimiert. In Zellen dagegen, die den FGFR4 Wildtyp exprimieren, zeigt sich eine deutliche, 30-fache negative Regulation von MMP-1. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da MMP-1 zu einer Klasse von Proteinen gehört, die Kollagen Fibrillen abbauen, die einen großen Anteil an der extrazellulären Matrix und den Basalmembranen ausmachen. MMP-1 kann also eine wichtige Funktion während der Invasion von Tumorzellen einnehmen. Ein weiteres Gen, das in MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 Zellen in negativer Weise reguliert wird, ist die RTK CCK-4. Die genaue Funktion dieser Kinase ist zwar noch nicht bekannt, es wird aber auf Grund ihrer stark erhöhten Expression in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu normalem Kolon-Gewebe eine Verbindung zur Tumorprogression vermutet (Ciossek *et al.*, 1995). Neben diesen Beispielen von negativer Regulation der Genexpression wurden aber auch Gene gefunden, die in den MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 stärker als in den Kontrollzellen oder in den MDA-MB-231 FGFR4 Arg388 Zellen exprimiert werden. Hierbei handelt es sich zum einen um die Tyrosinkinase Pyk-2 und zum anderen um die Tyrosinphosphatase PB-35, die bisher noch nicht charakterisiert und deren Funktion unbekannt ist. Weiterhin zeigt die Abbildung 18 deutlich, dass MDA-MB-231 Zellen endogen keinen FGFR4 besitzen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Expression von FGFR4 in der wildtyp und in der polymorphen Form in der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231 zu einer unterschiedlichen Regulation von Genen führt, die eine mögliche Rolle in der Metastasierung und Tumorprogression spielen. Weiterhin weisen die MDA-MB-231 FGFR4 Arg388 Zellen und die Kontrollzellen ein vergleichbares Expressionsmuster in allen getesteten Zellklonen auf, das sich in einigen Fällen deutlich von dem der MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 Zellen unterscheidet. Dieses legt die Vermutung nahe, dass der Einfluss des FGFR4 auf die Gen-Expression durch die Sequenzvariante in der TMD aufgehoben wird. Der genaue Mechanismus dafür ist aber noch unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

3.2.6 FGFR-4 inhibiert das Wachstum von MDA-MB-231 Zellen *in vivo*

Neben verschiedenen *in vitro* Testen, ist das Wachstum in Immun-supprimierten Mäusen des Stammes BalbC Nu/Nu (Nacktmäuse) ein wichtiger Indikator für Krebszellen. Um die verschiedenen MDA-MB-231 Zelllinien im Hinblick auf ihr Tumor-bildendes Potential weiter zu charakterisieren, wurden diese daher subkutan in Nacktmäuse injeziert. Dazu wurden je Tier zwischen 1 und 4×10^6 Zellen in 140 μ l PBS resuspendiert und mit 60 μ l Matrigel (13 μ g/ μ l) versetzt. Zur Injektion wurden die Mäuse kurz mit klinischem Ether betäubt. Nach der Applikation der jeweiligen Zellen wurden die Mäuse alle drei Tage kontrolliert und das Tumorwachstum gemessen.

In Tabelle 6 ist zu sehen, dass die Kontrollzellen MDA-MB-231 plx, die nur mit den leeren Viruspartikeln ohne cDNA infiziert worden waren, in 12 von 13 (92%) Tieren einen Tumor gebildet haben. Alle diese Tumore haben innerhalb von 21 Tagen das Volumen von 1cm^3 erreicht, so dass die Tiere getötet werden mussten. Zellen dagegen, die den FGFR4 wildtyp exprimieren (MDA-MB-231 WT2 und WT3) zeigten in 13 getesteten Tieren nur in einem Tier (7%) schwaches Wachstum.

Cells	Genotyp	Anzahl von Tumoren/Injektionen
MDA-MB-231 plx	keine FGFR4 Expression	12/13
MDA-MB-231 WT2	Gly/Gly	1/5
MDA-MB-231 WT3	Gly/Gly	0/8
MDA-MB-231 MT6	Arg/Arg	4/5 ^a
MDA-MB-231 MT11	Arg/Arg	5/8 ^a

Tab 6. Wachstum von subkutanen Tumoren in Nacktmäusen (*in vivo*). In Mäuse des Stammes BalbC Nu/Nu (Nacktmäuse) werden subkutan in die Nackenregion je Tier 4×10^6 Zellen der angegebenen Zelllinien injeziert. Tumorwachstum wurde nach 6 Wochen Beobachtung als negativ bezeichnet. a; die beobachteten Tumore besitzen ein deutlich reduziertes Volumen im Vergleich zu Tumoren, die durch die Kontrollzellen gebildet werden.

Der FGFR4 entfaltet hier also eine deutlich Tumor-supprimierende Aktivität, die durch die Einführung von Arginin an die Position 388 in der TMD allerdings teilweise wieder

neutralisiert wird, wie das Tumorwachstum der MDA-MB-231 FGFR4 Arg388 Zellen in Nacktmäusen zeigt. In 9 von 13 Tieren (69%) wurden Tumore nach der Injektion der MDA-MB-231 FGFR4 Arg388 Zellen gefunden. Im Unterschied zu den Kontrollzellen war die Tumorbildung aber deutlich verlangsamt und das Volumen nach 21 Tagen geringer.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der FGFR4 eine inhibierende Wirkung auf die Tumorbildung durch MDA-MB-231 Zellen in Nacktmäusen hat, die durch die neue Sequenzvariante in der Transmembrandomäne verringert wird.

3.3 Die extrazelluläre Domäne des FGFR4 vermittelt heterophile Zelladhäsion

Um die Organisation und Integrität eines Organismus zu erhalten, müssen Zellen die Fähigkeit besitzen, sowohl Zell-Zell Kontakte als auch Bindungen zu extrazellulären Matrixproteinen wie z.B. Kollagen oder Fibronectin zu knüpfen. Diese wichtigen Wechselwirkungen mit der unmittelbaren Umgebung der Zelle werden durch Zelladhäsionsmoleküle, die keine eigene enzymatische Aktivität besitzen, wie z.B. Integrine, Cadherine etc. vermittelt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch RTK und Phosphatasen selbst Zelladhäsion vermitteln können oder aber in die Signalkaskaden, die durch die Adhäsion von Zellen aktiviert werden, eingebunden sind. Beispiele dafür sind die EGF-, PDGF- und VEGF-Rezeptoren, die durch Integrine, die nach Bindung an ihre jeweiligen Liganden aktiviert sind, stimuliert werden (Moro *et al.*, 1998; Soldi *et al.*, 1999; Schneller *et al.*, 1997). Dabei handelt es sich um eine Wechselwirkung zwischen einer RTK und einem Integrin, die auf der Oberfläche der gleichen Zelle erfolgt (Cis-Aktivierung). Neben diesen Beispielen wurde schon 1994 durch Williams *et al.*, gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne des FGFR1 mit den Proteinen N-CAM, N-Cadherin und L1 interagieren kann und dadurch die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors stimuliert wird. Bei diesem Mechanismus handelt es sich um eine Trans-Aktivierung zwischen Molekülen auf der Oberfläche von verschiedenen Zellen, die das Richtungswachstum von Axonen *in vitro* und *in vivo* steuern (Saffel *et al.*, 1997).

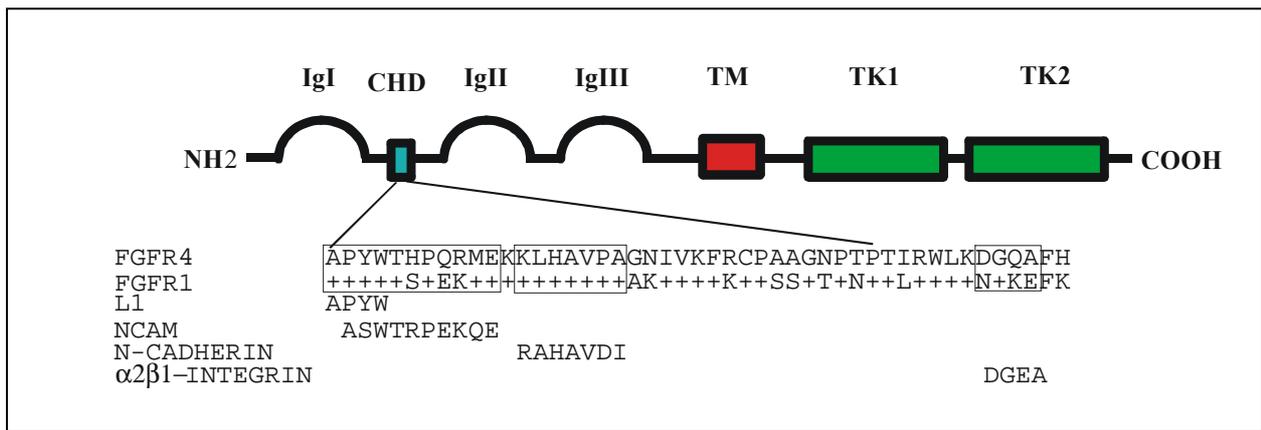


Abb. 19 Ein Schema der FGF Rezeptoren 1 und 4. Ein Bereich von 20 Aminosäuren zeigt Sequenz-Homologien zu den Zelladhäsions Proteinen L1, N-CAM und N-Cadherin. Zusätzlich findet sich im FGFR4 22 Aminosäuren später noch ein weiteres Motiv, das als Bindungsstelle für den Integrin-Rezeptor $\alpha 2\beta 1$ dienen kann. Ig=Immunglobulin-Domäne; NH2=Amino-Terminus; COOH=Carboxyl-Terminus; CHD=“Cell-Adhesion Homology“ Domäne; TMD=Transmembrandomäne; TK= Tyrosin-kinase Domäne

Als charakteristische Motive enthält die extrazelluläre Domäne des FGFR1 einen Bereich von 20 Aminosäuren, der sehr starke Übereinstimmungen zu Sequenzen in den oben genannten Zelladhäsionsmolekülen aufweist (Abb. 19). Dieser Sequenz-Abschnitt wird als die CAM Homologie Domäne (CHD) bezeichnet (Doherty und Walsh, 1997).

Ein Beispiel in der CHD ist das HAV-Motiv, das für die homophile Bindung der Cadherine verantwortlich ist und in vielen Mitgliedern der Cadherin Protein-Familie vorkommt. Ein weiteres Beispiel ist die Aminosäuresequenz APYW, die sowohl im L1-Protein, als auch im FGFR1 vertreten ist. Interessanterweise ist in den FGF-Rezeptoren 1, 2 und 4 die CHD stark konserviert. Zusätzlich besitzt der FGFR4 noch eine zusätzliche mögliche Bindungsstelle, die ähnlich zu dem Integrin $\alpha 2\beta 1$ Bindungs-Motiv DGEA in $\alpha 1$ -Kollagen ist (Staatz *et al.*, 1991) und in den anderen FGF Rezeptoren nicht vorkommt (Abb. 19).

Zelladhäsion spielt aber nicht nur im gesunden Organismus eine Rolle, sondern ist häufig auch an der Entwicklung von Krankheiten beteiligt. Zum Beispiel müssen Krebszellen während der Metastasierung in der frühen invasiven Phase Kontakte zu den umgebenden Zellen unterbrechen und neue zu den Basalmembranen bilden. Um dagegen im weiteren Verlauf des Metastasierungsprozesses im Blutkreislauf überleben zu können, müssen diese Zellen an Plättchen, Leukozyten und Fibrin binden. In einer späteren Phase ist es notwendig, dass sich die so disseminierten Tumorzellen an das Endothel der Blutgefäße in den Zielorganen haften können. Alle diese Adhäsionsprozesse lösen Signalkaskaden aus, in die

Tyrosinkinasen eingebunden sind, die das weitere Verhalten der Zellen steuern. Aus diesem Grund sollte die Frage beantwortet werden, ob die extrazelluläre Domäne des FGFR4 als Zelladhäsionsmolekül dienen kann, das an der Aktivierung von intrazellulären Signalwegen beteiligt ist. Im Hinblick auf die häufig erhöhte FGFR4 Expression in den Tumor-Zelllinien und die Assoziation des neuen FGFR4 Arg388 Allel mit einer stärkeren Tumorprogression sollte so eine mögliche Funktion des FGFR4 als morphoregulatorischer Faktor in der Tumorentwicklung untersucht werden.

3.3.1 Zellen binden an ein GST-FGFR4 (extrazelluläre Domäne) Fusionsprotein

Um die mögliche Funktion der extrazellulären Domäne des FGFR4 als Zelladhäsion vermittelndes Molekül untersuchen zu können, wurde ein GST-Fusionsprotein der extrazellulären Domäne des FGFR4 (Δ FGFR4-GST) hergestellt. Dazu wurde aus der FGFR4 cDNA mit spezifischen Oligonukleotiden der erforderliche Bereich mit Hilfe der PCR vervielfältigt und in einen GST-Fusionsvektor kloniert. Hierbei handelt es sich um einen durch C. Cant (diese Arbeitsgruppe) modifizierten pcDNA3 Vektor, in dessen MCS-Bereich (Multiple Cloning Site) die GST-codierende cDNA eingesetzt wurde. Da dieser Vektor einen CMV-Promoter besitzt, ist es so möglich, GST-Fusionsproteine anders als sonst üblich in eukaryotischen Zellen zu exprimieren. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass GST-Fusionsproteine mit oft wichtigen post-translationellen Modifikationen, wie z.B. Glykosilierungen gebildet werden können. Weil unter anderem Glykosilierungen für die Funktion von extrazellulären Proteinen von besonderer Bedeutung sein können, erschien diese Vorgehensweise besonders geeignet.

Im nächsten Schritt wurden 293T Zellen mit dem Δ FGFR4-GST Expressionsplasmid transfiziert und drei Wochen mit dem Antibiotikum G418 selektioniert. Dann wurde das Medium durch G418 resistente Zellen fünf Tage lang konditioniert. Da Δ FGFR4-GST noch das Signalpeptid aber keine Transmembrandomäne mehr besitzt, wird das Fusionsprotein von den Zellen an das Medium abgegeben und kann aus diesem gereinigt werden. Das auf diese Weise erhaltene GST-Fusionsprotein wurde für die weiteren Zelladhäsionsexperimente eingesetzt.

3. Ergebnisse

Dazu wurden 6 cm Zellkulturschalen mit 500 μ l einer Nitrozellulose/Methanol Lösung (0.8 ml/cm²) 5 min lang inkubiert, die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und 5 min bei RT getrocknet. Danach wurde in die Mitte der Platte 5 μ l des in PBS gelösten Δ FGFR4-GST (50 μ g/ml) pipettiert und bei RT 3h inkubiert.

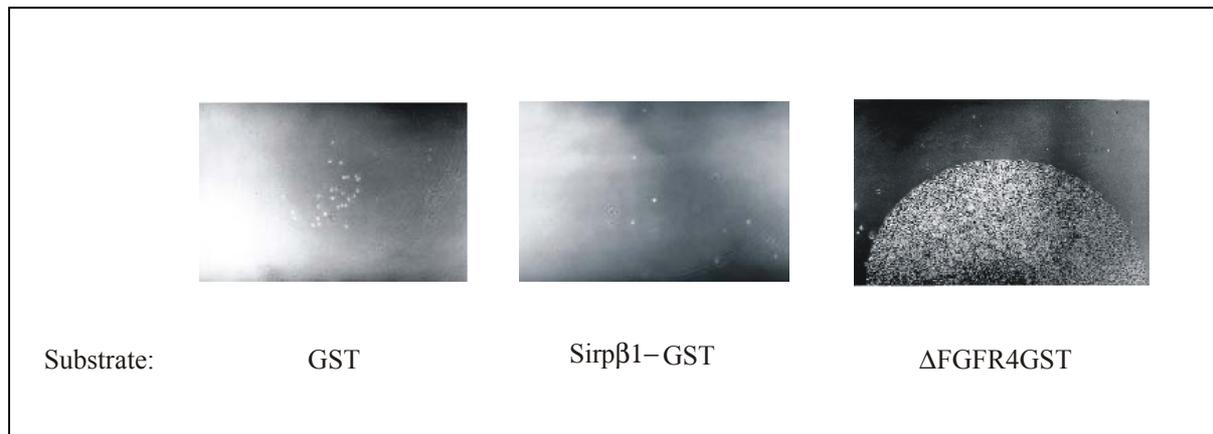


Abb. 20 L6 Zellen adherieren an Δ FGFR4-GST aber nicht an Sirp β 1-GST oder GST. Zellkulturschalen wurden mit den gleichen Mengen der jeweiligen Substrate beschichtet. 500.000 L6 wurden ausgesät und 30 min in Medium (+10%FCS) bei 37°C inkubiert. Nicht adherente Zellen wurden gewaschen.

Zur Kontrolle wurde ein Sirp β 1-GST Fusionsprotein verwendet. Dieses Transmembran-Protein besitzt ähnlich wie der FGFR4 drei Immunglobulin-Domänen, kann aber keine Zell-adhäsion vermitteln (C. Cant; nicht-publizierte Daten). Beide Proteine wurden auf die gleiche Weise aus Medium-Überständen gereinigt. Zur Blockierung der Nitrozellulose wurden die Platten 2h mit einer BSA/PBS Lösung (5mg/ml) inkubiert. L6 Myoblasten, die endogen keine FGFR Rezeptoren exprimieren, wurden in einer Dichte von 500.000 Zellen in 3 ml Medium ausgesät, 30 min inkubiert und nicht-adherierte Zellen gewaschen. Abbildung 20 zeigt, dass auf Platten, die mit Δ FGFR4-GST beschichtet waren, L6 Myoblasten sehr gut adherieren konnten, während sie sich weder auf GST noch auf Sirp β 1-GST beschichteten Platten in diesem Experiment anhefteten. Diese Ergebnisse zeigen, dass Δ FGFR4-GST spezifisch mit Molekülen auf der Oberfläche der L6 Myoblasten wechselwirken kann. Interessanterweise exprimieren L6 Myoblasten keine FGF Rezeptoren (Wang *et al.*, 1994; siehe 3.2.2). Diese Ergebnisse belegen deshalb zusätzlich, dass es sich bei der beobachteten Adhäsion dieser Zellen an Δ FGFR4-GST beschichtete Platten nicht um eine homophile Assoziation handelt, sondern um eine heterophile Wechselwirkung mit Mitgliedern einer anderen Protein-Familie.

3.3.2 COS7, NIH3T3 und PC12 Zellen adherieren an Δ FGFR4-GST

Im vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass L6 Myoblasten an Δ FGFR4-GST adherieren können. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob auch andere Zelltypen die Eigenschaft haben, an Δ FGFR4-GST zu binden. Um diese Frage beantworten zu können, wurde ein Zelladhäsions Assay entwickelt, mit dessen Hilfe die Menge der adherierten und lebendigen Zellen in einem Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt werden konnte. Der Test misst die Aktivität eines mitochondrialen Enzyms und reflektiert daher die Gesamtmenge der lebenden Zellen.

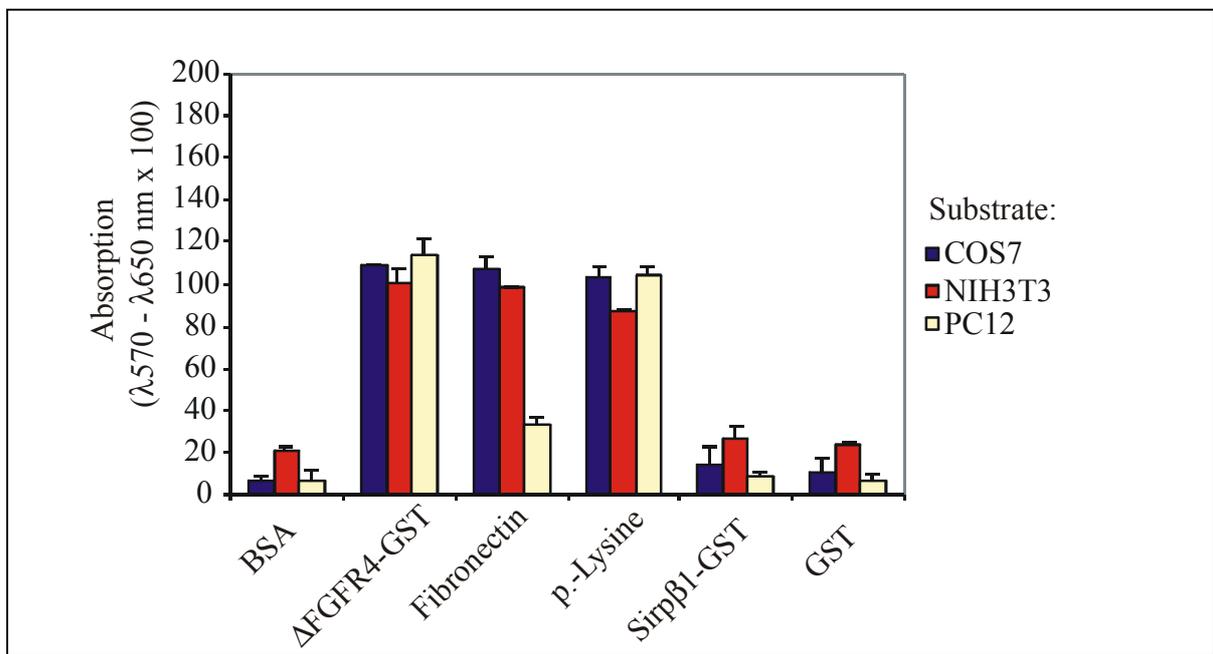


Abb. 21 PC12-, COS7- und NIH3T3-Zellen adherieren an Δ FGFR4-GST. 12-Loch Zellkulturplatten wurden mit jeweils 4 μ g der jeweiligen Substrate beschichtet (BSA: 2mg). 150.000 Zellen wurden ausgesät, 30 min inkubiert und nicht-adherierte Zellen gewegewaschen. Die Menge der adherierten Zellen wurde mit Hilfe eines modifizierten MTT-Assays photometrisch bestimmt. Jedes Experiment wurde 3x wiederholt. Die Absorptionswerte ergeben sich aus den Mittelwerten.

Dazu wurden 12-Loch Zellkulturplatten mit den entsprechenden Substraten beschichtet und 30 min mit 150.000 COS7, NIH3T3 und PC12 pro ml Medium inkubiert. Nicht-adherierte Zellen wurden gewegewaschen. Danach wurde in jedes Loch 100 μ l MTT (2.5mg/ml PBS) pipettiert und 2 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Isopropanol/HCl konnten dann die Zellen lysiert und die Menge des gelösten Farbstoffes photometrisch bestimmt werden.

Die Abbildung 21 zeigt, dass COS7 und NIH3T3 Zellen sowohl Δ FGFR4-GST als auch Fibronectin als Substrat zur Adhäsion nutzen können. Dagegen adherieren beide Zelltypen

3. Ergebnisse

weder an Sirp β 1-GST und BSA noch an GST alleine, die als negativ Kontrollen eingesetzt wurden. Um auszuschließen, dass Differenzen in der Proteinmenge die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften der beiden Fusionsproteine verursachen, wurden in einem weiteren Experiment Zellkulturplatten mit der 10-fachen Menge Sirp β 1-GST beschichtet. Allerdings konnten auch bei einer 10-fach höheren Sirp β 1-GST Konzentrationen keine COS7 Zellen adherieren (Abb. 22).

Interessanterweise adherieren PC12 Zellen nicht an das ECM-Protein Fibronectin (Abb. 21). Diese Beobachtung stimmt mit früheren Experimenten überein, in denen gezeigt wurde, dass PC12 Zellen auf Fibronectin beschichteten Platten nur schwach binden können (Doherty *et al.*, 1988). Auf der anderen Seite stellt Δ FGFR4-GST ein gutes Adhäsionssubstrat für PC12-Zellen dar (Abb. 21).

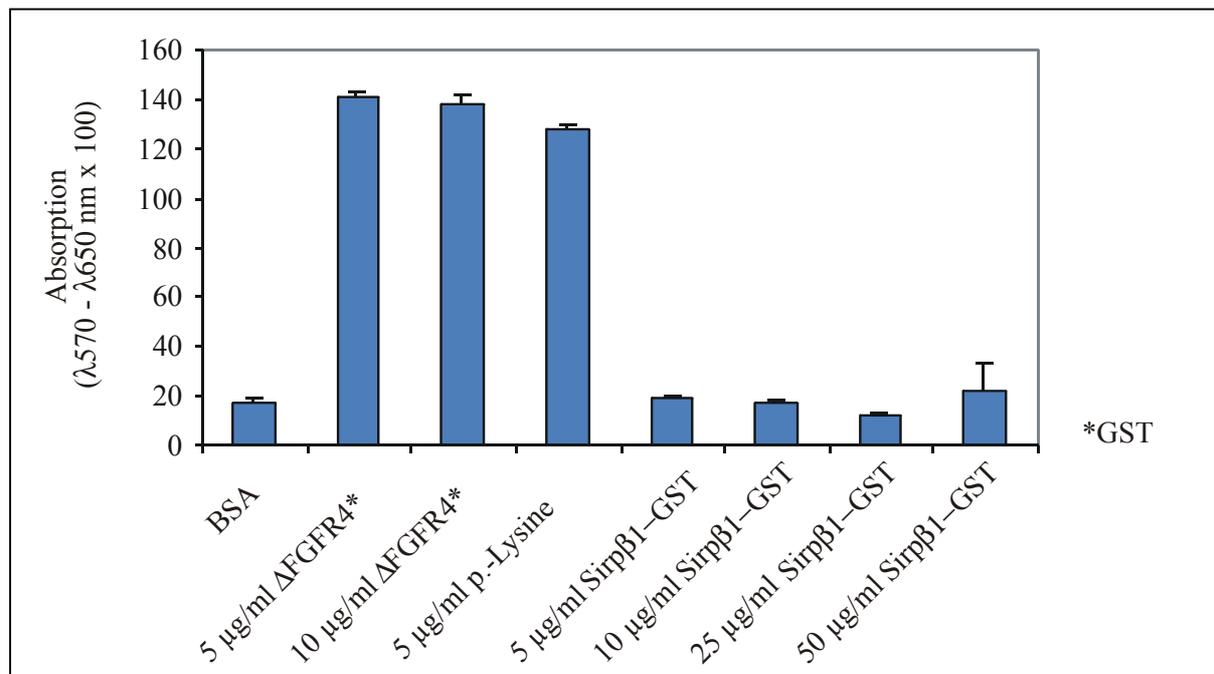


Abb. 22 COS7 Zellen adherieren nicht an Sirp β 1-GST. COS7 Zellen wurden auf Platten ausgesät, die mit 400 μ l der jeweils angegebenen Substrate beschichtet worden waren. Jeder Wert ist der Mittelwert aus drei Experimenten.

Dieses lässt vermuten, dass Δ FGFR4-GST entweder nicht mit dem Fibronectin Rezeptor interagiert oder neben diesem noch mindestens ein weiteres Molekül zur Bindung verwenden kann.

Poly-Lysine wurde als Positiv-Kontrolle in diesem Assay verwendet. Aufgrund der stark positiven Ladung von poly-Lysine können Zellen unspezifisch an dieses Substrat binden.

3.3.3 Die Δ FGFR4-GST vermittelte Zelladhäsion ist abhängig von 2-wertigen Kationen

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass verschiedene Zelltypen spezifisch *in vitro* an Δ FGFR4-GST adherieren können. Weiterhin lag aufgrund der Aminosäuresequenz-Homologien in der CHD des FGFR4 und verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen der Integrin-, Cadherin- und Immunglobulin-Proteinfamilien die Vermutung nahe, dass diese an dem Zelladhäsions Vorgang beteiligt sein können. Da die Funktion von Integrinen und Cadherinen von Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} abhängig ist, sollte die Zelladhäsion an Δ FGFR4-GST in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen dieser 2-wertigen Kationen untersucht werden.

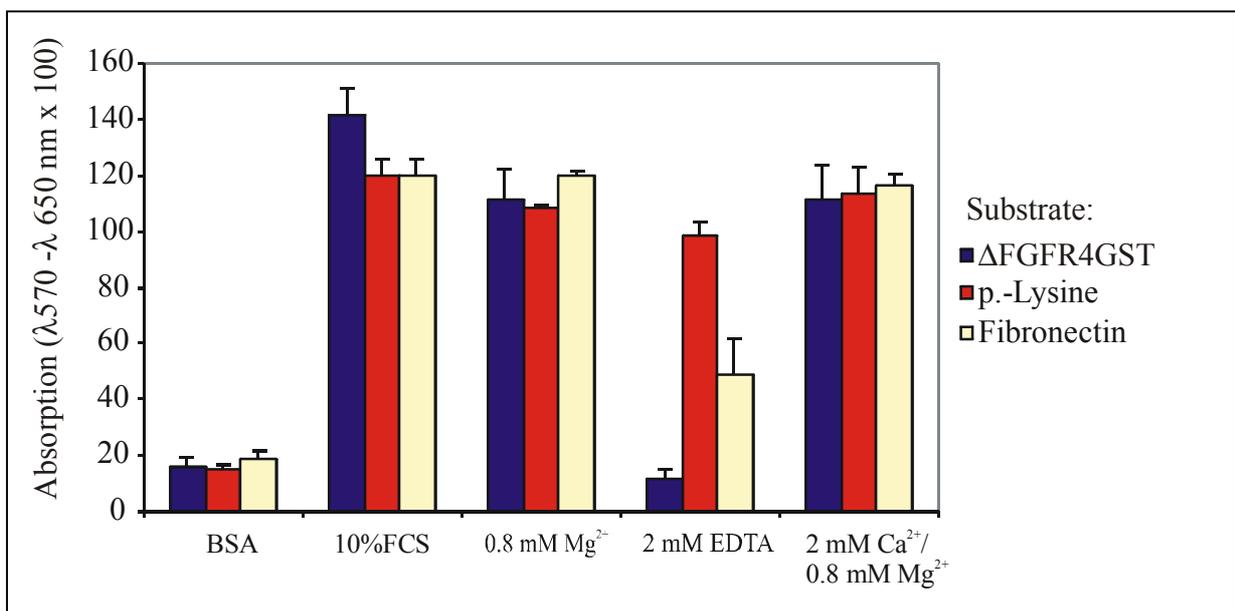


Abb. 23 EDTA inhibiert die Zelladhäsion an Δ FGFR4-GST. 12-Loch Zellkulturplatten werden mit $4\mu g$ der angegebenen Substrate beschichtet. 150.000 Cos7 Zellen werden mit den jeweiligen Kation-Konzentrationen oder EDTA 15 min vorinkubiert und dann auf die beschichteten Platten ausgesät. Die Menge der adherierten Zellen wurde photometrisch gemessen. Jedes Experiment wurde 3x wiederholt. Die angegebenen Absorptionen sind die Mittelwerte aus diesen drei Experimenten.

Abbildung 23 zeigt, dass die Anwesenheit von 2-wertigen Kationen für die Adhäsion von COS7 Zellen an Δ FGFR4-GST absolut erforderlich ist. Vorinkubieren der Zellen mit 2 mM

EDTA inhibiert die Adhäsion an Δ FGFR4-GST um 100% und die an Fibronectin um 60%. Dagegen wird wie erwartet die unspezifische Adhäsion an poly-Lysine nicht durch EDTA beeinflusst.

3.3.4 Heparin hat keinen Einfluss auf die Zelladhäsion

FGF und FGF Rezeptoren binden an Heparin-Sulfat Moleküle, die auf der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix lokalisiert sind. Zellen, die kein Heparin-Sulfat aber FGF Rezeptoren exprimieren, können sich an Nachbarzellen, die Heparin-Sulfat auf der Oberfläche besitzen in einem FGF abhängigen Mechanismus anheften (Richard *et al.*, 1995). In diesen Co-Kulturen bildet sich wahrscheinlich ein Komplex zwischen Heparin-Sulfat auf der einen Zelle, einem überbrückenden FGF und dem FGF-Rezeptor auf der anderen Zelle.

Die Gültigkeit dieses möglichen Mechanismus in Bezug auf die Adhäsion an Δ FGFR4-GST wurde im folgenden Experiment untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in Gegenwart von 50 μ /ml löslichen Heparin auf die beschichteten Platten ausgesät.

Nach der photometrischen Bestimmung der adherierten Zellen stellte sich dabei heraus, dass lösliches Heparin keinen Einfluss auf die Zelladhäsion von COS7 Zellen auf Δ FGFR4-GST und Fibronectin hat (Abb. 24). Dieses Ergebnis belegt, dass der oben beschriebene Mechanismus nicht die Ursache für die beobachteten Effekte sein kann.

Interessanterweise blockiert lösliches Heparin aber vollständig die unspezifische Adhäsion an poly-Lysine (Abb. 24). Der Grund dafür ist wahrscheinlich in der Art der Wechselwirkung zwischen poly-Lysine und der Zelloberfläche zu suchen. Aufgrund der vielen Lysinreste ist poly-Lysine stark positiv geladen. Auf der Zelloberfläche dagegen gibt es eine große Menge von Proteoglycanen, die negative Ladungen tragen.

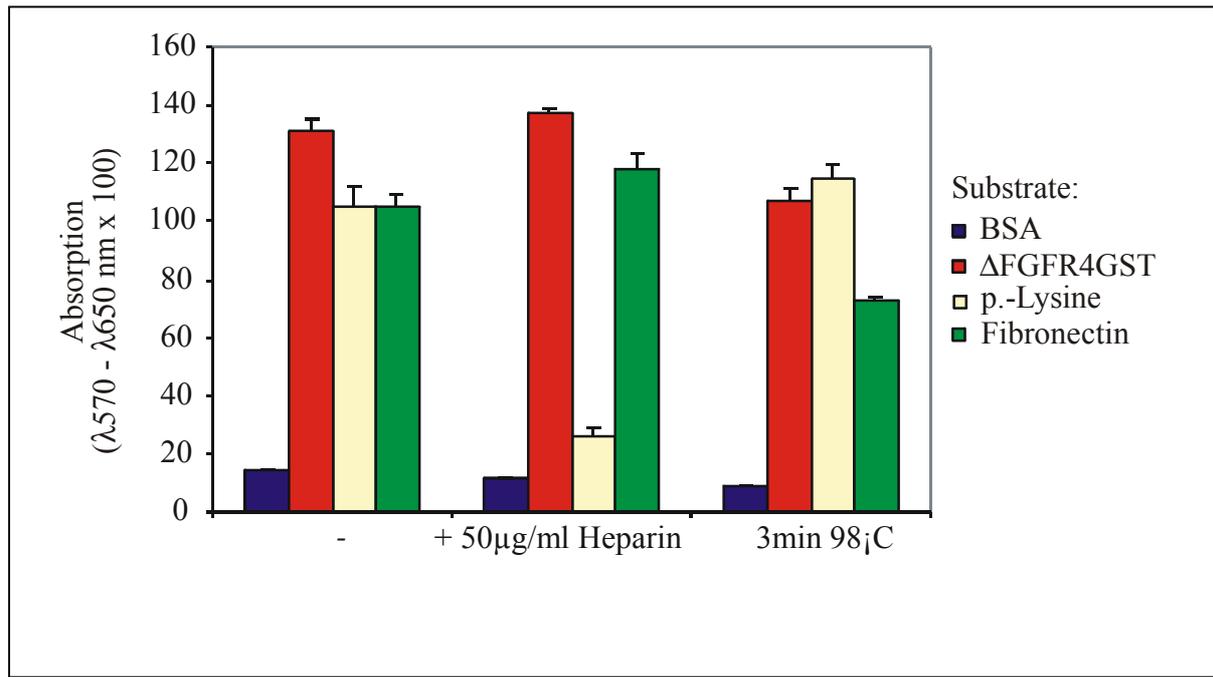


Abb. 24 Effekt von löslichem Heparin auf die Adhäsion von Cos7 Zellen an ΔFGFR4-GST . 150000 Cos7 Zellen werden auf beschichtete Zellkulturplatten ausgesät, die vorher 15 min mit 50 μg/ml Heparin vorinkubiert worden sind. Nicht-adherierte Zellen wurden nach 30 min gewaschen und die Menge der adherierten Zellen photometrisch bestimmt. Jeder Wert ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Bindung an poly-Lysine beruht daher wahrscheinlich auf den Ladungsunterschieden zwischen der Zelloberfläche und poly-Lysine, die durch lösliches Heparin, das ebenfalls ein Proteoglycan ist und negative Ladungen trägt, neutralisiert werden.

3.3.5 Die Adhäsion an ΔFGFR4-GST steuert verschiedene Signalkaskaden in COS7 Zellen

Die Integrin-abhängige Adhäsion von Fibroblasten an Fibronectin beschichtete Substrate induziert die Aktivierung der zytosolischen Serin/Threonin Kinase ERK2. Diese Aktivierung kann mit Hilfe eines *in vitro* Kinaseassays identifiziert werden, bei dem nach Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern die katalytische Aktivität von ERK2 an Hand der Phosphorylierung des exogenen Substrates MBP (myelin basic protein) bestimmt wird.

3. Ergebnisse

Im folgenden Experiment sollte die Funktion der Δ FGFR4-GST vermittelten Adhäsion bei der Aktivierung von ERK2 untersucht werden. Hierzu wurden COS7 Zellen 24 h gehungert und mit 5 mM EDTA von der Zellkulturplatte gelöst.

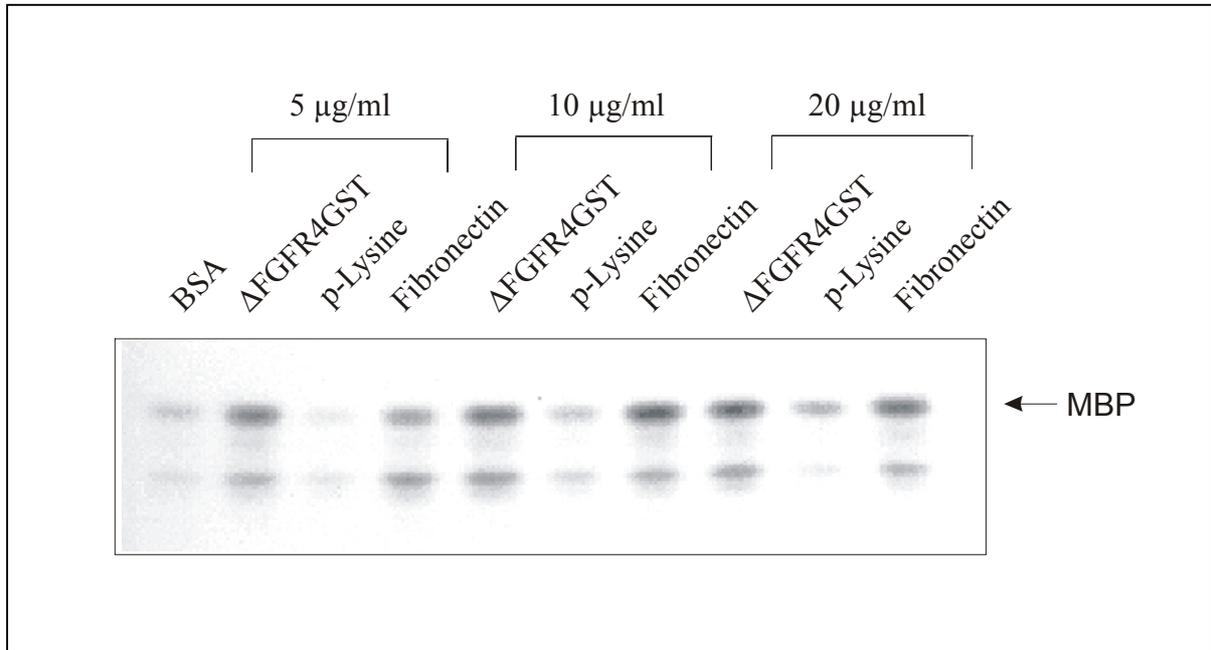


Abb. 25 Adhäsion von Cos7 Zellen an Δ FGFR4-Gst führt zur ERK2 Aktivierung. Zellen wurden 24h in Medium ohne FCS kultiviert und auf den jeweiligen Substraten ausgesät. Nach 30 min wurden die nicht-adherierten Zellen mit einer Pipette abgesaugt und die übrigen Zellen lysiert. Die abgesaugten Zellen wurden vorsichtig pelletiert und ebenfalls lysiert. Die vereinigten Lysate wurden dann für den *in vitro* Kinaseassay verwendet.

Die Zellen wurden zweimal mit FCS freien Medium gewaschen und auf beschichtete Platten ausgesät. Nach 30 min wurden die nicht adherierten Zellen abgesaugt und die adherierten lysiert. Die nicht-adherierten Zellen wurden durch vorsichtiges Zentrifugieren pelletiert und ebenfalls lysiert. Die Lysate wurden vereinigt und der Kinaseassay wie beschrieben (2.6.2) durchgeführt.

Abbildung 25 zeigt, daß die Adhäsion von COS7 Zellen an Δ FGFR4-GST und Fibronectin, dass als positiv Kontrolle verwendet wurde, zu einer starken Phosphorylierung von MBP durch ERK2 führt. ERK2 wird also durch den Adhäsionsvorgang an dieses Substrat aktiviert. Nach Adhäsion an poly-Lysine dagegen wurde selbst bei einer hohen Substrat-Konzentration keine oder nur eine sehr schwache ERK2 Aktivierung gefunden.

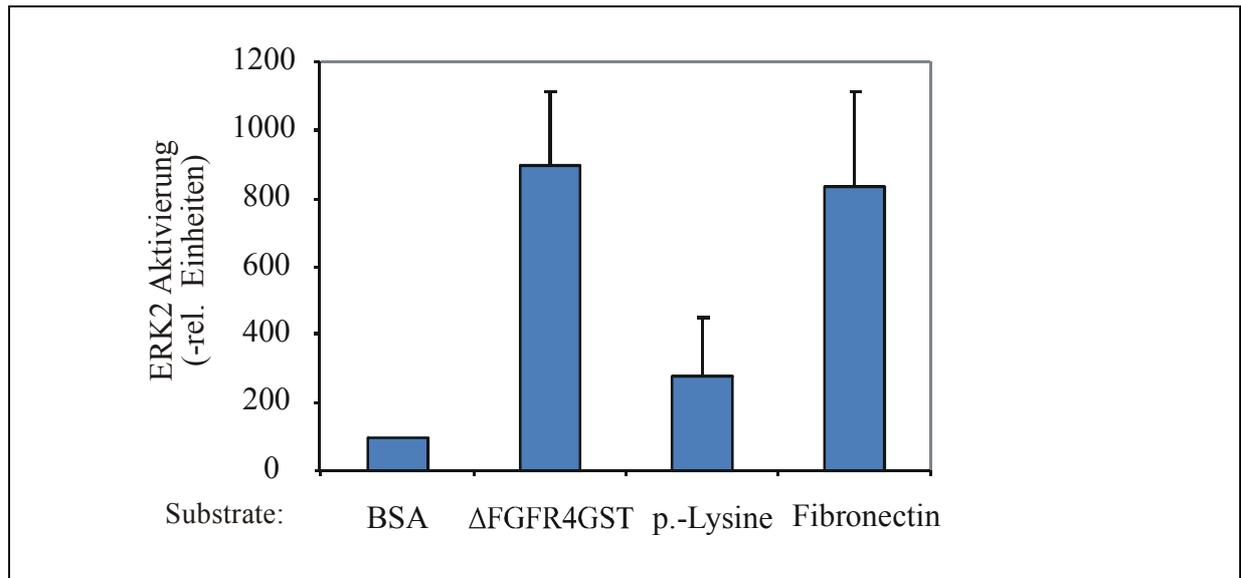


Abb. 26 Quantifizierung des Autoradiogrammes (siehe Abb. 25). Die Autoradiogramme der Kinase-Assays werden 16h auf Phospho-Imager Platten exponiert und in einem Fuji-BAS 2500 gescannt. rel. Einheiten bedeutet Pixel/mm²

Um die Stärke der Aktivierung quantifizieren zu können, wurden die Kinaseassays 16h auf Phosphoimager Platten exponiert und danach gescannt. Es zeigte sich, dass während der Adhäsion an Δ FGFR4-GST und Fibronectin die Aktivität von ERK2 10fach im Vergleich zu BSA (keine Adhäsion) oder poly-Lysine zunimmt (Abb. 26).

Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass ähnlich wie bei der Aktivierung von Integrinen durch Fibronectin die Wechselwirkung von Δ FGFR4-GST und einem unbekanntem Protein zu der Aktivierung von ERK2 führt.

3.3.6 Zelladhäsion aktiviert die MAP-Kinase JNK, aber nicht p38

Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt, daß COS7 Zellen, neben anderen Zelltypen, spezifisch an die extrazelluläre Domäne des FGFR4 adherieren können und dass dabei die MAP-Kinase ERK2 aktiviert wird. Da bereits aus früheren Veröffentlichungen bekannt war, daß auch die MAP-Kinasen JNK und p38 während der Zelladhäsion an ECM-Proteine aktiviert werden können (Oktay *et al.*, 1999; Esparza *et al.*, 1999), sollte geklärt werden, ob dieses auch im Fall Δ FGFR4-GST zutrifft.

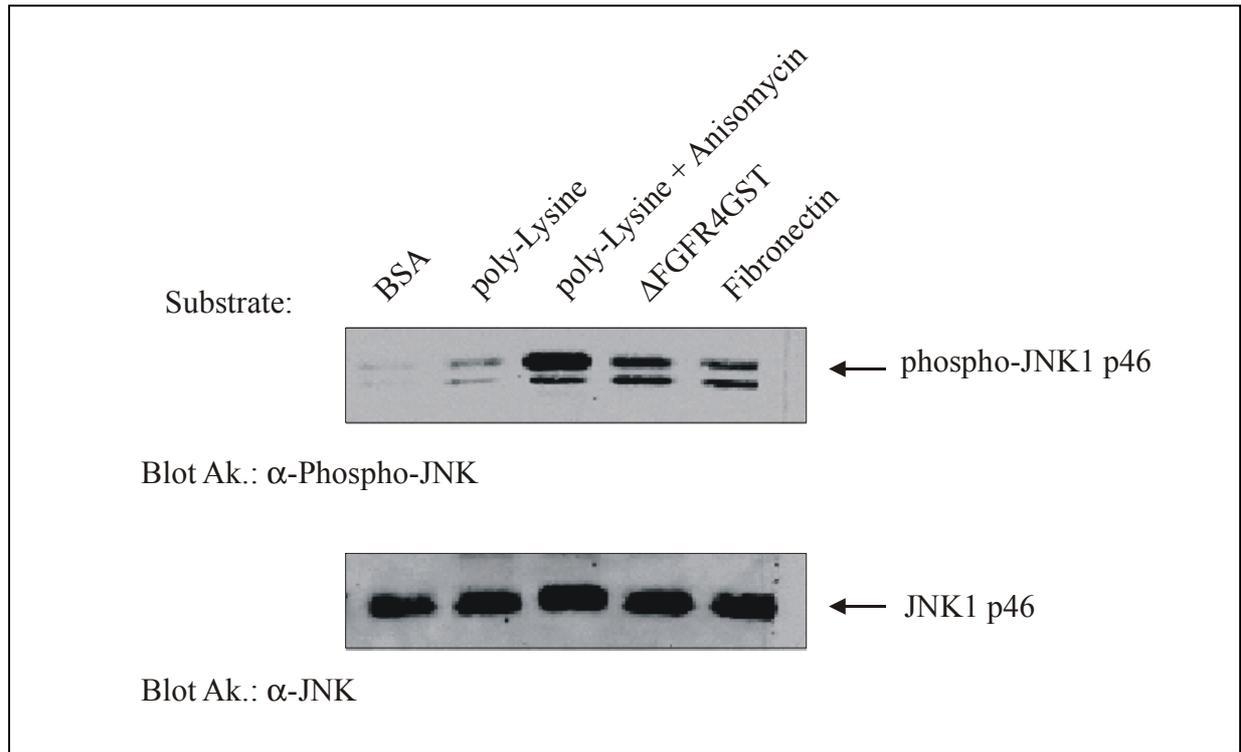


Abb. 27 Adhäsion an Δ FGFR4-GST aktiviert die JNK-Kinase. COS7 Zellen wurden 24h Serum-gehungert, mit 5mM EDTA abgelöst, 2x mit serumfreiem Medium gewaschen und 30 min auf beschichteten Zellkulturplatten inkubiert. Die Gesamtzelllysate wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit α -phospho-JNK Antikörpern immunodetektiert.

Für diese Untersuchungen wurden Antikörper eingesetzt, die die Threonin- / Tyrosin-Phosphorylierung in den Motiven TPY (JNK) oder TGY (p38) erkennen. Phosphorylierung dieser Aminosäuren bedeutet Aktivierung der Kinase.

Die Analyse durch einen Western-Blot mit den vereinigten Gesamtlysaten der adherierten und nicht-adherierten Zellen und den entsprechenden Antikörpern zeigte, daß die JNK Kinase während der Adhäsion an Δ FGFR4-GST und Fibronectin phosphoryliert wird, während die unspezifische Bindung an poly-Lysin nicht zur Phosphorylierung führt (Abb. 27). Als Positiv-Kontrolle diente die JNK Phosphorylierung nach Stimulation mit Anisomycin und als negative Kontrolle nicht-adherierte Zellen (BSA).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob auch p38, eine Kinase, die zur dritten Familie der MAP-Kinasen gehört, nach Adhäsion phosphoryliert wird. Hier zeigte sich, daß die Aktivierung von p38 während der Adhäsion von COS7 an Δ FGFR4-GST nicht zunimmt.

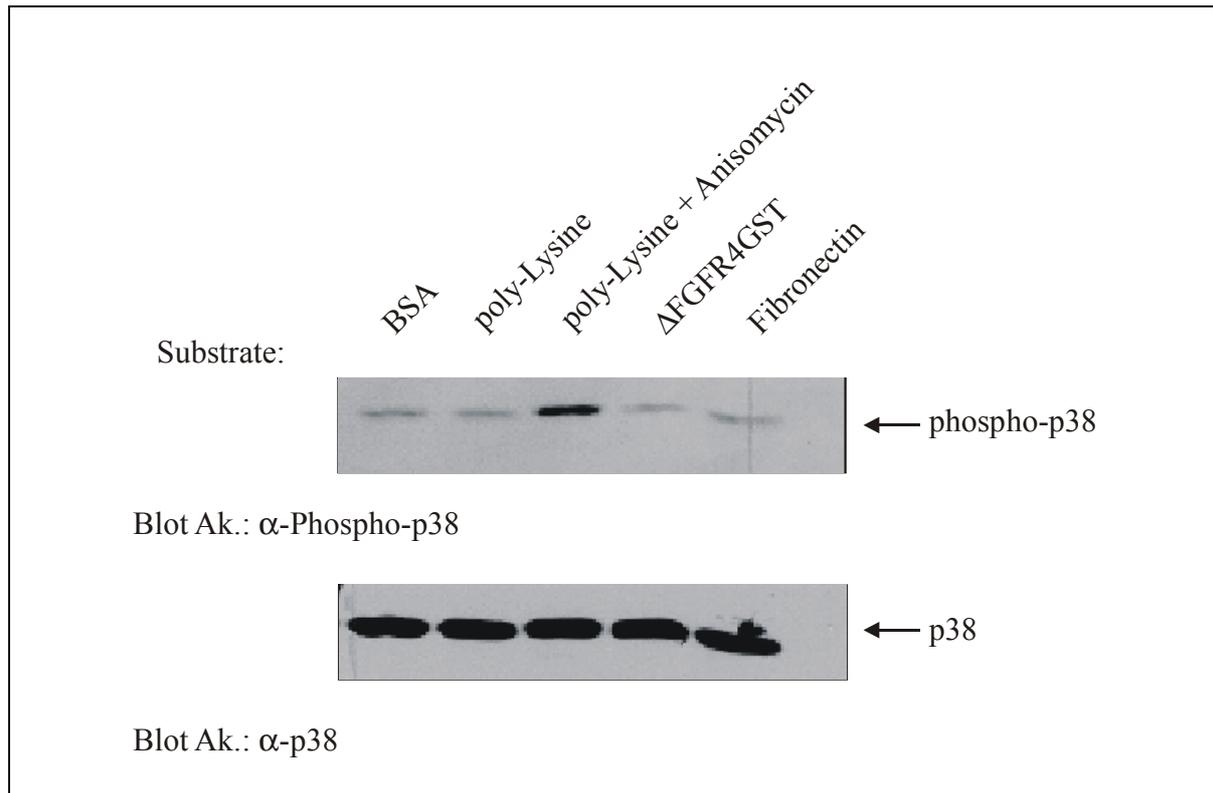


Abb. 28 Adhäsion an Δ FGFR4-GST aktiviert nicht die p38-Kinase. COS7 Zellen wurden 24h Serumgehungert, mit 5mM EDTA abgelöst, 2x mit serumfreiem Medium gewaschen und 30 min auf beschichteten Zellkulturplatten inkubiert. Die Gesamtzelllysate wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit α -phospho-p38 Antikörpern immundetektiert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Zelladhäsion an Δ FGFR4-GST zur Aktivierung von zellulären Prozessen führt. Interessanterweise führt auch die Aktivierung von Integrinen durch ihre Liganden, wie z.B. Fibronectin zu einer Phosphorylierung von MAP-Kinasen (siehe Ergebnisse in dieser Doktorarbeit), die bei der spezifischen Anheftung der Zellen eine wichtige Rolle spielt (Stupak *et al.*, 2000; Danen *et al.*, 1998).

3.3.7 Focal Adhesion Kinase (FAK) wird während der Zelladhäsion auf Δ FGFR4-GST aktiviert

Während der Zelladhäsion auf Δ FGFR4-GST werden die MAP-Kinasen ERK2 und JNK aktiviert. Ein ähnlicher Vorgang konnte auch für die Adhäsion an Fibronectin, das als Ligand für den α 1 β 3-Integrin Rezeptor wirkt, gezeigt werden. Diese Ergebnisse für die Fibronectin-

3. Ergebnisse

induzierte MAP-Kinase Aktivierung stehen in Übereinstimmung zu früheren Veröffentlichungen (Danen *et al.*, 1998). Damit stellt sich die Frage, ob FGFR4 mit einem Integrin wechselwirken und so die beobachtete Stimulierung der Signalkaskaden auslösen kann. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde untersucht, ob ein weiteres wichtiges Element der Integrin-aktivierten Signalkaskade, die Tyrosinkinase FAK, auch zum Δ FGFR4-GST abhängigen Signalweg gehört.

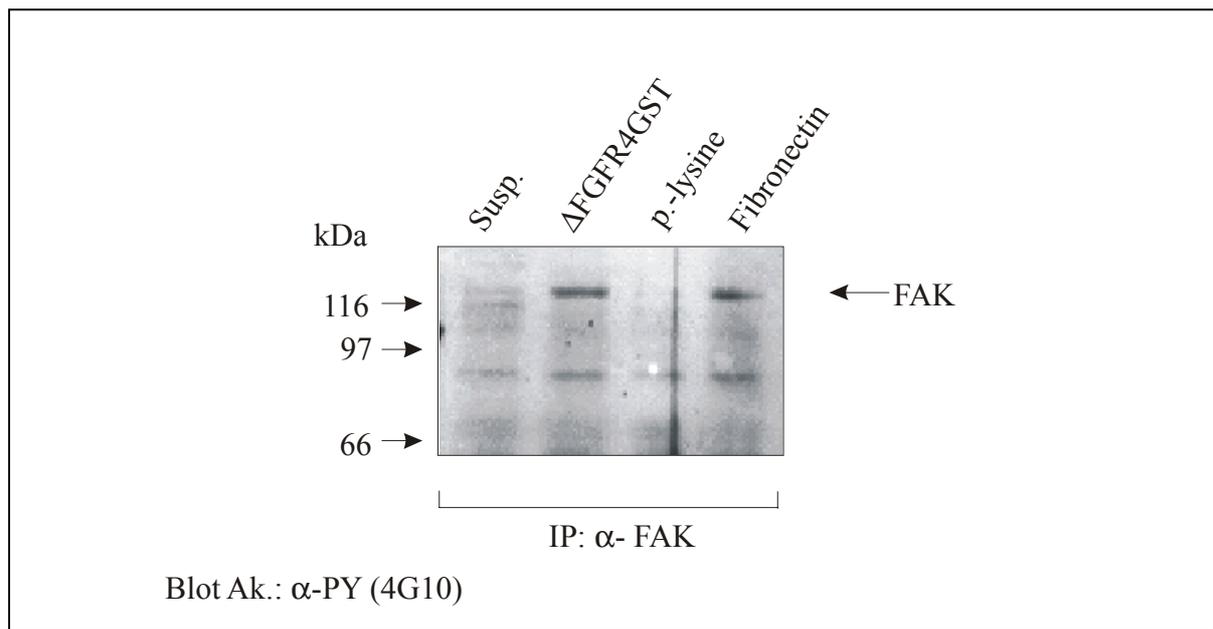


Abb. 29 FAK Tyrosin Phosphorylierung nach Adhäsion an Δ FGFR4-GST. COS7 Zellen wurden in Serumfreien Medium 24h gehungert und mit 5 mM EDTA abgelöst. Nach 30 min Inkubation auf den entsprechenden Substraten wurden die Lysate der adherierten und nicht-adherierten Zellen vereinigt und FAK mit polyklonalem FAK-Antikörper immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels 7.5%iger SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und Tyrosin-Phosphorylierte Proteine durch Phosphotyrosin spezifische Antikörper sichtbar gemacht.

Wie Abbildung 29 zeigt, wird nach Adhäsion an Δ FGFR4-GST FAK an Tyrosinresten phosphoryliert, während in Lysaten aus Zellen, die auf poly-Lysin ausgesäht wurden oder die in Suspension (BSA) gehalten wurden, keine FAK Phosphorylierung gefunden werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, daß die Tyrosinkinase FAK durch die Adhäsion von COS7 Zellen an Δ FGFR4-GST aktiviert wird.

3.3.8 Interaktion von biotynilierten Membran-Proteinen in einem *in vitro* „Pull-down“ Assay mit Δ FGFR4-GST

Die Adhäsion von Zellen an Δ FGFR4-GST ist abhängig von 2-wertigen Kationen und führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die extrazelluläre Domäne des FGFR4 mit einem weiteren Protein auf der Zelloberfläche interagiert, das intrazelluläre Signalwege steuert. Um diese möglichen Interaktionspartner identifizieren zu können, wurden die Membran-gebundenen Proteine auf der Oberfläche der Zellen mit Biotin markiert und ein sogenannter „Pull-down Assay“ durchgeführt.

Das Δ FGFR4 GST-Fusionsprotein wurde an Glutathion-Sepharose Matrix gebunden und damit FGFR4 Interaktionspartner aus den Zellysaten der biotynilierten Zellen präzipitiert. In den ersten vier Spuren der Abbildung 30 wurden die Präzipitate mit Lämmli-Puffer versetzt und die gelösten Proteine aufgetrennt. In der Spur der durch Δ FGFR4-GST präzipitierten Proteine kann man zwei spezifische Banden mit der Größe von 97 und 94 kD erkennen, die nicht in den Kontrollen zu sehen sind (GST; β Sirp-GST).

Als Kontrollen dienten GST und β Sirp-GST, die keine Adhäsionseigenschaften in den vorhergehenden Experimenten zeigten. Da aber neben den zwei spezifischen noch viele anscheinend unspezifisch gebundene Proteine nachgewiesen werden konnten, wurden in den zweiten vier Spuren Proteine aufgetragen, die spezifisch durch 10 mM Glutathion von der Glutathion Sepharose-Matrix abgelöst wurden.

Es zeigte sich, dass die meisten in den ersten vier Spuren zu erkennenden Banden in den Eluaten abwesend waren, während die beiden Proteine mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 97 und 94 kD auch in diesem zweiten Pull-down Assay vorhanden waren (Abb. 30).

Diese Ergebnisse belegen, daß die extrazelluläre Domäne des FGFR4 mit mindestens zwei Proteinen, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, wechselwirken kann. Interessanterweise besitzen die Integrine β 3 und β 5 ein scheinbares Molekulargewicht von 95 kD und 97 kD. Ob diese beiden Proteine die gesuchten Interaktionspartner sind, konnte aber im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr geklärt werden, da die benötigten Antikörper nicht zur Verfügung standen.

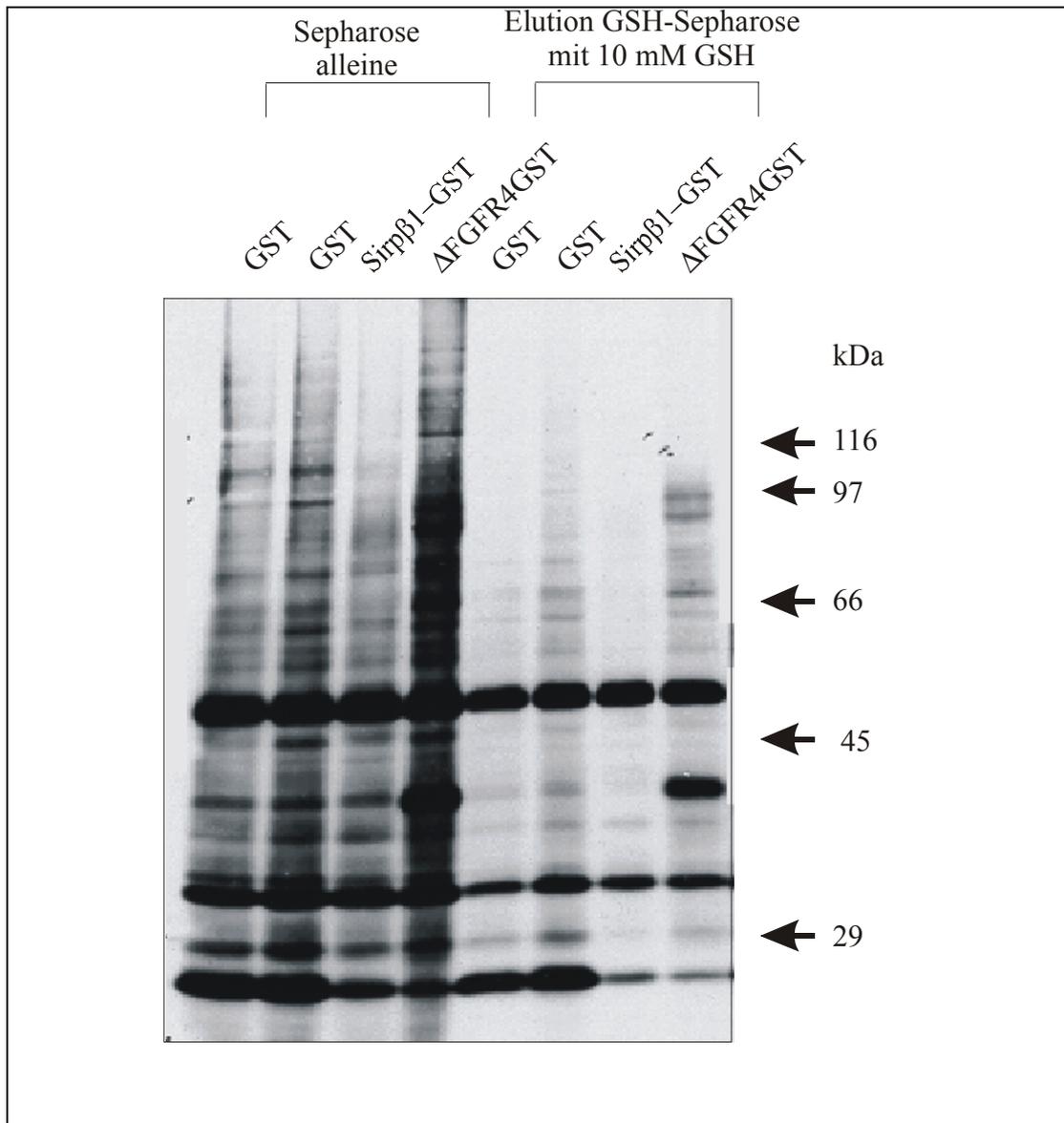


Abb. 30 Die Assoziation von biotynilierten Membranproteinen und Δ FGFR4-GST. Oberflächenproteine wurden mit membran-impermeablen NHS.biotin markiert und dann lysiert. Die Lysate wurden mit Δ FGFR4-GST präzipitiert und die biotynilierten Proteine mit Hilfe gradueller SDS-PAGE und anschließende Avidin-gekoppelter Peroxidase sichtbar gemacht.

3.3.9 Die vollständige extrazelluläre Domäne des FGFR4 ist nicht notwendig für die Zelladhäsion

Um zu untersuchen ob die 3-Dimensionale Struktur der gesamten extrazellulären Domäne des FGFR4 (FGFR4Ex) für die Zelladhäsion notwendig ist, wurden rekombinante GST-Fusionsproteine mit verschieden großen Fragmenten von FGFR4Ex hergestellt. Die verschiedenen Deletionsmutanten sind schematisch in Abbildung 31 dargestellt.

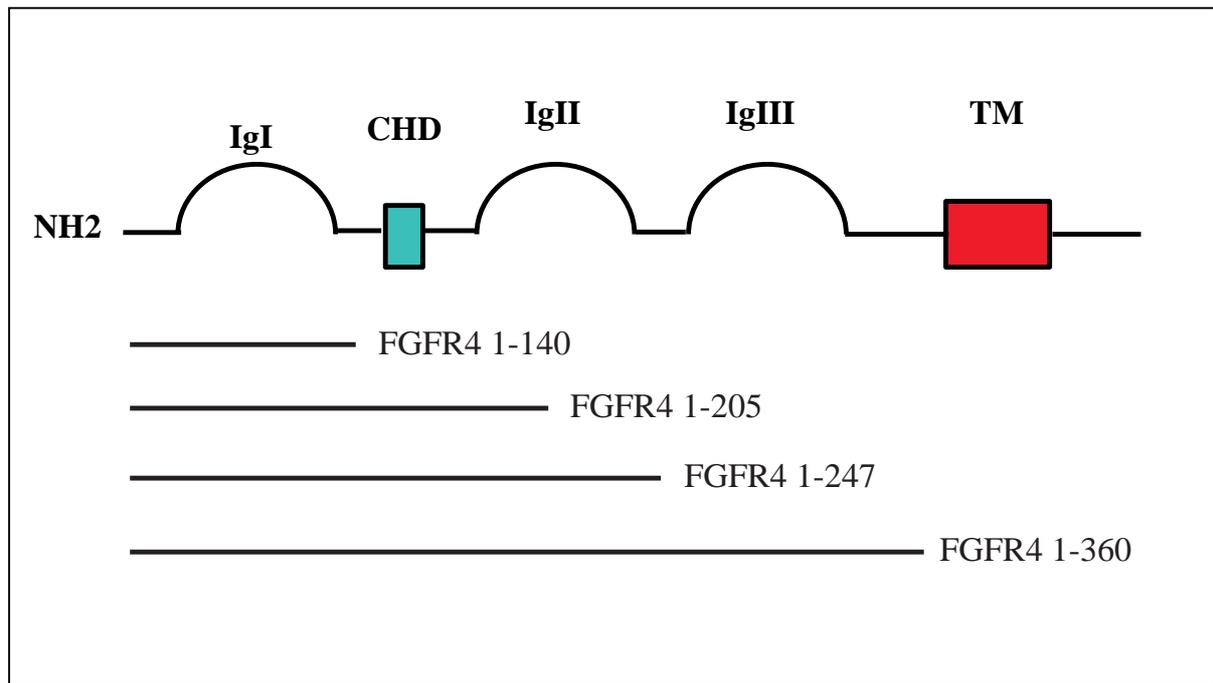


Abb. 31 Schematische Darstellung der verschiedenen GST-Fusionsproteine.

Die FGFR4 Fragmente wurden mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden hergestellt und im richtigen Leseraster in den pcDNA3-GST Vektor (C. Chant) kloniert. Nachdem 293T Zelllinien generiert worden waren, die die jeweiligen Konstrukte stabil exprimieren, wurden die Fusionsproteine auf die bereits beschriebene Methode (2.5.1) aus den Medium-Überständen der Zellen isoliert. Danach wurden Zellkulturplatten mit jeweils 4µg der Fusionsproteine beschichtet und der Zelladhäsionsassay durchgeführt.

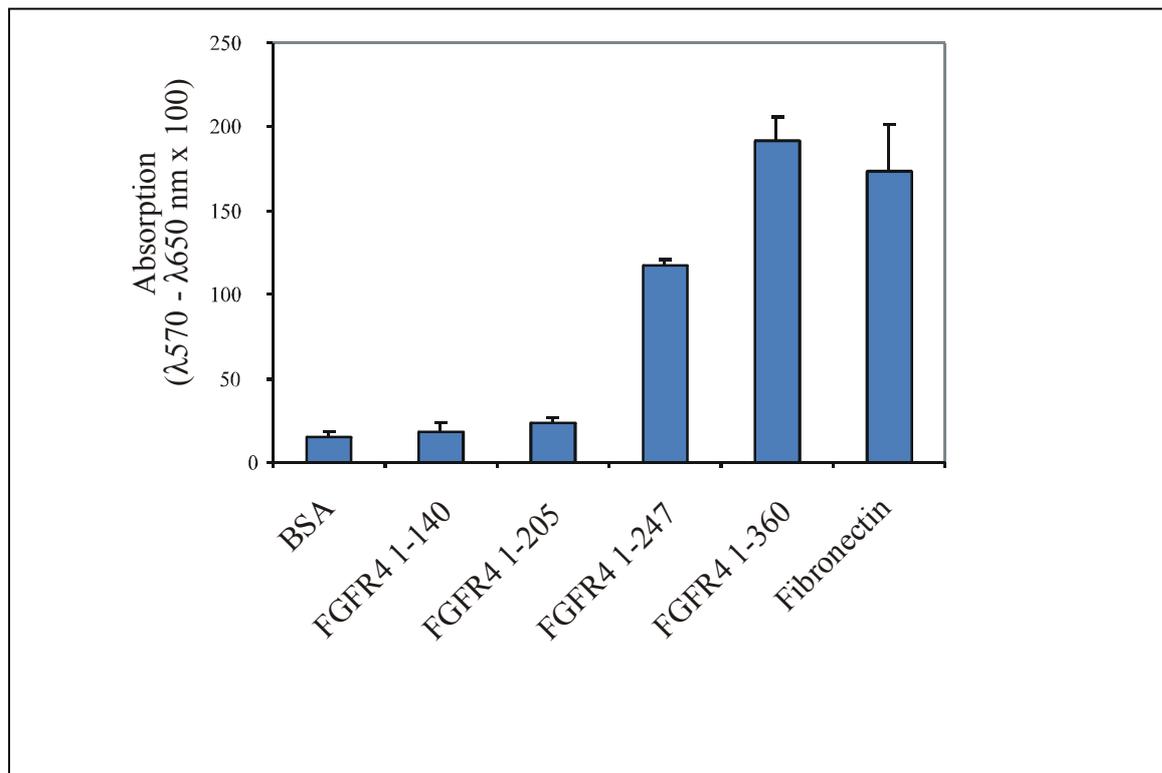


Abb. 32 Bestimmung des FGFR4 Zell-adhesiven Sequenzabschnittes. COS7 Zellen wurden mit 5 mM EDTA abgelöst, auf die mit den verschiedenen Substrate beschichteten Platten ausgesät und 30 min inkubiert. Nicht-adherierte Zellen wurden gewaschen und die Anzahl der adherierten photometrisch mit Hilfe eines modifizierten MTT Assays bestimmt. Jeder Punkt ist der Mittelwert von drei Messungen.

Dabei zeigte sich, daß nicht die gesamte FGFR4Ex Domäne zur Adhäsion beiträgt. Die beiden Fusionsproteine FGFR4 1-140 und 1-205, die die erste, bzw. zusätzlich noch die Hälfte der zweiten IG Domäne einschliessen, konnten keine Adhäsion vermitteln. Dagegen adherierten auf Zellkulturplatten, die mit FGFR4 1-247 (IG-Loop 1 u. 2) beschichtet waren, ungefähr 70% der Zellen und auf FGFR4 1-360 (FGFR4Ex) 100% (Abb. 32). Dieses Ergebnis beweist, dass neben den Sequenzmotiven in der FGFR4 CHD-Domäne (160-190) besonders der Sequenzabschnitt 205-360 eine wichtige Funktion bei der Adhäsion besitzt.

4. Diskussion

Die Entwicklung einer Zelle vom normalen zum neoplastischen Zustand ist ein vielstufiger Prozess, an dem Veränderungen in einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind. Die beiden Rezeptortyrosinkinasen (RTK), EGFR und HER2 sind Beispiele für Signalmoleküle, die eine dominierende Funktion bei der Entstehung von Brustkrebs besitzen. In den letzten Jahren sind eine Reihe von Beweisen erbracht worden, dass HER2 in 30% der Patienten mit Brustkrebs amplifiziert/überexprimiert ist und dieses eine schlechte klinische Prognose zur Folge hat. Um neue Parameter zu identifizieren, die für die prognostische Analyse von Tumorpatienten oder zur Entwicklung von Molekül spezifischen Medikamenten eingesetzt werden können, wurden in dieser Arbeitsgruppe die Expressions-Profile der meisten Phosphotyrosinkinasen (PTK) und -phosphatasen (PTP) in 18 Brustkrebs-Zelllinien und drei nicht transformierten Brustepithel-Zelllinien bestimmt. Hier zeigten unter anderem die Mitglieder der FGF-Rezeptor Familie eine sehr unterschiedliche, häufig starke Expression in den einzelnen Zelllinien. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde deshalb die Rolle der FGF Rezeptor Expression in der Tumor Entwicklung untersucht.

4.1 FGFR4 und im besonderen das neue Arg388 Allel trägt zu einer beschleunigten Tumorprogression bei

FGFR4 wird in sieben (38%) der 18 Brustkrebs-Zelllinien stark, in sechs (33%) mittel bis schwach und in fünf Zelllinien (28%) gar nicht exprimiert (Cherburkin & Knayzew, unveröffentlichte Ergebnisse). Im Gegensatz dazu konnten in den nicht transformierten Brustepithel Zelllinien keine FGFR4 Transkripte nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Publikationen überein, in denen ebenfalls eine häufig starke Expression von FGFR4 oder eine Amplifikation des FGFR4 Genes in Brustkrebs gefunden wurde (Jaakkola *et al.*, 1993; McLeskey *et al.*, 1994). Die erhöhte Expression von FGFR4 in Brustkrebs legt die Vermutung nahe, dass dieses Gen ähnlich wie HER2 zur Tumorentwicklung beitragen kann. Diese Hypothese wird zusätzlich noch durch die Untersuchungen von Hughes (1997) gestützt. In einer immunhistochemischen Analyse der FGF-Rezeptor Familie an Paraffinschnitten von allen humanen Organ-Systemen konnten die FGFR 1, 2 und 3 aber nicht der FGFR4 in den Drüsen, stromalen Fibroblasten und den Blutgefäßen des normalen Brustgewebes nachgewiesen werden. Zusammen mit den

Ergebnissen von Knayzew und Cherburkin zeigt sich also, dass der FGFR4 nur in Tumoren des Brustgewebes nicht aber in normalem Brustgewebe vorkommt.

Im Zuge dieser Doktorarbeit konnte zusätzlich noch gezeigt werden, dass der FGFR4 eine polymorphe Stelle in der Transmembrandomäne besitzt. An Position 1217 der Nukleotidsequenz wird ein Guanidin gegen ein Adenosin ausgetauscht, was zu einem Arginin an Position 388 des Proteins führt. Bei FGFR4 Arg388 handelt es sich um eine häufige Sequenzvariante, die in 50% der Bevölkerung entweder in homozygoter oder heterozygoter Form auftritt. Sie zeigt eine deutliche Überrepräsentanz in Brustkrebs Patienten mit HER2 Überexpression und ist mit einer signifikant verringerten Rezidiv-freien Überlebenszeit in Patienten mit axiliären Lymphknoten Metastasen verknüpft. Eine übereinstimmende Beziehung zwischen dem FGFR4 Arg Allel und klinisch, prognostischen Faktoren wurde weiterhin auch in Darmkrebs nachgewiesen.

Mutationen in RTKs sind oft die Ursache für schwere Erkrankungen oder Entwicklungsstörungen beim Menschen. Mindestens in 10 RTK Protein-Familien sind in den letzten Jahren somatische oder vererbliche Sequenzvarianten identifiziert worden. Die FGF Rezeptoren sind ein besonderes Beispiel für eine Familie von RTKs in denen Keimbahnmutationen zu autosomal dominant vererbten humanen Syndromen führen. In der Keimbahn von Patienten mit Zwergwuchs oder craniosynostotischen Syndromen, z.B. Crouzon, Pfeiffer, Apert und Jackson-Weiss sind über 50 verschiedene Mutationen in den FGFR1, FGFR2 und FGFR3 bekannt (Webster & Donoghue, 1997). Die meisten craniosynostotischen-Syndrome werden durch Mutationen in der extrazellulären Domäne des FGFR2 verursacht, während Zwergwüchsigkeit das Ergebnis von vererblichen Mutationen im FGFR3 ist. Achondroplasie, die häufigste Form von Zwergwuchs beim Menschen, wird durch eine Glycin→Arginin Substitution in der TMD des FGFR3 ausgelöst, die ähnlich zu der im Zuge dieser Doktorarbeit gefundenen Glycin→Arginin Substitution im FGFR4 ist. Interessanterweise sind bis heute im FGFR4 keine weiteren Mutationen, die mit Entwicklungsstörungen oder der Krebsentwicklung assoziiert sind, gefunden worden, (Gaudenz *et al.*, 1998), so dass die hier gezeigten Ergebnisse erstmals eine Diskussion über die Funktion von FGFR4 Sequenzvarianten in der humanen Pathogenese zulassen.

Mutationen in den FGFRs werden aber nicht nur in den genannten Entwicklungsstörungen gefunden. In jüngerer Zeit wurden somatische Mutationen im FGFR3 auch in Blasen- und Cervixkrebs und in multiplen Myelomen identifiziert (Chesi *et al.*, 1997, Capellen *et al.*, 1999). Allen diesen Mutationen ist gemeinsam, dass sie im Unterschied zu der Gly388Arg Mutation im FGFR4 äußerst selten sind (Allelfrequenz < 0.1%) und deshalb keine

signifikante Auswirkung auf sehr häufige Krankheiten haben. FGFR4 Gly388Arg dagegen wurde in 50% der normalen Bevölkerung entweder in hetero- oder homozygoter Form gefunden, und zeigt damit eine sehr hohe Frequenz. Es handelt sich also um einen sogenannten “susceptibility polymorphism” oder Prädispositions-Polymorphismus, der für die Gesamtbevölkerung von großer Bedeutung sein kann.

Ein prominentes Beispiel dafür sind die vererbten, sehr weit verbreiteten Varianten des Apolipoproteins E (APOE). Jedes APOE Allel ist mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit assoziiert, die Alzheimer-Krankheit in einem bestimmten Alter zu entwickeln (Corder *et al.*, 1993; Corder *et al.*, 1994). Im Unterschied zu dominanten Mutationen, wie z.B. den FGFR Mutationen in den craniosynostotischen Syndromen, bedeutet aber das Vorhandensein eines bestimmten APOE Genotyps für das jeweilige Individuum nicht notwendigerweise Schutz vor oder Ausbruch der Krankheit, sondern definiert ein Risiko, zu einer der beiden Gruppen zu gehören (Roses, 1997).

Auch die Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen wird durch Sequenzvarianten im humanen Genom beeinflusst. Man kann dabei generell zwischen Faktoren unterscheiden, die in die initiale Tumorentwicklung integriert sind und deswegen in Tumorpatienten in einer höheren Zahl als in der Gesamtbevölkerung gefunden werden. Neben vielen anderen sind als Beispiele hierfür die Keimbahn-Mutationen in BRCA1 und BRCA2 (Futreal *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995) und Polymorphismen im Vitamin-D Rezeptor Gen (Taylor *et al.*, 1996) zu nennen. Daneben gibt es aber auch Faktoren, die keine direkte Auswirkung auf die Entstehung des Tumors haben, aber zum Beispiel die Metastasierung eines bestehenden Tumors begünstigen, und deshalb nur in Patienten mit diesem Phänotyp überrepräsentiert sind. Ein besonders markantes Beispiel ist die GTPase RhoC, die in der Metastasenbildung durch murine Melanonzellen eine wichtige Rolle übernimmt, aber keinen Einfluss auf das Zellwachstum der primären Tumorzellen hat (Clark *et al.*, 2000). Hierbei handelt es sich allerdings nicht um einen genetischen Prädispositions-Faktor.

Ähnlich wie RhoC hat die Glycin→Arginin Substitution im FGFR4 keine Konsequenzen für die Entstehung von Tumoren. Dies wird durch die gleiche Verteilung der Allele in der Gruppe der Tumorpatienten und in der Kontrollgruppe belegt. Weiterhin zeigt die hohe Allelfrequenz von ca. 0.30, dass das FGFR4 Arg388 Allel keinen negativen Effekt für ihren gesunden Träger hat. Dennoch belegt die deutliche Häufung von Trägern mit dem FGFR4 Arg388 Allel in der Gruppe der Patienten mit rezidierten Brusttumoren, dass es sich bei dieser Sequenzvariante nicht um einen neutralen Polymorphismus handelt. Daneben wurde in weiteren Untersuchungen eine erhöhte HER2 Expression, die als ein wichtiger prognostischer

Faktor im Hinblick auf einen stark metastasierenden Brustkrebs gilt (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989)), in Patienten mit dem FGFR4 Arg388 Allel gefunden. Diese Befunde wurden durch Untersuchungen in einem Kollektiv von 61 Brusttumoren aus Italien und 86 Brusttumoren aus Frankreich bestätigt, so dass ein falsch-positives Ergebnis aufgrund von populationsbedingten Einflüssen oder eines methodischen Fehlers ausgeschlossen werden kann.

Der Einfluss von FGFR4 Arg388 auf die Tumorprogression ist aber nicht nur auf die Entität des Brustkrebs beschränkt. Auch in einer Gruppe von 81 Patienten mit Darmkrebs wurde sowohl eine Assoziation zwischen Tumoren im fortgeschrittenen Stadium und Lymphknoten-Metastasen mit FGFR4 Arg388, als auch eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Patienten gefunden. Besonders interessant in dieser Tumorentität ist, dass in den ersten 18 Monaten des Beobachtungszeitraumes die Patienten mit einem FGFR4 Arg388 Allel eine hohe Mortalität aufwiesen (12 Fälle; n=46), während bei den Patienten mit FGFR4 Gly388 Allel erst danach Todesfälle auftraten (0 Fälle; n=35). Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung, dass es eine statistisch signifikante Korrelation zwischen genomischer Instabilität (Microsatellite Instability; MSI), ein bekannter prognostischer Faktor in Darmkrebs, und dem FGFR4 Wildtyp Allel gibt (Daten nicht gezeigt). Daraus kann gefolgert werden, dass es zwei unabhängige Mechanismen im Darmkrebs gibt, die zu aggressiven Karzinomen führen. Ein schnellerer Prozess, der an das FGFR4 Arg388 Allel gekoppelt ist und ein langsamer, der durch MSI verursacht wird.

Diese Befunde wurden noch ein weiteres Mal durch die genotypische Analyse von 104 Plattenepithelkarzinomen der Kopf und Hals Region (S. Streit; diese Arbeitsgruppe) bestätigt. Auch hier korrelierte das Auftreten des FGFR4 Arg388 Alleles mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit (p=0.03). Es zeigt sich also, dass die Rolle des neuen FGFR4 Alleles nicht nur auf die Gruppe der Patienten mit Brustkrebs beschränkt bleibt, sondern vielmehr in mehreren, unabhängigen Studien belegt werden konnte.

Die genaue biologische Rolle der FGF Rezeptoren und im besonderen des FGFR4 in der Tumorentstehung ist bis heute noch nicht befriedigend geklärt, und eine Reihe von gegensätzlichen Untersuchungen sind in den letzten Jahren veröffentlicht worden. Erhöhte Expression von FGF Rezeptoren wurde unter anderem in Brustkrebs (Jaakola *et al.*, 1993; McLeskey *et al.*, 1994; Jacquemier *et al.*, 1994; Adnane *et al.*, 1991), Bauchspeichel-Drüsen Karzinom (Leung *et al.*, 1994), nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (Berger *et al.*, 1999) und Magenkarzinom (Shin *et al.*, 2000) gefunden. Die spezifische Inhibierung der FGF Rezeptor Aktivität durch dominant negative Mutanten oder die „Anti-sense“ Technik führt zur

Reduzierung des Zellwachstums bei Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* (Yayon *et al.*, 1997; Wang & Becker, 1997). Weiterhin verursacht die exogene Überexpression von verschiedenen FGF Liganden in NIH3T3 Fibroblasten den Verlust der Kontakt-Inhibition und des Tumorwachstums nach Injektion in immundefiziente Nacktmäuse (Li *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1996)). Diese Ergebnisse deuten auf eine positive Wirkung der FGF-Liganden und ihrer Rezeptoren auf die Tumorentwicklung hin. Auf der anderen Seite beweisen andere Arbeiten, dass einzelne Vertreter der FGF Rezeptoren und der FGF Liganden hemmend auf das Tumorwachstum einwirken können. So verursacht zum Beispiel die exogene Expression von FGFR2IIIb, einer spezifischen Spleiß-Variante des FGFR2, in Prostatakrebs Zellen und von FGF-2 in einer Brustkrebs-Zelllinie die Verringerung der Tumorgenität (Korah *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1997). Interessanterweise hat die Expression von FGF-2 in diesem System keinen Einfluss auf die Zellproliferation, sondern nur auf Parameter, die die Fähigkeit zur Metastasierung von Tumorzellen beeinflussen.

Für den FGFR4 konnte neben der bereits erwähnten erhöhten Expression in Brust- und anderen Tumoren in vielen Veröffentlichungen der letzten Jahre gezeigt werden, dass FGF-8b ein Ligand, der besondere Spezifität für den FGFR4 aufweist, häufig in Tumor- und benachbarten stromalen Geweben stark exprimiert ist. Dieses gilt sowohl für Brust- als auch für Prostatakarzinome. Zusätzlich ergaben diese Untersuchungen, dass in Tumoren mit hoher FGF8b Expression immer auch FGFR4 vorhanden ist. Da aber der FGFR4 im Gegensatz zu den FGF Rezeptoren 1, 2 und 3 keine mitogenen Eigenschaften in allen bisher getesteten Zellsystemen gezeigt hat (Vainikka *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997; Shaoul *et al.*, 1995), liegt die Funktion dieses Rezeptors wahrscheinlich nicht in der initialen Tumorentstehung oder der weiteren Proliferation der Tumorzellen, sondern eher in den Prozessen, die die Metastasierung von Tumoren ermöglichen. Diese Möglichkeit wird auch durch die Assoziation der FGFR4 Arg388 Mutante mit einer beschleunigten Tumorprogression in Brust-, Plattenepithel- und Darmkrebs unterstrichen. Besonders interessant in diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Johnston und Mitarbeitern aus dem Jahre 1995. In diesen Experimenten wurde demonstriert, dass FGF-1 und FGF-2 in Brustkrebs Zellen aber nicht in normalen Brustepithel Zellen einen Vorgang induzieren können, der als Membran "Ruffling" bezeichnet wird und einen wichtigen Prozess während der Zellbewegung und damit der Metastasierung darstellt (Jiang, 1995; Hojo *et al.*, 1999). Bemerkenswert aber ist, dass nur in Zellen, die FGFR4 exprimieren, Membran Ruffling induziert werden konnte. Der Grund für die ausbleibende Stimulierbarkeit von normalen Brustepithel Zellen könnte also in dem Fehlen von FGFR4 begründet sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neue Sequenzvariante FGFR4 Arg388 mit einer beschleunigten Tumorprogression korreliert, und wahrscheinlich keine Funktion in der initialen Tumorentstehung übernimmt. Diese Ergebnisse weisen auf einen neuen Mechanismus innerhalb der Tumorentwicklung hin, in dem in einem ersten Schritt durch exogene oder endogene Faktoren die Tumorbildung induziert wird, während die weitere Progression dann durch vererbliche genetische Parameter beeinflusst wird.

4.2 Die Funktion der FGFR4 Arg388 Mutation bei der Rezeptor-Aktivierung

Es ist seit langer Zeit allgemein anerkannt, dass die Transmembrandomäne (TMD) von RTKs eine kritische Funktion bei der Aktivierung und Regulation der Rezeptor-Dimerisierung hat. Punktmutationen in den TMD von mindestens 2 RTKs, Neu/ErbB2 und FGFR3, sind identifiziert worden, die zur unregulierten, Liganden-unabhängigen Rezeptor-Aktivierung führen. Diesen Punktmutationen ist gemeinsam, dass es zum Austausch der ursprünglichen hydrophoben Aminosäure gegen eine stark geladene, hydrophile Aminosäure kommt (siehe Fig.2). In mehreren Publikationen ist die Möglichkeit vorgeschlagen worden, dass diese Mutationen eine Wechselwirkung der TMD von zwei benachbarten Rezeptoren innerhalb der Zellmembran aufgrund von Wasserstoff-Brückenbindungen ermöglichen, und dieser Vorgang zur Stabilisierung von Rezeptor-Dimeren und damit zur unkontrollierten Aktivierung führt (Sternberg und Gullick, 1989 u. 1990; Weiner *et al.*, 1989). Um zu überprüfen, ob auch die FGFR4 Arg388 Mutation zu einer verstärkten Rezeptor-Aktivierung führt, sollte daher diese Mutation in den Wildtyp Rezeptor eingeführt werden und dieser dann in Zellen, die endogen keinen FGFR4 besitzen, exprimiert werden. Die in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Aktivierung zwischen dem mutierten und dem Wildtyp Rezeptor. Die Tyrosin-Phosphorylierung des mutierten und des Wildtyp FGFR4 war sowohl im stimulierten als auch im unstimulierten Zustand vergleichbar. Auch die Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 nach FGF-1 Stimulation war für beide FGFR4-Varianten identisch. Mit den hier durchgeführten Experimenten konnte also kein Unterschied in der Rezeptor-Aktivität zwischen FGFR4 Arg388 und FGFR4 Gly388 gefunden werden. Dieses lässt vermuten, dass der Einfluss von FGFR4 Arg388 auf die Tumorprogression durch schwache Veränderungen in der Aktivierungs-Kinetik verursacht wird, die durch die hier angewandten experimentellen Methoden nicht zu detektieren sind.

Interessanterweise haben eine Reihe von Untersuchungen gezeigt, dass zum einen verschiedene RTK durch die gleichen TMD Punktmutationen unterschiedlich stark aktiviert werden und dass die Position der Mutation innerhalb der TMD eine wichtige Rolle spielt (Bell *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1997; Webster und Donoghue; 1996). Die zweite Beobachtung liegt darin begründet, dass es innerhalb der TMD heptamere Subdomänen gibt, die nur eine bestimmte Anordnung der hydrophilen Aminosäuren zulassen. Geht man zum Beispiel von der α -helikalen TMD von HER2/Neu aus, so besteht eine Windung aus 3.5 Aminosäuren (Gullick *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1998). Deletion oder Insertion von 3-4 Aminosäuren führt also zu einer Rotation der Kinase Domäne um 360° in Bezug zum Dimer-Partner. Dieses bedeutet, daß hydrophile Aminosäuren im Abstand von 3-4 und 7 Positionen im Dimer immer gegenüber liegen und so miteinander wechselwirken können. Einführung von hydrophilen Aminosäuren an verschiedene Positionen innerhalb der TMD sollten also zu einer periodischen Zunahme der Kinase-Aktivität führen, je nach Position der ausgetauschten Aminosäuren innerhalb der Dimere zueinander. Genau diese periodische Aktivierung konnte auch gezeigt werden (Bell *et al.*, 2000). Dieses Modell wird durch Ergebnisse zur Dimerisierung der Rezeptortyrosin-phosphatase- α noch weiter bestätigt. Hier konnte gezeigt werden, dass ungepaarte Cysteine an vier verschiedenen Positionen innerhalb der α -Helix nur in den Fällen zu biologisch aktiven Dimeren führen, in denen die aktiven Zentren der Phosphatasen in einer Linie gegenüber liegen (Jiang *et al.*, 1999). Interessanterweise liegen alle bisher gefundenen natürlich vorkommenden Mutationen in TMD der RTK η , einschließlich des neuen FGFR4 Arg388 Allele, genau auf den Positionen, die aufgrund des Modells aktivierend wirken. Weiterhin wurde auch gezeigt, dass eine geladene Aminosäure auf Position +7 am Ende der TMD eine schwächer aktivierende Wirkung besitzt, als in der Mitte der TMD (Bell *et al.*, 2000; Donoghue, D.J., persönliche Mitteilung). Ein Befund, der durch die stärker polare Umgebung in diesem Bereich zu erklären ist.

Die offenbar nur schwache Veränderung der Rezeptoraktivität durch eine hydrophile Aminosäure an Position 388 in der Transmembrandomäne des FGFR4 erklärt damit auch die Beobachtung, dass dieser Polymorphismus in der Bevölkerung weit verbreitet ist und keinen offensichtlichen Einfluss auf den gesunden Träger hat.

4.3 FGFR4 beeinflusst die Migration von MDA-MB-231 Brustkrebs-Zelllinien

Die beobachtete Assoziation zwischen dem FGFR4 Arg388 Allel und einer beschleunigten Tumorprogression lässt vermuten, daß Tumore mit diesem Allel zu einer beschleunigten Metastasierung neigen. Der Prozess der Metastasierung ist durch vielfältige Wechselwirkungen zwischen Tumor und Wirtsgewebe gekennzeichnet. Diese sind die Mobilisierbarkeit, Migration- und Deformierbarkeit von Zellen, die Produktion von Proteasen, die Zellproliferation und die Tumorangio-genese.

Bei den unter 3.2.3 gezeigten Experimenten zeigte sich, daß Zellen der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231 in ihrer Migrationfähigkeit behindert sind, wenn sie den FGFR4 Wildtyp exprimieren. Produzieren sie dagegen den mutierten FGFR4 kann Zellmigration beobachtet werden. Die Wildtyp Form des FGFR4 hat also einen negativen Einfluss auf die Migration von MDA-MB-231 Zellen. Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch die Inhibierung des Wachstums von MDA-MB-231 FGR4 Gly388 Zellen in BalbC Nu/Nu Mäusen, während Zellen, die mit einem leeren Virus infiziert worden waren ein erwartet starkes Tumorstadium in diesem Modell zeigten. Wie auch im Fall der Zellmigration wurde dieser inhibierende Effekt des FGFR4 durch die Einführung von Arg388 in die TMD teilweise aufgehoben. Interessanterweise konnten aber keine gravierenden Unterschiede in der Zellproliferation in *in vitro* Experimenten zwischen den einzelnen MDA-MB-231 Zelllinien festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stimmen mit einer früheren Veröffentlichung überein, daß die Stimulierung von MDA-MB-231 Zellen durch den Liganden FGF-2, der auch FGFR4 aktivieren kann, zu einem Verlust der typischen Eigenschaften eines malignen Tumors, wie zum Beispiel Zellmigration, Invasion und Tumorbildung *in vivo* führt (Korah *et al.*, 2000). Weitere Publikationen belegen diese Ergebnisse (Fenig *et al.*, 1997) und demonstrieren, dass eine vermehrte Produktion von FGF-2 bindenden Rezeptoren in Brusttumoren mit einer guten klinischen Prognose korreliert (Blanckaert *et al.*, 1998). Interessanterweise belegen frühere Arbeiten (Carstens *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1993), daß der FGFR2 in malignen und nicht-malignen Prostatakarzinomen in zwei verschiedenen Varianten vorliegt, deren Produktion während des Überganges von der nicht-malignen in die maligne Form induziert beziehungsweise blockiert wird. FGFs und die korrespondierenden Rezeptoren können also sowohl eine Tumor-Suppressor Funktion besitzen, wie auch als Onkogene wirken.

4.4 cDNA Array Analyse von MDA-MB-231 Zellen

Die bisherigen Daten zeigen, dass Expression des Wildtyp FGFR4 in MDA-MB-231 Zellen zu einer Inhibierung der spontanen ungerichteten Zellmigration führt, während die Expression von FGFR4 Arg388 keine Auswirkung auf diesen Vorgang hat. Diese Ergebnisse waren umso überraschender, da eine frühere Veröffentlichung eine positive Funktion des transient stimulierten FGFR4 in der Zellmigration vermuten ließ (Johnston *et al.*, 1995). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die andauernde Stimulation durch die Überexpression des FGFR4 sein, die sich von der transienten, Liganden-induzierten Stimulation unterscheidet. Aus diesem Grunde war es wichtig langfristige Veränderungen in der Genexpression, die durch die ektopische Überexpression von FGFR4 Gly388 oder FGFR4 Arg388 ausgelöst werden, zu untersuchen. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss die sowohl in Zelllinien als auch in primären Tumoren beobachtete FGFR4 Überexpression (Gly388 und Arg388 Allel) auf die Expression anderer Gene in Krebszellen haben kann.

Eine Möglichkeit zur simultanen Expressionsanalyse einer großen Anzahl von Genen ist die spezifische Hybridisierung radioaktiv markierter cDNA mit einer Vielzahl von Gensonden, die auf einer Matrix immobilisiert sind (cDNA Array Technologie) (Duggan *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck Nylon-Membranen mit immobilisierten cDNA Fragmenten von Kinasen, Phosphatasen und Proteasen als Gensonden eingesetzt, da viele Mitglieder dieser drei funktionellen Proteinfamilien in der Vergangenheit als Faktoren identifiziert worden sind, die sowohl in der Tumorentstehung als auch in der Tumorprogression von Bedeutung sind.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression der zwei verschiedenen FGFR4 Varianten tatsächlich die Aktivität von Genen, die eine Rolle in der Metastasierung und Migration von Brustkrebs-Zellen haben, unterschiedlich beeinflusst. Zum Beispiel wurde eine 15-fache negative Regulation der Matrix-Metalloprotease 1 (MMP-1) in MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 Zellen im Vergleich zu den MDA-MB-231 FGFR4 Arg388 und Kontrollzellen gefunden (Abb. 18).

Die Funktion der MMPs als Enzyme, die die extrazelluläre Matrix degradieren können hat diese Proteinfamilie zu einem Schlüsselement der Tumorinvasion und Metastasierung gemacht. Besonders, nachdem bewiesen wurde, dass die Inhibierung von spezifischen Proteasen zur Blockierung der Zellinvasion in *in vitro* Assays führt (Aznavoorian *et al.*, 1993; Cresson *et al.*, 1986; Stetler-Stevenson *et al.*, 1993). Zusätzlich konnten in klinischen Studien Korrelationen zwischen Tumorprogression und Protease-Aktivität

aufgedeckt werden, die die Funktion von MMPs weiter unterstreichen (Ponton *et al.*, 1990; Shima *et al.*, 1992). Allerdings wird die Expression von MMPs in primären Karzinomen noch nicht als prognostischer Faktor eingesetzt.

Interessanterweise haben neuere Untersuchungen ergeben, dass die Transmigration von Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix nur wenig bis keine Degradation der Basalmembran benötigt (Friedl *et al.*, 1998; Nehls und Hermann, 1996). Andererseits ist für die Migration von Keratinozyten auf einer 2-dimensionalen Matrix, auf der keine Barriere die Zellbewegung behindert, die Protease-Aktivität von MMP-1 notwendig (Pilcher *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass MMP-1 entweder direkt in den Migrationsvorgang einbezogen ist, indem es den migrierenden Zellen ermöglicht, sich von der Matrix zu lösen, oder dass sie Faktoren aus der extrazellulären Matrix lösen kann, die Migration induzieren. Die negative Regulation von MMP-1 kann also ein Grund für die beobachtete Inhibierung der Migration von MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 Zellen sein. Ein weiteres Gen, das in den MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 Zellen deutlich schwächer als in den Kontroll oder den FGFR4 Arg388 Zellen exprimiert wird, ist die RTK CCK-4. Die Funktion von CCK-4 ist allerdings unklar. Es handelt sich zwar um ein Transmembran Glykoprotein mit einer hohen Homologie zu der RTK KLG, aber mit Sequenzvariationen in der Kinase-Domäne, die diese inaktivieren (Ciossek *et al.*, 1995). Aufgrund der exklusiven Expression von CCK-4 in Darmkrebs und dem Fehlen von CCK-4 in normalem Darmgewebe wird aber angenommen, dass CCK-4 eine funktionelle Rolle bei der Progression von Darmkrebs einnimmt. CCK-4 könnte hier in Analogie zu HER3 (Wallasch *et al.*, 1995) als Signal-Verstärker oder –Modulator für bisher noch nicht identifizierte Kinasen dienen.

Ein anderes überraschendes Ergebnis ist die verstärkte Expression von Pyk-2 in den beiden MDA-MB-231 FGFR4 Gly388 Zellklonen. Pyk-2 ist eine zytosolische Tyrosin-kinase mit Homologie zur Tyrosinkinase FAK. Genau wie diese gilt auch Pyk-2 als positiver Regulator der Zellmigration (Avraham *et al.*, 2000). Andererseits dient Pyk-2 als notwendiges Element der induzierten Apoptose in multiplen Myelomen (Chauhan *et al.*, 1999). Der positive Einfluss auf Zellmigration und Invasion könnte also durch die Funktion von Pyk-2 als Apoptose vermittelnde Kinase aufgehoben werden und insgesamt für einen Tumor eher negative Auswirkungen haben. Diese Erklärung wird zusätzlich durch das Fehlen von starker Pyk-2 Expression in primären Tumoren unterstrichen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die stabile Überexpression von beiden Sequenzvarianten des FGFR4 zu einer unterschiedlichen Regulation der Aktivität von Genen

führt, die sowohl an der Migration als auch der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind.

4.5 FGFR4 vermittelte Zelladhäsion

Die RTK FGFR4 enthält in ihrem extrazellulären Bereich drei Immunglobulin-Domänen (IG) und weist somit Homologie zu Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin Super-Familie wie N-CAM und Ng-CAM auf (Cunningham, 1995). Für die Adhäsion sind allgemein zwei funktionell verschiedene Mechanismen bekannt: ein von 2-wertigen Kationen wie z.B. Ca^{2+} und Mg^{2+} abhängiger ist für die Cadherine und Integrine beschrieben (Takeichi *et al.*, 1988; Hynes, 1992). Die Anwesenheit von Ca^{2+} beziehungsweise Mg^{2+} stabilisiert die extrazelluläre Domäne der Cadherine oder Integrine und ist so essentiell für die Fähigkeit der Moleküle zur Zelladhäsion (Pokutta *et al.*, 1994; Gailit und Ruoslahti, 1988). Eine Kation unabhängige Interaktion wird dagegen bei den Mitgliedern der Immunglobulin Protein-Familie beobachtet (Cunningham, 1987).

Neben den drei IG-Domänen enthält die Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne des FGFR4 noch Erkennungsmotive für verschiedene weitere Zelladhäsionsmoleküle. Sie befinden sich in einem Bereich zwischen der ersten und zweiten IG-Domäne in direkter Nachbarschaft zu der sogenannten Acidic-Box, einem Bereich von negativ geladenen Aminosäuren, dessen genaue Funktion unbekannt ist. Die Sequenzmotive erstrecken sich über einen Bereich von 40 Aminosäuren und sind homolog zu Erkennungsmotiven in einer Reihe von Zelladhäsionsmolekülen (siehe Abb. 19).

Die frühen Untersuchungen von Blaschuk und Mitarbeitern hatten ergeben, dass ein Tripeptid (His-Ala-Val; das HAV-Motif) in Cadherinen, dem eine außerordentlich wichtige Rolle in der homophilen Bindung der Cadherine zukommt, auch im FGFR1 vorkommt (Byers *et al.*, 1992; Blaschuk *et al.*, 1990). Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich in der gleichen Region, die in den FGFR1, FGFR2 und FGFR4 konserviert ist (Abb. 19), weitere Sequenzhomologien zu den Zelladhäsionsmolekülen (CAM) N-CAM und L1 befinden (Williams *et al.*, 1994; Mason *et al.*, 1994). Diese Befunde führten zu der Hypothese, dass FGF Rezeptoren an dem CAM vermittelten Neuritenwachstum beteiligt sind. Tatsächlich konnte dieser Prozess durch Peptide, die homolog zu diesem speziellen Sequenzabschnitt im FGFR1 sind, blockiert werden. Eine direkte Interaktion zwischen CAMs und FGFR1 ist bis heute aber noch nicht nachgewiesen worden.

Zusätzlich zu diesen diskutierten Bindungspartnern besitzt der FGFR4 noch ein weiteres Motif, das als Bindungsstelle für die Integrin-Rezeptoren $\alpha_2\beta_1$ im Collagen I dienen könnte (Staatz *et al.*, 1991). Alle diese Befunde zusammen mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen belegen die Hypothese, dass FGFRs mit CAMs interagieren und ein wichtiger Vermittler von adhäsions-abhängigen Signalkaskaden sind.

Zum Beispiel adherieren COS7 Zellen auf Zellkulturplatten die mit einem Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären Domäne des FGFR4 und c-terminalen GST, beschichtet sind (3.3.2). Eine ähnliche Funktion in der Zelladhäsion wurde auch für FGFR1 und den Liganden FGF-2 berichtet (Rusnati *et al.*, 1997; Richard *et al.*, 1995; Richard *et al.*, 2000). In diesem Fall ist die FGFR1 und FGF-2 vermittelte Zellaggregation aber abhängig von der Anwesenheit membrangebundenen Heparins. FGF-2 kann an Heparin auf der einen Zelle und an den FGFR1 auf der anderen Zelle binden und diese verbrücken. Dieser Mechanismus kann im Fall der in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigten FGFR4 vermittelten Zelladhäsion allerdings ausgeschlossen werden. Zum einen hatte lösliches Heparin im großen Überschuss, welches im oben beschriebenen Mechanismus die Aggregation der Zellen blockiert, keinen Einfluss auf die Zelladhäsion an die extrazelluläre Domäne des FGFR4 (Abb. 24) und zum anderen wurde diese durch Inkubation mit EDTA komplett inhibiert (Abb. 23). Dieses bedeutet aber, dass eine mögliche Wechselwirkung zwischen FGF-2, FGFR4 und Heparin, die nicht abhängig von 2-wertigen Kationen ist, die beobachteten Ergebnissen nicht erklären kann. Gleiches gilt für die beschriebene Interaktion zwischen dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ und FGF-2 (Richard *et al.*, 1995), die ähnlich wie die FGFR4 vermittelte Zelladhäsion zwar abhängig von 2-wertigen Kationen ist, aber auch teilweise sensitiv gegenüber der Gegenwart von löslichem Heparin, das an FGF-2 binden kann. Dass kein exogenes FGF-2 in den Zelladhäsionsassays notwendig war, um diesen Prozess zu vermitteln, ist ein weiterer Punkt, der gegen diese beiden Mechanismen spricht. Es ist also richtig von einer direkten Wechselwirkung zwischen der extrazellulären FGFR4 Domäne und einem membran-gebundenen Protein auszugehen. Diese Hypothese wird durch die gezeigte Bindung von biotinmarkierten Membranproteinen mit einem Δ FGFR4-GST Fusionsprotein noch weiter untermauert (Abb. 30). Interessanterweise wurde durch Gao und Goldfarb (1995) gezeigt, dass der FGFR4 das einzige Mitglied der FGFR Proteinfamilie ist, das direkt an Heparin binden kann. Aber auch in diesem Fall wäre eine Inhibierung der Zelladhäsion an Δ FGFR4-GST durch lösliches Heparin zu erwarten.

In weiteren Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass die MAP-Kinasen ERK2 und JNK1, aber nicht p38 nach Adhäsion an Δ FGFR4-GST aktiviert werden (siehe 3.3.5 u.

3.3.6). Auch die zytosolische Tyrosinkinase FAK wird während des Adhäsionsprozesses phosphoryliert (siehe 3.3.7). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen zur Integrin vermittelten Signalbildung überein. In NIH3T3 Zellen induziert die Anlagerung der Zellen an Fibronectin die Assoziation des Adapterproteins Grb2 und der Tyrosinkinase c-Src an FAK und die Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 (Schlaepfer *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass in diesem Komplex FAK durch c-Src phosphoryliert wird und dieser Vorgang eine Bindungsstelle für Grb2 erzeugt, durch die Integrin Stimulation durch Fibronectin an den Ras/MAP-Kinase Signalweg gekoppelt wird (Schlaepfer *et al.*, 1994). Ob auch die Aktivierung des Ras/MAP-Kinase Signalwegs nach Adhäsion an Δ FGFR4-GST durch den oben beschriebenen Mechanismus erfolgt, muss aber noch in weiteren Experimenten aufgeklärt werden. Interessant in diesem Zusammenhang sind auch die Untersuchungen von Ugo Cavallaro und Mitarbeitern, die zeigen konnten, dass der FGFR4 in β -Tumorzellen mit N-CAM und N-Cadherin interagieren kann, was zu einer FGFR4 Aktivierung und erhöhten, β 1-Integrin vermittelten Assoziation an die Zellmatrix führt (Cavallaro *et al.*, 2001). Weiterhin wird ein Multiproteinkomplex mit wichtigen Signaltransduktionsmolekülen wie z.B. pp60^{c-src}, FRS2, PLCg, Cortactin und GAP-43 gebildet. Diese Beobachtungen sind umso wichtiger da N-CAM negative β -Tumorzellen sehr stark Metastasieren, während N-CAM positive β -Tumorzellen nicht Metastasieren (Perl *et al.*, 1999) und unterstreichen eine mögliche negative Funktion des FGFR4 in der Tumormetastasierung durch Interaktionen mit Zelladhäsionsmolekülen.

Die Zelladhäsion an die extrazelluläre Domäne des FGFR4 ist ein heterophiler Prozess: L6 Myoblasten, die endogen keine FGF Rezeptoren exprimieren (siehe 3.2.2), binden mit der gleichen Effizienz an Δ FGFR4-GST, wie L6 Myoblasten die FGFR4 ektopisch überexprimieren (Daten nicht gezeigt). Eine homophile FGFR4-FGFR4 Interaktion ist in diesem Zelltyp also nicht notwendig. Dieses Ergebnis unterscheidet sich damit deutlich von den Beobachtungen zu den Adhäsionseigenschaften der RTK AXL (Bellosta *et al.*, 1995; McCloskey *et al.*, 1997), die ähnlich wie die FGF Rezeptoren eine extrazelluläre Domäne mit Immunglobulin-Schleifen aber zusätzlich zu diesen noch zwei Fibronectin Typ III Bereiche besitzt (Rescigno *et al.*, 1991). Neben dem ähnlichen strukturellen Aufbau des extrazellulären Bereiches befinden sich aber keine zusätzlichen CAM Erkennungsmotive in der extrazellulären Domäne von AXL. Die Zelladhäsion wird bei AXL im Unterschied zu FGFR4 sowohl durch homophile Wechselwirkungen zwischen zwei Rezeptormolekülen (Bellosta *et al.*, 1995) als auch in Analogie zum FGFR1 durch Bindung an den Liganden (Gas6) vermittelt (McCloskey *et al.*, 1997). Die Funktion der Zelladhäsion durch AXL ist noch nicht genau

bekannt. Die Kinase-Aktivität von AXL wird zwar stimuliert, aber sie aktiviert nicht die Zellproliferation (Fridell *et al.*, 1996). Interessanterweise wird auch nach der Liganden-induzierten Aktivierung von FGFR4 keine erhöhte Zellproliferation gemessen (Vainika *et al.*, 1994; Shaoul *et al.*, 1995). Eine mögliche Rolle dieser beiden RTK könnte also die Kommunikation zu Nachbarzellen oder der unmittelbaren Umgebung sein, um Prozesse wie Migration und Invasion zu steuern.

Eine Klasse von RTKn, deren Liganden nicht löslich, sondern an der Membran verankert sind und die somit direkt mit Partnern auf der Oberfläche einer benachbarten Zelle interagieren, sind die Eph Rezeptoren (Frisén *et al.*, 1999). Sie steuern die Bildung von Strukturen, wie z.B. des Blutgefäß- oder des Nervensystems, durch die gegenseitige Abstoßung oder Anheftung von verschiedenen Zellen (Hattori *et al.*, 2000). Die membrangebundenen Liganden und Rezeptoren dieser Molekülfamilie ermöglichen dadurch die zielspezifische Wanderung von Zellen auf der Oberfläche von anderen Zellen oder Geweben (Barinaga, 1995). Diese Vorgänge spielen eine herausragende Rolle bei der Embryonalentwicklung. Zellwanderung ist aber auch ein wichtiger Prozess während des invasiven Tumorwachstums und der Metastasierung. Tatsächlich konnten Veränderungen in der Eph Rezeptoren Expression in einer Reihe von unterschiedlichen Karzinomtypen nachgewiesen werden (Easty *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999; Kiyokawa *et al.*, 1994; Andres *et al.*, 1994). Die Eph Rezeptoren sind also der Prototyp von RTKs, die keine unmittelbare Funktion in der Regulierung der Zellproliferation haben, sondern durch Interaktionen mit ihren nicht-löslichen Liganden die Zellmigration regulieren und so die Bildung von Organen und Geweben und damit von Organismen kontrollieren. Ob die Interaktion des FGFR4 mit Molekülen auf benachbarten Zellen auch Auswirkungen auf die Migration haben kann, muss aber noch weiter untersucht werden.

Eine weitere Funktion für die FGFR4 vermittelte Zelladhäsion ist auch bei der Steuerung der Apoptose (gesteuerter Zelltod) denkbar. Für den EGF Rezeptor konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Zelladhäsion an die ECM-Komponenten Fibronectin zu einer Stimulierung der Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors führt, und dadurch die Zellen vor Apoptose geschützt werden. Der Einsatz von antagonistischen Antikörpern, die gegen die Integrin-Untereinheiten αv und $\beta 3$ gerichtet sind, inhibiert die EGFR Aktivierung. Die Stimulierung des EGFR wird also auch durch Integrine vermittelt (Moro *et al.*, 1998). Dieses funktionelle Prinzip ist aber nicht nur auf den EGFR beschränkt, sondern auch andere RTK sind entweder an adhäsions-induzierten Signalwegen durch Interaktionen mit Integrinen beteiligt, oder aber ihre Stimulierbarkeit wird durch Wechselwirkungen mit aktivierten Integrinen erhöht. Zum

Beispiel wird die Stimulierbarkeit des PDGFR und des VEGFR-2 durch Blockierung der Integrine αv und $\beta 3$ deutlich reduziert (Schneller *et al.*, 1997; Soldi *et al.*, 1999). Es wäre also denkbar, dass der FGFR4 über das vorhandene Bindungsmotiv in seiner extrazellulären Domäne mit spezifischen Integrinen zusammenwirken kann. Allerdings muss diese Hypothese erst in weiteren Experimenten bewiesen werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK) FGFR4 (Fibroblast Growth Factor Rezeptor 4) in der Tumorentwicklung untersucht. Der FGFR4 besteht aus einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einer einspännigen Transmembrandomäne und einem intrazellulären Bereich, der neben zwei Kinasedomänen auch eine Reihe von Bindungsmotiven für Adapterproteine mit und ohne enzymatische Aktivität enthält. Die Tyrosinkinase Funktion des FGFR4 wird durch lösliche Liganden, die FGFs, stimuliert. Die häufig starke Aktivität des FGFR4 Gens in Tumorgeweben lässt eine Funktion des FGFR4 in der Tumorentwicklung vermuten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine Mutation in der Transmembrandomäne des FGFR4 nachgewiesen, die zu einem Austausch der hydrophoben Aminosäure Glycin gegen die hydrophile, stark geladene Aminosäure Arginin an Position 388 führt (Gly388Arg). Diese Mutation ist homolog zu der seltenen Glycin→Arginin Sequenzvariante im FGFR3, die die dominant autosomal vererbte Krankheit Achondroplasie verursacht. Genau wie diese handelt es sich bei FGFR4 Gly388Arg um eine Keimbahnmutation, die aber mit einer sehr hohen Allelfrequenz von 0.30 auftritt. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass FGFR4 Gly388Arg nicht an der initialen Tumorentstehung beteiligt ist, da die FGFR4 Allele eine vergleichbare Verteilung in Kontrollindividuen und Brustkarzinom Patienten aufweisen. Die Analyse der klinischen Patientendaten in Verbindung mit der FGFR4 Allel Verteilung ergab dagegen eine deutliche Überrepräsentanz von Trägern des Arg388 Allel in der Gruppe der Patienten mit Lymphknotenmetastasen und einer reduzierten rezidivfreien Überlebenszeit. Das FGFR4 Arg388 Allel ist also mit einer schlechten klinischen Prognose in Patienten mit Brustkarzinomen assoziiert. Dieses Ergebnis wird zusätzlich durch die erhöhte HER2 Expression in Patienten mit einem Arg388 Allel gestützt, die in zwei unabhängigen Studien gezeigt werden konnte. Darüber hinaus beschränkt sich die Beziehung zwischen dem neuen FGFR4 Arg388 Allel und einem schwereren klinischen Verlauf nicht nur auf Brustkarzinome, sondern wurde auch in Kolorektalenkarzinomen nachgewiesen. Diese Befunde demonstrieren, dass der FGFR4 und speziell das neue Arg388 Allel eine breite Bedeutung für die Tumorentwicklung bei Karzinomen hat.

Zusätzlich wurde unter Verwendung von gezielter Mutagenese untersucht, welche Bedeutung der geladenen Aminosäure Arginin in der Transmembrandomäne bei der Funktion des FGFR4 zukommt. Die Immunblot/Immundefektion Analysen des stimulierten FGFR4 Rezeptors zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Tyrosinkinaseaktivität zwischen

dem Wildtyprezeptor (Gly388) und der Rezeptormutante. Die *in vitro* Kinase Assays der MAP-Kinase ERK2, die nach FGFR4 Stimulierung in L6 Myoblasten aktiviert wird, bestätigen diese Ergebnisse. In der Fähigkeit zu migrieren, unterschieden sich Brustkrebszellen, die stabil den mutierten FGFR4 exprimierten, dagegen deutlich von vergleichbaren Zellen, die den Wildtyprezeptor exprimierten. Daneben ergab die cDNA Array Analyse in den oben genannten Brustkrebszelllinien unterschiedliche Expressionsstärken für eine Reihe von Genen, die in der Tumorentwicklung eine bedeutende Rolle spielen.

Des weiteren gelang es mit einem Fusionsprotein zwischen der extrazellulären FGFR4 Domäne und dem Glutathion-S-Transferase (GST) Protein eine ungewöhnliche Funktion des FGFR4 in der Zelladhäsion nachzuweisen. Nur wenige RTKs waren bis dahin als Vermittler von Zelladhäsion bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass verschiedene Zelltypen exklusiv auf Zellkulturplatten, die mit dem FGFR4-GST Fusionsprotein beschichtet sind, adherieren können. Im Gegensatz zu früheren Befunden ist dieser Prozess abhängig von zweiwertigen Kationen und kann nicht durch einen Überschuss von löslichen Heparin blockiert werden. Weiterhin konnten die spezifische Bindung von zwei Proteinen, deren Identität noch unbekannt ist, an das FGFR4-GST Fusionsprotein nachgewiesen werden, so dass von einer direkten Wechselwirkung zwischen der extrazellulären Domäne des FGFR4 mit weiteren Molekülen ausgegangen werden kann. Die Untersuchungen ergaben außerdem Hinweise auf eine Integrin-vermittelte Signalkette, die während der Adhäsion an FGFR4-GST induziert wird. Es wurde sowohl die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung der “Focal Adhesion Kinase” (FAK) als auch die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK2 und JNK gezeigt. Die hier erarbeiteten Daten ermöglichen also, eine Funktion des FGFR4 als morphoregulatorisches Protein zu diskutieren.

Darüberhinaus erlauben die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse erstmals eine Diskussion über die Funktion von Sequenzvarianten im FGFR4 in der humanen Pathogenese und insbesondere in der Tumorprogression. Sie zeigen, dass das vererbte FGFR4 Arg388 Allel mit einer schlechten klinischen Prognose in Brust- und Darmkrebs assoziiert ist und weisen auf einen Mechanismus hin, in dem der klinische Verlauf von Tumorerkrankungen durch vererbliche Parameter moduliert wird.

6. Literaturverzeichnis

Ahmed, N.U., Ueda, M., Ito, A., Ohashi, A., Funasaka, Y. & Ichihashi, M. Expression of fibroblast growth factor receptors in naevus-cell naevus and malignant melanoma. (1997) *Melanoma Res.* **7**, 299-305.

Armstrong, E., Partanen, J., Cannizzaro, L., Huebner, K. & Alitalo, K. Localization of the fibroblast growth factor receptor-4 gene to chromosome region 5q33-qter. (1992) *Genes Chromosomes Cancer.* **4**, 94-98.

Avraham, H., Park, S.Y., Schinkmann, K. & Avraham, S. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. (2000) *Cell Signal.* **12**, 123-133.

Aznavoorian, S., Murphy, A.N., Stetler-Stevenson, W.G. & Liotta, L.A. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. (1993) *Cancer.* **71**, 1368-1383

Bargmann, C.I., Hung, M.C. & Weinberg, R.A. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. (1986) *Cell.* **45**, 649-657.

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

Barinaga M. Receptors find work as guides. (1995) *Science.* **269**, 1668-1670.

Baasner, S., von Melchner, H., Klenner, T., Hilgard, P. & Beckers, T. Reversible tumorigenesis in mice by conditional expression of the HER2/c-erbB2 receptor tyrosine kinase. (1996) *Oncogene.* **13**, 901-911.

Behrens, J., Mareel, M.M., Van Roy, F.M. & Birchmeier, W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. (1989) *J Cell Biol.* **108**, 2435-2447.

Bell, C.A., Tynan, J.A., Hart, K.C., Meyer, A.N., Robertson, S.C. & Donoghue, D.J. Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the neu receptor tyrosine kinase. (2000) *Mol Biol Cell.* **11**, 3589-3599

Bellosta, P., Costa, M., Lin, D.A. & Basilico, C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. (1995) *Mol Cell Biol.* **15**, 614-625.

Bugler, B., Amalric, F. & Prats, H. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. (1991) *Mol Cell Biol.* **11**, 573-577.

Burgess, W.H., Dionne, C.A., Kaplow, J., Mudd, R., Friesel, R., Zilberstein, A., Schlessinger, J. & Jaye, M. Characterization and cDNA cloning of phospholipase C-gamma, a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. (1990) *Mol Cell Biol.* **10**, 4770-4777.

Burgess, W.H. & Maciag, T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. (1989) *Annu Rev Biochem.* **58**, 575-606.

Bredel, M., Pollack, I.F., Campbell, J.W. & Hamilton, R.L. Basic fibroblast growth factor expression as a predictor of prognosis in pediatric high-grade gliomas. (1997) *Clin Cancer Res.* **3**, 2157-2164.

Brookes, A.J. The essence of SNPs. (1999) *Gene.* **234**, 177-186.

Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. & Radvanyi, F. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. (1999) *Nat Genet.* **23**, 18-20

Cavallaro, U., Niedermeyer, J., Fuxa, M. & Christofori G. N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signaling (2001) *Nat Cell Biol* **3**, 650-657.

Chauhan, D., Hideshima, T., Pandey, P., Treon, S., Teoh, G., Raje, N., Rosen, S., Krett, N., Husson, H., Avraham, S., Kharbanda, S. & Anderson, K.C. RAFTK/PYK2-dependent and -independent apoptosis in multiple myeloma cells. (1999) *Oncogene.* **18**, 6733-6740

Chiesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. (1997) *Nat Genet.* **16**, 260-264.

Chen, W.C. & Obrink, B. Cell-cell contacts mediated by E-cadherin (uvomorulin) restrict invasive behavior of L-cells. (1991) *J Cell Biol.* **114**; 319-327.

Chung, C.T. & Miller, R.H. Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. (1993) *Methods Enzymol.* **218**, 621-7.

Colomer, R., Aparicio, J., Montero, S., Guzman, C., Larrodera, L. & Cortes-Funes, H. Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma. (1997) *Br J Cancer.* **76**, 1215-12120.

Clark, E.A. & Brugge, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. (1995) *Science.* **268**, 233-239.

Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S. & Hynes, R.O. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. (2000) *Nature.* **406**, 532-535.

Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A. & Ullrich, A. Tyrosine Kinase Receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. (1985) *Science* **230**, 1132-1139

Cresson, D.H., Beckman, W.C., Tidwell, R.R., Geratz, J.D. & Siegal, G.P. In vitro inhibition of human sarcoma cells' invasive ability by bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)methane a novel esteroprotease inhibitor. (1986) *Am J Pathol.* **123**, 46-56.

- Danen, E.H., Lafrenie, R.M., Miyamoto, S. & Yamada, K.M. Integrin signaling: cytoskeletal complexes, MAP kinase activation, and regulation of gene expression. (1998) *Cell Adhes Commun.* **6**, 217-224.
- Deng, C.X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M.M., Daugherty, C., Ornitz, D.M. & Leder, P. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. (1994) *Genes Dev.* **24**, 3045-3057.
- Dhanasekaran, D.J. & Reddy, E.P. Signaling by dual specificity kinases (1998) *Oncogene.* **17**, 1447-1455
- DiGabriele, A.D., Lax, I., Chen, D.I., Svahn, C.M., Jaye, M., Schlessinger, J. & Hendrickson, W.A. Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor. (1998) *Nature.* **393**, 812-817
- Dionne, C.A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J.M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W.H., Jaye, M. & Schlessinger, J. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. (1990) *EMBO J* **9**, 2685-2692
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R. & Aaronson, S.A. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. (1987) *Science.* **237**, 178-182.
- Doherty, P., Robinson, E. & Walsh, F.S. Analysis of PC12 cell adhesion to muscle and non-muscle cells and components of the extracellular matrix. (1988) *Exp Cell Res.* **179**, 233-242.
- Downward, J. Cell cycle: routine role for Ras. (1997) *Curr Biol.* **7**, 258-260.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. & Trent, J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. (1999) *Nat Genet* **21**, (1 Suppl), 10-14.
- Edery, P., Eng, C., Munnich, A. & Lyonnet, S. RET in human development and oncogenesis. (1997) *Bioessays.* **19**, 389-395
- Evans, W.E. & Relling, M.V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. (1999) *Science.* **286**, 487-91.
- Esparza, J., Vilardell, C., Calvo, J., Juan, M., Vives, J., Urbano-Marquez, A., Yague, J. & Cid, M.C. Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. (1999) *Blood.* **94**, 2754-2766.
- Fedi, P., Tronick, S.R. & Aaronson, S.A. Growth factors in cancer medicine. Holland J.F., Bast, D.L., Morton, E., Frei, E., Kufe D.W. & Weichselbaum, R.R. eds. pp. 41-64
- Feng, S., Wang, F., Matsubara, A., Kan, M. & McKeehan, W.L. Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. (1997) *Cancer Res.* **57**, 5369-5378.

- Fleming, T.P., Saxena, A., Clark, W.C., Robertson, J.T., Oldfield, E.H., Aaronson, S.A. & Ali, I.U. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. (1992) *Cancer Res.* **52**, 4550-4553
- Folkman, J. & Klagsbrun, M. Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. (1987) *Nature.* **329**, 671-672
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D. & Aaronson, S.A. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. (1989) *Science* **245**, 752-5
- Fridell, Y.W., Jin, Y., Quilliam, L.A., Burchert, A., McCloskey, P., Spizz, G., Varnum, B., Der, C. & Liu, ET. Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. (1996) *Mol Cell Biol.* **16**, 135-145
- Friedl, P., Noble, P.B., Walton, P.A., Laird, D.W., Chauvin, P.J., Tabah, R.J., Black, M. & Zanker, K.S. Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. (1995) *Cancer Res.* **55**, 4557-4560.
- Frisen, J., Holmberg, J. & Barbacid, M. Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development. (1999) *EMBO J.* **18**, 5159-5165.
- Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D. & Birchmeier, W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. (1991) *J Cell Biol.* **113**, 173-185.
- Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y., et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. (1994) *Science.* **266**, 120-122
- Gao, G. & Goldfarb, M. Heparin can activate a receptor tyrosine kinase. (1995) *EMBO J.* **14**, 2183-2190.
- Ghosh, A.K., Shankar, D.B., Shackelford, G.M., Wu, K., T'Ang, A., Miller, G.J., Zheng, J. & Roy-Burman, P. Molecular cloning and characterization of human FGF8 alternative messenger RNA forms. (1996) *Cell Growth Differ.* **7**, 1425-1434.
- Giri, D., Ropiquet, F. & Ittmann, M.R. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. (1999) *Clin Cancer Res.* **5**, 1063-1071.
- Goldfarb, M., Deed, R., MacAllan, D., Walther, W., Dickson, C. & Peters, G. Cell transformation by Int-2 a member of the fibroblast growth factor family. (1991) *Oncogene.* **6**, 65-71.
- Greenfield, C., Hiles, I., Waterfield, M.D., Federwisch, M., Wollmer, A., Blundell, T.L. & McDonald, N. Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. (1989) *EMBO J.* **20**, 4115-4123.
- Gullick, W.J. A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two. (1994) *Eur J Cancer.* **30**, 2186

- Halushka, M.K., Fan, J.B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R. & Chakravarti, A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. (1999) *Nat Genet.* **22**, 239-247
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. (2000) *Cell.* **7**, 57-70.
- Hanks, S.K. & Polte, T.R. Signaling through focal adhesion kinase. (1997) *Bioessays.* **19**, 137-45.
- Hattori, M. Osterfield, M. & Flanagan J.G. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. (2000) *Science.* **289**, 1360-1365
- Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. & Westermark, B. & Nister, M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messengerRNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. (1992) *Cancer Res.* **52**, 3213-3219.
- Holgado-Madruga, M., Emllet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K. & Wong, A.J. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. (1996) *Nature.* **379**, 560-564.
- Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., Shimbo, T. & Suthanthiran, M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism.(1999) *Nature* **397**, 530-534
- Hughes, S.E. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. (1997) *J Histochem Cytochem.* **45**, 1005-1019.
- Hughes, S.E. Localisation and differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal and atherosclerotic human arteries. (1996) *Cardiovasc Res.* **32**, 557-569.
- Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. (1995) *Cell* **80**, 225-236
- Hunter ,T. & Sefton B.M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. (1980) *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1311-1315
- Imamura, T., Engleka, K., Zhan, X., Tokita, Y., Forough, R., Roeder, D., Jackson, A., Maier, J.A., Hla, T., & Maciag, T. Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. (1990) *Science.* **249**, 1567-1570
- Jaye, M., Howk, R., Burgess, W., Ricca, G.A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T. & Drohan, W.N. Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. (1986) *Science.* **233**, 541-545.

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

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

Johnston, C.L., Cox, H.C., Gomm, J.J. & Coombes, R.C. bFGF and aFGF induce membrane ruffling in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells: FGFR-4 involvement. (1995) *Biochem J.* **306**, 609-616.

Kavanaugh, W.M., Turck, C.W. & Williams, L.T. PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. (1995) *Science.* **268**, 1177-1179

Keegan, K., Johnson, D.E. Williams, L.T. & Hayman, M.J. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**,1095-1099

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. (1996) *Cell.* **18**, 159-170.

Korah, R.M., Sysounthone, V., Golowa, Y. & Wieder, R. Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. (2000) *Cancer Res.* **60**, 733-740.

Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I. & Schlessinger, J. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. (1997) *Cell.* **89**, 693-702.

Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. & Aaronson, S.A. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9193-9197

Kunkel, T. The mutational specificity of DNA polymerase-beta during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations. (1985) *J Biol Chem.***260**,787-76.

Lee, S.Y. & Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. (1990) *Biotechniques.* **9**, 676-679.

Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, Hughes CM, Smith P, Dublin E, Prigent SA, Gullick WJ, Hurst HC. Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. (1992) *Br J Cancer.* **66**, 11621-11626

Li, Y., Basilico, C. & Mansukhani. A. Cell transformation by fibroblast growth factors can be suppressed by truncated fibroblast growth factor receptors. (1994) *Mol Cell Biol.* **14**, 7660-7669

Linder, M.W., Prough, R.A. & Valdes, R Jr. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. (1997) *Clin Chem.* **43**, 254-266.

Lin, R.Y., Argenta, P.A., Sullivan, K.M. & Adzick, N.S. Diagnostic and prognostic role of basic fibroblast growth factor in Wilms' tumor patients. (1995) *Clin Cancer Res.* **1**, 327-331.

Lipfert, L., Haimovich, B., Schaller, M.D., Cobb, B.S., Parsons, J.T. & Brugge, J.S. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. (1992) *J Cell Biol.* **119**, 905-912.

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

Malarkey, K., Belham, C.M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P.H. & Plevin, R. The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. (1995) *Biochem J* **309**, 361-375

Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S. Mervic, M. Lyall, R. Levitzki, A. Ullrich, A Zilberstein, A. & Schlessinger, J. (1989) EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell* **57**, 1101-1117

Margolis, B., Bellot, F., Honegger, A.M., Ullrich, A., Schlessinger, J. & Zilberstein, A. Tyrosine kinase activity is essential for the association of phospholipase C-gamma with the epidermal factor receptor. (1990) *Mol Cell Biol* **10**, 435-441

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., *et al.* Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. (1995) *Science.* **268**, 1336-1338

Mayer, B.J. & Baltimore, D. Signaling through SH2 and SH3 domains. (1993) *Trends Cell Biol.* **3**, 8-13

McCloskey, P., Fridell, Y.W., Attar, E., Villa, J., Jin, Y., Varnum, B. & Liu, E.T. GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. (1997) *J Biol Chem.* **272**, 23285-23291.

Messing J. New M13 vectors for cloning. (1983) *Methods Enzymol.* **101**, 20-78.

Miloso, M., Mazzotti, M., Vass, W.C. & Beguinot, L. SHC and GRB-2 are constitutively activated by an epidermal growth factor receptor with a point mutation in the transmembrane domain. (1995) *J Biol Chem.* **270**, 19557-19562.

Monsonigo-Ornan, E., Adar, R., Feferman, T., Segev, O. & Yayon, A. The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. (2000) *Mol Cell Biol.* **20**, 516-522.

Morin, P.J. beta-catenin signaling and cancer. (1999) *Bioessays.* **21**, 1021-1030

Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G. & Defilippi, P. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. (1998) *EMBO J.* 1998 **17**, 6622-6632.

- Morrison, D.K. & Cutler, R.E. The complexity of Raf-1 regulation. (1997) *Curr Opin Cell Biol.* **9**, 174-179.
- Morrison, R.S., Yamaguchi, F., Saya, H., Bruner, J.M., Yahanda, A.M., Donehower, L.A. & Berger, M. Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I are implicated in the growth of human astrocytomas. (1994) *J Neurooncol.* **18**, 207-216.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. (1983) *J Immunol Methods.* **65**, 55-63
- Muenke, M. & Schell, U. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. (1995) *Trends Genet.* **11**, 308-313.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. (1987) *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Neal, D.E., Sharples, L., Smith, K., Fennelly, J., Hall, R.R. & Harris, A.L. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of Cancer. (1999) *Cancer* **65**, 1619-1625.
- Nicholson, S., Richard, J., Sainsbury, C., Halcrow, P., Kelly, P., Angus, B., Wright, C., Henry, J., Farndon, J.R. & Harris, A.L. Epidermal growth factor receptor (EGFr); results of a 6 year follow-up study in operable breastcancer with emphasis on the node negative subgroup. (1991) *Br J Cancer.* **63**, 146-150.
- Oktay, M., Wary, K.K., Dans, M., Birge, R.B. & Giancotti, F.G. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. (1999) *J Cell Biol* **145**, 1461-1469.
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G & Goldfarb, M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. (1996) *J Biol Chem* **271**, 15292-15297
- Partanen, J., Makela, T.P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson-Welsh, L. & Alitalo, K. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. (1991) *EMBO J* **10**, 1347-1354
- Pawson, T. Protein modules and signalling networks. (1995) *Nature.* **373**, 573-580.
- Perl AK, Dahl U, Wilgenbus P, Cremer H, Semb H, Christofori G. Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells. (1999) *Nat Med.* **5**, 286-291.
- Peters, G., Lee, A.E. & Dickson C. Concerted activation of two potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumour virus. (1986) *Nature* **320**, 628-631
- Pierce, J.H., Arnstein, P., DiMarco, E., Artrip, J., Kraus, M.H., Lonardo, F., Di Fiore, P.P. & Aaronson, S.A. Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells. (1991) *Oncogene* **6**, 1189-1194

- Pilcher, B.K., Dumin, J.A., Sudbeck, B.D., Krane, S.M., Welgus, H.G. & Parks, W.C. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. (1997) *J Cell Biol.* **137**, 1445-1457.
- Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J. & Mohammadi, M. Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. (1999) *Cell.* **101**, 413-424.
- Plowman, G.D., Ullrich, A. & Shawver L.K. Receptor tyrosine kinases as targets for drug intervention (1994) *Drug News & Perspectives* **7**, 334-339.
- Ponton, A., Coulombe, B. & Skup, D. Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity. (1991) *Cancer Res.* **51**, 2138-2143.
- Prigent, S.A. & Lemoine, N.R. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. (1992) *Prog Growth Factor Res.* **4**, 1-24.
- Rescigno, J., Mansukhani, A. & Basilico, C. A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. (1991) *Oncogene.* **6**, 1909-1913
- Richard, C., Liuzzo, J.P. & Moscatelli, D. Fibroblast growth factor-2 can mediate cell attachment by linking receptors and heparan sulfate proteoglycans on neighboring cells. (1995) *J Biol Chem.* **270**, 24188-24196.
- Richard, C., Roghani, M. & Moscatelli, D. Fibroblast growth factor (FGF)-2 mediates cell attachment through interactions with two FGF receptor-1 isoforms and extracellular matrix or cell-associated heparan sulfate proteoglycans. (2000) *Biochem Biophys Res Commun.* **276**, 399-405.
- Robinson, M.J. & Cobb, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. (1997) *Curr Opin Cell Biol.* **9**, 180-186.
- Rusch, V.W., Albain, K.S., Crowley, J.J., Rice, T.W., Lonchyna, V., McKenna, R., Jr., Livingston, R.B., Griffin, B.R. & Benfield, J.R. Surgical resection of stage IIIA and stage IIIB non-small-cell lung cancer after concurrent induction chemoradiotherapy. A Southwest Oncology Group trial. (1993) *J Thorac Cardiovasc Surg.* **105**, 97-104.
- Salven, P., Teerenhovi, L. & Joensuu, H. A high pretreatment serum basic fibroblast growth factor concentration is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. (1999) *Blood.* **94**, 3334-3339.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T. & van der Geer, P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. (1994) *Nature.* **372**, 786-791.
- Schlessinger, J., Lax, I. & Lemmon, M. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? (1995) *Cell.* **83**, 357-360.

- Schneller, M., Vuori, K. & Ruoslahti, E. Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. (1997) *EMBO J.* **16**, 5600-5607
- Segatto, O., King, C.R., Pierce, J.H., Di Fiore, P.P. & Aaronson, S.A. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. (1988) *Mol Cell Biol.* **8**, 5570-5574.
- Shaoul, E., Reich-Slotky, R., Berman, B. & Ron, D. Fibroblast growth factor receptors display both common and distinct signaling pathways. (1995) *Oncogene.* **10**, 1553-1561.
- Shima, I., Sasaguri, Y., Kusukawa, J., Yamana, H., Fujita, H., Kakegawa, T. & Morimatsu, M. Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behavior of esophageal carcinoma. A clinicopathologic study. (1992) *Cancer* **70**, 2747-2753.
- Shingu, K., Fujimori, M., Ito, K., Hama, Y., Kasuga, Y., Kobayashi, S., Itoh, N. & Amano J. Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 in thyroid diseases: difference between neoplasms and hyperplastic lesions. (1998) *Endocr J.* **45**, 35-43.
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G. & Bussolino, F. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. (1999) *EMBO J.* **18**, 882-892
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., et al. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.* **72**, 767-778.
- Sorkin, A., Helin, K., Waters, C.M., Carpenter, G. & Beguinot, L. Multiple autophosphorylation sites of the epidermal growth factor receptor are essential for receptor kinase activity and internalization. Contrasting significance of tyrosine 992 in the native and truncated receptors. (1992) *J Biol Chem.* **267**, 8672-8678.
- Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. & Lax, I. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. (1994) *Cell.* **79**, 1015-1024.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. (1989) *Science.* **244**, 707-712.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. (1987) *Science.* **235**, 177-182.
- Staatz, W.D., Fok, K.F., Zutter, M.M., Adams, S.P., Rodriguez, B.A. & Santoro, S.A. Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen. (1991) *J Biol Chem.* **266**, 7363-7367.

Stamp, G., Fantl, V., Poulsom, R., Jamieson, S., Smith R, Peters G, Dickson C. Nonuniform expression of a mouse mammary tumor virus-driven int-2/Fgf-3 transgene in pregnancy-responsive breast tumors. (1992) *Cell Growth Differ.* **3**, 929-938.

Stark, K.L., McMahon, J.A. & McMahon, A.P. FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse. (1991) *Development.* **113**, 641-651.

Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. & Liotta, L.A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. (1993) *Annu Rev Cell Biol.* **9**, 541-573

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

Stupack, D.G., Cho, S.Y. & Klemke, R.L. Molecular signaling mechanisms of cell migration and invasion. (2000) *Immunol Res.* **21**, 83-88.

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

Taira, M., Yoshida, T., Miyagawa, K., Sakamoto, H., Terada, M. & Sugimura, T. cDNA sequence of human transforming gene hst and identification of the coding sequence required for transforming activity. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2980-2984

Takahashi, J.A., Fukumoto, M., Igarashi, K., Oda, Y., Kikuchi, H. & Hatanaka, M. Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas. (1992) *J Neurosurg* **76**, 792-798.

Takahashi, J.A., Suzui, H., Yasuda, Y., Ito, N., Ohta, M., Jaye, M., Fukumoto, M., Oda, Y., Kikuchi, H. & Hatanaka, M. Gene expression of fibroblast growth factor receptors in the tissues of human gliomas and meningiomas. (1991) *Biochem Biophys Res Commun.* **177**, 1-7

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

Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Kaneko, S. & Sugimachi, K. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. (1990) *Cancer Res.* **50**, 7077-7080.

Taylor, J.A., Hirvonen, A., Watson, M., Pittman, G., Mohler, J.L. & Bell, D.A. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. (1996) *Cancer Res* **56**, 4108-4110

Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J.D., Klapper, L.N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B.J., Sela, M., Andrews, G.C. & Yarden, Y. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. (1997) *EMBO J.* **16**, 4938-50.

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

- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. (1984) *Nature* **309**, 418-425
- Vainikka, S., Joukov, V., Wennstrom, S., Bergman, M., Pelicci, P.G. & Alitalo, K. Signal transduction by fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4). Comparison with FGFR-1. (1994) *J Biol Chem.* **269**. 18320-18326.
- van der Geer, P., Hunter, T & Lindberg, R.A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. (1994) *Annu Rev Cell Biol* **10**, 251-337
- van der Geer, P. & Pawson, T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. (1995) *Trends Biochem Sci.* **20**, 277-280.
- van Heumen WR, Claxton C, Pickles JO Fibroblast growth factor receptor-4 splice variants cause deletion of a critical tyrosine. (1999) *IUBMB Life* **48**, 73-78
- Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F. & Pawson, T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. (1997) *Mol Cell.* **1**, 13-23.
- Wallasch, C., Weiss, F.U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W. & Ullrich, A. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. (1995) *EMBO J.* **14**, 4267-4275
- Wang, J.K. & Goldfarb, M. Amino acid residues which distinguish the mitogenic potentials of two FGF receptors. (1997) *Oncogene.* **14**, 1767-1778.
- Wang, J.K., Xu, H., Li, H.C. & Goldfarb, M. Broadly expressed SNT-like proteins link FGF receptor stimulation to activators of Ras. (1996) *Oncogene.* **13**, 721-729.
- Warrington, J.A., Bailey, S.K., Armstrong, E., Aprelikova, O., Alitalo, K., Dolganov, G.M., Wilcox, A.S., Sikela, J.M., Wolfe, S.F., Lovett, M., et al., A radiation hybrid map of 18 growth factor, growth factor receptor, hormone receptor, or neurotransmitter receptor genes on the distal region of the long arm of chromosome 5. (1992) *Genomics.* **13**, 803-808.
- Webster, M.K. & Donoghue, D.J. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. (1996) *EMBO J.* **15**, 520-527.
- Webster, M.K. & Donoghue, D.J. FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. (1997) *Trends Genet.* **13**, 178-182.
- Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K. & Deng, C.X. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. (1998) *Development.* **125**, 3615-3623.
- Wilkie, A.O., Morriss-Kay, G.M., Jones, E.Y. & Heath, J.K. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. (1995) *Curr Biol.* **5**, 500-507

- Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S. & Doherty, P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. (1994) *Neuron*. **13**, 583-94.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. & Micklem, G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. (1995) *Nature*. **378**, 789-792.
- Xie, M.H., Holcomb, I., Deuel, B., Dowd, P., Huang, A., Vagts, A., Foster, J., Liang, J., Brush, J., Gu, Q., Hillan, K., Goddard, A. & Gurney, A.L. FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. (1999) *Cytokine*. **11**, 729-35
- Yamaguchi, T.P., Harpal, K., Henkemeyer, M. & Rossant, J. fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. (1994) *Genes Dev*. **8**, 3032-3044.
- Yarden, Y. & Ullrich, A. Growth factor receptor tyrosine kinases. (1988) *Annu Rev Biochem* **57**, 443-478
- Yarden Y. & Schlessinger, J. Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. (1987) *Biochemistry*. **26**, 1443-1451.
- Yarden, Y. & Schlessinger, J. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. (1987) *Biochemistry*. **26**, 1434-1442
- Yiangou, C., Gomm, J.J. Coope, R.C., Law, M., Luqmani, Y.A., Shousha, S., Coombes, R.C. & Johnston, C.L. Fibroblast growth factor 2 in breast cancer: occurrence and prognostic significance. (1997) *Br J Cancer*. **75**, 28-33.
- Yoshimura, N., Sano, H., Hashiramoto, A., Yamada, R., Nakajima, H., Kondo, M. & Oka, T. The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. (1998) *Clin Immunol Immunopathol*. **89**, 28-34
- Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R.B., Weinstein, M., Deng, C.X. & McKeehan, W.L. Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. (2000) *J Biol Chem*. **275**, 15482-15489.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. & Schreiber, S.L. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. (1994) *Cell*. **76**, 933-945
- Zhan, X., Bates, B., Hu, X.G. & Goldfarb, M. The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. (1988) *Mol Cell Biol*. **8**, 3487-3495.
- Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H., Reed, J.C. & Ruoslahti, E. Integrin activation by R-ras. (1996) *Cell* **85**, 61-69.

7. Abkürzungen

'	Minute
''	Sekunde
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAM	Cell Adhesion Molecule
cDNA	komplementäre DNA
CHD	CAM Homology Domain
CTP	Cytosintri-phosphat
Da	Dalton (relative Molmasse)
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
d. AG	diese Arbeitsgruppe
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds DNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular regulated kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
Gab1	Grb2-associated binder-1
GDP	Guanosindiphosphat
Gly	Glycin
GPCR	G protein-coupled receptor
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

7. Abkürzungen

HER	humaner EGFR
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
IG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-jun N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kCl	Kaliumchlorid
M	molar (Mole pro Liter)
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MEK	MAP/ERK Kinase
Min	Minute
mRNA	messenger RNA
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) zur Analyse
p. a.	Phosphat-gepufferte Saline
PBS	Polymerase Kettenreaktion
PCR	Restriktions-Fragment-Längen- Polymorphismus
PCR-RFLP	Platelet-derived growth factor
PDGF	Polyethylenglykol
PEG	Pleckstrin Homologie Domäne
PH-Domäne	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI 3-Kinase	Phospholipase C
PLC	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PMSF	Phosphotyrosine binding
PTB	Protein-Tyrosinphosphatase(n)
PTP(n)	Ribonukleinsäure
RNA	Umdrehungen pro Minute
rpm	Raumtemperatur
RT	Rezeptortyrosinkinase(n)
RTK(n)	Natriumdodecylsulfat
SDS	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SDS-PAGE	(Src homology 2 domain-containing) transforming protein 1
SHC	Src Homologie 2,3 Domäne
SH2,3-Domäne	Single Nucleotide Polymorphism
SNP	sucl-associated neurotrophic factor target
SNT-1	Son of sevenless
Sos	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEMED	Transforming Growth Factor
TGF	Transmembrandomäne
TMD	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris	Thymintriphosphat
TTP	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
Tween 20	Enzymsaktivitätseinheit (Unit)
U	

7. Abkürzungen

u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro (Gesamt-)Volumen
w/v	Masse pro (Gesamt-)Volumen
w/w	Masse pro (Gesamt-)Masse
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Name: Johannes Bange
Geburtsdatum: 6. Februar 1969
Geburtsort: Köln
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Adresse: Fasanenweg 2
80261 Neuried

Schulausbildung:

1975 – 1979: Kath. Grundschule Refrath
1979 – 1988: Kaiserin-Theophanou-Schule, Köln – allg.
Hochschulreife 1988

Wehrdienst:

10/88 – 12/89 Sanitäter im 7. Panzeraufklärungsbatallion, Augustdorf

Praktikum:

2/90 – 8/90: Praktikum im molekularbiologischen Labor der Madaus AG, Köln

Akademische Ausbildung:

11/90 – 4/93: Studium der Chemie an der Julius-Maximilian-Universität, Würzburg
Vordiplom in Chemie (Organische Chemie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie)
6/93 – 9/93: Bioorganisches Praktikum im Labor für Biorganik der Universität
Bristol, England
10/93 – 6/96: Studium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i.
Breisgau, Diplom in Chemie (Organische Chemie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie, Hauptfach: Biochemie)

- 10/95 – 6/96: Diplomarbeit am Institut für Biochemie and Molekularbiologie der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Breisgau
Abteilung Prof. Dr. Maximilian Tropschug:
„Zur Isolierung der Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Protein-Phosphatase 2B (Calcineurin) aus *Neurospora crassa* und zur Charakterisierung ihrer regulatorischen Untereinheit“
- 11/96 - Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Abteilung für Molekularbiologie, Prof. Dr. Axel Ullrich
„Untersuchungen zur Funktion der Rezeptor Tyrosin Kinase FGFR4 in der Tumorentwicklung“
- 5/99 – 10/99 Gewerblicher Rechtsschutz (Patent-, Gebrauchsmuster-, Markenrecht, Datenbankrecherche) – Seminar Ludwig-Maximilians-Universität, München, Patentanwalt Dr. Stefan Michalsky

Präsentationen:

- 12/98: Graduiertenkolleg „Molekulare und zelluläre Mechanismen der Pathogenese“
A new missense mutation in the FGF-Receptor 4 gene is associated with reduced disease free survival in breast cancer.
- 1/99: Statusseminar der Dechema “Chiptechnologie für DNA-Diagnostik und Sequenzanalyse in Deutschland“; Therapeutic Target Identification in Mammary Carcinoma by Gene Family Focussed cDNA Array Hybridization Analysis
- 6/00: 16th Annual Meeting “Oncogenes and Tumor Suppressors”, Salk Institute, La Jolla
Therapeutic Target Identification in Mammary Carcinoma by Gene Family Focussed cDNA Array Hybridization Analysis
- 10/00: GBM Herbsttagung München
- 11/00: EMBO Kurs, “cDNA Arrays: Applications and Data Analysis”, EMBL, Heidelberg
- 11/00: BIOLOG 99: 2. Münchner Studentenkongress für Biowissenschaften

Patente / Publikationen:

Bange, J., Knyzav, P. & Ullrich A. Use of inhibitors for the treatment of disorders related to rtk hyperfunction, especially cancer. Patent: DE198002377, WO99/37299

Bange J., Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. (2001) *Nature Medicine* 7, 548-552 (Übersichtsartikel).

Zwick, E., Bange, J. & Ullrich, A. Receptor Tyrosine Kinase Signaling as Targets for Cancer Intervention Strategies. (2001) *Endocrine related Cancer*, 8, 161-73. (Übersichtsartikel)

Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. (2002) *Trends Mol Med.* 8, 17-23. (Übersichtsartikel)

Bange, J., Prechtel, D., Harbeck, N., Schmitt, M., Cherburkin, Y., Specht, K., Knayzev, P., Knayzeva, T., Gärtner, S., Sures, I., Imyanitov, E., Häring, H.U., Iacobelli, S., Höfler, H. & Ullrich, A. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg388 allele. (2002) *Cancer Res.* 62, 840-847.

Nachwort

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

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für sein großes Interesse und seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die besonderen Freiräume und für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen danken. Sehr herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Domdey für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität zu betreuen. Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus danke ich ganz herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich natürlich bei meinen Eltern, die mich während all der Jahre jederzeit unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Irmi Sures für ihre Einführung in die „wunderbare Welt der Molekularbiologie“, Sylvia Gärtner, Tatjana Knyazeva, Yuri Cherburkin, Pjotr Knyazev und an Herrn Dr. Dieter Prechtel, der mit pathologischem Rat zur Seite stand.

Ein weiteres Dankeschön an „Ullrichs Labcrew“ Jan, Marc, G-Punkt, Kunkel, Oliver, Reimar, Bea 1 und 2, Marta, Andy 1 und 2, Sylvia, Charly, Peter, Esther, Susanne, Renate, Markus, Lars, Martin, Christian, Norbert, Karsten, Jens, Stefan, Christoph, Christiane, Anil, Tina, Michael und Miriam für viele gute Stunden im Labor, für die vielen fruchtbaren Diskussionen, guten Ratschläge und natürlich für viele unvergessliche Feste. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Renate Gautsch und Uta Eichelsbacher.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meiner Frau Susanne und meinen zwei Kindern Lukas und Hannah bedanken, die so manchen verpassten Sonntagsausflug akzeptieren mussten.

Allen Freunden und Verwandten, insbesondere meine Geschwistern, möchte ich für die nie endende Unterstützung danken.