

**Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität zu Lübeck**  
Direktor: Prof. Dr. med. S. Perner

# **Die Rolle der Rezeptortyrosinkinasen AXL und FGFR3 in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Hannah Stefanie Billig  
aus Bonn  
Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sven Perner

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Armin Steffen

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.06.2019

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis .....	3
2	Vorabveröffentlichung von Ergebnissen .....	5
3	Abkürzungsverzeichnis .....	6
4	Einleitung .....	8
4.1	Tumore im HNO-Bereich .....	8
4.1.1	Pathogenese der Tumore im HNO-Bereich.....	9
4.2	Rezeptortyrosinkinasen .....	13
4.2.1	Rezeptortyrosinkinasen als therapeutische Zielstrukturen .....	14
4.2.2	AXL .....	15
4.2.3	FGFR3 .....	18
4.3	Zielsetzung .....	22
5	Material .....	23
5.1	Geräte und Software .....	23
5.2	Verbrauchsmaterialien.....	23
5.3	Chemikalien und Reagenzien.....	24
5.4	Reaktionskits .....	26
5.5	Puffer und Lösungen .....	26
5.6	Medien für die Zellkultur .....	28
5.7	Antikörper .....	28
5.8	Zelllinien .....	29
5.9	Patientenkollektiv.....	29
6	Methoden.....	30
6.1	Immunhistochemische Färbung.....	30
6.2	Kultivieren von Zellen .....	30
6.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	31
6.4	Bestimmung der Zellzahl .....	31
6.5	Herstellung von AXL-überexprimierenden Zellen .....	31
6.6	Zellproliferationsassay.....	31

6.7	Migrations- und Invasions-Assays .....	32
6.8	Proteinextraktion und -bestimmung .....	32
6.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Transfer auf eine PVDF-Membran.....	33
6.10	Statistiken.....	33
7	Ergebnisse.....	34
7.1	AXL.....	34
7.1.1	Immunhistochemische Färbung .....	34
7.1.2	Die Funktion von AXL in der Tumorprogression.....	38
7.1.3	Inhibition von AXL in HNSCC.....	39
7.2	FGFR3.....	41
7.2.1	Immunhistochemische Färbung .....	41
8	Diskussion .....	46
8.1	AXL.....	46
8.2	FGFR3.....	49
9	Zusammenfassung .....	53
10	Literaturverzeichnis.....	54
11	Abbildungsverzeichnis .....	64
12	Tabellenverzeichnis .....	64
13	Anhang .....	66
13.1	Tabellen.....	66
14	Danksagung.....	70
15	Lebenslauf.....	72

## 2 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Die Ergebnisse dieser Arbeit finden sich in den folgenden Publikationen wieder:

von Mässenhausen A<sup>†</sup>, Brägelmann J<sup>†</sup>, Billig H<sup>†</sup>, Thewes B, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Brossart P, Kirfel J, Perner S.

"Implication of the Receptor Tyrosine Kinase AXL in Head and Neck Cancer Progression."

International Journal of Molecular Sciences (IF: 3,226). 2016 Dez; 18(7): pii: E7

<sup>†</sup> trugen in gleichem Maße zu der Arbeit bei

Inhalte dieses Artikels finden sich im Abschnitt 6, 7.1 sowie 8.1 wieder.

von Mässenhausen A, Deng M, Billig H, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Göke F, Franzen A, Heasley L, Kirfel J, Brägelmann J, Perner S.

"Evaluation of FGFR3 as a Therapeutic Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma."

Targeted Oncology (IF: 3,438). 2016 Oct;11(5): 631-642.

Inhalte dieses Artikels finden sich im Abschnitt 6, 7.2 sowie 8.2 wieder.

Auf die Vorabveröffentlichungen wird an entsprechenden Stellen nicht mehr hingewiesen.

### 3 Abkürzungsverzeichnis

(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar
AKT	Protein kinase B
AXL	AXL receptor tyrosine kinase
CCND1	Cyclin D1
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E6/E7	Protein E6/E7
EGFR	Epidermal growth factor receptor
et al.	et alii
FBS	Fötale Bovines Serum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
g	Erdbeschleunigung
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunden
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papilloma Virus
HR	Hazard ratio
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
kDA	Kilodalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
min	Minuten
ml	Milliliter
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MTT	Thiazolyl-Blau-Tetrazolium-Bromid
n	Number
nm	Nanometer
NSCLC	Non small cell lung cancer
OSCC	Oral squamous cell carcinoma

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAS	Rat sarcoma
RB	Retinoblastom
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.	siehe
S.	Seite
SD	Standard Abweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SI	Färbeintensität
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TACC3	Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein 3
TAM	TYRO3 AXL MER
TCGA	The cancer genome atlas research network
TMA	Tissue microarray
TP53	Tumor protein 53
UICC	Union internationale contre le cancer
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

## 4 Einleitung

### 4.1 Tumore im HNO-Bereich

Plattenepitheliale Tumore im Hals-Nasen-Ohren-Bereich (HNO; engl. Head and Neck squamous cell carcinoma, HNSCC) sind die zehnthäufigste Krebsart in der westlichen Welt. Dabei sind Männer 2,5-mal häufiger betroffen als Frauen (1). Im Jahr 2012 wurden weltweit geschätzte 387.100 Fälle von HNO-Tumoren neu diagnostiziert, während 196.200 Personen an deren Folgen verstarben (2). Die jährlich neu diagnostizierten Fälle von HNO-Tumoren machen in den Vereinigten Staaten von Amerika 3 % aller neu gestellten Krebsdiagnosen aus (1).

Am häufigsten betroffen sind Mundhöhle inklusive Lippe und Zunge (46 %), gefolgt von Larynx (29 %), Pharynx (14 %) und Tonsillen (9 %) (3).

Wesentliche Risikofaktoren für die Entwicklung eines HNO-Tumors stellen der Konsum von Alkohol sowie von Tabak dar, wobei der kombinierte Gebrauch von beidem einen synergistischen Effekt auf das Krebsrisiko hat (4, 5). Weiterhin wurde in den 90er Jahren ein zusätzlicher prädisponierender Faktor entdeckt: das Humane Papillomavirus (HPV) (6). Die Prävalenz von HPV in HNSCC liegt bei circa 25 %, meist handelt es sich dabei um HPV16 (7, 8). Zu beobachten ist, besonders in der oropharyngealen Region, eine über die Jahre steigende Inzidenz von HPV-positiven Tumoren, was auf ein verändertes Sexualverhalten bei Risikogruppen zurückzuführen ist (9).

HPV-positive HNO-Tumore gehen mit einer besseren Prognose einher als das bei HPV-negativen Tumoren der Fall ist, was vermutlich einer erhöhten Radiosensitivität und besserem Therapieansprechen geschuldet ist (9, 10).

Allgemein lag die 5-Jahres-Überlebens-Rate von Patienten mit HNO-Tumoren im Jahr 2016 bei 63 % – ein primärer Grund für die schlechte Prognose ist vor allem, dass sich die meisten Tumore bei Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen, nicht mehr lokalen Stadium befinden. Genauer sind bei Diagnose 31 % der Tumore der Mundhöhle und des Pharynx in einem lokalisierten Stadium, während 47 % bereits regionale und 18 % sogar ferne Metastasen gesetzt haben. Das 5-Jahres-Überleben der Patienten mit lokal begrenzten Tumoren liegt bei 83 %, bei vorhandenen Lymphknotenmetastasen liegt dieser Wert bei 62 % und nur 38 % der Patienten mit Fernmetastasen überleben fünf Jahre (1).

Die Stadieneinteilung der Tumore geschieht anhand des TNM-Systems, welches sich aus der Tumorgroße (T 1-4), dem Befall von regionalen Lymphknoten (N 0-3)



sowie der Fernmetastasierung (M 0/1) durch Tumorzellen zusammensetzt. Das anhand dieses Systems bestimmte Tumorstadium ist stark mit der Prognose der Patienten assoziiert und wird klinisch genutzt, um eine Therapie festzulegen (11). Diese besteht primär, falls eine Resektion möglich ist, aus einer Operation, die in der Regel auch eine Halslymphknotenausräumung beinhaltet. Zusätzlich kann eine adjuvante Radiochemotherapie oder eine alleinige Strahlentherapie erfolgen oder es kann eine neoadjuvante Radiochemotherapie stattfinden, falls der Tumor initial für eine Operation zu groß ist. Eine alleinige Chemotherapie ohne Radiatio bietet keinen Vorteil. Für Patienten mit einem inkurablen Tumor können Chemo- oder Strahlentherapie sowie palliative chirurgische Maßnahmen in Erwägung gezogen werden (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 2012).

Während Operationen und Radiochemotherapien seit Jahrzehnten angewendet werden, sind gezielte Therapien für HNO-Tumore bis jetzt sehr begrenzt und mit mäßigen Ansprechraten sowie vielen Nebenwirkungen verbunden; zum Teil kommt eine EGFR-inhibierende Therapie zum Einsatz (12). Die Entwicklung gezielter Therapien ist, wie Beispiele anderer Entitäten zeigen, vielsprechend, jedoch müssen geeignete Zielstrukturen ausgemacht werden.

#### **4.1.1 Pathogenese der Tumore im HNO-Bereich**

Vorgängerläsionen von HNO-Tumoren können sich vielseitig äußern – meist durch Leukoplakie, Erythroplakie, Pachydermie, Papillom oder durch Ulzeration (13). Obwohl ungefähr 95 % der Tumore im HNO-Bereich Plattenepithelkarzinome sind, sind Therapieansprechen und Prognose der Tumore alles andere als homogen (14). Diverse genetische Alterationen und Veränderungen in vielen Signalwegen wurden identifiziert (15-18).

Zwei Gruppen, die prinzipiell unterschieden werden müssen, sind HPV-positive und HPV-negative Tumore, die sich in vielen Charakteristika grundlegend unterscheiden.

HPV-negative Tumore bilden mit circa 75 % die größte Gruppe der HNSCC (7). Sie weisen im Vergleich zu HPV-positiven Tumoren eine schlechtere Prognose auf, sind häufiger mit Risikofaktoren wie Alkoholkonsum und Rauchen assoziiert und zeigen ein anderes genetisches Alterationsmuster (14).

HPV-negative Tumore zeichnen sich häufig durch Deletionen oder inaktivierende Mutationen von Tumorsuppressorgenen aus. Beispiele für betroffene Gene sind *Tumor protein 53* (*TP53*; 86 % der HPV-negativen Tumore), *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A*, 57 %), *FAT atypical cadherin 1* (*FAT1*, 32 %) und *Translokations-assoziiertes Notch homolog 1* (*NOTCH1*, 26 %) (19).

Mit einer Prävalenz von bis zu 86 % stellt *TP53* das am häufigsten von somatischen Mutationen betroffene Tumorsuppressorgen in HNSCC dar (19).

Die entscheidende Rolle, die *TP53* als Tumorsuppressorprotein zukommt, ist bereits seit Langem bekannt (20) – so wird es auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (21). Tritt eine Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) auf, veranlasst *TP53* einen Zellzyklusarrest am Ende der G1-Phase vor dem Übergang in die S-Phase und initiiert außerdem die Reparatur der DNA (22). Ist diese nicht erfolgreich, kann *TP53* die Apoptose der betroffenen Zelle einleiten.

Um die *TP53*-Level in einer gesunden Zelle niedrig zu halten, bindet Mouse double minute 2 homolog (*MDM2*) an *TP53* und transportiert es von Nukleus zum Zytosol. Dort fungiert *MDM2* als Ubiquitin-Ligase und bewirkt somit den Abbau von *TP53* durch das Proteasom (23-26). Als *MDM2*-Inhibitor tritt *P14<sup>ARF</sup>* auf, welches als Genprodukt von *CDKN2A* in HNO-Tumoren häufig funktionell inaktiv ist (19, 27).

Das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* ist in HPV-negativen HNSCC häufig (57%) von homozygoten Deletionen, inter- und intrachromosomalen Fusionen betroffen (19). Die Genprodukte *P16<sup>INK4</sup>* und *P14<sup>ARF</sup>* sind an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt, indem *P16<sup>INK4</sup>* den Übergang von der G1- in die S-Phase bremst und *P14<sup>ARF</sup>* die Biogenese von Ribosomen inhibiert bzw. einen *TP53*-abhängigen Zellzyklusarrest initiiert (s. oben) (28, 29).

Eine bedeutende Rolle für die Karzinogenese von HNO-Plattenepithelkarzinomen spielt der Phosphoinositid-3-Kinase/Protein Kinase B (*PI3K/AKT*)-Signalweg. Er ist bei etwa einem Drittel der Patienten überaktiv und somit der am häufigsten mutierte onkogene Signalweg in HNSCC (30).

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase reguliert via *AKT* eine Vielzahl möglicher Effektorproteine – darunter Mechanistic target of rapamycin (*mTOR*), CAMP responsive element binding protein (*CREB*) und Protein 27 (*P27*) – und beeinflusst dadurch wichtige Prozesse wie Zellüberleben, -wachstum und Zellzyklus (31, 32).

Die Aktivierung des Signalwegs ist einerseits durch vorgeschaltete Rezeptortyrosinkinasen möglich, andererseits durch eine Amplifikation von *Phosphatidylinosi-*

*tol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA*; 34 % in HPV-negativen bzw. 56 % HPV-positiven HNSCC) oder Verlust von *Phosphatase and tensin homolog (PTEN*; 12 % in HPV-negativen HNSCC) (19, 33-36).

Dabei korreliert der Verlust von *PTEN* in HNO-Tumoren mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem schlechteren Patientenüberleben, während die Amplifikation von *PIK3CA* vermutlich für einen früheren Schritt in der Karzinogenese verantwortlich ist (37-40).

Teilweise lassen sich in HPV-negativen HNO-Tumoren außerdem Amplifikationen von für Rezeptortyrosinkinasen kodierenden Genen finden: dazu gehören *EGFR* (in 15 %) und *FGFR1* (in 10 %) (19, 41). EGFR nachgeschaltet ist der PI3K/AKT-Signalweg, zusätzlich kann EGFR aber auch Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) aktivieren, welches im Nukleolus die Transkription von Genen veranlasst, welche Zellüberleben, Proliferation und Tumorwachstum fördern (42).

In 34 % der Plattenepithelkarzinome der HNO-Region ist das Protoonkogen *Cyclin D1 (CCND1)* amplifiziert, welches für das Zellzyklusprotein Cyclin D1 kodiert (19). Dysreguliertes Cyclin D1 lässt sich bei Patienten mit HNSCC, abgesehen vom Tumorgewebe selbst, bereits in prämaligen Läsionen finden, was darauf hindeutet, dass die Amplifikation von *CCND1* einen frühen Schritt in der Entstehung von HNO-Tumoren darstellt (43, 44).

Cyclin D1 reguliert als Komplex mit den Cyclin-abhängigen Kinasen 4 oder 6 (CDK4/CDK6) den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (s. Abbildung 1). In HPV-positiven Tumoren setzt an dieser Stelle E7 an (s. unten).

Als HPV-positiv gelten etwa 25 % der HNO-Tumore (7). Sie gehen mit einer günstigeren Prognose einher als HPV-negative Tumore und sind meist im Oropharynx lokalisiert (9). Zudem ist *TP53* nicht mutiert (18, 19, 45).

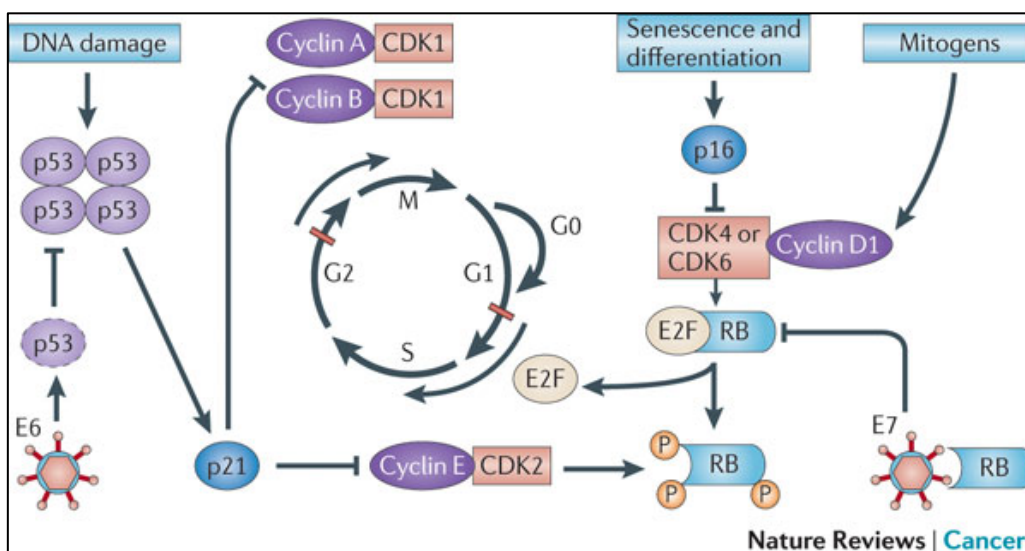
Für die Karzinogenese nach HPV-Infektion spielen zwei HPV-Onkoproteine eine wesentliche Rolle: Protein E6 und E7. Sie sorgen gemeinsam dafür, dass Tumorzellen immortalisiert werden (46).

E6 bindet *TP53* und verhindert so die *TP53*-vermittelte Apoptose. Angriffspunkt ist außerdem die G2-Phase des Zellzyklus, in der DNA-Schäden erkannt und Checkpoint-Kinasen aktiviert werden (*CHK1* und *CHK2*). Diese aktivieren bei einer Schädigung des Erbmaterials *TP53*, das über Protein 21 (*P21*, *CDK-Inhibitor 1*)

eine Inhibition mehrerer CDKs und einen Zellzyklusarrest bewirkt (s. Abbildung 1) (47).

E7 setzt an anderer Stelle des Zellzyklus an – es bindet die Retinoblastom (RB)-Pocket-Proteine (Retinoblastom, Retinoblastom like protein 1 und 2) und verhindert damit ein Stoppen des Zellzyklus vor Eintritt in die S-Phase (48). Die physiologische Funktion der RB-Pocket-Proteine ist, den Transkriptionsfaktor E2F zu binden und so seine Freisetzung zu verhindern. Durch ein mitogenes Signal werden Cyclin D1-CDK4- und Cyclin D1-CDK6-Komplexe aktiviert und bewirken die Phosphorylierung der RB-Pocket-Proteine, die dadurch E2F freisetzen (s. Abbildung 1).

Die Expression der beiden Virus-Onkoproteine bewirkt also einen synergistischen Effekt zur Immortalisierung der Tumorzellen durch Eintritt in den Zellzyklus mittels hoher E2F-Spiegel sowie Verhinderung von TP53-induzierter Apoptose (14).



**Abbildung 1:** Deregulation des Zellzyklus durch den humanen Papillomavirus (14)

Trotz der Identifikation der zahlreichen häufigen Mutationen bleibt die Therapie von Tumoren der Hals-Nasen-Ohren-Region eine Herausforderung. In Zukunft müssen neben funktionellen Analysen auf Proteinebene und der Reevaluation der auf genetischer Ebene festgestellten Mutationen therapierbare Zielstrukturen ausgemacht werden und präklinisch und klinisch bewertet werden.

## 4.2 Rezeptortyrosinkinasen

Von 90 Tyrosinkinasen entsprechen 58 dem Rezeptor-Typ – sie lassen sich in 20 Unterfamilien einteilen (49).

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) sind transmembranäre Glykoproteine, bestehend aus einer extrazellulären Domäne mit der Aufgabe Liganden zu binden, einer transmembranären Helix zur Verankerung des Proteins in der Zellmembran sowie einer zyttoplasmatisch befindlichen Kinase-Domäne. Diese ist katalytisch aktiv und enthält Protein-Protein-Binde-Elemente sowie regulatorische Untereinheiten (50, 51). Wesentliches Unterscheidungsmerkmal der verschiedenen RTKs ist der extrazelluläre Teil, während sich intrazellulär immer eine oder mehrere Kinase-Domänen befinden (50).

Rezeptortyrosinkinasen sind unter anderem eingebunden in grundlegende Prozesse wie Proliferation, Zellzyklus und -überleben, in Zellmigration, -stoffwechsel und Differenzierung (52).

Das Binden eines Liganden ist essentiell für die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase. Durch Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptortyrosinkinase-Ligand-Komplexes kommt es zur *trans*-Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinreste der Kinasedomäne durch den Dimer-Partner, wodurch der Rezeptor in ein aktives Stadium übergehen kann (52).

In einer zweiten Phase werden intrazelluläre Signalmoleküle bereitgestellt, die als Docking-Stellen für nachgeschaltete Proteine dienen.

Für einige Rezeptortyrosinkinasen wie FGFR1 existiert außerdem eine dritte Phase, in der die Aktivität der Kinase potenziert wird (52, 53).

Zur Regulation der aktivierten Rezeptortyrosinkinase stehen der Zelle mehrere Mechanismen zur Verfügung.

Einen davon stellt die Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes dar. Da der Komplex im endozytierten Vesikel weiterhin aktiv bleibt, dient die Internalisierung vermutlich entweder der Spezifizierung der Stoffwechselantwort oder der Kontrolle der Stärke der Antwort (54). Ubiquitin dient dabei als endosomales Sortier-Signal – entweder ein Rezeptor wird lysosomal/endosomal abgebaut oder er wird wieder in die Zellmembran eingebaut (54, 55).

Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) sind ein weiterer Regulator für die Aktivität von RTKs. Dabei können sie die Aktivität inhibieren oder fördern (56, 57).

Trotz einer Vielzahl an Daten zu den Aufgaben von Rezeptortyrosinkinasen kann man noch nicht davon sprechen, dass ihre Rollen komplett verstanden werden. Jedoch scheinen sie, sofern sie in ihrer Funktion gestört sind, zur Genese chronischer Erkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 2 beizutragen sowie die Entstehung von Krebs zu begünstigen (58).

Die pathologische Aktivierung von RTKs kann vier unterschiedlichen Mechanismen folgen: chromosomale Translokation, RTK-Überexpression, Gain-of-function-Mutation (aktivierende Mutation) oder autokrine Aktivierung (52).

Eine der bekanntesten RTK-Familien ist die EGFR/ERBB-Familie, die in Tumorerkrankungen häufig überexprimiert oder mutiert ist (52).

ERBB2 beispielsweise ist in 25-30 % der Brustkrebs-Primärtumoren überexprimiert und mit einer schlechten Prognose verbunden (59). Als weiteres Mitglied der Familie ist EGFR in einer Vielzahl von unterschiedlichen Tumoren überexprimiert (52). Dazu zählen Tumore im HNO-Bereich, Tumore der Ovarien, der Blase und des Ösophagus. In einigen dieser Entitäten, unter anderem auch in HNO-Tumoren, konnte zudem ein Zusammenhang zwischen einer schlechten Prognose der Patienten und einer hohen EGFR-Expression nachgewiesen werden (60).

#### **4.2.1 Rezeptortyrosinkinasen als therapeutische Zielstrukturen**

Die entscheidende Rolle der Rezeptortyrosinkinase für die Funktion der Zelle, insbesondere für potenziell kanzerogene Eigenschaften, legt die Vermutung nahe, dass ihre Dysregulation ein kritischer Schritt in der Transformation einer gesunden zur Tumorzelle ist.

Zudem fungieren Rezeptortyrosinkinasen zur Weitergabe extrazellulärer Signale in intrazelluläre und intranukleäre Kompartimente und sind durch ihre membranäre Lokalisation gut erreichbar (61).

Die Nutzung einer Rezeptortyrosinkinase als therapeutische Zielstruktur kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Dazu verwendet werden monoklonale Antikörper, niedermolekulare Inhibitoren sowie Rezeptor-Fusions-Proteine.

Besonders wichtig und oft genutzt sind niedermolekulare Inhibitoren und monoklonale Antikörper. Niedermolekulare Inhibitoren binden intrazellulär die Adenosintri-phosphat (ATP)-Bindestelle der Rezeptortyrosinkinase und inhibieren auf diesem Weg deren Kinase-Aktivität. An anderer Stelle setzen monoklonale Antikörper an – sie binden tumorspezifische Zell-Oberflächenstrukturen (62). Rezeptor-Fusions-Proteine, auch Ligand-Traps genannt, bestehen aus der extrazellulären

Domäne des Rezeptors, die an den Fibronectin (Fc)-Teil von Immunglobulin G1 (IgG1) gebunden ist. So werden die Liganden durch das Fusionsprotein gefangen, bevor sie den Rezeptor aktivieren können (63).

Medizin, die auf die individuellen Voraussetzungen eines Patienten eingeht, ist die Idee, die hinter zielgerichteten Therapien steht. Bestimmte RTKs werden in unterschiedlichen Tumoren nur von einer umschriebenen Patientengruppe exprimiert.

Beispielhaft für die erfolgreiche Therapie von amplifizierten Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren sind niedermolekulare EGFR-Inhibitoren (z. B. Erlotinib), die routinemäßig in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen eingesetzt werden (64). EGFR kann auch durch monoklonale Antikörper erreicht werden: hierfür wird Cetuximab oder Panitumumab eingesetzt (62, 65).

Ein Problem bei der Therapie von RTKs sind die Resistenzen, die Tumore häufig gegen die verabreichten Medikamente ausbilden, zum Beispiel durch Mutation, auto-/parakrine Produktion von Liganden oder durch die Aktivierung von alternativen Signalwegen (66). Ansätze zur Überwindung der Resistenzen sind beispielsweise das Einsetzen von Inhibitoren mehrerer Rezeptortyrosinkinasen oder die Blockade extra- sowie intrazellulärer RTK-Kompartimente (61).

Da eine EGFR-Überexpression in HNSCC häufig vorkommt (67), stehen mehrere Therapien mit EGFR als Zielstruktur zur Verfügung: der monoklonale Antikörper Cetuximab als Ergänzung zur Bestrahlung oder Chemotherapie bietet einen moderaten Vorteil in der mittleren Überlebenszeit für die Patienten (68, 69). Der niedermolekularen Inhibitor Erlotinib zeigte in klinischen Studien keinen Vorteil zur konventionellen Therapie (70, 71).

Dies zeigt, dass eine zielgerichtete Therapie in HNSCC grundsätzlich möglich ist, dass es für die weitere Verbesserung der Behandlung jedoch nötig ist, geeignete Ziele für die Therapie zu evaluieren. Da Rezeptortyrosinkinasen als geeignete Zielstrukturen bekannt sind, wollen wir die zwei möglichen Kandidaten AXL und FGFR3 weitergehend untersuchen.

#### **4.2.2 AXL**

Die Rezeptortyrosinkinase AXL zählt neben MER proto-oncogene und TYRO3 protein tyrosine kinase zu der Familie der TAM-Rezeptortyrosinkinasen.

Sie besteht aus zwei extrazellulär liegenden N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domänen und zwei Fibronectin Typ III-Domänen. Einer einfachen transmembranären Domäne folgt die intrazelluläre, katalytisch aktive Kinase-

Domäne (72). *AXL* liegt auf dem Chromosom 19, auf der Position q13.2 und wird durch 20 Exons kodiert. Es gibt zwei Splicevarianten und möglicherweise alternative Spliceprodukte in Tumoren (72-74).

Als Ligand von *AXL* ist in erster Linie das Vitamin K-abhängige Protein Growth-arrest-specific gene 6 (*GAS6*) bekannt (72, 75).

Die Aktivierung *AXL*s geschieht normalerweise durch Binden des Liganden und Homodimerisierung zweier Liganden-Rezeptor-Komplexe. Alternativ ist jedoch auch eine Heterodimerisierung von *AXL* mit TAM-Familienmitgliedern, insbesondere mit *TYRO3*, aber auch mit *EGFR*, möglich (72). Ist *AXL* aktiviert, können verschiedene Proteine an die phosphorylierte Kinasedomäne *AXL*s binden. Ein Grund für die Vielfalt der nachgeschalteten Signalwege ist, dass *AXL* mehrere Docking-Stellen (Tyr779, Tyr821 und Tyr866) für seine Substrate bereitstellt (72).

Welche Aufgaben *AXL* erfüllt und mit welchen Signalmolekülen es interagiert, ist im Speziellen auch von dem betroffenen Gewebe abhängig. *AXL* reguliert in vielen unterschiedlichen Organen und Zelltypen wichtige Zellfunktionen. Dazu zählen Zellen wie Makrophagen, natürliche Killer-Zellen und dendritische Zellen, die Immun- und Entzündungsreaktionen des Körpers steuern. Ebenfalls in glatten Gefäßmuskelzellen, in Nervenzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) und in Fibroblasten des Herzens wird *AXL* exprimiert (75).

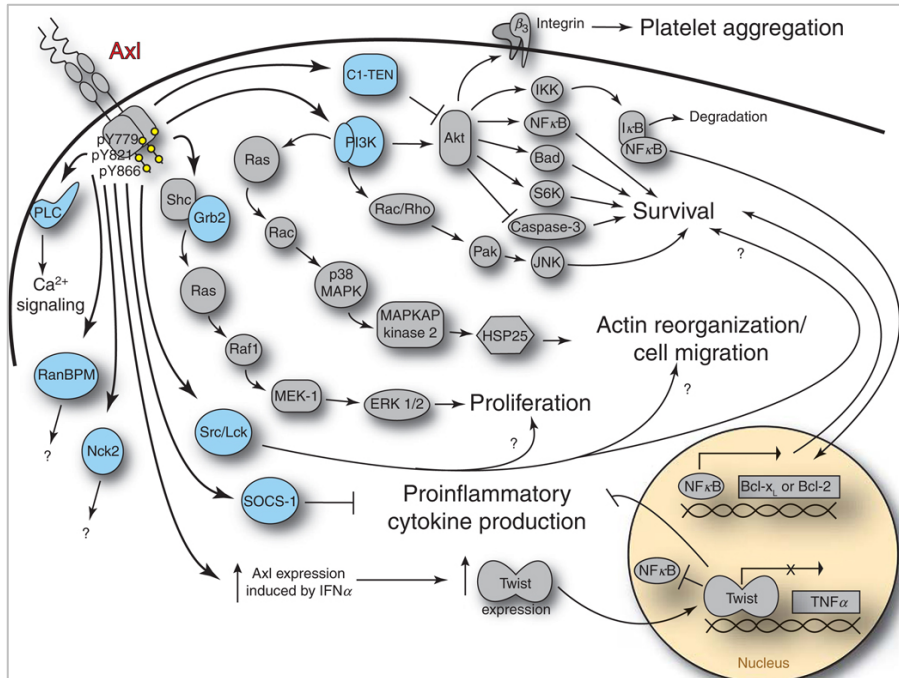
Eine Übersicht wichtiger nachgeschalteter Signalwege bietet Abbildung 2. Viele der durch *AXL* regulierten Signalwege können in einer maligne transformierten Zelle dazu führen, dass der Zellzyklus und die physiologische Zellfunktion onkogen verändert werden.

Ein bedeutendes nachgeschaltetes Protein stellt die Phosphatidylinositol-3-kinase dar. Der *AXL*/*PI3K*/*AKT*-Signalweg reguliert das Zellüberleben und den Zellzyklus (32). Über diesen Signalweg kann *AXL* in einer maligne transformierten Zelle die Transkription anti-apoptotischer Proteine wie B-cell lymphoma 2 (*BCL-2*) oder B-cell lymphoma-extra large (*BCL-XL*) stärken und gleichzeitig das pro-apoptotische Bcl-2-associated death promoter schwächen (*BAD*) (72).

Ein weiteres wichtiges Signalmolekül ist die Extracellular-signal-regulated kinase (*ERK 1/2*). Über *ERK* ist *AXL* in der Lage, die Zellproliferation zu beeinflussen (76).

Weiterhin reguliert *AXL* Verankerungs-unabhängiges Wachstum sowie Migration und Invasion (77, 78). Dafür nimmt *AXL* Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition, vermutlich indem es mit Vimentin interagiert (78, 79).





**Abbildung 2:** AXL-Signalwege (75). AXL vermittelt über vielfältige nachgeschaltete Signalmoleküle wichtige Zellfunktionen wie Zellüberleben, Proliferation und Migration. Es reguliert Plättchenaggregation und spielt eine Rolle bei proinflammatorischen Immunantworten sowie der Organisation des Zytoskeletts.

Eine erhöhte Expression wurde bis jetzt nachgewiesen in Tumoren wie nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, kolorektalen und ösophagealen Karzinomen, Brustkrebs, Ovarial- und Nierenzellkarzinomen (72, 80, 81).

Neben der Aktivierung grundlegender Schritte zur Karzinogenese kann AXL auch der Grund für ein fehlendes Ansprechen von Patienten auf ihre Therapie sein. In vielen Tumorentitäten wurde AXL als der Hauptakteur bei der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika oder Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren identifiziert. Ein Beispiel ist die Therapie mit dem Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib sowie dem monoklonalen Antikörper Cetuximab bei *EGFR*-mutiertem nicht kleinzelligem Lungenkarzinom (non small cell lung cancer, NSCLC). Nach einem initial guten Therapieansprechen entwickeln Patienten meist nach kurzer Zeit eine Resistenz. Bei einigen dieser Patienten scheint eine gesteigerte AXL-Aktivierung Grund dafür zu sein und eine AXL-Inhibition kann die Sensitivität gegenüber Erlotinib wiederherstellen (81-83).

Auch in HNO-Tumoren vermittelt AXL eine Erlotinib-Resistenz sowie eine Resistenz gegen den Phosphoinositide-3-kinase- $\alpha$ -Inhibitor BYL719. Durch Heterodimerisierung mit EGFR und Aktivierung der Proteinkinase C wird wiederum

mTOR aktiviert. Eine Kombination von AXL- sowie EGFR-Inhibition führt in resistenten Zellen zur Resensitivierung für die gegen PI3K bzw. gegen EGFR gerichtete Therapie (84, 85).

Die Ergebnisse mehrerer Studien deuten darauf hin, dass AXL außerdem onkogene Funktionen in HNO-Tumoren übernimmt (86, 87).

BGB324 (BerGenBio ASA) ist ein selektiver, niedermolekularer Inhibitor für AXL, der sich aktuell in Phase I bzw. in Phase II klinischer Studien befindet. Er wird an Patienten mit akuter myeloischer Leukämie oder mit myelodysplastischem Syndrom getestet (88).

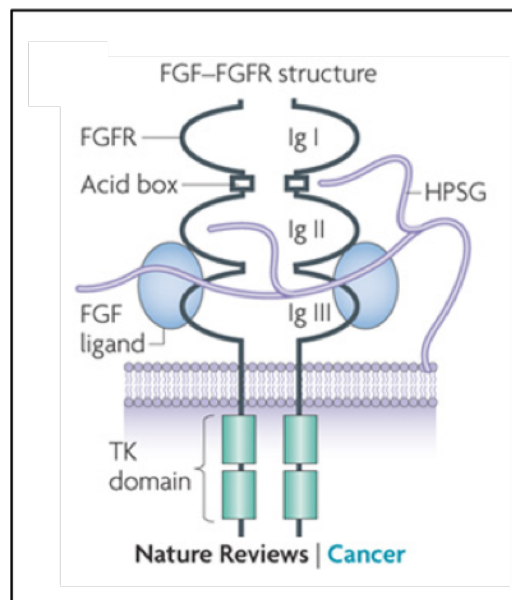
Nach Zusammenschau der aktuellen Daten lässt sich festhalten, dass die Rezeptortyrosinkinase AXL schon in vielen Tumorentitäten als wirksame therapeutische Zielstruktur ausgemacht wurde und die bis jetzt vorliegenden Erkenntnisse zu HNO-Tumoren eine ähnlich bedeutsame Rolle für AXL vermuten lassen.

In dieser Arbeit wollen wir die Expression von AXL während der Tumorprogression untersuchen und evaluieren, ob AXL eine mögliche therapeutische Zielstruktur in HNSCC darstellt.

#### **4.2.3 FGFR3**

Der Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gehört zur Familie der Fibroblast growth factor (FGF)-Rezeptoren, welche FGFR1-5 einschließt. Durch die Arbeitsgruppe von Prof. Perner wurde auch bereits FGFR1 untersucht (41, 89).

Der FGF-Rezeptor 3 umfasst drei extrazellulär liegende Immunglobulin (Ig)-Domänen, eine transmembranäre Helix sowie eine intrazellulär befindliche und gespaltene Kinase-Domäne (s. Abbildung 3). Der Ligandenbindung dient eine Binderegion, die durch die Ig II und III gebildet wird. Durch alternatives Spleißen von Ig III wird die Spezifität des Rezeptors für seine Liganden erreicht, die entstehenden Isoformen werden FGFR IIIb und IIIc genannt (90, 91).



**Abbildung 3:** Struktur des FGF-FGFR-Komplexes (90).

18 FGFs stellen Liganden für die FGF-Rezeptoren dar, zusätzlich binden aber auch Heparansulfate an den dimerisierten Komplex, um die Bindung zu stabilisieren und seine Aktivität zu steigern (90, 92).

Physiologischerweise findet man FGFR3 in Geweben wie der Niere, der Lunge, dem Gehirn, außerdem im Knorpel, Pankreas sowie im Darm und im Hoden (91).

Bindet ein Ligand den Rezeptor und ein Dimer entsteht, kommt es zu einer Konfigurationsänderung, durch welche die intrazelluläre FGFR-Kinasedomäne via Autophosphorylierung aktiviert wird. Als Adaptorprotein dient FGFR Substrat 2 (FRS2), welches durch FGFR an mehreren Stellen phosphoryliert wird und dadurch in der Lage ist, weitere Adaptorproteine wie Son of sevenless (SOS) und Growth factor receptor-bound 2 (GRB2) zu binden. Nachgeschaltete Signalwege sind der Rat sarcoma (RAS)/Rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF)- und MAPK-, aber auch der STAT1-Signalweg (90, 93, 94).

Welche Aufgaben FGFR3 erfüllt, hängt vom zellulären Kontext ab, in dem sich die Rezeptortyrosinkinase befindet (90). Für Gewebe wie die Linse des menschlichen Auges wurde FGFR3 eine differenzierungshemmende Rolle zugeschrieben, während es in intestinalen Geweben die Proliferation fördert (95, 96). Im Gegensatz dazu scheint FGFR3 in Chondrozyten eine apoptotische Wirkung auszuüben (94, 97). In Knockout-Mäusen (*Fgfr3*<sup>-/-</sup>) übte FGFR3 einen negativen Einfluss auf die Differenzierung aus, passend zu den oben beschriebenen Beobachtungen aus der menschlichen Linse (91, 98).

In nichtinvasiven Harnblasenkarzinomen wurde FGFR3 als Prädiktor für eine günstige Prognose identifiziert (99, 100). Van Rhijn et al. zeigten, dass Patienten mit Harnblasentumoren mit Wildtyp-FGFR3 dreimal häufiger ein Rezidiv erlitten als Tumore mit aktivierenden Mutationen in FGFR3 (99). Die hinter diesen Eigenschaften stehenden Mechanismen und Signalwege sind nicht bekannt, es wird jedoch angenommen, dass FGFR3 die Zell-Zell- sowie die Zell-Matrix-Adhäsion hemmt (101).

In mehreren Tumorentitäten weist eine eng umschriebene Patientengruppe ein onkogenes Fusionsprotein auf, bestehend aus Transforming acidic coiled-coil containing protein 3 (TACC3) und FGFR3. Dieses scheint in enger Verbindung zu den Polen der Mitosespindel zu stehen und hier die Chromosomentrennung zu beeinflussen. Zu den betroffenen Tumorentitäten gehören Glioblastome, Lungen-Adenokarzinome, Zervixkarzinome, aber auch Tumore der Kopf-Hals-Region (102-106). Das Fusionsprotein aus FGFR3 und TACC3 kann in HNSCC den EGFR/RAS/ERK-Signalweg aktivieren und verantwortlich für die Entwicklung einer Resistenz gegen eine EGFR-Blockade sein (107).

Die Aufgaben der Rezeptortyrosinkinase in HNO-Tumoren sind bis jetzt noch nicht exakt verstanden, allerdings scheint ein Teil der Patienten von FGFR3-Mutationen in HNO-Tumoren betroffen zu sein. In HPV-negativen Tumoren belaufen sich die aktuellen Zahlen auf 1-2 %, während in HPV-positiven Tumoren 11-12 % der Patienten betroffen sind (19, 108).

*In vitro* ist eine FGFR3-Überexpression in Karzinom-Zellen der Mundhöhle (engl. Oral squamous cell carcinoma; OSCC) assoziiert mit einer gesteigerten Proliferation, während ein entsprechender Knockdown die Sensitivität der Zellen gegenüber radioaktiven Strahlen erhöhen kann (109).

Einige selektive pan-FGFR-Inhibitoren sind aktuell bereits verfügbar. Die besten Ergebnisse konnten bis jetzt für Patienten mit dem Fusionsprotein TACC3-FGFR3 erzielt werden. Zwei klinische Studien der Phase I mit den Inhibitoren JNJ-42756493 (Janssen) und BGJ398 (Novartis) erreichten ein partielles Ansprechen der Tumore mit TACC3/FGFR3-Translokation bzw. mit FGFR3-Amplifikation in urothelialen Tumoren (110, 111).

Momentan finden klinische Studien der Phase II zu beiden Inhibitoren statt.

AZD4547 (AstraZeneca) stellt einen weiteren pan-FGFR-Inhibitor dar, dessen Nutzen in klinischen Studien der Phase II untersucht wurde. Besonders gut sprachen FGFR2-amplifizierte Magentumore auf den Inhibitor an (112).

Weitere Ansatzpunkte für selektive FGFR-Therapien stellen monoklonale Antikörper sowie die weiter oben beschriebenen Rezeptor-Fusions-Proteine dar, welche als Liganden-Fallen („Ligand-Traps“) agieren (110, 113, 114).

FGFR3 scheint in den Prozess der Karzinogenese in HNSCC mit einbezogen zu sein, indem es beispielsweise Proliferation in OSCC vermittelt. Zusätzlich trägt es zur Entwicklung von Therapieresistenzen bei. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression von FGFR3 in HNO-Tumoren weitergehend zu evaluieren, um seine Rolle in der HNO-Tumor-Entstehung besser zu verstehen.

### 4.3 Zielsetzung

Tumore der Kopf-Hals-Region stellen die zehnthäufigste Tumorentität dar, was bedeutet, dass jährlich zwischen 150.000 und 200.000 Menschen daran versterben. Die gängigen therapeutischen Optionen sind bis heute limitiert und beschränken sich zumeist auf die chirurgische Exzision, Chemotherapie und Radiatio mit der einhergehenden hohen systemischen Toxizität und verbundener Morbidität und Mortalität. Entsprechend große Vorteile in Bezug auf die Überlebensprognose von Tumorpatienten sowie auf deren Lebensqualität birgt die Entwicklung spezifischer Therapien, die auf dem Verständnis der molekularen Grundlagen von HNO-Tumoren beruhen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen ist es das Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung von AXL sowie von FGFR3 in Tumoren des HNO-Bereichs genauer zu evaluieren und herauszufinden, inwieweit AXL und FGFR3 – wie auch in anderen Tumorentitäten – mögliche therapeutische Zielstrukturen darstellen.

Zur Analyse der AXL-Expression soll eine immunhistochemische Färbung an Patientengewebe zeigen, ob sich HNO-Normalgewebe, Primärtumoren, Lymphknoten-Metastasen und Rezidive in der Höhe der AXL-Expression unterscheiden und ob die Expression mit klinischen Daten korreliert.

Ferner soll via *in vitro*-Studien ermittelt werden, welche Funktion AXL in der HNSCC-Tumorprogression zukommt und ob AXL eine geeignete therapeutische Zielstruktur darstellt. Zur Beantwortung dieser Frage werden die Effekte der AXL-Inhibition auf die genannten Eigenschaften an Zelllinien untersucht werden, welche entweder eine hohe oder eine sehr schwache Expression der Rezeptortyrosinkinase zeigen. Hierfür wird der niedermolekulare Inhibitor BGB324 genutzt werden, welcher sich bereits in klinischen Studien der Phase II für andere Tumorentitäten befindet (s. Abschnitt 4.2.2).

Bezogen auf FGFR3 gilt es, mittels einer immunhistochemischen Färbung herauszufinden, inwieweit die Proteinexpression während der Tumorprogression variiert. Da die Daten hierzu in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich ausgefallen sind, soll evaluiert werden, ob FGFR3 möglicherweise zur Tumorprogression beiträgt oder einen günstigen Prognosemarker darstellen könnte. Hierfür müssen die Daten der Immunhistochemie mit klinischen Parametern korreliert werden.

## 5 Material

### 5.1 Geräte und Software

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Amersham Imager 600	GE Healthcare, München, Deutschland
BBD 6220 CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CX41 (Aufrecht Mikroskop)	CX41 (Aufrecht Mikroskop) Olympus, Hamburg, Deutschland
Definiens Tissue Studio 2.1 image analysis software	Definiens, München, Deutschland
Eppendorf Thermomixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heraeus Brutschrank, Function Line, B6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Ofen, Series 6000, T6120	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hyrax M 55 Rotationsmikrotom	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mars Klasse 2 Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	ScanLaf, Lyngø, Dänemark
Mini Trans-Blot® Cell	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell System	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Mini-Sub® Cell GT Cell	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Neubauer improved-Zählkammer	LO – Laboroptik, Lancing, UK
Pannoramic Desk Scanner	3DHitech, Budapest, Ungarn
PIPETBOY acu 2 - Pipet Aid INTEGRA	Biosciences, Zizers, Schweiz
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio Rad, Hercules, CA, USA
PowerPac™ HC Power Supply	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Sorvall™ Legend™ Micro 21R Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ventana Discovery XT automated staining system	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA

### 5.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10 cm Zellkulturschale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
15 ml Reaktionsgefäß	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland

24-Loch Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
50 ml Reaktionsgefäß	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
6-Loch Platte	Corning, Corning, NY, USA
96-Loch Platte (flacher Boden)	Corning, Corning, NY, USA
Adhäsions-Objektträger, für Gewebeschnitte, Stärke 1 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
CRYO.STM Gefäße (2 ml) zum Einfrieren von Zellen	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Deckgläser (24 x 50 mm)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Einmal-Skalpelle	FEATHER®, Osaka, Japan
Flaschen für die Zellkultur (25 cm <sup>2</sup> )	VWR, Darmstadt, Deutschland
Gelloading Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger, Stärke 1 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Roti®-PVDF (Polyvinylidenfluorid), 0,45 µM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Wattestäbchen	Labomedic, Bonn, Deutschland
Whatman 3MM Chr Papier	GE Healthcare, München, Deutschland
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

### 5.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3:** Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
10 M Natronlauge (NaOH)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
10 M Salzsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
4 % Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS, 10 % w/v in dH <sub>2</sub> O)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Aquatex®	Merck, Darmstadt, Deutschland
ATX Ponceau S red staining solution	Fluka, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
BGB324	BerGenBio, Bergen, Norwegen
Bluing Reagent	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Amresco, Solon, OH, USA
Cell Conditioning 1 (CC1)	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Cell Conditioning 2 (CC2)	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Cytoseal 60 Thermo	Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dimethylformamid (DMF)	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland



Dimethylsulfoxid (DMSO)	Biozol, Eching, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (EtOH)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS), hitzinkaktiviert, 56 °C, 30 Minuten	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Waldeck, Münster, Deutschland
Hematoxylin II	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
HEPES Puffer (1 M)	GE Healthcare, München, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Matrigel™ Invasion Chambers 8,0-µm-Einsätze	VWR, Darmstadt, Germany
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
N,N,N,NTetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxychelate	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (100 x, 5000 U/ml)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (100 mM in 100 % EtOH)	Fluka, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Phosphatseinhibitorcocktail II und III	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Propidium Iodid Solution (PI)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ROTI®-LOAD 1 reduzierend, 4 x	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT, 5 mg/ml in PBS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Transparente PET-Membran, 8,0 µm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Tris Pufferan®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Trypanblau (0,4 %)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	DAKO, Glostrup, Dänemark

## 5.4 Reaktionskits

**Tabelle 4:** Reaktionskits

Reaktionskit	Hersteller
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, München, Deutschland
Discovery DAB Map Detection Kit	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Discovery UltraMap anti-Mouse HRP	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Discovery UltraMap anti-Rab HRP	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
UltraView Universal DAB Detection kit	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA

## 5.5 Puffer und Lösungen

50 x TAE (pH 8,0)  
 2 M Trizma Base  
 1 M Eisessig  
 50 mM EDTA

RIPA-Lysepuffer (Radioimmunoprecipitations-Assaypuffer)

1 % v/v IGEPAL® CA-630  
 0,5 % w/v Natriumdesoxychelate  
 0,1 % w/v SDS  
 2 mM EDTA  
 PBS

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M Trizma Base  
 0,4 % w/v SDS  
 dH<sub>2</sub>O

**Tabelle 5:** Sammelgel für Gelelektrophorese

Sammelgel (2 Gele)	
dH <sub>2</sub> O	6 ml
Sammelgelpuffer	2 ml
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	2 ml

10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

Trenngelpuffer (pH 8,8)  
 1,5 M Trizma Base  
 0,4 % w/v SDS  
 dH<sub>2</sub>O

**Tabelle 6:** Trenngel für Gelelektrophorese

Trenngele (2 Gele)	8,5%	10%	15%
dH <sub>2</sub> O	5 ml	4,25 ml	1,75 ml
Trenngelpuffer	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	4,25 ml	5 ml	7,5 ml
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

10 x Laufpuffer (pH 8,3)  
 250 mM Trizma Base  
 1,92 M Glycin  
 0,1 % w/v SDS  
 dH<sub>2</sub>O

1 x Laufpuffer  
 10 % 10 x Laufpuffer  
 90 % dH<sub>2</sub>O

10 x Transferpuffer (pH 8,3)  
 250 mM Trizma Base  
 1,92 M Glycin  
 dH<sub>2</sub>O

1 x Transferpuffer  
 10 % 10 x Transferpuffer  
 10 % Methanol  
 80 % dH<sub>2</sub>O

10 x TBS (pH 7,5)  
 0,5 M Tris-HCl  
 1,5 M NaCl  
 dH<sub>2</sub>O

1 x TBS-T  
 1 x TBS  
 0,05 % Tween® 20

MTT-Solvent (pH 4,7)  
 40 % v/v Dimethylformamide  
 2 % v/v Eisessig

16 % w/v SDS  
dH2O

## 5.6 Medien für die Zellkultur

Medium zur Kultivierung von HN Zellen:

DMEM mit L-Glutamin  
10 % FBS  
1 x Penicillin/Streptomycin (50 U/ml)

Medium zur Kultivierung von SCC-25 Zellen:

DMEM/F-12  
10 % FBS  
2 mM L-Glutamin  
400 ng/ml Hydrocortison  
1 x Penicillin/Streptomycin (50 U/ml)

Einfriermedium:

800 µl des jeweiligen Kultivierungsmedium  
100 µl FBS  
100 µl DMSO

## 5.7 Antikörper

**Tabelle 7:** Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung (Westernblot)	Verdünnung (IHC)
<b>Primärantikörper</b>			
Axl (AF154)	R&D Systems Minneapolis, MN, USA		1:500
Axl (C89E7)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA TBS-T	
FGFR3 (B-9)	Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA	1:200 5 % Milch TBS-T 1:10	1:10
β-actin (AC-74)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:5000 5 % Milch TBS-T	

Sekundärantikörper			
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:5000 5 % Milch TBS-T	
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA	1:5000 5 % Milch TBS-T	
Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch West Grove, PA, USA		1:500

## 5.8 Zelllinien

**Tabelle 8:** Zelllinien

Zelllinie	Lokalisation	Firma	Referenz
HN	Zervikale Lymphknotenmetastase (Primärtumor: Epithelzellkarzinom des Gaumens)	Leibniz Institute DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig, Deutschland	Kawamata et al., International Journal of Cancer, 1997(115)
SCC-25	Epithelzellkarzinom der Zunge	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA	Rheinwald et al., Cancer research, 1981(116)

## 5.9 Patientenkollektiv

Die Bonner HNSCC-Kohorte umfasst insgesamt 810 Gewebeproben von 555 Patienten, welche im Zeitraum 1997 bis 2011 im Universitätsklinikum Bonn behandelt wurden. Darunter befinden sich ursprünglich 488 Primärtumore, 241 Lymphknotenmetastasen und 68 lokale Rezidive.

Die Studie wurde durch die institutionelle Prüfungskommission der Universität Bonn genehmigt (#148/11; 04-07-2011) (89).

Zum Patientenkollektiv, speziell für AXL und FGFR3, s. Tabelle 11, S.66 bzw. Tabelle 12, S.68.

## **6 Methoden**

Die Zellkultur-Versuche wurden von mir unter Anleitung von Anne von Mäßenhausen durchgeführt.

### **6.1 Immunhistochemische Färbung**

Die AXL- und FGFR3-Protein-Expression wurde anhand einer immunhistochemischen Färbung von Tissue-Microarrays (TMA) durchgeführt. Immunhistochemische Färbungen dienen der Identifizierung der Proteinexpression in einem Gewebe. Dabei werden Antigene/Epitope durch einen Antikörper gebunden und mit einem Markermolekül sichtbar gemacht. Die Färbung der Gewebeproben für AXL und FGFR3 erfolgte mithilfe des Ventana Discovery XT automated staining system (117). Anschließend wurden die Schnitte mittels des Panoramic Desk Scanners digitalisiert und die Färbung mit der Definiens Tissue Studio 2.1 image analysis software analysiert. Die Definiens-Software dient der semi-automatischen Quantifizierung der immunhistochemischen Färbintensität. Dabei werden Tumorregionen durch den Untersucher markiert und durch das Programm wird eine kontinuierliche, durchschnittliche Färbintensität (willkürliche Einheiten) berechnet. Dabei bedeuten höhere Werte eine intensivere Färbung (118).

Die immunhistochemische Färbung der Gewebeproben übernahm Wenzel Vogel. Ihre Digitalisierung und Auswertung wurde von mir unter Anleitung von Johannes Brägelmann durchgeführt.

### **6.2 Kultivieren von Zellen**

Die Zelllinien wurden in den beschriebenen Medien (s.5.6, S.28) bei 37 °C, 5 % CO<sup>2</sup>- und 95 % Feuchtigkeits-Gehalt der Luft kultiviert.

In der Werkbank mit vertikalem Luftstrom wurde ausschließlich steril gearbeitet. Die Zellkulturmedien wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert. Wachstumsmedien wurden circa alle 4 Tage ausgewechselt. Bei Konfluenz der Zellen wurden diese passagiert: dafür wurden sie zuerst mit PBS gewaschen; anschließend wurden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturplatte abgelöst und danach zur Neutralisierung des Trypsins in 5 ml Medium aufgenommen.

Je nach Zellreihe wurden 10-25 % der Zellen in 10 ml frischem Medium kultiviert.

### **6.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Um Zellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren wurden diese kryokonserviert. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben mittels Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Anschließend wurden sie für 5 min bei 200 g abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium in ein 1,5 ml-Kryogefäß überführt. Eingewickelt in ein Papiertuch erfolgte eine Herabkühlung auf -80 °C.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden die in dem 1,5 ml-Kryogefäß gelagerten Zellen mit Medium in Raumtemperatur resuspendiert. Dann wurden sie in 10 ml Medium aufgenommen und bei 200 g für 5 min abzentrifugiert. In einer T25-Zellkulturflasche wurden die Zellen in 7 ml frischem Medium kultiviert.

### **6.4 Bestimmung der Zellzahl**

Um immer gleiche Bedingungen für die Versuche herzustellen, muss eine konstante Zellzahl verwendet werden. Dafür nutzten wir eine Neubauer-Zählkammer, mit der wir die Zellzahl mittels folgender Formel bestimmten:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen pro Quadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Volumen der Zählkammer}}$$

Nach Ablösen der Zellen durch Trypsin wurden sie zentrifugiert (200 g, 5 min) und in 0,5-5 ml Medium resuspendiert (je nach Größe des Zellpellets).

Anschließend wurden die Zellen in Trypanblau verdünnt und in die Neubauer-Zählkammer aufgetragen und gezählt.

### **6.5 Herstellung von AXL-überexprimierenden Zellen**

Die Herstellung der AXL-überexprimierenden SCC-25-Zellen sowie mit den Zellen stattfindende Versuche übernahm Anne von Mäßenhausen.

Zur Herstellung der Zellen wurde cDNA von AXL in den pLenti-C-mGFP Vektor kloniert und der AXL-enthaltende oder der leere Vektor mittels lentiviraler Transduktion in die Zielzellen gebracht (119).

### **6.6 Zellproliferationsassay**

Die Zellproliferation wurde mittels Thiazolyl-Blau-Tetrazolium-Bromid (MTT) gemessen. Dafür wurden für die Überexpressionsexperimente 1500 AXL-überexprimierende SCC-25-Zellen bzw. Kontrollzellen in 100 µl Medium in eine 96-Loch-Platte ausplattiert. Für die Inhibitionsexperimente gaben wir 2500 HN-

oder SCC-25-Zellen mit 50 µl Medium auf die Platte. Am darauffolgenden Tag fügten wir unterschiedliche Mengen BGB324 in 50 µl Medium hinzu.

Das Prinzip des Versuchs beruht auf der Stoffwechselaktivität lebender Zellen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 500 µg/ml MTT-Reagenz dazugegeben. Dieses setzen lebende Zellen zu einem violettfarbenen, unlöslichen Formazanprodukt um. Um dieses löslich zu machen und später seine Extinktion messen zu können, fügten wir nach 4 h Inkubation im Brutschrank 100 µl MTT Solvent hinzu. Am darauffolgenden Tag wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen (118-120).

### **6.7 Migrations- und Invasions-Assays**

Zur Ermittlung des Migrations- und Invasionsverhaltens der Zellen wurden Migrations- bzw. mit Matrigel beschichtete Invasionskammern genutzt.  $1 \times 10^5$  HN- oder SCC-25-Zellen wurden in die obere Kammer ausplattiert und Medium mit 2 % Fötalem Bovinen Serum (FBS) hinzugegeben. Auf der anderen Seite der Kammer diente Medium mit 10 % FBS-Gehalt dazu, einen Migrations- / Invasionsreiz zu liefern. Nach 24 bzw. 48 h wurden die migrierten / invadierten Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, mit Hämalun gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Es wurden 5-10 repräsentative Areale der Membran gezählt (118).

Für die statistische Auswertung wurden bei jedem Versuch die Migrations- bzw. Invasionswerte nach DMSO-Behandlung auf 1 gesetzt. Dann wurde der relative Unterschied zur BGB324-Behandlung errechnet und für diesen der Mittelwert der 3 Versuche mit der Standardabweichung gebildet.

### **6.8 Proteinextraktion und -bestimmung**

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen mit dem Radioimmunoprecipitations-Assay (RIPA)-Puffer und darin jeweils 1:100 verdünntem Proteaseinhibitor, Phosphataseinhibitor und Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF; finale Konzentration in Lysepuffer 1 nM) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellreste mit 13.000 g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert.

Der Extraktion der Proteine folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptions-Messung einer Standardreihe mit BSA in RIPA-Puffer. Dazu nutzten wir das BCA Protein Assay Kit.

Um die Proteine zu denaturieren wurden sie mit ROTI®-LOAD 1 und RIPA-Puffer gemischt für 5 min bei 95 °C erhitzt (118, 119).



## **6.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Transfer auf eine PVDF-Membran**

Nach Zugabe eines Ladepuffers besaßen diese eine einheitlich negative Ladung und wanderten im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Das Gel, in dem die Proteine aufgetragen waren, bewirkte eine Auftrennung der Proteine ihrer Größe nach. Nach dem Transfer der Proteine auf eine aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde diese für 1 Stunde mit 5 % Milch TBS-T oder mit 5 % BSA TBS-T geblockt, bevor sie über Nacht im Primärantikörper inkubiert werden konnte. Nachdem dieser am nächsten Tag abgewaschen wurde, wurde die Membran für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend erneut gewaschen.

Im letzten Schritt wurde die Membran mit dem ECL Western Blotting Detection Reagent behandelt und die entstehende Chemilunineszenz mit dem Amersham Imager 600 sichtbar gemacht.

Der detaillierte Ablauf ist bereits publiziert/vorbeschrieben (118, 119).

## **6.10 Statistiken**

Die Unterschiede zwischen zwei Gruppen einer kontinuierlichen Variable wurden anhand eines zweiseitigen Signifikanzniveaus von 0,05 mit dem t-Test für normalverteilte Variablen oder dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test getestet. Für mehr als eine Gruppe nicht-normalverteilter Daten nutzten wir den Kruskal-Wallis-H-Test. Das Überleben wurde anhand der Kaplan-Meier-Kurve sowie des log-rank-Tests und anhand eines Cox-Regressionsmodells (121, 122) analysiert. Alle Analysen wurden mithilfe IBM SPSS Statistics 22 und 25 gefertigt.

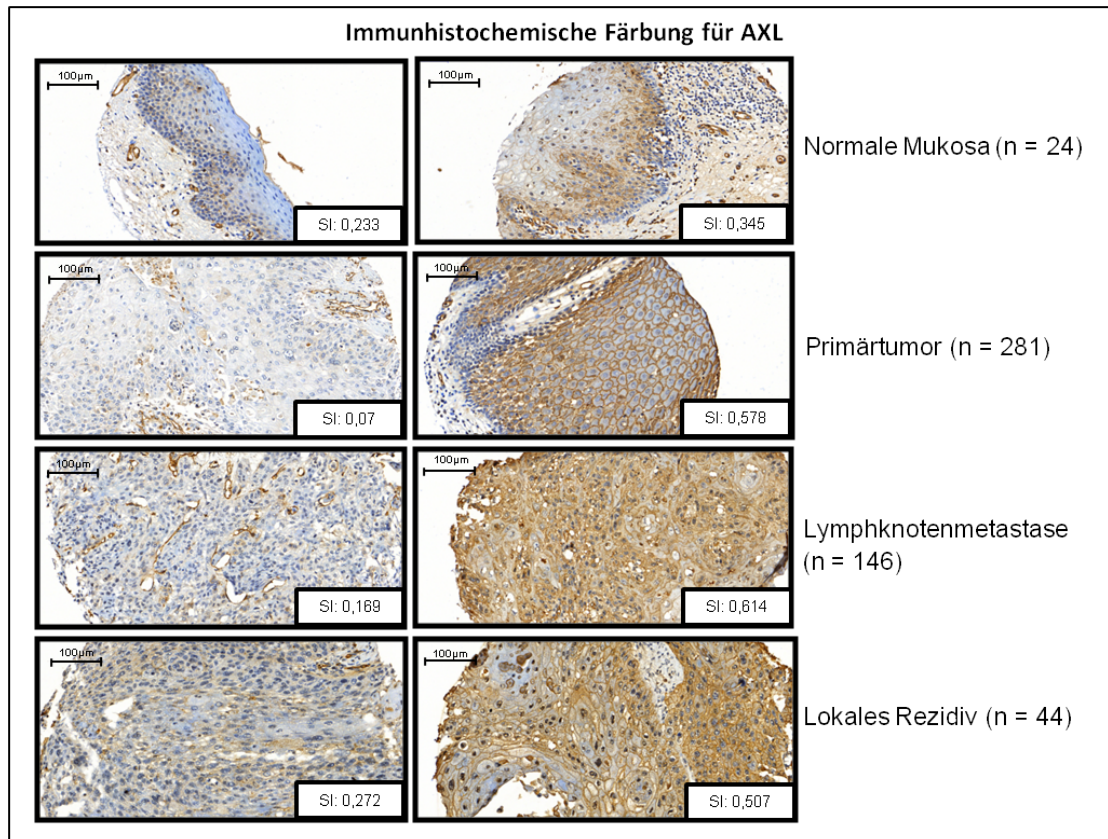
Meine statistischen Auswertungen wurden von Johannes Brägelmann unterstützt. Zusätzlich nahm ich an zwei SPSS-Kursen des Bonner Hochschulrechenzentrums teil.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 AXL

#### 7.1.1 Immunhistochemische Färbung

Für die Quantifizierung der AXL-Protein-Expression standen uns 495 Gewebeproben zur Verfügung, die von 364 Patienten stammen und sich zusammensetzen aus 24 Proben der normalen Mukosa, 281 Primärtumoren, 146 Lymphknoten-Metastasen sowie 44 lokalen Rezidiven.



**Abbildung 4:** AXL-Expression in HNSCC-Patienten. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Bild aller Manifestationen mit schwacher (erste Spalte) und eins mit starker AXL-Anfärbung (zweite Spalte). Die Expression wurde quantifiziert anhand der durchschnittlichen membranösen Färbeintensität, errechnet durch die Definiens-Software (SI: staining intensity, willkürliche Einheit; höchster Wert 0,931 / niedrigster Wert 0,063). Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (118).

In der immunhistochemischen Analyse war AXL in erster Linie wie erwartet membranär lokalisiert, zum Teil wurde es aber auch zytoplasmatisch angefärbt, wobei die Expression primär im Epithel sichtbar war (s. Abbildung 4). Da außerdem Färbung in Gefäßendothelzellen sichtbar war, wurden für die Quantifizierung die epithelialen / tumorösen Bereiche unter Ausschluss von Stroma und Gefäßen selektiert. In der normalen Mukosa wurde AXL mit Fokus auf die basalen Schichten

exprimiert, während wir in Tumorgewebe eine homogenere Färbung feststellten (s. Abbildung 4).

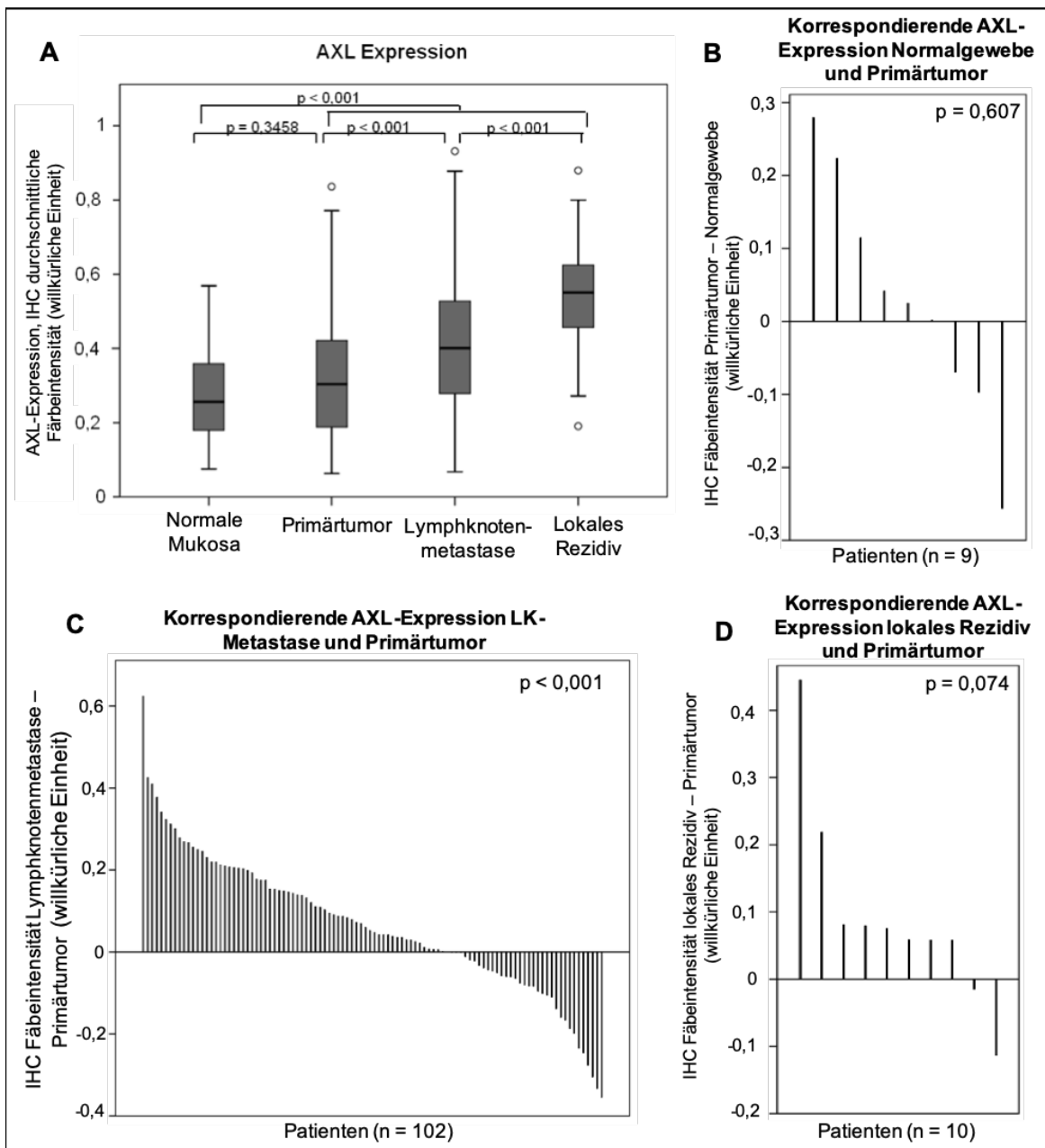
Wir stellten einen Anstieg der AXL-Protein-Expression während der Tumorprogression fest (s. Abbildung 5A). Dabei ließ sich bereits im Vergleich von Normalgewebe mit Primärtumor die Tendenz zu einer stärkeren Expression im Primärtumor beobachten, die jedoch das Signifikanzniveau nicht erreichte ( $p = 0,35$ ). Die Lymphknotenmetastasen zeigten eine deutlich höhere AXL-Expression im Vergleich zu den Primärtumoren ( $p < 0,001$ ), während die lokalen Rezidive eine wiederum höhere AXL-Expression aufwiesen als die Lymphknotenmetastasen ( $p < 0,001$ ).

Die Gegenüberstellung von normaler Mukosa zur Entität maligner Gewebe ergab eine signifikant höhere AXL-Expression der malignen Gewebe ( $p < 0,001$ ).

Der kontinuierliche Anstieg der AXL-Protein-Expression von Normalgewebe über Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen bis hin zu lokalen Rezidiven deutet auf eine wachsende Bedeutung AXLs während der Tumorprogression hin.

Da sich in den einzelnen Manifestationen eine große Streubreite der immunhistochemischen Anfärbung von AXL ergab (s. Abbildung 5A), verglichen wir korrespondierende Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen von Patienten, für die beide Gewebeproben vorhanden waren ( $n = 102$ , s. Abbildung 5C). In dieser gepaarten Analyse war die Färbung der Lymphknotenmetastasen signifikant höher als die der dazu gehörigen Primärtumoren ( $p < 0,001$ ).

Für korrespondierende Normalgewebe und Primärtumoren sowie Primärtumoren und Rezidive ergab sich bei wenigen verfügbaren Stichproben kein signifikantes Ergebnis, allerdings ließ sich der Trend einer höheren AXL-Expression im Lokalrezidiv als im Primarius bei den entsprechenden, korrespondierenden Proben nachvollziehen (s. Abbildung 5B und D).

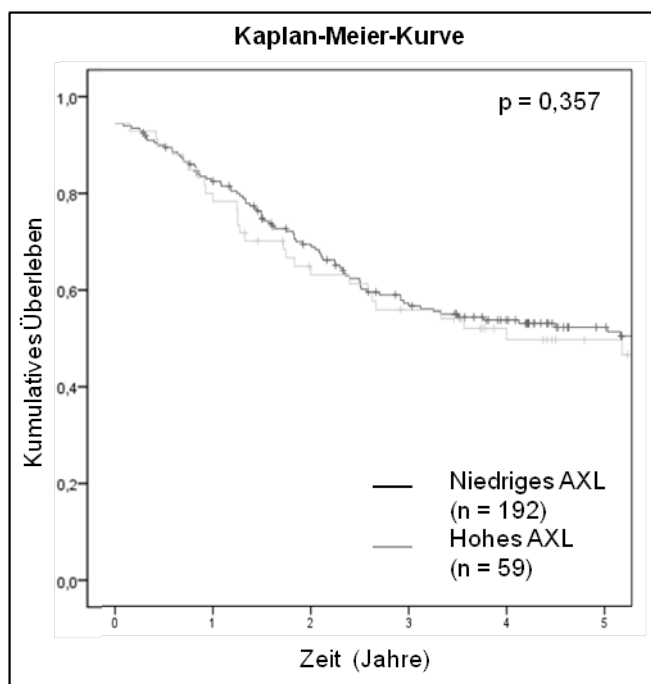


**Abbildung 5:** **A** AXL-Expression aller Proben nach Entität. (p-Wert basierend auf zweiseitigem t-Test für ungepaarte Stichproben) **B-D** Differenz der AXL-Protein-Expression korrespondierender Proben (Proben eines Patienten). P-Wert basierend auf zweiseitigem t-Test für gepaarte Stichproben.  
Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (118).

Klinische Informationen waren für 321 (88,2 %) der Patienten verfügbar, jedoch ergab sich keine Korrelation der AXL-Protein-Expression mit klinischen Parametern wie beispielsweise dem Staging des Primarius, Noxen oder dem Alter bei Erstdiagnose (s. Tabelle 11, S. 66).

Die Überlebensanalyse anhand des Kaplan-Meier-Verfahrens ergab keinen signifikanten Unterschied für Primärtumoren mit niedriger und solche mit hoher AXL-

Expression (s. Abbildung 6; 5-Jahres-Überleben für AXL niedrig 49 % und für AXL hoch 53 %,  $p = 0,357$ ). In Übereinstimmung dazu zeigte auch ein Cox-Regressionsmodell keinen Überlebensunterschied für Patienten mit einer hohen AXL-Expression nach Adjustierung für wichtige bzw. Prognose-assoziierte klinische Parameter (s. Tabelle 9;  $p = 0,928$ , HR = 1,022).



**Abbildung 6:** AXL-Überlebensanalyse. Vergleich von Patienten mit hoher (Werte im obersten Quartil) und niedriger AXL-Expression (Werte unterhalb der 75 %-Marke) des Primarius. Signifikanzwert basierend auf log rank-Test. Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (118).

**Tabelle 9:** Multivariates Cox-Regressionsmodell. P-Wert für gesamtes Modell 0,007. Evaluert wurden Effekte der AXL-Expression für Patienten mit einem Expressionswert im höchsten Quartil (hohes AXL) nach Adjustierung für klinische Parameter, die in HNSCC als Prognose-assoziiert gelten. Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (118).

Kovariablen		Hazard Ratio	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
<b>Hohes AXL</b>	[wahr]	1,02	0,64 - 1,64	0,93
<b>Alter</b>	[Jahre]	1,01	0,99 - 1,04	0,4
<b>UICC Stadium</b>	[II vs. I]	1,97	0,75 - 5,18	0,17
	[III vs. I]	2,63	1,02 - 6,81	0,05
	[IV vs. I]	3,23	1,41 - 7,37	0,005
<b>HPV Status</b>	[positiv]	0,34	0,12 - 0,96	0,04

<b>Tabak</b>	[Nichtraucher vs. Raucher]	1,05	0,49 - 2,25	0,9
<b>Alkohol</b>	[gelegentlich vs. Nichttrinker]	0,62	0,31 - 1,26	0,19
	[Mittel bis stark vs. Nichttrinker]	1,5	0,86 - 2,65	0,16

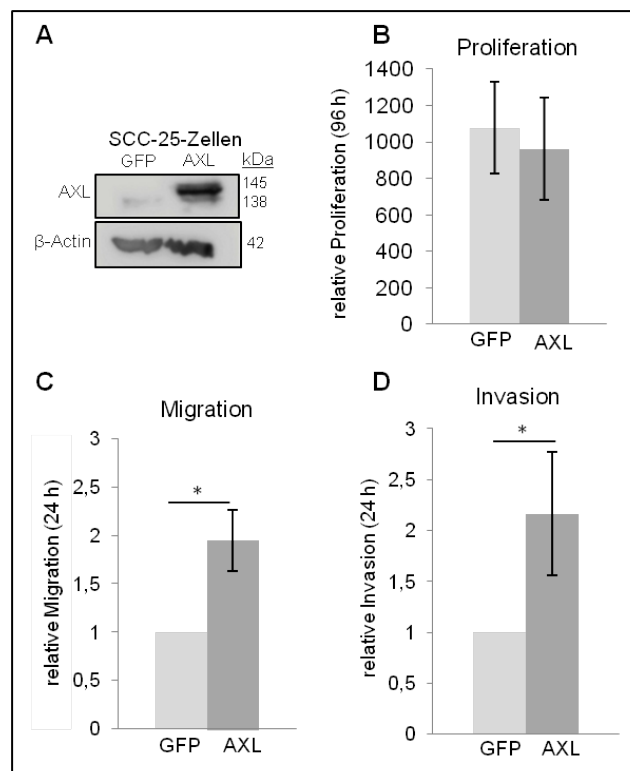
### 7.1.2 Die Funktion von AXL in der Tumorprogression

Die Versuche zur Überexpression wurden von Anne von Mäßenhausen durchgeführt.

Zur Evaluation der Aufgaben, welche AXL in der Tumorprogression übernimmt, etablierten wir eine Überexpression in SCC-25-Zellen, welche kaum endogenes AXL exprimieren (s. Abbildung 7A). Daraufhin betrachteten wir, wie sich die Überexpression von Green fluorescent protein (GFP)-markiertem AXL auf essentielle tumorigene Eigenschaften auswirkt. Als Kontrolle dienten SCC-25-Zellen, die mit einem Vektor transduziert wurden, der ausschließlich GFP exprimiert.

Nach 96 Stunden konnten wir keinen Unterschied in der Proliferation zwischen den AXL-überexprimierenden sowie den Kontroll-Zellen feststellen.

Allerdings bewirkte die Überexpression von AXL eine Verdoppelung von Migration und Invasion nach 24 Stunden (s. Abbildung 7C und D,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 7:** AXL-Überexpression in SCC-25-Zellen. **A** AXL-Überexpression in SCC-25-Zellen im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen. Die doppelte Bande der AXL-Überexpressionszellen zeigt neben der Expression endogenen AXLs die Expression von GFP-markiertem AXL. **B** Relative Proliferation der AXL-Überexpressions- und GFP-Kontrollzellen. ( $n = 3$ ) **C** Relative Migration der AXL-Überexpressions- und GFP-Kontrollzellen. ( $n = 3$ ) **D** Relative Invasion der AXL-Überexpressions- und GFP-Kontrollzellen. ( $n = 3$ ). **B-D** zweiseitiger t-Test bei verbundenen Stichproben,  $*p < 0,05$ . GFP green fluorescent protein  
Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (118).

### 7.1.3 Inhibition von AXL in HNSCC

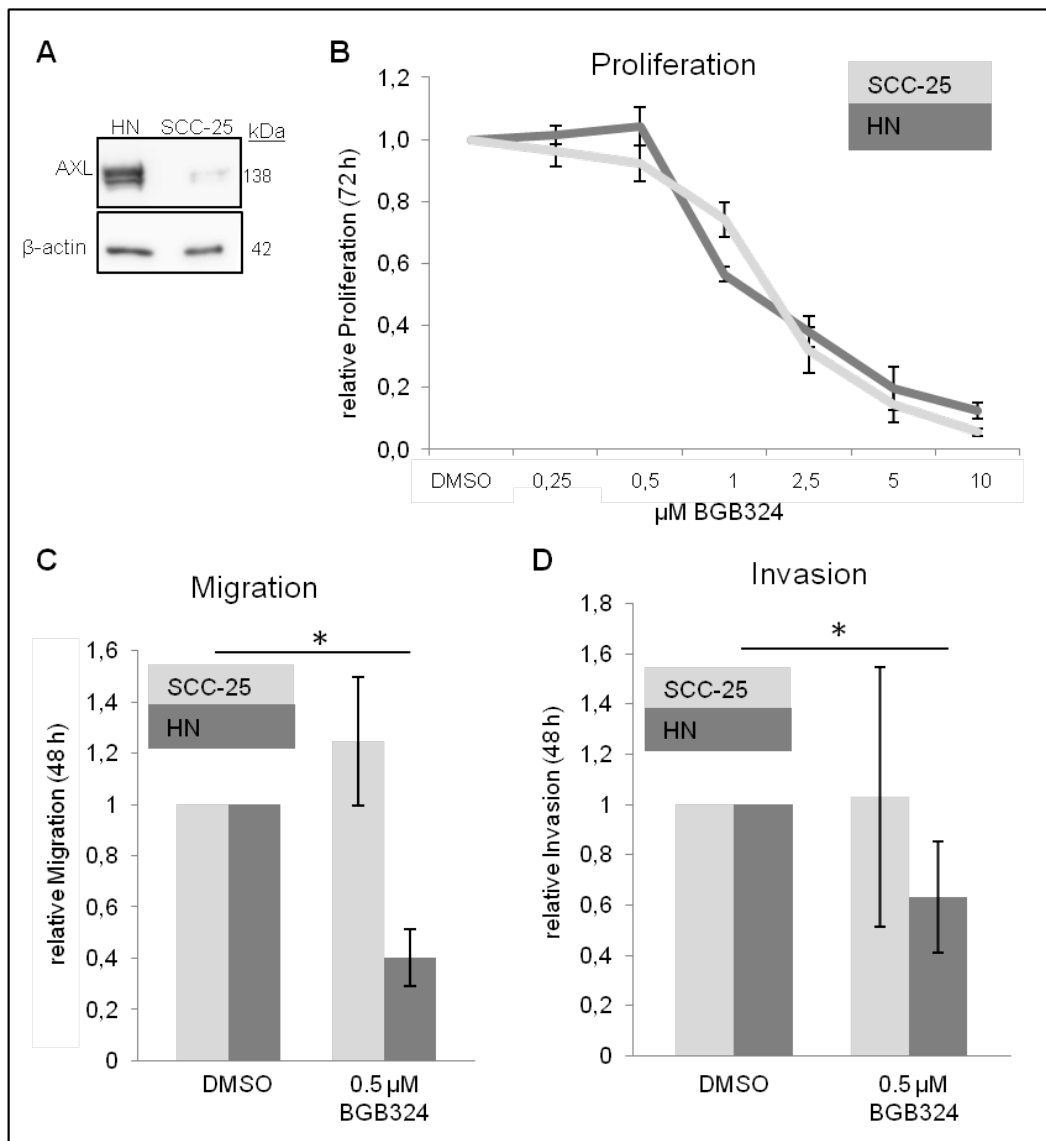
Um zu evaluieren, ob AXL einen geeigneten Ansatzpunkt für Therapien in Tumoren der Kopf-Hals-Region darstellen könnte, benutzten wir den selektiven niedermolekularen AXL-Inhibitor BGB324. Dabei verglichen wir die Effekte des Inhibitors auf SCC-25-Zellen mit niedriger endogener AXL-Expression mit den Effekten auf HN-Zellen, welche höhere AXL-Level aufweisen (s. Abbildung 8A).

Als Kontrolle fungierten jeweils Zellen, die mit DMSO behandelt wurden.

Nach 72 Stunden konnten wir eine Abnahme des Zellüberlebens in beiden Zellreihen beobachten, während darin keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zellreihen bestanden (s. Abbildung 8B).

Weiterhin untersuchten wir den Effekt der Inhibition auf die Zellmotilität der SCC-25- sowie der HN-Zellen. Dafür fand zunächst eine Vorbehandlung beider Zellreihen mit 0,5  $\mu\text{M}$  BGB324 bzw. mit DMSO für 24 Stunden statt.

Nach 48 Stunden stellten wir eine um mehr als die Hälfte verminderte Migration und eine ebenfalls deutlich geminderte Invasion der mit BGB324 behandelten HN-Zellen fest. Für die SCC-25-Zellen ergab sich keine Veränderung im Migrations- oder Invasionsverhalten (s. Abbildung 8C und D).



**Abbildung 8:** AXL-Inhibition mit BGB324. **A** AXL-Expression in HN- und SCC-25-Zellen. **B** Relative Proliferation in HN und SCC-25 nach Behandlung mit unterschiedlichen Mengen BGB324 ( $n = 3$ , jeweils in Triplikaten). **C** Relative Migration von HN und SCC25 nach Vorbehandlung mit BGB324 für 24h ( $n = 3$ ) **D** Relative Invasion von HN und SCC25 nach Vorbehandlung mit BGB324 für 24h ( $n = 3$ ). **C, D** zweiseitiger gepaarter t-Test,  $n = 3$ ,  $*p < 0,05$ . DMSO Dimethyl Sulfoxid.

Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (118).

Insgesamt ist festzuhalten, dass in unserer Patientenkohorte die AXL-Expression von Normalgewebe über Primärtumor und Lymphknoten-Metastase bis hin zum lokalen Rezidiv signifikant zunimmt. Bei der Zusammenschau von klinischen Parametern ergab sich kein Hinweis für eine Korrelation der Expression von AXL mit dem Überleben.

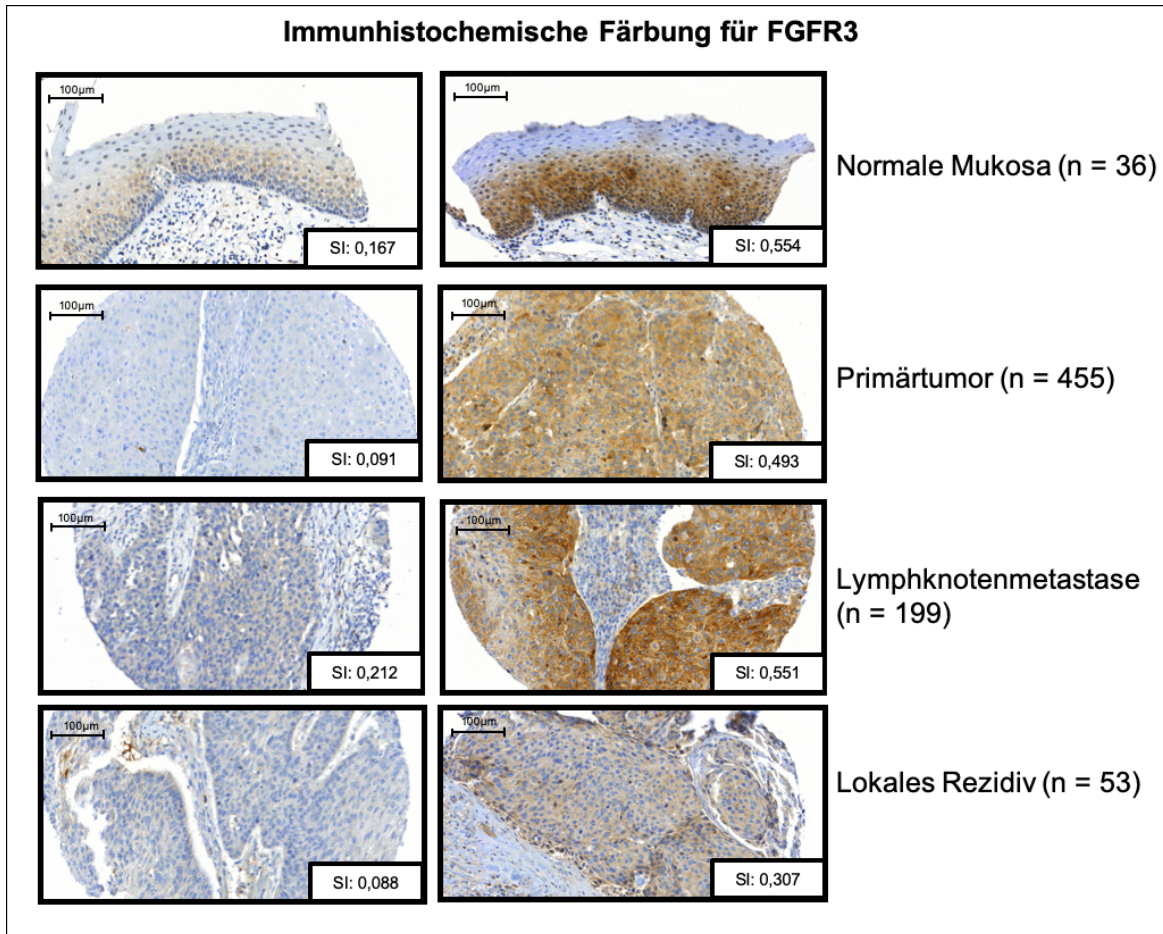
In *in vitro*-Experimenten zeigt die Überexpression von AXL zwar keinen Effekt auf die Proliferationsrate, verdoppelte jedoch Migration und Invasion der Zellen, welche durch AXL-Inhibition effektiv gehemmt werden konnten.



## 7.2 FGFR3

### 7.2.1 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Analyse der FGFR3-Protein-Expression waren Gewebeproben von 536 Patienten verfügbar, dabei 36 Proben normaler Mukosa, 455 Proben von Primärtumoren, 199 Lymphknotenmetastasen sowie 53 lokale Rezidive.

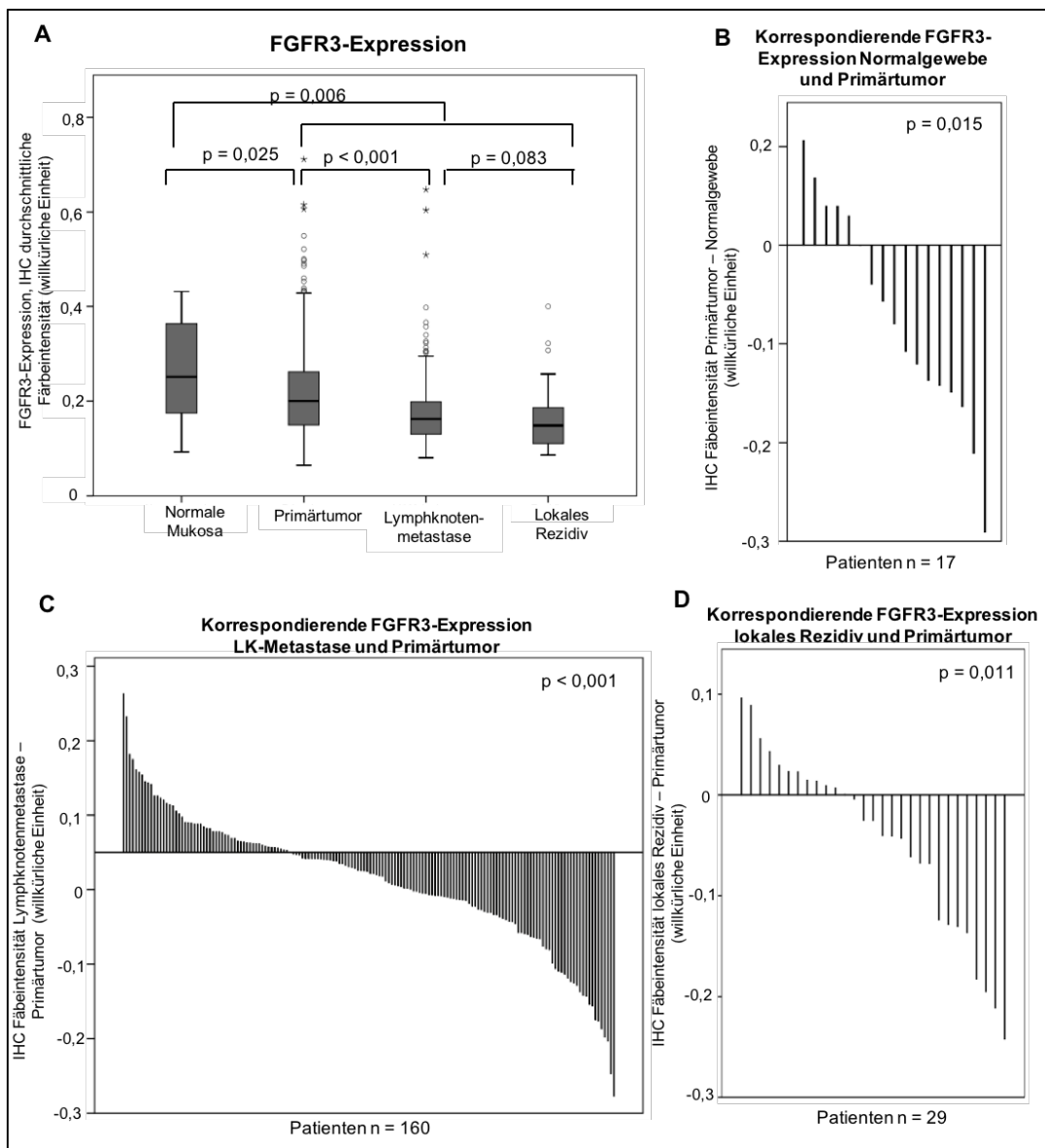


**Abbildung 9:** FGFR3-Expression in HNSCC-Patienten. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Bild aller Manifestationen mit schwacher (erste Spalte) und eins mit starker FGFR3-Anfärbung (zweite Spalte). Die Expression wurde quantifiziert anhand der durchschnittlichen membranösen Färbeintensität, errechnet durch die Definiens-Software (SI: staining intensity, willkürliche Einheit; höchster Wert 0,711/niedrigster Wert 0,064). Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (123).

In der immunhistochemischen Färbung wurde FGFR3 in den basalen Schichten des Plattenepithels angefärbt. Die Expression beschränkte sich nicht nur auf die Zellmembran, sondern war auch im Zytoplasma zu beobachten (s. Abbildung 9). Die Expression von FGFR3 war, nach Analyse der immunhistochemischen Färbung, in der normalen Mukosa am größten und nahm in der Tumorprogression signifikant ab. Im Primärtumor wird also mehr FGFR3 exprimiert als in der Lymph-

knoten-Metastase und dort wiederum mehr als im lokalen Rezidiv (s. Abbildung 10A).

Die Reduktion der FGFR3-Expression während der Tumorprogression konnten wir auch für Patienten bestätigen, für die Gewebeproben aus mehreren Entitäten vorlagen. So war sowohl die Reduktion der FGFR3-Expression vom Normalgewebe zum korrespondierenden Primärtumor im gepaarten t-Test signifikant ( $p = 0,015$ ) als auch die Differenz zwischen dem Primarius und der entsprechenden Lymphknotenmetastase ( $p < 0,001$ ); und auch die Differenz zwischen Lokalrezidiv und korrespondierendem Primärtumor erreichte das Signifikanzniveau ( $p = 0,011$ ; s. Abbildung 10B-D).

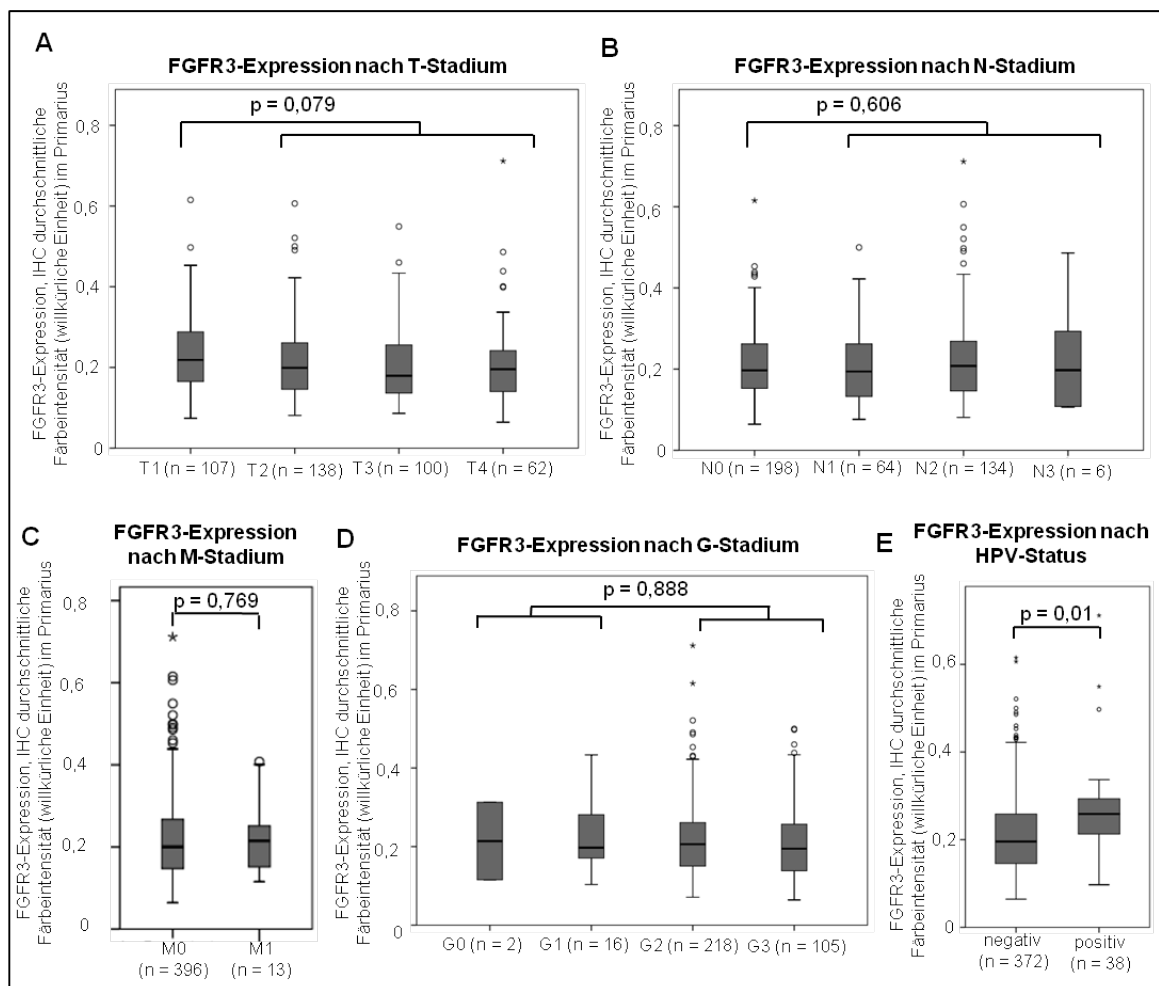


**Abbildung 10:** A FGFR3-Expression nach Entität. (p-Wert errechnet mittels zweiseitigen t-Tests für ungepaarte Stichproben) B-D Differenz der FGFR3-Protein-Expression korrespondierender Proben (Proben eines Patienten). P-Wert basierend auf zweiseitigem t-Test für gepaarte Stichproben.

Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (123).

Weiterhin sahen wir, dass es unter den Primärtumoren eine Untergruppe von 7,5 % gibt, die FGFR3-Werte aufweisen, die größer sind als das 1,5-fache des Interquartilsabstands (s. Abbildung 10A).

Die Korrelation mit klinischen Daten wie dem Staging des Primarius, Noxen oder dem Alter bei Erstdiagnose ergab keine signifikanten Ergebnisse (s. Abbildung 11A-D / s. Tabelle 12, S.68). Allerdings konnten wir einen geringen, aber hoch signifikanten Unterschied der FGFR3-Expression des Primarius beobachten, der vom HPV-Status abhängt. HPV-positive Primärtumoren exprimieren mehr FGFR3 als es bei negativem HPV-Status der Fall ist ( $p = 0,01$ ; s. Abbildung 11E).

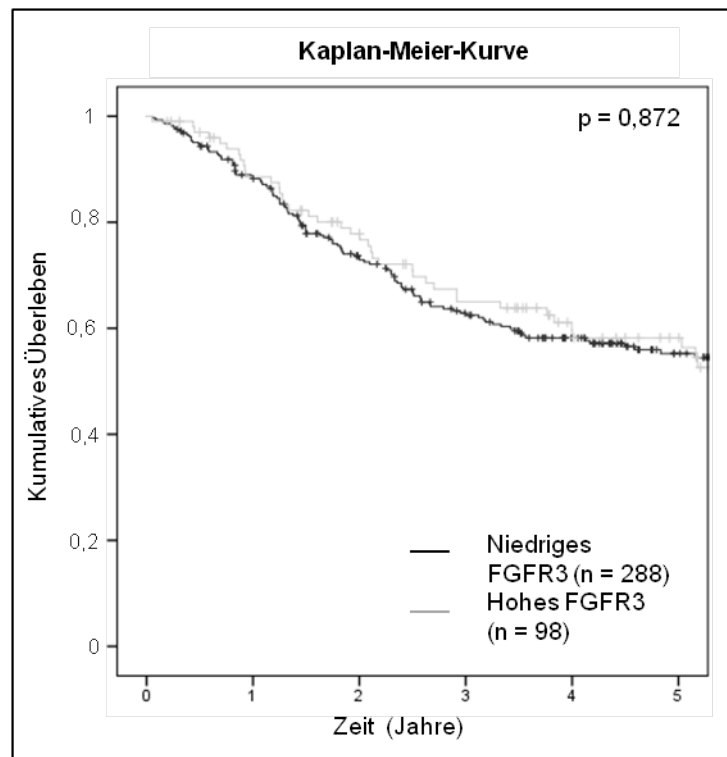


**Abbildung 11:** A-C FGFR3-Expression je nach Staging des Primarius. Die Unterschiede zu den Zahlen in Tabelle 12 (S. 68) ergeben sich daraus, dass in der Tabelle auch Proben berücksichtigt werden, für die nicht vom Primarius stammen (z. B. Lymphknotenmetastasen) D FGFR3-Expression nach Grading des Primarius E FGFR3-Expression nach HPV-Status. (A-E: p-Wert errechnet mittels Mann-Whitney-U-Test)

Zur Überlebensanalyse teilten wir die Patienten in zwei Gruppen: diejenigen Patienten, deren FGFR3-Protein-Expression im oberen Quartil liegt, wiesen eine 5-

Jahres-Überlebensrate von 58 % auf, während von den Patienten mit niedrigerem FGFR3 nach 5 Jahren noch 55 % lebten. Der Überlebensunterschied zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant (s. Abbildung 12; log-rank-Test = 0,872).

Nach Adjustierung für wichtige klinischer Parameter wie Alter, Union internationale contre le cancer (UICC)-Stadium und HPV-Status konnten wir im Rahmen eines Cox-Regressionsmodells zwar ein um 14 % gesteigertes Risiko des Todes ermitteln, sofern die FGFR3-Expression des Primarius im oberen Quartil liegt, jedoch war dieser Wert nicht signifikant ( $p = 0,49$ ; s. Tabelle 10).



**Abbildung 12:** FGFR3-Überlebensanalyse. Vergleich von Patienten mit hoher (Werte oberhalb des 75 %-Quartils) und niedriger FGFR3-Expression (Werte unterhalb des 75 %-Quartils) des Primarius. Signifikanzwert basierend auf log rank-Test. Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (123).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die FGFR3-Expression in der Tumorprogression bzw. zu malignen Entitäten hin signifikant abnimmt.

Außerdem ist die FGFR3-Expression HPV-Status-abhängig: HPV-positive Primärtumoren exprimieren mehr FGFR3 als es bei HPV-negativen Primärtumoren der Fall ist.

Die Korrelation mit weiteren klinischen Parametern sowie die Überlebensanalysen ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

Die Auswertung der Daten wurde durch Johannes Brägelmann unterstützt. Weiterführende funktionelle Experimente wurden im Rahmen dieses Themas von Anne von Mäßenhausen durchgeführt (123).

**Tabelle 10:** Multivariates Cox-Regressionsmodell. P-Wert für gesamtes Modell < 0,0001. Evaluiert werden Effekte der FGFR3-Expression für Patienten mit einem Expressionswert oberhalb des 75%-Quartils (hohes FGFR3) nach Adjustierung für klinische Parameter, die in HNSCC als Prognose-assoziiert gelten. Verändert nach von Mäßenhausen et al., 2016 (123).

Kovariable		Hazard Ratio	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
<b>Hohes FGFR3</b>	[wahr]	1,14	0,79 - 1,65	0,49
<b>Alter</b>	[Jahre]	1,03	1,01 - 1,04	0,001
<b>UICC Stadium</b>	[II vs. I]	2,05	1,08 - 3,90	0,03
	[III vs. I]	2,62	1,43 - 4,80	0,002
	[IV vs. I]	4,07	2,37 - 6,99	< 0,0001
<b>HPV Status</b>	[positiv]	0,38	0,18 - 0,78	0,009

## 8 Diskussion

### 8.1 AXL

Die Rezeptortyrosinkinase AXL spielt in einer Vielzahl an Tumorentitäten eine Rolle. Ihre Bedeutung in der Karzinogenese wurde bereits für zahlreiche Organe nachgewiesen: Lunge, Brust, Darm, Speiseröhre, Eierstock und Niere sind einige Beispiele (72, 80, 81).

Auch in der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region scheint AXL involviert zu sein. Anhaltspunkte dafür liefern die Arbeiten von Giles et al. aus dem Jahr 2013 sowie von Brand et al. aus dem Jahr 2015 (85, 87).

Um die Aufgaben und die Bedeutung von AXL genauer zu verstehen, haben wir die Expression an 495 Gewebeproben untersucht, die nicht nur aus Primärtumoren und aus Normalgewebe stammen, sondern erstmals auch aus Lymphknotenmetastasen sowie aus Lokalrezidiven.

Dabei stellten wir einen Anstieg der AXL-Expression während der Tumorprogression fest. Im Einzelnen sahen wir einen Trend zu einer intensiveren Färbung im Primärtumor als in normaler Mukosa (nicht signifikant), eine stärkere Expression von AXL in Lymphknotenmetastasen als in Primärtumoren und die intensivste Färbung in Lokalrezidiven. Dieses Färbeverhalten AXLs konnten wir ebenfalls in den korrespondierenden Proben einzelner Patienten nachweisen.

Dazu passt auch, dass die SCC-25-Zellreihe – welche uns als Kontrollzellreihe diente – kaum AXL exprimiert. Sie stammt aus einem Primärtumor der Zunge (116). Im Gegensatz dazu besitzen HN-Zellen, die aus einer Lymphknotenmetastase isoliert wurden, ein sehr viel höheres endogenes AXL (115).

Lee et al. beschrieben eine Korrelation zwischen einer hohen AXL-Expression im Primärtumor und positivem Lymphknotenstatus für Mundhöhlenkarzinome (OSCC) (86). Mit unseren Ergebnissen können wir diese Erkenntnisse erweitern.

Unsere Daten sprechen dafür, dass die AXL-Expression in der Tumorprogression variiert bzw. zunimmt und dass AXL während der Tumorprogression an Bedeutung gewinnt. Eine Evaluierung AXLs als therapeutische Zielstruktur sollte folglich auch für fortgeschrittene Tumorstadien stattfinden.

Obgleich wir einen Anstieg der AXL-Expression zu malignen Entitäten hin beobachteten, konnten wir keine Korrelation zwischen hoher AXL-Expression und klinischen Parametern wie Lymphknotenmetastasen, Rezidiventwicklung oder

Staging des Primarius feststellen. Damit entsprechen unsere Ergebnisse nicht denen anderer Arbeitsgruppen (85-87), die einen Zusammenhang zwischen AXL-Expression und den genannten Parametern dokumentierten. Weiterhin war AXL im Gegensatz zu anderen Studien (85-87) in unserer Kohorte kein ungünstiger Prognosefaktor.

Zum Einen könnten methodische Unterschiede die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen erklären: Giles et al. verwendeten messenger Ribonukleinsäure (mRNA) als Grundlage ihrer Analysen und Brand et al. sowie Lee et al. nutzten ein nominales (kein kontinuierliches) System zur Bewertung der AXL-Expression.

Darüber hinaus mag auch die Strukturierung der Kohorten eine Rolle spielen. Die 300 Patienten, deren Daten dem The Cancer Genome Atlas entnommen wurden, weisen eine viel geringere 10-Jahres-Überlebensrate auf als die Patienten unserer Kohorte (TCGA: 10-Jahres-Überlebensrate 10% AXL hoch und 30 % AXL niedrig; Bonn HNSCC: 10-Jahres-Überlebensrate 53 % AXL hoch und 42 % AXL niedrig) (85). Diese Ungleichheit könnte zurückzuführen sein auf einen Unterschied des geografischen oder ethnischen Hintergrunds oder auf verschiedene therapeutische Grundlagen. Zu widersprüchlichen Ergebnissen, was die Korrelation von AXL mit klinischen Parametern betrifft, kamen auch bereits Studien an nicht-kleinzelligen-Bronchialkarzinomen (124, 125).

Bei der Untersuchung der Aufgaben von AXL in der Tumorprogression konnten wir keinen Effekt auf die Proliferation feststellen. So gab es nach Überexpression von AXL in SCC-25-Zellen, die ursprünglich eine niedrige endogene Expression aufweisen, keine Änderung im Proliferationsverhalten der Zellen.

Bei Behandlung der Zellen mit aufsteigenden Dosen des selektiven AXL-Inhibitors BGB324 zeigten sowohl HN-Zellen mit hoher als auch die Kontrollzellen SCC-25 mit niedriger AXL-Expression einen Rückgang der Proliferation. Möglicherweise geht dieses Verhalten also auf Off-Target-Effekte des Inhibitors zurück. Hinweise darauf lieferten bereits Holland et al., die leichte antiproliferative bzw. zytotoxische Off-Target-Effekte durch den Inhibitor dokumentierten (126). Giles et al. beobachteten nach AXL-Inhibition eine Reduktion des Proliferationsverhaltens von AXL-exprimierenden Zellen sowie von Zellen, welche kein endogenes AXL besitzen (85). Sie nahmen am ehesten an, dass diese Effekte darauf zurückzuführen seien, dass BGB324 auch auf EGFR inhibierend wirkt – rund 100-fach weniger als auf AXL.

Brand et al. erreichten im Gegensatz dazu einen selektiven Rückgang der Proliferation von AXL-exprimierenden Zellreihen, während Zellreihen ohne nachweisbares AXL nicht in ihrer Überlebensfähigkeit eingeschränkt wurden. Jedoch hingen die Werte der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ -Werte) nicht mit der Höhe der AXL-Expression der Zellreihe zusammen, sondern waren davon unabhängig (87). Daraus ergibt sich eine weitere mögliche Erklärung der Diskrepanz zu unseren Ergebnissen: da die durch uns als Kontrolle verwendeten SCC-25-Zellen nicht frei von AXL sind, sondern lediglich kaum AXL exprimieren, ist es denkbar, dass sie ebenfalls auf die AXL-Inhibition durch BGB324 ansprechen.

Neben der Proliferation gehören auch Migration und Invasion zu den essentiellen kanzerogenen Eigenschaften einer maligne transformierten Zelle. Während die AXL-Überexpression die Proliferation nicht beeinflusste, verdoppelten sich dadurch Migration und Invasion, was einhergeht mit den Beobachtungen, die wir in unserer immunhistochemischen Analyse gemacht haben. Hier war die AXL-Expression in malignen Entitäten am höchsten.

Durch Vorbehandlung von HN-Zellen mit BGB324 ließen sich Migration und Invasion jeweils in erheblichem Maße verringern. Die zur Kontrolle dienenden SCC-25-Zellen wurden durch die Inhibition nicht beeinflusst. Da, wie oben beschrieben, BGB324 in hohen Dosen Off-Target-Effekte verursacht, verwendeten wir eine Dosis, die keine Veränderung des Proliferationsverhalten von HN- oder SCC-25-Zellen nach sich zieht.

Aus diesen Daten schließen wir, dass AXL in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region Migration und Invasion vermittelt. Dazu passen die Ergebnisse unserer immunhistochemischen Analyse, die besagen, dass AXL in fortgeschrittenen Entitäten wie Lymphknotenmetastase und Lokalrezidiv vermehrt exprimiert wird.

Unsere Daten gehen einher mit denen, die von Tumoren anderer Lokalisationen stammen, in denen AXL auch als Motor von Migration und Invasion bekannt ist. Beispiele dafür sind das Prostatakarzinom, der Brustkrebs, das Gliom und das Pankreaskarzinom (78, 127-130).

Aufgrund der beschränkten Bedeutung AXLs für Proliferation gehen wir nicht davon aus, dass eine AXL-Inhibition als Monotherapie ausreichend sein wird. Allerdings kommt sie als Kombination mit bestehenden Therapieprotokollen in Frage und könnte Chemotherapie oder Radiatio ergänzen. Es sollten in Zukunft weitere



Untersuchungen an AXL-positiven Patienten oder solchen mit Lymphknotenmetastasen stattfinden, um eine Tumorprogression möglicherweise zu verhindern.

## 8.2 FGFR3

FGFR3 spielt in der Karzinogenese epithelialer Tumore der Harnblase oder der Lunge eine Rolle (99, 100, 131, 132). Obwohl bis heute noch kein durchgreifendes Verständnis der Bedeutung von FGFR3 in HNSCC herrscht, fanden erste Studien Mutationen in *FGFR3*, die ein Hinweis auf eine mögliche Relevanz der Rezeptortyrosinkinase in HNO-Tumoren sind (19, 108, 133).

Da die Daten jedoch nicht eindeutig und zum Teil auch widersprüchlich sind, ist eine weitergehende Evaluation der Rolle FGFR3s in HNSCC erforderlich. Verlässliche Daten zur FGFR3-Protein-Expression in Tumorgewebe fehlen zu großen Teilen, da *FGFR3* in erster Linie auf DNA-/ RNA-Ebene analysiert wurde.

Aus diesem Grund fand im Rahmen unserer Studie eine immunhistochemische Analyse von 743 Gewebeproben statt, die Normalgewebe, Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen sowie Lokalrezidive umfassen.

Dabei stellten wir bei einer kleinen Patientengruppe von 7,5 % eine besonders hohe FGFR3-Expression fest, definiert als mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstands der Färbeintensität. Ähnliche Zahlen konnten wir im Rahmen weiterführender Experimente auch auf mRNA-Ebene für die TCGA-Kohorte bestätigen (123).

Henson und Gollin fanden – ähnlich unseren Ergebnissen – in nur einem von fünf Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle eine deutlich erhöhte FGFR3-Expression (109).

Ein Problem ist, dass eine Vielzahl der Studien keine kontinuierliche Quantifizierung der Protein-Expression vornimmt, sondern die Färbeintensität in mehrere Stufen aufteilt. Aus diesem Grund ist es schwer, eine Subpopulation mit stark abweichender Expression – die wir in unserer Kohorte identifizierten – zu erkennen.

Nayak et al. bewerteten 75% der Plattenepithelkarzinome des Mundes als FGFR3-positiv (134). Dabei nahmen sie keine kontinuierliche Skalierung der Expression vor, sondern unterschieden lediglich positive von negativer Expression. Eine visuelle Reevaluation der Rate an positiven Gewebeproben unserer Kohorte ergab eine Prozentzahl von 90%.

Sweeny et al. konnten dagegen bei einer kleinen Probenanzahl von 13 keine positive FGFR3-Färbung in Tumorregionen (OSCC) nachweisen (135).

Die Unterschiede der Zahlen rühren möglicherweise von verschiedenen Lokalisationen, aus denen die Tumorproben entnommen wurden. Auch denkbar wäre eine Diskrepanz der Daten aufgrund der visuellen Cut-Off-Grenzen, die durch den Untersucher gesetzt werden. Wahrscheinlich gibt es auch einen nicht unerheblichen Effekt des ethnischen Hintergrundes auf den Mutationsstatus bzw. die Expression von FGFR3: bei Nayak et al. handelt es sich um Patienten eines indischen Krankenhauses. Sweeny et al. arbeiteten mit Proben von Patienten aus Alabama. Anhaltspunkte auf eine bedeutende Rolle der ethnischen Herkunft lieferten die Studien von Zhang et al. sowie Aubertin et al. an OSCC aus den Jahren 2005 bzw. 2007. Während Zhang et al. bei einer (fraglich) japanischen Kohorte in 62% ihrer 71 Tumorproben eine G697C-Mutation dokumentierten, konnten Aubertin et al. unter 39 Proben keine einzige G697C-Mutation finden – sie stießen in ihrer französisch-stämmigen Kohorte ausschließlich auf Wildtyp-*FGFR3* (136).

Bisherige Studien stellten eine Korrelation von positivem HPV-Status mit dem *FGFR3*-Mutations-Status fest. Seiwert et al. wiesen bei 12 % HPV-positiver HNSCC Mutationen nach, während bei negativem HPV-Status nur 1 % der Tumoren *FGFR3*-Mutationen zeigten (108). Ähnliche Zahlen wurden durch The Cancer Genome Atlas Network veröffentlicht: 11 % *FGFR3*-Mutationen bei positivem und 2 % bei negativem HPV-Status (19). Auch Bersani et al. bestätigten dieses Jahr die Korrelation zwischen HPV- und Mutations-Status: 7 % der HPV-positiven Tumoren mit *FGFR3*-Mutation im Vergleich zu 2 % bei negativem HPV-Nachweis (133). Alle drei genannten Studien bezogen in ihre Analysen mehrere Hundert Proben mit ein.

Nach unserem Wissen sind unsere Daten die ersten, die auch einen Zusammenhang der FGFR3-Protein-Expression mit dem HPV-Status des Primarius belegen. Koole et al. untersuchten diesen Zusammenhang ebenfalls, konnten jedoch die Korrelation auf Proteinebene nicht bestätigen (137). Jedoch teilten Koole et al. die Kohorte lediglich in FGFR3-positiv oder -negativ ein und es erfolgte keine weitere Abstufung der Färbeintensität. Diese Grundlage macht es womöglich schwer, weniger offensichtliche Unterschiede wahrzunehmen, zumal unsere Analyse eine nur geringe, jedoch hoch signifikante Differenz der FGFR3-Färbintensität zwischen HPV-positiven und -negativen Tumoren ergab.

Einen weiteren Unterschied zwischen unserer und der Studie von Koole et al. liefert die Strukturierung ihrer Kohorte: 80 % der Tumore befinden sich in Stadium III oder IV, während es bei uns rund 20 % weniger in diesen Stadien sind.

Davon abgesehen muss eine Korrelation des FGFR3-Mutationsstatus mit einer klinischen Variable nicht zwingend bedeuten, dass sich diese Beobachtung auf der FGFR3-Expressionsebene nachvollziehen lässt. In einer Studie an Harnblasenkarzinomen dokumentierten Tomlinson et al. zwar bei 85 % der in *FGFR3* mutierten Tumore ebenfalls eine hohe FGFR3-Expression, allerdings wiesen auch 42 % der nicht-mutierten Tumore eine hohe FGFR3-Expression auf (138).

Wie bei Koole et al. gab es in unserer Kohorte keine Korrelation zwischen FGFR3-Expression und Gesamtüberleben der Patienten. Auch Bersani et al. stellten in HNSCC keinen Effekt von FGFR3 auf das Gesamtüberleben fest, aber dokumentieren bei vorhandener *FGFR3*-Mutation eine signifikant schlechtere Rate für das krankheitsfreie Überleben (disease-free survival) (133).

Wir ermittelten eine Abnahme der FGFR3-Expression von der normalen Mukosa hin zum Primärtumor; im Primarius war die FGFR3-Färbung intensiver als in der Lymphknotenmetastase und dort konnten wir wiederum einen Trend zu einer höheren Expression als im Lokalrezidiv feststellen.

Eine Abnahme der Expression während des Tumorprogresses wurde bereits von einer Vielzahl an Autoren und in unterschiedlichen Entitäten beschrieben:

In Tumoren der Kopf-Hals-Region ist ein Trend zu einer stärkeren FGFR3-Expression in weniger fortgeschrittenen Tumorstadien vorbeschrieben: Nayak et al. stellten eine vermehrte FGFR3-Expression in den UICC-Stadien I und II fest (134).

Ähnlich den Ergebnissen aus unserer Kohorte beobachteten Sonvilla et al. bei kolorektalen Karzinomen eine geringere FGFR3-Expression als im Normalgewebe (139). In anderen Tumorentitäten sind außer FGFR3-Expressionsunterschieden auch FGFR3-Mutationen beschrieben, die mit niedrigen Tumorstadien assoziiert zu sein scheinen. In Glioblastomen stellten Lindgren et al. in 80 bzw. 64 % der G1- oder G2-differenzierten Primärtumore eine Mutation in *FGFR3* fest, während von elf G3-differenzierten Tumoren nur einer eine *FGFR3*-Mutation aufwies (140).

Tomlinson et al. identifizierten eine ähnliche Korrelation zwischen niedrigem Tumorstadium sowie gut differenzierten Tumoren mit einer hohen *FGFR3*-Mutationsfrequenz in Harnblasentumoren (138). Dazu passen die Beobachtungen

durch van Rhijn et al., dass ein positiver *FGFR3*-Mutationsstatus in oberflächlichen Harnblasentumoren mit einer niedrigen Rezidivrate assoziiert ist (99).

Im Gegensatz dazu dokumentierten Guancial et al. in einer 231 Fälle-starken Kohorte, bestehend aus Primärtumoren der Harnblase sowie 33 Metastasen, eine höhere *FGFR3*-Expressionsrate für Metastasen als für Primärtumore. Einen Einfluss auf das Gesamtüberleben übte *FGFR3* jedoch auch hier nicht aus (141).

Welche genetischen Grundlagen hinter der *FGFR3*-Expression stehen, können wir an unserer Kohorte nicht nachvollziehen. Es wäre jedoch interessant zu erfahren, inwieweit Mutationen im Verhältnis zur *FGFR3*-Protein-Expression auftreten. Bis jetzt wurden bereits *FGFR3*-Mutationen für HNO-Tumore identifiziert, von denen eine als Driver-Mutation bekannt ist. Die S249C-Mutation kommt bei Bersani et al. sowie bei Seiwert et al. nur in HPV-positiven Tumoren vor (108, 133).

Zusätzlich wäre möglicherweise auch die genauere Evaluation der Rolle von Fusionsproteinen in HNSCC aufschlussreich. Ein bereits in Einzelfällen vorbeschriebenes Beispiel ist *FGFR3-TACC3* (19, 106). Zellen, die ein solches Fusionsprotein tragen, weisen eine gesteigerte Sensitivität für eine *FGFR3*-Inhibition auf, während seine Überexpression eine Steigerung der Proliferationsrate bewirkt (142).

Zusammengenommen gibt die aktuelle Studienlage keinen Hinweis darauf, dass *FGFR3* als zuverlässiger prognostischer Parameter in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region agiert. Welche genaue Funktion es in den einzelnen Entitäten übernimmt, bedarf zusätzlicher Abklärung.

In weiterführenden *in vitro*-Untersuchungen unserer Gruppe zu *FGFR3* wurde eine gesteigerte Proliferationsrate sowie eine erhöhte Inhibitor-Sensitivität bei *FGFR3*-überexprimierenden Zellen dokumentiert (123). *FGFR3*-Inhibition könnte deshalb für eine Subgruppe von Patienten wichtig sein. Weitere Studien hierzu und zur *FGFR3*-Expression als möglichem prädiktiven Marker sind allerdings notwendig.

## 9 Zusammenfassung

Tumore der Kopf-Hals-Region stellen mit circa 387.100 jährlich neu gestellten Krebsdiagnosen die zehnthäufigste Tumorentität weltweit dar (2).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Verständnis der Tumorbilogie – insbesondere der beiden Rezeptortyrosinkinasen FGFR3 und AXL – in HNO-Tumoren zu erweitern und mögliche Therapieoptionen zu erkennen.

Die an 495 Gewebeproben untersuchte Expression von AXL nahm vom Normalgewebe bis hin zum lokalen Rezidiv kontinuierlich zu. Obgleich dies ein Hinweis auf eine wachsende Bedeutung von AXL während der Tumorprogression ist, stellte AXL in unserer Kohorte keinen Faktor für eine ungünstige Prognose dar. Damit widersprechen unsere Daten denen einiger anderer Studien (85-87), was an methodischen oder geografischen Unterschieden liegen mag, aber auch durch strukturelle Diskrepanzen der Kohorten begründet sein könnte.

Die Ergebnisse unserer funktionellen Versuche zeigen, dass AXL grundlegend in die Migration und Invasion von Tumorzellen eingebunden ist und diese Funktion mit BGB324 selektiv inhibiert werden kann. AXL übt in unserer Studie keinen Einfluss auf die Proliferation aus. Unsere Daten geben einen Hinweis darauf, dass eine AXL-Inhibition möglicherweise in Kombination mit weiteren therapeutischen Herangehensweisen eine Tumorprogression verhindern könnte.

Durch eine immunhistochemische Analyse an 743 Gewebeproben fanden wir heraus, dass FGFR3 in der normalen Mukosa am stärksten exprimiert wird, während seine Expression über Primärtumor, Lymphknotenmetastase bis hin zum Lokalrezidiv abnimmt. Bei einer Subgruppe von 7,5 % der Patienten jedoch dokumentierten wir eine besonders starke FGFR3-Expression im Primarius. Bei der Korrelation mit klinischen Daten stellten wir eine höhere FGFR3-Expression bei positivem HPV-Status fest, was übereinstimmt mit Ergebnissen aus Studien, die eine höhere *FGFR3*-Mutationsrate bei positivem HPV-Status feststellten (19, 108, 133). FGFR3 ist in unserer sowie in den Kohorten anderer nicht mit dem Gesamtüberleben assoziiert (133, 137). Auch wenn FGFR3 vermutlich keinen robusten prognostischen Faktor darstellt, könnte eine FGFR3-Inhibition für eine Subgruppe an Patienten mit besonders hoher Expression von Bedeutung sein und als prädiktiver Marker für Therapieansprechen dienen.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics. *CA*. 2016. 66: 7–30.
2. Torre L A, Bray F, Siegel R L, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics. *CA*. 2012. 65: 87–108
3. Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *The oncologist*. 2010. 15: 994-1001.
4. Wynder E L, Bross I J, Feldman R M. A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer*. 1957. 10: 1300–1323
5. Blot W J, McLaughlin J K, Winn D J, Austin D F, Greenberg R S, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg J B, Stemhagen A, Fraumeni J F. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Research*. 1988. 3282-3287.
6. Shindoh M, Chiba I, Yasuda M, Saito T, Funaoka K, Kohgo T, Amemiya A, Sawada Y, Fujinaga J. Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression. *Cancer*. 1995. 76: 1513-1521.
7. Kreimer A R, Clifford G M, Boyle P, Franceschi S. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2005. 14: 467-475.
8. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & Neck*. 2013. 35: 747–755.
9. Gooi Z, Chan J Y K, Fakhry C. The Epidemiology of the Human Papillomavirus Related to Oropharyngeal Head and Neck Cancer. *The Laryngoscope*. 2016. 894–900.
10. Lindel K, Beer K T, Laissue J, Greiner R H, Aebbersold D M. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer*. 2001. 92: 805-813.
11. Mao L, Hong W K, Papadimitrakopoulou V A. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell*. 2004. 5: 311–316.
12. Cohen E E W. Role of Epidermal Growth Factor Receptor Pathway–Targeted Therapy in Patients With Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of clinical oncology*. 2006. 24: 2659-2665.
13. Boeninghaus H-G, Lenarz T. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, 13. 8.15.2 Nasenhaupthöhle und Nasennebenhöhlen; 11.2.2 Veränderungen der Zungenoberfläche; 11.4.2 Malignome; 14.5.2 Präkanzerosen: pp. 191, 218, 230, 273. Springer: Heidelberg, 2007.
14. Leemans C R, Braakhuis B J M, Brakenhoff R H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2011. 11: 9-22.
15. Woolgar J A, Triantafyllou A. Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. *Oral Pathology*. 2008. 45: 361–385.
16. Chung C H, Parker J S, Karaca G, Wu J, Funkhouser W K, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, Shockley W W, Weissler M C, Dressler L G, Shores C G, Yarbrough W G, Perou C M. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*. 2004. 5: 489–500.

17. Hayes D N, Grandis J R. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*; 2015:576–582.
18. Smeets S J, Brakenhoff R H, Ylstra B, van Wieringen W N, van de Wiel J A, Leemans C R, Braakhuis B J M. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. *Cellular Oncology*. 2009. 31: 291-300.
19. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015. 576-582.
20. Baker S J, Fearon E R, Nigro J M, Hamilton S R, Preisinger A C, Jessup J M, Van Tuinen P, Ledbetter D H, Barker D F, Nakamura Y, Withe R, Vogelstein B. Chromosome 17 Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. *Science*. 1989. 244: 217-221.
21. Lane D P. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992. 358: 15–16.
22. Kastan M B, Kuerbitz S J. Control of G1 arrest after DNA damage. *Environ Health Perspectives*. 1993. 101: 55–58.
23. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997. 387: 296-299.
24. Kubbutat M H G, Jones S N, Vousden K H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997. 387: 299 - 303.
25. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters*. 1997. 420: 25–27.
26. Prives C. Signaling to p53: Breaking the MDM2–p53 Circuit. *Cell*. 2001. 95: 5-8.
27. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois N J, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlov I, Lee H-W, Cordon-Cardo C, DePinho R A. The Ink4a Tumor Suppressor Gene Product, p19Arf, Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53. *Cell*. 1998. 92: 713–723.
28. Liggett W H, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of clinical oncology*. 1998. 16: 1197-1206.
29. Sherr C J, Bertwistle D, Den Besten W, Kuo M-L, Sugimoto M, Tago K, Williams R T, Zindy F, Roussel M F. p53-Dependent and -Independent Functions of the Arf Tumor Suppressor. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2005. 70: 129-137.
30. Lui V W Y, Hedberg M L, Li H, Vangara B S, Pendleton K, Zeng Y, Lu Y, Zhang Q, Du Y, Gilbert B R, Freilino M, Sauerwein S, Peyser N D, Xiao D, Diergaarde B, Wang L, Chiosea S, Seethala R, Johnson J T, Kim S, Duvvuri U, Ferris R L, Romkes M, Nukui T, Kwok-Shing Ng P, Garraway L A, Hammerman P S, Mills G B, Grandis J R. Frequent Mutation of the PI3K Pathway in Head and Neck Cancer Defines Predictive Biomarkers. *Cancer Discovery*. 2013. 3: 761-769.
31. Rafalski V A, Brunet A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Progress in Neurobiology*. 2011. 93: 182–203.
32. Ángel J, Vara F, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Báron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2004. 30: 193–204.
33. Okami K, Wu L, Riggins G, Cairns P, Goggins M, Evron E, Halachmi N, Ahrendt S A, Reed A L, Hilgers W, Kern S E, Koch W M, Sidransky D, Jen J. Analysis of PTEN/MMAC1 Alterations in Aerodigestive Tract Tumors. *Cancer Research*. 1997. 509-511.

34. Shao X, Tandon R, Samara G, Kanki H, Yano H, Close L G, Parsons R, Sato T. Mutational analysis of the PTEN gene in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*. 1998. 684–688.
35. Mountzios G, Rampias T, Psyrri A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Annals of Oncology*. 2014. 25: 1889-1900.
36. Korshunov V A. Axl-dependent signalling: a clinical update. *Clinical Science*. 2012. 122: 361-368.
37. Lee J I, Soria J-C, Hassan K A, El-Naggar A K, Tang X, Liu D D, Ki Hong W, Mao L. Loss of PTEN Expression as a Prognostic Marker for Tongue Cancer. *Archives Otolaryngology Head Neck Surgery*. 2001. 172: 1441-1445.
38. Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, du Manoir S. A Simple Specific Pattern of Chromosomal Aberrations at Early Stages of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Research*. 2001. 61: 4122-4129.
39. Woenckhaus J, Steger K, Werner E, Fenic I, Gamerdinger U, Dreyer T, Stahl U. Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *The Journal of Pathology*. 2002. 198: 335–342.
40. Qiu W, Schönleben F, Li X, Ho D J, Close L G, Manolidis S, Bennett B P, Su G H. PIK3CA Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2006. 12: 1441-1446.
41. Göke F, Franzen A, Hinz T K, Marek L A, Yoon P, Sharma R, Bode M, von Maessenhausen A, Lankat-Buttgereit B, Göke A, Golletz C, Kirsten R, Boehm D, Vogel W, Kleczko E K, Eagles J R, Hirsch F R, Van Bremen T, Bootz F, Schroeck A, Kim J, Tan A-C, Jimeno A, Heasley L E, Perner S. FGFR1 Expression Levels Predict BGJ398 Sensitivity of FGFR1-Dependent Head and Neck Squamous Cell Cancers. *Clinical Cancer Research*. 2015. 21: 4356-4364.
42. Leeman R J, Lui V W Y, Grandis J R. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert opinion on biological therapy*. 2006. 6: 231-241.
43. Izzo J G, Papadimitrakopoulou V A, Li X Q, Ibarguen H, Lee J S, Ro J Y, El-Naggar A, Hong W K, Hittelman W N. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene*. 1998. 17: 2313-2322.
44. Bartkova J, Lukas J, Müller H, Strauss M, Gusterson B, Bartek J. Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Research*. 1995. 55: 949-956.
45. Braakhuis B J M, Snijders P J F, Keune W-J H, Meijer C J L M, Ruijter-Schippers H J, Leemans C R, Braakenhoff R H. Genetic Patterns in Head and Neck Cancers That Contain or Lack Transcriptionally Active Human Papillomavirus. *Journal of National Cancer Institute*. 2004. 96: 998-1006.
46. Schlegel R, Phelps W C, Zhang Y L, Barbosa M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *The EMBO journal*. 1988. 7: 3181–3187.
47. Werness B A, Levine A J, Howley P A. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990. 248: 76-79.



48. Dyson N, Howley P M, Munger K, Harlow E. The Human Papilloma Virus--16 E7 Oncoprotein Is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science*. 1989. 243: 934-937.
49. Robinson D R, Wu Y-M, Lin S-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 2000. 19: 5548-5557.
50. Hubbard S R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1999. 71: 343-358.
51. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990. 61: 203-212.
52. Lemmon M A, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010. 141: 1117-1134.
53. Schlessinger J, Lemmon M A. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE*. 2003. 2003: re12-re12.
54. Wiley H S, Burke P M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic*. 2001. 2: 12-18.
55. Kirkin V, Dikic I. Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007. 19: 199-205.
56. Östman A, Böhmer F-D. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends in Cell Biology*. 2001. 11: 258-266.
57. Thomas M L, Brown E J. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunology Today*. 1999. 20: 406-411.
58. Hotamisligil G S, Peraldi P, Budavari A, Ellis R. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha-and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996. 271: 665.
59. 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, Press M F. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989. 244: 707-712.
60. Nicholson R I, Gee J M W, Harper M E. EGFR and cancer prognosis. *European journal of cancer*. 2001. 37, Supplement 4: 9-15.
61. Hojjat-Farsangi M. Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies. *International journal of molecular sciences*. 2014. 15: 13768-13801.
62. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006. 6: 714-727.
63. Brooks A N, Kilgour E, Smith P D. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012. 18: 1855-1862.
64. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2010. 11: 121-128.
65. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon J-L, Van Laethem J-L, Maurel J, Richardson G. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2007. 25: 1658-1664.

66. Le Tourneau C, Faivre S, Raymond E. New developments in multitargeted therapy for patients with solid tumours. *Cancer Treatment Reviews*. 2008. 34: 37-48.
67. Kalyankrishna S, Grandis J R. Epidermal Growth Factor Receptor Biology in Head and Neck Cancer. *Journal of clinical oncology*. 2006. 24: 2666-2672.
68. Bonner J A, Harari P M, Giralt J, Azarnia N, Shin D M, Cohen R B, Jones C U, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies M S, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky E K, Ang K K. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*. 2006. 354: 567-578.
69. Vermorken J B, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer H-R, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008. 359: 1116-1127.
70. Siu L L, Soulieres D, Chen E X, Pond G R, Chin S F, Francis P, Harvey L, Klein M, Zhang W, Dancey J, Eisenhauer E A, Winqvist E. Phase I/II Trial of Erlotinib and Cisplatin in Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Princess Margaret Hospital Phase II Consortium and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study. *Journal of clinical oncology*. 2007. 25: 2178-2183.
71. Martins R G, Parvathaneni U, Bauman J E, Sharma A K, Raez L E, Papagikos M A, Yunus F, Kurland B F, Eaton K D, Liao J J, Mendez E, Futran N, Wang D X, Chai X, Wallace S G, Austin M, Schmidt R, Hayes D N. Cisplatin and Radiotherapy With or Without Erlotinib in Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Randomized Phase II Trial. *Journal of clinical oncology*. 2013. 31: 1415-1421.
72. Brown M, Black J R M, Sharma R, Stebbing J, Pinato D J. Gene of the month: Axl. *Journal of Clinical Pathology*. 2016. 69: 391-397.
73. O'Bryan J P, Frye R A, Cogswell P C, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, Le Beau M M, Earp H S, Liu E T. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Molecular and cellular biology*. 1991. 11: 5016-5031.
74. Wang Z, Lo H S, Yang H, Gere S, Hu Y, Buetow K H, Lee M P. Computational analysis and experimental validation of tumor-associated alternative RNA splicing in human cancer. *Cancer Research*. 2003. 63: 655-657.
75. Linger R M, Keating A K, Earp H S, Graham D K. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Advances in cancer research*. 2008. 100: 35-83.
76. Hafizi S, Dahlbäck B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006. 17: 295-304.
77. Koorstra J-B M, Karikari C, Feldmann G, Bisht S, Leal-Rojas P, Offerhaus G J A, Alvarez H, Maitra A. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biology & Therapy*. 2009. 8: 618-626.
78. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi J, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C, Lorens J, Ivaska J. Vimentin regulates EMT induction by Slug and

- oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 2011. 30: 1436-1448.
79. Byers L A, Diao L, Wang J, Saintigny P, Girard L, Peyton M, Shen L, Fan Y, Giri U, Tumula P K, Nilsson M B, Gudikote J, Tran H, Cardnell R J G, Bearss D J, Warner S L, Foulks J M, Kanner S B, Gandhi V, Krett N, Rosen S T, Kim E S, Herbst R S, Blumenschein G R, Lee J J, Lippman S M, Ang K K, Mills G B, Hong W K, Weinstein J N, Wistuba I I, Coombes K R, Minna J D, Heymach J V. An epithelial–mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clinical Cancer Research*. 2013. 19: 279-290.
80. Wimmel A, Glitz D, Kraus A, Roeder J, Schuermann M. Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion. *European journal of cancer*. 2001. 37: 2264-2274.
81. Zhang Z, Lee J C, Lin L, Olivas V, Au V, LaFramboise T, Abdel-Rahman M, Wang X, Levine A D, Rho J K, Choi Y J, Choi C-M, Kim S-W, Jang S J, Park Y S, Kim W S, Lee D H, Lee J-S, Miller V A, Arcila M, Ladanyi M, Moonsamy P, Sawyers C, Boggon T J, Ma P C, Costa C, Taron M, Rosell R, Halmos B, Bivona T G. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nature genetics*. 2012. 44: 852-860.
82. Brand T M, Iida M, Stein A P, Corrigan K L, Braverman C M, Luthar N, Toulany M, Gill P S, Salgia R, Kimple R J, Wheeler D L. AXL Mediates Resistance to Cetuximab Therapy. *Cancer Research*. 2014. 74: 5152-5164.
83. Meyer A S, Miller M A, Gertler F B, Lauffenburger D A. The Receptor AXL Diversifies EGFR Signaling and Limits the Response to EGFR-Targeted Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Science Signaling*. 2013. 6: ra66-ra66.
84. Elkabets M, Pazarentzos E, Juric D, Sheng Q, Pelosof Raphael A, Brook S, Benzaken Ana O, Rodon J, Morse N, Yan Jenny J, Liu M, Das R, Chen Y, Tam A, Wang H, Liang J, Gurski Joseph M, Kerr Darcy A, Rosell R, Teixidó C, Huang A, Ghossein Ronald A, Rosen N, Bivona Trever G, Scaltriti M, Baselga J. AXL Mediates Resistance to PI3K $\alpha$  Inhibition by Activating the EGFR/PKC/mTOR Axis in Head and Neck and Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Cell*. 2015. 27: 533-546.
85. Giles K M, Kalinowski F C, Candy P A, Epis M R, Zhang P M, Redfern A D, Stuart L M, Goodall G J, Leedman P J. Axl Mediates Acquired Resistance of Head and Neck Cancer Cells to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib. *Molecular cancer therapeutics*. 2013. 12: 2541-2558.
86. Lee C-H, Yen C-Y, Liu S-Y, Chen C-K, Chiang C-F, Shiah S-G, Chen P-H, Shieh Y-S. Axl is a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2012. 19: 500-508.
87. Brand T M, Iida M, Stein A P, Corrigan K L, Braverman C M, Coan J P, Pearson H E, Bahrar H, Fowler T L, Bednarz B P, Saha S, Yang D, Gill P S, Lingen M W, Saloura V, Villaflor V M, Salgia R, Kimple R J, Wheeler D L. AXL Is a Logical Molecular Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2015. 21: 2601-2612.
88. Hellesøy M, Gullaksen S-E, Tislevoll B S, Fagerholt O H E, Reikvam H, Loges S, Cortes J, Heuser M, Chromik J, Skavland J, Sulen A, Bruserud Ø, Lorens J, Gausdal G, Micklem D, Gjertsen B T. Single Cell Signaling Pharmacodynamics in a Phase 1b Trial of the Axl Inhibitor BGB324 in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2016. 128: 3995-3995.

89. Göke F, Bode M, Franzen A, Kirsten R, Goltz D, Goke A, Sharma R, Boehm D, Vogel W, Wagner P, Lengerke C, Kristiansen G, Kirfel J, Van Bremen T, Bootz F, Heasley L E, Schrock A, Perner S. Fibroblast growth factor receptor 1 amplification is a common event in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mod Pathol*. 2013. 26: 1298-1306.
90. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010. 10: 116-129.
91. L'hôte C G, Knowles M A. Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Experimental cell research*. 2005. 304: 417-431.
92. Bocharov Eduard V, Lesovoy Dmitry M, Goncharuk Sergey A, Goncharuk Marina V, Hristova K, Arseniev Alexander S. Structure of FGFR3 Transmembrane Domain Dimer: Implications for Signaling and Human Pathologies. *Structure*. 2013. 21: 2087-2093.
93. Eswarakumar V P, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2005. 16: 139-149.
94. Sahni M, Ambrosetti D-C, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes & development*. 1999. 13: 1361-1366.
95. Govindarajan V, Overbeek P A. Secreted FGFR3, but not FGFR1, inhibits lens fiber differentiation. *Development*. 2001. 128: 1617-1627.
96. Vidrich A, Buzan J M, Ilo C, Bradley L, Skaar K, Cohn S M. Fibroblast growth factor receptor-3 is expressed in undifferentiated intestinal epithelial cells during murine crypt morphogenesis. *Developmental dynamics*. 2004. 230: 114-123.
97. Harada D, Yamanaka Y, Ueda K, Nishimura R, Morishima T, Seino Y, Tanaka H. Sustained phosphorylation of mutated FGFR3 is a crucial feature of genetic dwarfism and induces apoptosis in the ATDC5 chondrogenic cell line via PLC $\gamma$ -activated STAT1. *Bone*. 2007. 41: 273-281.
98. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*. 1996. 84: 911-921.
99. van Rhijn B W G, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels W J, van der Kwast T H, Zwarthoff E C. The Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Mutation Is a Strong Indicator of Superficial Bladder Cancer with Low Recurrence Rate. *Cancer Research*. 2001. 61: 1265-1268.
100. 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. *Nature genetics*. 1999. 23: 18-20.
101. di Martino E, Kelly G, Roulson J-A, Knowles M A. Alteration of Cell-Cell and Cell-Matrix Adhesion in Urothelial Cells: An Oncogenic Mechanism for Mutant FGFR3. *Molecular Cancer Research*. 2014.
102. Singh D, Chan J M, Zoppoli P, Niola F, Sullivan R, Castano A, Liu E M, Reichel J, Porrati P, Pellegatta S, Qiu K, Gao Z, Ceccarelli M, Riccardi R, Brat D J, Guha A, Aldape K, Golfinos J G, Zagzag D, Mikkelsen T, Finocchiaro G, Lasorella A, Rabadan R, Iavarone A. Transforming Fusions of FGFR and TACC Genes in Human Glioblastoma. *Science*. 2012. 337: 1231-1235.

103. Parker B C, Annala M J, Cogdell D E, Granberg K J, Sun Y, Ji P, Li X, Gumin J, Zheng H, Hu L, Yli-Harja O, Haapasalo H, Visakorpi T, Liu X, Liu C-g, Sawaya R, Fuller G N, Chen K, Lang F F, Nykter M, Zhang W. The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma. *The Journal of clinical investigation*. 2013. 123: 855-865.
104. Capelletti M, Dodge M E, Ercan D, Hammerman P S, Park S-I, Kim J, Sasaki H, Jablons D M, Lipson D, Young L, Stephens P J, Miller V A, Lindeman N I, Munir K J, Richards W G, Jänne P A. Identification of Recurrent FGFR3–TACC3 Fusion Oncogenes from Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2014. 20: 6551-6558.
105. Carneiro B A, Elvin J A, Kamath S D, Ali S M, Paintal A S, Restrepo A, Berry E, Giles F J, Johnson M L. FGFR3–TACC3: A novel gene fusion in cervical cancer. *Gynecologic Oncology Reports*. 2015. 13: 53-56.
106. Yuan L, Liu Z-H, Lin Z-R, Xu L-H, Zhong Q, Zeng M-S. Recurrent FGFR3-TACC3 fusion gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*. 2014. 15: 1613-1621.
107. Daly C, Castanaro C, Zhang W, Zhang Q, Wei Y, Ni M, Young T M, Zhang L, Burova E, Thurston G. FGFR3-TACC3 fusion proteins act as naturally occurring drivers of tumor resistance by functionally substituting for EGFR/ERK signaling. *Oncogene*. 2017. 36: 471-481.
108. Seiwert T Y, Zuo Z, Keck M K, Khattri A, Peadamallu C S, Stricker T, Brown C, Pugh T J, Stojanov P, Cho J, Lawrence M S, Getz G, Brägelmann J, DeBoer R, Weichselbaum R R, Langerman A, Portugal L, Blair E, Stenson K, Lingen M W, Cohen E E W, Vokes E E, White K P, Hammerman P S. Integrative and Comparative Genomic Analysis of HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 2015. 21: 632-641.
109. Henson B J, Gollin S M. Overexpression of KLF13 and FGFR3 in Oral Cancer Cells. *Cytogenetic and Genome Research*. 2010. 128: 192-198.
110. Chae Y K, Ranganath K, Hammerman P S, Vaklavas C, Mohindra N, Kalyan A, Matsangou M, Costa R, Carneiro B, Villaflor V M, Cristofanilli M, Giles F J. Inhibition of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) pathway: the current landscape and barriers to clinical application. *Oncotarget*. 2017. 8: 16052-16074.
111. Rouanne M, Lorient Y, Leuret T, Soria J-C. Novel therapeutic targets in advanced urothelial carcinoma. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016. 98: 106-115.
112. Smyth E C, Turner N C, Peckitt C, Pearson A, Brown G, Chua S, Gillbanks A, Johnston S R, Tarazona N, Cutts R, Gillbanks A, Kilgour E, Smith N R, Rooney C, Watkins D, Chau I, Popat S, Cunningham D. Phase II multicenter proof of concept study of AZD4547 in FGFR amplified tumours: American Society of Clinical Oncology; 2015.
113. Martínez-Torrecedrada J, Cifuentes G, López-Serra P, Saenz P, Martínez A, Casal J I. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clinical Cancer Research*. 2005. 11: 6280-6290.
114. Qing J, Du X, Chen Y, Chan P, Li H, Wu P, Marsters S, Stawicki S, Tien J, Totpal K, Ross S, Stinson S, Dornan D, French D, Wang Q-R, Stephan J-P, Wu Y, Wiesmann C, Ashkenazi A. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t (4; 14)-positive multiple myeloma in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009. 119: 1216-1229.

115. Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Harada K, Yoshida H, Sato M. Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines. *International journal of cancer*. 1997. 70: 120-127.
116. Rheinwald J G, Beckett M A. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Research*. 1981. 41: 1657-1663.
117. Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl A-C, Scheble V J, Maier S, Reischl M, Mikut R, Altorki N K, Moch H, Fend F, Staebler A, Bass A J, Meyerson M, Rubin M A, Soltermann A, Lengerke C, Perner S. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol*. 2011. 24: 944-953.
118. von Mässenhausen A, Brägelmann J, Billig H, Thewes B, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schrock A, Bootz F, Brossart P, Kirfel J, Perner S. Implication of the Receptor Tyrosine Kinase AXL in Head and Neck Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2016. 18.
119. von Mäßenhausen A F. Entwicklung neuer Therapien in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs-Die Rolle der Rezeptortyrosinkinase FGFR3, DDR2, MERTK und AXL. Math.-Nat. Diss. Bonn; 2016.
120. von Mässenhausen A, Sanders C, Thewes B, Deng M, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Duensing S, Schröck A, Bootz F, Brossart P, Kirfel J, Heasley L, Brägelmann J, Perner S. MERTK as a novel therapeutic target in head and neck cancer. *Oncotarget*. 2016. 7: 32678-32694.
121. Cox D R. Regression Models and Life-Tables (aus der Serie *Breakthroughs in Statistics: Methodology and Distribution*). New York: Springer New York; 1992.
122. Kaplan E L, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*. 1958. 53: 457-481.
123. von Mässenhausen A, Deng M, Billig H, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Göke F, Franzen A, Heasley L, Kirfel J, Brägelmann J, Perner S. Evaluation of FGFR3 as a Therapeutic Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Targeted oncology*. 2016. 11: 631-642.
124. Shih Y-S, Lai C-Y, Kao Y-R, Shiah S-G, Chu Y-W, Lee H-S, Wu C-W. Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia*. 2005. 7: 1058-1064.
125. Linger R M A, Cohen R A, Cummings C T, Sather S, Migdall-Wilson J, Middleton D H G, Lu X, Baron A E, Franklin W A, Merrick D T, Jedlicka P, DeRyckere D, Heasley L E, Graham D K. Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2013. 32: 3420-3431.
126. Holland S J, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, Duan M, Torneros A, Yu J, Heckrodt T J, Zhang J, Ding P, Apatira A, Chua J, Brandt R, Pine P, Goff D, Singh R, Payan D G, Hitoshi Y. R428, a Selective Small Molecule Inhibitor of Axl Kinase, Blocks Tumor Spread and Prolongs Survival in Models of Metastatic Breast Cancer. *Cancer Research*. 2010. 70: 1544-1554.
127. Paccez J D, Vasques G J, Correa R G, Vasconcellos J F, Duncan K, Gu X, Bhasin M, Libermann T A, Zerbini L F. The receptor tyrosine kinase Axl is

- an essential regulator of prostate cancer proliferation and tumor growth and represents a new therapeutic target. *Oncogene*. 2013. 32: 689-698.
128. Shiozawa Y, Pedersen E A, Patel L R, Ziegler A M, Havens A M, Jung Y, Wang J, Zalucha S, Loberg R D, Pienta K J, Taichman R S. GAS6/AXL Axis Regulates Prostate Cancer Invasion, Proliferation, and Survival in the Bone Marrow Niche. *Neoplasia*. 2010. 12: 116-IN114.
  129. Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle H-H, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, Kiessling F, Eichelsbacher U, Essig M, Read T-A, Erber R, Ullrich A. Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. 103: 5799-5804.
  130. Song X, Wang H, Logsdon C D, Rashid A, Fleming J B, Abbruzzese J L, Gomez H F, Evans D B, Wang H. Overexpression of receptor tyrosine kinase Axl promotes tumor cell invasion and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*. 2011. 117: 734-743.
  131. Liao R G, Jung J, Tchaicha J, Wilkerson M D, Sivachenko A, Beauchamp E M, Liu Q, Pugh T J, Peadarallu C S, Hayes D N, Gray N S, Getz G, Wong K-K, Haddad R I, Meyerson M, Hammerman P S. Inhibitor-Sensitive FGFR2 and FGFR3 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*. 2013. 73: 5195-5205.
  132. Tiseo M, Gelsomino F, Alfieri R, Cavazzoni A, Bozzetti C, De Giorgi A M, Petronini P G, Ardizzoni A. FGFR as potential target in the treatment of squamous non small cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2015. 41: 527-539.
  133. Bersani C, Sivars L, Haegglblom L, DiLorenzo S, Mints M, Ährlund-Richter A, Tertipis N, Munck-Wikland E, Näsman A, Ramqvist T, Dalianis T. Targeted sequencing of tonsillar and base of tongue cancer and human papillomavirus positive unknown primary of the head and neck reveals prognostic effects of mutated FGFR3. *Oncotarget*. 2017.
  134. Nayak S, Goel M M, Makker A, Bhatia V, Chandra S, Kumar S, Agarwal S. Fibroblast Growth Factor (FGF-2) and Its Receptors FGFR-2 and FGFR-3 May Be Putative Biomarkers of Malignant Transformation of Potentially Malignant Oral Lesions into Oral Squamous Cell Carcinoma. *PloS one*. 2015. 10: e0138801.
  135. Sweeny L, Zimmermann T M, Liu Z, Rosenthal E L. Evaluation of Tyrosine Receptor Kinases in the Interactions of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells and Fibroblasts. *Oral Oncology*. 2012. 48: 1242-1249.
  136. Aubertin J, Tourpin S, Janot F, Ahomadegbe J-C, Radvanyi F. Analysis of fibroblast growth factor receptor 3 G697C mutation in oral squamous cell carcinomas. *International journal of cancer*. 2007. 120: 2058-2059.
  137. Koole K, van Kempen P M W, Swartz J E, Peeters T, van Diest P J, Koole R, van Es R J J, Willems S M. Fibroblast growth factor receptor 3 protein is overexpressed in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine*. 2016. 5: 275-284.
  138. Tomlinson D C, Baldo O, Harnden P, Knowles M A. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *The Journal of Pathology*. 2007. 213: 91-98.
  139. Sonvilla G, Allerstorfer S, Heinzle C, Stattner S, Karner J, Klimpfinger M, Wrba F, Fischer H, Gauglhofer C, Spiegl-Kreinecker S, Grasl-Kraupp B, Holzmann K, Grusch M, Berger W, Marian B. Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration. *Br J Cancer*. 2010. 102: 1145-1156.

140. Lindgren D, Liedberg F, Andersson A, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, Mansson W, Fioretos T, Höglund M. Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene*. 2006. 25: 2685-2696.
141. Guancial E A, Werner L, Bellmunt J, Bamias A, Choueiri T K, Ross R, Schutz F A, Park R S, O'Brien R J, Hirsch M S, Barletta J A, Berman D M, Lis R, Loda M, Stack E C, Garraway L A, Riester M, Michor F, Kantoff P W, Rosenberg J E. FGFR3 expression in primary and metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Medicine*. 2014. 3: 835-844.
142. Wu Y-M, Su F, Kalyana-Sundaram S, Khazanov N, Ateeq B, Cao X, Lonigro R J, Vats P, Wang R, Lin S-F, Cheng A-J, Kunju L P, Siddiqui J, Tomlins S A, Wyngaard P, Sadis S, Roychowdhury S, Hussain M H, Feng F Y, Zalupski M M, Talpaz M, Pienta K J, Rhodes D R, Robinson D R, Chinnaiyan A M. Identification of Targetable FGFR Gene Fusions in Diverse Cancers. *Cancer Discovery*. 2013. 3: 636-647.

## 11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Deregulation des Zellzyklus durch den humanen Papillomavirus.....	12
Abbildung 2: AXL-Signalwege.....	17
Abbildung 3: Struktur des FGF-FGFR-Komplexes .....	19
Abbildung 4: AXL-Expression in HNSCC-Patienten.....	34
Abbildung 5: AXL-Expression / graphische Darstellung.....	36
Abbildung 6: AXL-Überlebensanalyse.....	37
Abbildung 7: AXL-Überexpression .....	39
Abbildung 8: AXL-Inhibition mit BGB324.....	40
Abbildung 9: FGFR3-Expression in HNSCC-Patienten.....	41
Abbildung 10: FGFR3-Expression / graphische Darstellung .....	42
Abbildung 11: FGFR3-Expression und TNM- / G-Stadium / HPV-Status .....	43
Abbildung 12: FGFR3-Überlebensanalyse.....	44

## 12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Software .....	23
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	24
Tabelle 4: Reaktionskits .....	26
Tabelle 5: Sammelgel für Gelelektrophorese .....	26
Tabelle 6: Trenngel für Gelelektrophorese .....	27
Tabelle 7: Antikörper .....	28



Tabelle 8: Zelllinien .....	29
Tabelle 9: Multivariates Cox-Regressionsmodell für AXL. ....	37
Tabelle 10: Multivariates Cox-Regressionsmodell für FGFR3 .....	45
Tabelle 11: AXL-Patientenkollektiv.....	66
Tabelle 12: FGFR3-Patientenkollektiv.....	68

## 13 Anhang

### 13.1 Tabellen

**Tabelle 11:** AXL-Patientenkollektiv. Für einige Patienten waren Gewebeproben für mehr als eine Entität verfügbar (z. B. Normalgewebe, Primärtumor).

	Anzahl	Durchschnittliche AXL-Expression (willkürliche Einheit)	Statistiken
<b>Verfügbare Gewebe</b>			
Normale Mukosa	24 (13*)	0,256	Normale Mukosa vs. Primarius, Lymphknoten- metastase und Rezidiv: p < 0,001 <sup>(1)</sup>
Primärtumor	281 (17*)	0,304	
Lymphknoten-Metastase	146 (14*)	0,401	
Lokales Rezidiv	44 (5*)	0,551	
Patienten mit klinischen Daten n = 321			
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	240 (74,8 %)	0,304	p = 0,108 <sup>(1)</sup>
Weiblich	81 (25,2 %)	0,250	
<b>Alter [Jahre, SD]</b>	61,7 (11,7 %)		
<b>Alter</b>			
< 54	86 (26,8 %)	0,305	p = 0,635 <sup>(2)</sup>
54-62	84 (26,2 %)	0,272	
62-70	80 (24,9 %)	0,342	
> 70	71 (22,1 %)	0,255	
<b>Anatomische Lokalisation des Primärtumors</b>			
Mundhöhle	80 (24,9 %)	0,295	p = 0,229 <sup>(2)</sup>
Oropharynx	117 (36,4 %)	0,246	
Hypopharynx/ Larynx	116 (36,1 %)	0,317	
Unbekannt	8 (2,5 %)		
<b>Tabak</b>			
Nichtraucher	27 (8,4 %)	0,290	p = 0,13 <sup>(1)</sup>
Raucher	223 (69,5 %)	0,351	
Unbekannt	71 (22,1 %)		

<b>Alkohol</b>			
Nichttrinker	89 (27,7 %)	0,312	p = 0,112 <sup>(2)</sup>
Gelegentlich	58 (18,1 %)	0,351	
Mittel bis stark	85 (26,5 %)	0,244	
Unbekannt	89 (27,7 %)		
<b>HPV-Status</b>			
Positiv	30 (9,3 %)	0,295	p = 0,429 <sup>(1)</sup>
Negativ	291 (90,7 %)	0,338	
<b>T-Stadium des Primärtumors</b>			
T1	76 (23,7 %)	0,299	p = 0,324 <sup>(2)</sup>
T2	119 (37,1 %)	0,328	
T3	72 (22,4 %)	0,274	
T4	50 (15,6 %)	0,242	
Unbekannt	4 (2,2 %)		
<b>N Stadium des Primärtumors</b>			
N0	137 (42,7 %)	0,288	p = 0,495 <sup>(2)</sup>
N1	48 (15,0 %)	0,325	
N2	124 (38,6 %)	0,260	
N3	5 (1,6 %)	0,288	
Unbekannt	7 (2,2 %)		
<b>M Stadium des Primärtumors</b>			
M0	305 (95 %)	0,290	p = 0,32 <sup>(1)</sup>
M1	14 (4,4 %)	0,227	
Unbekannt	2 (0,6 %)		

\* Anzahl der Patienten ohne klinische Informationen

(1) Mann-Whitney-U-Test, (2) Kruskal-Wallis-H-Test, SD: Standardabweichung, HPV: Humaner Papillomavirus.

Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (118).

**Tabelle 12:** FGFR3-Patientenkollektiv. Für einige Patienten waren Gewebeproben für mehr als eine Entität verfügbar (z. B. Normalgewebe, Primärtumor).

	<b>Anzahl</b>	<b>Durchschnittliche FGFR3-Expression (willkürliche Einheit)</b>	<b>Statistiken</b>
<b>Verfügbare Gewebe</b>			
Normale Mukosa	36 (18*)	0,257	Normale Mukosa vs. Primarius, Lymphknoten- metastase und Rezidiv: p = 0,006 <sup>(1)</sup>
Primärtumor	455 (51*)	0,217	
Lymphknoten-Metastase	199 (19*)	0,175	
Lokales Rezidiv	53 (7*)	0,159	
Patienten mit klinischen Daten n = 449			
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	333 (74,2 %)	0,214	p = 0,366 <sup>(1)</sup>
Weiblich	116 (25,8 %)	0,224	
<b>Alter [Jahre, SD]</b>	62,5 (11,1)		
<b>Alter</b>			
< 54	115 (25,6 %)	0,22	p = 0,952 <sup>(2)</sup>
54-62	121 (26,9 %)	0,216	
62-70	112 (24,9 %)	0,212	
> 70	101 (22,5 %)	0,218	
<b>Anatomische Lokalisation des Primärtumors</b>			
Mundhöhle	115 (26,9 %)	0,209	p = 0,431 <sup>2)</sup>
Oropharynx	143 (31,8 %)	0,228	
Hypopharynx/ Larynx	184 (41 %)	0,213	
Unbekannt	7 (1,6 %)		
<b>Tabak</b>			
Nichtraucher	42 (9,4 %)	0,242	p = 0,047 <sup>(1)</sup>
Raucher	302 (67,3 %)	0,212	
Unbekannt	105 (23,4 %)		

<b>Alkohol</b>			
Nichttrinker	126 (28,1 %)	0,229	p = 0,272 <sup>(2)</sup>
Gelegentlich	77 (17,2 %)	0,217	
Mittel bis stark	120 (26,8 %)	0,204	
Unbekannt	125 (27,9 %)		
<b>HPV-Status</b>			
Positiv	39 (8,7 %)	0,265	p = 0,001 <sup>(1)</sup>
Negativ	410 (91,3 %)	0,212	
<b>T-Stadium des Primärtumors</b>			
T1	120 (26,7 %)	0,233	p = 0,063 <sup>(2)</sup>
T2	154 (34,3 %)	0,214	
T3	106 (23,6%)	0,208	
T4	65 (14,5%)	0,208	
Unbekannt	4 (0,9 %)		
<b>N Stadium des Primärtumors</b>			
N0	212 (47,2 %)	0,213	p = 0,805 <sup>(2)</sup>
N1	69 (15,4 %)	0,206	
N2	153 (34,1 %)	0,228	
N3	6 (1,3 %)	0,231	
Unbekannt	9 (2,0 %)		
<b>M Stadium des Primärtumors</b>			
M0	431 (96 %)	0,217	p = 0,769 <sup>(1)</sup>
M1	16 (3,6 %)	0,225	
Unbekannt	2 (0,4 %)		

\* Anzahl der Patienten ohne klinische Informationen

(1) Mann-Whitney-U-Test, (2) Kruskal-Wallis-H-Test, SD: Standardabweichung, HPV: Humaner Papillomavirus.

Verändert nach von Mässenhausen et al., 2016 (124).

## 14 Danksagung

Mein Dank gilt den folgenden Personen, die mich wesentlich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Sven Perner dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Forschungsprojekt teilzuhaben. Ich bedanke mich für seine außerordentlich verlässliche und persönliche Betreuung.

Seine Unterstützung und sein Engagement haben es mir ermöglicht, im Rahmen meiner Doktorarbeit nicht nur unheimlich viele neue, wissenschaftliche Kenntnisse zu erlangen, sondern auch, mich persönlich weiterzuentwickeln. Ganz besonders danke ich Herrn Professor Sven Perner für ein jederzeit offenes Ohr, für Anregung, Ratschlag, Warmherzigkeit und für seine Zuverlässigkeit!

Mein ausdrücklicher Dank gilt außerdem Frau Doktor Anne von Mäßenhausen, ohne deren Betreuung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihre wertvolle und sachkundige Unterstützung in allen Phasen meiner Dissertation, bei Planung, Durchführung und Auswertung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dabei bin ich insbesondere dankbar für ihre Bereitschaft, mir ihr großes Wissen zum wissenschaftlichen Arbeiten zu vermitteln und für ihre Unterstützung und Geduld bei der Anleitung im Labor. Ihre herzliche und verständnisvolle Art haben erheblich dazu beigetragen, dass ich mich in der Arbeitsgruppe von Anfang an gut aufgehoben gefühlt habe.

Bei Herrn Doktor Johannes Brägelmann bedanke ich mich ganz besonders für die Einführung in statistische Auswertungen. Seine sachkundige Betreuung und wegweisenden Anregungen haben essentiell zu meinem Verständnis von Statistik und Datenmanagement beigetragen. Jederzeit war er bereit, Fragen zu beantworten und mich mit seinem fundierten Wissen zu unterstützen. Danke sage ich auch für seine tatkräftige Hilfe und für seine engagierte Art, die mir viel Spaß bei der Arbeit mit Statistik vermittelt hat.

Frau Christine Sanders und Frau Britta Thewes gilt ein großer Dank für die gute Zusammenarbeit in Labor und Büro sowie für eine positive Stimmung, die das Arbeiten angenehm gemacht hat.

Bei Herrn Wenzel Vogel bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, die Organisation des Labors und eine gute und angenehme Atmosphäre im Arbeitsalltag des Labors.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der AG Perner danke ich für die tolle Aufnahme in die Gruppe, für eine freundschaftliche Gemeinschaft und für die gegenseitige Unterstützung im Labor, im Büro und auf persönlicher Ebene. Ohne sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen und dafür gilt ihnen ein besonders herzlicher Dank.

Meinen Eltern danke ich in besonderem Maß für ihre bedingungslose, verständnisvolle und unersetzbare Unterstützung zu jedem Zeitpunkt.

## 15 Lebenslauf

**Name:** Hannah Billig

**Geburtsjahr/ -ort:** 1994 (Bonn)



### **Ausbildung:**

2004 – 2012 Clara-Fey-Gymnasium in Bonn, Abitur

2012 Beginn des Humanmedizinstudiums (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)

2014 Erstes Staatsexamen/ Humanmedizin

2015 (Februar - November) Experimentelle Untersuchungen im Rahmen der Dissertation

2016 Vortrag auf der 100. Jahrestagung der Gesellschaft für Pathologie in Berlin: „The role of AXL in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma“

### **Publikationen:**

von Mässenhausen A, Deng M, **Billig H**, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Göke F, Franzen A, Heasley L, Kirfel J, Brägelmann J, Perner S.

"Evaluation of FGFR3 as a Therapeutic Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma."

Targeted Oncology (IF: 3,438). 2016 Oct;11(5): 631-642.

von Mässenhausen A<sup>†</sup>, Brägelmann J<sup>†</sup>, **Billig H<sup>†</sup>**, Thewes B, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Brossart P, Kirfel J, Perner S.

"Implication of the Receptor Tyrosine Kinase AXL in Head and Neck Cancer Progression."

International Journal of Molecular Sciences (IF: 3,226). 2016 Dez; 18(7): pii: E7

<sup>†</sup> trugen in gleichem Maße zu der Arbeit bei