

Entwicklung neuer Therapien in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

**Die Rolle der Rezeptortyrosinkinasen
FGFR3, DDR2, MERTK und AXL**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne Friederike von Mäßenhausen

aus

Bonn

Bonn, November 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Sven Perner

2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der Promotion: 21. März 2016

Erscheinungsjahr: 2016

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs	1
1.2 Molekularbiologie der Tumore des Kopf-Hals-Bereichs	3
1.3 Rezeptortyrosinkinasen	9
1.4 Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs	13
1.5 Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3)	15
1.6 Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2).....	18
1.7 MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK)	20
1.8 AXL receptor tyrosine kinase (AXL)	22
1.9 Zielsetzung	24
2. Material	26
2.1 Geräte und Software	26
2.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.3 Chemikalien und Reagenzien	28
2.4 Reaktionskits	31
2.5 Puffer und Lösungen	31
2.6 Medien für die Zellkultur	33
2.7 Nukleinsäuren	34
2.8 Plasmide.....	36
2.9 Antikörper	37
2.10 Zelllinien	39
2.11 Patientenkollektiv	40
3. Methoden	42
3.1 Molekularbiologie	42
3.1.1 Herstellung chemokompetenter Zellen	42
3.1.2 Aufarbeitung von Plasmiden	42
3.1.3 StarGate® Klonierung.....	43
3.1.4 Herstellung von FGFR3 Mutanten	45
3.1.5 Klonierung in den pLenti-C-mGFP Vektor	46
3.1.6 Klonierung in pLKO-Tet-On Vektor.....	49
3.1.7 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT PCR)....	50

3.2 Zellbiologie	51
3.2.1 Kultivieren von Zellen	51
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	52
3.2.3 Zählen von Zellen	52
3.2.4 Transfektion von Zellen mit ScreenFect® A	52
3.2.5 Herstellung von Viruspartikeln	53
3.2.6 Lentivirale Transduktion.....	53
3.2.7 Induktion des Knockdowns mit Doxycyclin	53
3.2.8 MTT Tetrazolium Reduktionsversuch	53
3.2.9 Untersuchung von Migration und Invasion	54
3.2.10 Soft Agar Assay	54
3.2.11 Adhäsion.....	54
3.2.12 Zellzyklusanalyse (PI Färbung)	55
3.2.13 Apoptose Analyse (Annexin V/PI Färbung)	55
3.3 Biochemie.....	55
3.3.1 Proteinextraktion und -bestimmung	55
3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer auf PVDF-Membranen	56
3.3.3 Immunblotanalyse und Detektion durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL).....	56
3.3.4 Humaner Phospho-Rezeptortyrosinkinase (RTK) Array.....	57
3.4 Immunhistochemie	57
3.4.1 Immunhistochemische Färbungen.....	57
3.5 Bioinformatik.....	58
3.5.1 Bestimmung der Mutationsfrequenz von Rezeptortyrosin- kinasen	58
3.6 Statistik.....	58
3.6.1 Statistische Auswertung	58
4. Ergebnisse.....	59
4.1 Identifizierung von potentiell wichtigen Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	59
4.1.1 Mutationsfrequenz von Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	59
4.1.2 Proteinexpression von Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	60
4.2 Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3).....	64
4.2.1 Immunhistochemische Analyse	64
4.3 Funktion von Wildtyp-FGFR3 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	65

4.3.1	Funktion von FGFR3 Mutanten in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.....	68
4.3.2	Effekt von BGJ398 auf FGFR3 Überexpressionszellen.....	70
4.4	Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2).....	73
4.4.1	Immunhistochemische Analyse	73
4.4.2	Funktion von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.....	74
4.4.3	Inhibition von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs mit Dasatinib	76
4.5	MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK)	79
4.5.1	Immunhistochemische Analyse	79
4.5.2	Funktion von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.....	81
4.5.3	Inhibition von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	82
4.6	AXL receptor tyrosine kinase (AXL)	90
4.6.1	Immunhistochemische Analyse	90
4.6.2	Funktion von AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.....	90
4.6.3	Inhibition von AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	92
5.	Diskussion	100
5.1	Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3).....	100
5.2	Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2).....	104
5.3	MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK)	107
5.4	AXL receptor tyrosine kinase (AXL)	111
5.5	Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	114
5.6	Ausblick	115
6.	Zusammenfassung.....	117
A.	Anhang	118
B.	Abbildungsverzeichnis	119
C.	Tabellenverzeichnis	121
D.	Literaturverzeichnis	122
E.	Danksagung.....	143
F.	Aktive Konferenzbeiträge	145
G.	Publikationen.....	146

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABL	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALK	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AXL	AXL receptor tyrosine kinase
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CIS	Carcinoma in situ
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CYLD	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)
D	DMSO
DDR	Discoidin domain receptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dox	Doxycyclin
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced GFP (verstärktes GFP)
EGFR	Epidermal growth factor receptor

EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	Mitogen-activated protein kinase, MAPK
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FBS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibronektin
fwd	foward (vorwärts)
g	Erdbeschleunigung
GAS6	Growth arrest-specific protein 6
GFP	Green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
HER2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, ERBB2
HER3	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3, ERBB3
HGF	Hepatocyte growth factor
HPV	Humane Papillomaviren
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin 6
IPTG	Isopropyl thiogalactosid
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Loss of heterozygosity (Verlust von Heterozygotie)
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MERTK	MER proto-oncogene, tyrosine kinase
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
mg	Milligramm

min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
ng	Nanogramm
NK Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanomol
nM	Nanomolar
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyde
PI	Propidium Iodid
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTPR	Rezeptor-artige Proteintyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB	Retinoblastoma
RET	Ret proto-oncogene
rev	reverse (rückwärts)
RhoA	Ras homolog family member A
RIPA Puffer	Radioimmunoprecipitations-Assaypuffer
RNA	Ribonukleinsäure

ROS1	ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase
rpm	rounds per minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SH2	Src homology-2
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA (kleine eingreifende RNA)
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TACC3	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
TBS-T	Tris-buffered Saline (Puffer Saline) mit Tween
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGF β	Transforming growth factor β
TMA	Tissue-Microarray
TNM-Klassifikation	Einteilung von malignen Tumoren (T=Tumor, N=Nodes/Lymphknoten, M=Metastasen)
TP53	Tumorprotein p53
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
TYRO3	TYRO3 protein tyrosine kinase
v/v	Volumenprozent
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Kinase insert domain receptor, KDR
w/v	Gewichtsvolumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
z. B.	zum Beispiel
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab an folgender Stelle veröffentlicht:

von Mässenhausen A, Deng M, Billig H, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Göke F, Franzen A, Heasley L, Brägelmann J, Perner S
Evaluation of FGFR3 as a therapeutic target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
Targeted Oncology, manuscript submitted

Diese Vorabveröffentlichung bezieht sich auf Teilergebnisse aus Abschnitt 4.2 und betrifft folgende Abbildungen und Tabellen:

- Abbildung 4-4. FGFR3 Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.
- Abbildung 4-5. Expression von FGFR3 Isoformen in Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs
- Abbildung 4-6 A, B, D, E. Funktion von FGFR3 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.
- Tabelle 4-4. FGFR3 IIIb Mutationen in Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.
- Abbildung 4-7. FGFR3 Mutationen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.
- Abbildung 4-8 A. Proliferation von FGFR3-Mutatanten Überexpressionszellen.
- Abbildung 4-9 A-D. BGJ398 Behandlung von FGFR3 Überexpressionszellen.

Aufgrund dieser Aufführung wird auf die genannten Vorabveröffentlichungen an den entsprechenden Stellen nicht zusätzlich verwiesen.

1. Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs

Tumore des Kopf-Hals Bereichs sind die sechst häufigste Tumorentität weltweit ¹, wobei Plattenepithelkarzinome mehr als 95 % dieser Tumore ausmachen ². Verschiedene Risikofaktoren wie Rauchen und Alkoholkonsum, aber auch Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) spielen eine wichtige Rolle in dieser Tumorentität ^{3,4,5}. Tumore der Kopf-Hals Region werden am häufigsten bei Patienten zwischen 55 und 64 Jahren diagnostiziert, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen ⁶.

Die unterschiedlichen Regionen des Kopf-Hals-Bereichs sind verschieden häufig von Tumoren betroffen: Mundhöhle inklusive Zunge und Lippe (46,3 %), Pharynx (13,5 %), Larynx (29,4 %), Sonstige (10,8 %) ⁷ und sind mit bestimmten Risikofaktoren und Metastasierungsverhalten assoziiert (Abb. 1-1). Beispielsweise entwickeln sich Larynx-, Hypopharynx- und Tumore im Mundboden selten in Nicht-Rauchern, wohingegen diese häufiger Tumore am seitlichen Zungenrand auftreten ⁸. Außerdem metastasieren Hypopharynxtumore häufiger als Tumore des Larynx und der Mundhöhle ⁴.

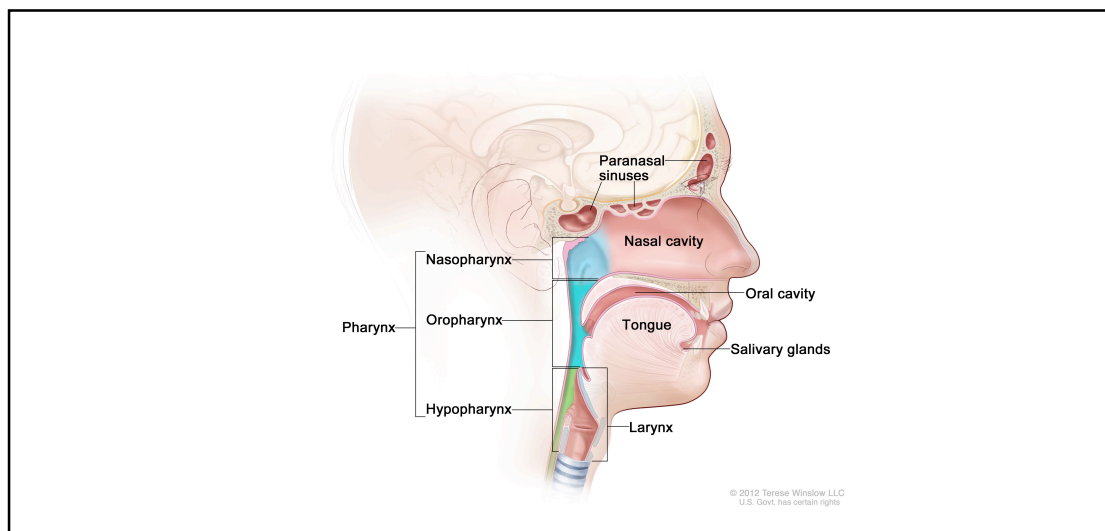


Abbildung 1-1. Lokalisationen von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs. ⁹

Die Prognose für Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs ist vor allem vom TNM-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose abhängig ^{2,4}. Das Stadium wird dabei von Tumorgöße und –invasivität (T), dem Befall von regionalen Lymphknoten (N) und

dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) bestimmt. Während das Überleben bei lokalisierten Tumoren bei 83 % liegt, sinkt es auf 54 % bei Vorhandensein von regionalen Metastasen und auf bis zu 32 % bei Patienten mit Fernmetastasen, wobei bei etwa der Hälfte der Patienten bei Diagnose bereits die Lymphknoten befallen sind¹. Auch wenn sich im Allgemeinen eine abnehmende Mortalitätsrate für Tumore des Kopf-Hals Bereichs zeigt¹, ist die Rate an HPV-positiven Tumoren steigend^{10,11}. HPV-positive Patienten zeigen jedoch im Allgemeinen eine bessere Überlebensrate^{12,10}.

Die Therapieoptionen bei Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs beschränken sich meist auf operatives Entfernen des Tumors sowie Radio- und Chemotherapie^{2,4,5}. In frühen Stadien wird der Tumor wenn möglich entfernt und anschließend eine Radiotherapie mit oder ohne Chemotherapie durchgeführt. Ist der Tumor bereits zu groß wird vor Operation und Radiotherapie eine Chemotherapie gemacht¹³. Bei nicht-operablen Tumoren kommt eine Kombination aus Radio- und Chemotherapie zum Einsatz⁵. Für die Chemotherapie werden sowohl Platinverbindungen als auch Taxane verwendet¹³. Obwohl in allen drei Therapiebereichen Fortschritte erzielt wurden⁴, liegt das Fünf-Jahres Überleben für Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs im Durchschnitt nur bei 61 %¹.

Unter Rezidiven werden sowohl das Wiederkehren eines Tumors aus Zellen, die nach Therapie nicht vollständig eliminiert wurden, als auch Zweitumore zusammengefasst¹⁴. Die Rezidivrate bei Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs beträgt 16-52 % und ist unter anderem abhängig von der Lokalisation des Primärtumors, dem Stadium bei Diagnose und der Therapie^{14,15,16,17}. Rezidive sind allgemein mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert^{18,19} und werden meist mit Chemotherapie behandelt¹³. Kombinationen verschiedener Platinverbindungen zeigten zwar eine bessere Ansprechrage, konnten jedoch das Überleben der Patienten nicht verbessern^{20,21}.

Zusammenfassend, gehören Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs zu einer häufigen Tumorentität, deren Überlebensrate gering ist. Aus diesem Grund ist es wichtig neue Therapieoptionen finden.

1.2 Molekularbiologie der Tumore des Kopf-Hals-Bereichs

Wie andere Tumore entstehen Tumore des Kopf-Hals Bereichs durch die Anhäufung genetischer und epigenetischer Defekte und durch die klonale Expansion einzelner Zellpopulationen ²².

Im Allgemeinen sind die Veränderungen in Tumore des Kopf-Hals Bereichs sehr heterogen ^{2,23}. Nichtsdestotrotz können Tumore des Kopf-Hals-Bereichs histologisch ²⁴, karyotypisch ²⁵ und auch molekular in verschiedene Subgruppen eingeteilt werden ^{26,27}, wobei die Bedeutung dieser Subgruppen noch unklar ist. Es ist jedoch allgemein akzeptiert, dass HPV-positive Tumore, die etwa 20 % der Tumore ausmachen, eine eigene Subgruppe bilden. HPV-negative Tumore mit hoher chromosomaler Instabilität machen circa 65 % der Fälle aus und sind im Gegensatz zu Tumoren mit geringerer chromosomaler Instabilität häufig aneuploid und haben eine schlechtere Prognose ². Bei der Tumorgenese von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs führt der Verlust von Heterozygotie (Loss of Heterozygotie, LOH) von Chromosom 9p21 mit dem cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A* Lokus), der für p16 und p14^{ARF} kodiert, sowie Inaktivierung dieser Gene zu einer Hyperplasie der normalen Mukosa. Durch weitere LOHs der Regionen 3p21 sowie 17p13 und tumor protein p53 (*TP53*) Mutationen kommt es zur Dysplasie, die sich nach LOH von 11q13, 13q21 und 14q32 in ein Carcinoma in situ (CIS) entwickeln kann. Im Karzinom lassen sich dann LOH von 6p, 8, 4q27 und 10q23 sowie Phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) Inaktivierungen nachweisen (Abb. 1-2) ²⁸.

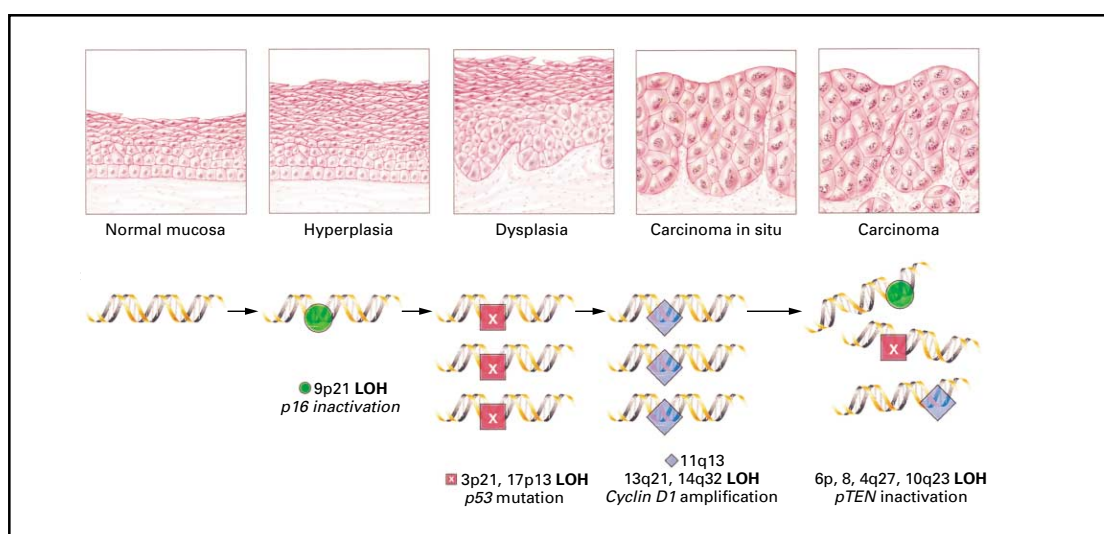


Abbildung 1-2. Entwicklung eines invasiven Tumors aus der normalen Mukosa mit einhergehenden molekularen Veränderungen. (LOH, Loss of heterozygosity) ⁵

Auf genetischer Ebene konnten zwei unabhängige Studien aus dem Jahr 2011 durch Exom Sequenzierung von insgesamt etwa 100 gepaarten Tumor-Normalgeweben neben bereits für Tumore des Kopf-Hals-Bereichs bekannten Genen (*TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) und harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (*HRAS*)) Mutationen in *NOTCH1* nachweisen. Die biologischen und klinischen Auswirkungen der oben genannten Veränderungen dieser Gene sind bereits in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs untersucht.

NOTCH1 Mutationen sind häufig inaktivierend. Dementsprechend scheint *NOTCH1* in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ein Tumorsuppressor zu sein ²⁹. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass *TP63* ein Gegenspieler von *NOTCH1* in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs häufig mutiert und amplifiziert ist ^{30,31}. Beides führt unabhängig voneinander zu einer Störung des Zellzyklus und des Epithelzell-Differenzierungsprogramm in Vorläuferzellen ²³. Im Gegensatz dazu wurde jedoch ebenfalls gezeigt, dass bei einem Drittel der Tumore des Kopf-Hals Bereichs der NOTCH Signalweg unabhängig vom *NOTCH1* Mutationsstatus aktiviert ist was die Ambivalenz dieses Signalwegs in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs aufzeigt ³².

Inaktivierende *TP53*-Mutationen werden bereits früh in der Tumorgenese und insgesamt in Zweidrittel aller Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs gefunden ^{28,33}. Sie führen zu einem Eintreten der Zelle in den Zellzyklus trotz beschädigter DNA ³⁴. Diese Mutationen sind mit Rauchen und Alkoholkonsum ³⁵, sowie einem schlechteren Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie assoziiert ^{36,37}. *TP53* kann weiterhin durch MDM2 Protoonkogene, E3 Ubiquitinproteinligase (MDM2) zum Ubiquitin-abhängigen Abbau markiert werden, wobei letzteres durch p14^{ARF} inaktiviert wird welches wie oben beschrieben häufig funktionell inaktiv ist ³⁸.

Eine weitere wichtige Rolle spielt der Retinoblastoma (RB) Tumorsuppressor Signalweg: *CDKN2A* verhindert normalerweise die Phosphorylierung von RB über Bindung an den Cyclin D1 cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/CDK6) Komplex. RB wiederum inhibiert in seiner unphosphorylierten Form E2F Transkriptionsfaktoren. Nach seiner Phosphorylierung durch den Cyclin D1 CDK4/CDK6 Komplex setzt es E2F Transkriptionsfaktoren frei und die Zelle geht in die S-Phase ²³. Inaktivierungen von *CDKN2A* durch genetische oder epigenetische Mechanismen werden in 80 % der Tumore des Kopf-Hals Bereichs gefunden ³⁹ und treten häufig gemeinsam mit Cyclin D1 Amplifikationen auf ³¹ was zu vermehrter Proliferation führt. RB welches

wie oben beschrieben eine inhibitorische Rolle im Zellzyklus hat ist, zumindest in HPV-negativen Tumoren, nicht so häufig wie *CDKN2A* inaktiviert, da dies vermutlich zu keinem weiteren Wachstumsvorteil führen würde⁴⁰. Weiterhin lässt sich in 80 % der Tumore des Kopf-Hals Bereichs Telomerase oder Telomerasereversetranskriptase (TERT)-Aktivität nachweisen was eine Verkürzung der Telomere verhindert und so eine unendliche Replikation ermöglicht. Die genaue Rolle von TERT in dieser Tumorentität ist jedoch noch unklar².

Ein weiterer wichtiger, häufig deregulierter Signalweg in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ist der epidermal growth factor receptor/mitogen activated protein kinase/phosphatidyl Inositol 3 Kinase, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1/signal transducer and activator of transcription (EGFR/MAPK/PI3K, AKT/STAT) Weg. *EGFR* Amplifikationen mit daraus resultierender Überexpression werden häufig in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs gefunden⁴¹ und sind mit schlechter Prognose assoziiert²⁶. Die Aktivierung von EGFR führt zu einer Signalweiterleitung über den MAP Kinase-, PI3K/AKT sowie STAT3 Signalweg. Neben Überexpression kann es auch durch Verlust der EGFR Phosphatase protein tyrosine phosphatase, receptor type, S (*PTPRS*), die bei einem Viertel der Patienten mit Epithelzellkarzinomen in der Mundhöhle gefunden wird, zu einem verlängerten EGFR Signal kommen⁴². Mutationen in Komponenten des MAP Kinase Signalwegs werden in 8 % der Tumore des Kopf-Hals Bereichs gefunden⁴³, wobei es sich häufig im *HRAS* Mutationen handelt^{29,30,43}.

Wichtiger scheint der PI3K/AKT Signalweg zu sein, der in einem Drittel der Patienten mutiert ist, wobei sowohl *PIK3CA* Mutationen als auch Amplifikationen häufig gefunden werden⁴³. In der Tat ist *PIK3CA* das am häufigsten mutierte Gen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs^{30,29,31,43}. Diese Mutationen führen zu einer erhöhten Kinaseaktivität, sowie Migration und Invasion⁴⁴. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls gezeigt, dass die Inhibition des PI3K-Signalwegs bei Vorhandensein von Mutationen eine effektive Therapie ist^{43,45}. Zur Zeit werden drei verschiedene PI3-Kinase Inhibitoren in klinischen Studien für Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs getestet²³. Auch wenn Verluste von *PTEN*, dem Gegenspieler der PI3-Kinasen, auf genetischer Ebene nur in 5-10 % der Tumore des Kopf-Hals Bereichs gefunden werden, ist die Proteinexpression in 30 % der Fälle stark reduziert. Der Verlust von *PTEN* ist unter anderem mit aggressiverem Tumorwachstum und schlechterem Überleben assoziiert und *PTEN* ist somit ein wichtiger Tumorsuppressor in dieser Tumorentität^{46,47}. Da die Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs

wie oben beschrieben über verschiedene veränderte Mechanismen abläuft ist es nicht verwunderlich, dass AKT in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs häufig aktiviert ^{48,49} und ein unabhängiger prognostischer Marker für schlechte klinische Parameter ist ^{50,51}. Die Wichtigkeit von AKT wird weiterhin durch die Tatsache unterstrichen, dass Inhibition des pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (PDK1), die in diesem Signalweg über AKT liegt, das Tumorwachstum hemmt ^{49,52}. Zur Zeit läuft eine Phase I/II klinische Studie mit einer Kombination aus mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1, MEK) und AKT Inhibition bei Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ²³.

Weiterhin wurde in myeloiden Vorläuferzellen eine Verbindung zwischen dem PI3K/AKT Signalweg und dem mammalian target of rapamycin (mTOR) gefunden ⁵³, und auch in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs scheinen diese Signalwege verbunden ⁵⁴. mTOR Aktivierung tritt früh in der Karzinogenese von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs auf ^{48,54} und seine Inhibition führt zu Tumorregression in Mausmodellen ⁵⁴.

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass auch das eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (*EIF4EBP1*, *4E-BP1*), welches die Translation reguliert und von mTOR phosphoryliert wird ⁵⁵, in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs überexprimiert oder amplifiziert und mit Tumorprogression assoziiert ist ⁵⁶.

Phosphoryliertes und somit aktives STAT3 wird häufig in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs und dem danebenliegenden normalen Gewebe gefunden und ist damit vermutlich eine frühe Veränderung in der Karzinogenese ⁵⁷. STAT3 wird in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs durch EGFR ⁵⁸, autokrine Aktivierung des GP130 Zytokinrezeptors über Interleukin 6 (IL-6) ^{59,60} oder auch Erythropoietin aktiviert ⁶¹.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Promotoren der STAT-inhibitorischen Proteine cytokine inducible SH2-containing protein (CISH) *SOCS-1* und *SOCS-3* oft hypermethyliert und somit herunterreguliert sind ⁶². Aktives STAT3 führt zu einem veränderten Zellzyklus, fördert die Proliferation sowie das Überleben der Tumorzellen ⁶³ und ist mit Lymphknotenmetastasen sowie einer schlechteren Prognose assoziiert ⁶⁴. Neben STAT3 scheint auch STAT5 eine Rolle in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs zu spielen ⁶⁵.

Weiterhin spielt der transforming growth factor β (TGF β)-Signalweg, der in normalen Zellen eine inhibitorische Rolle hat, in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine Rolle. Der transforming growth factor receptor β II (*TGFBR2*, *TGF β RII*) ist häufig

herunterreguliert und mutiert^{66,67} und auch Chromosom 18q, auf dem sich die Gene der SMAD-Familie für *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* und *TGFβ RII* befinden, fehlt häufig². Eine verringerte Expression von TGFβ RII, aber nicht RI, assoziiert mit weniger p-Smad2 und aggressiverem Tumorwachstum⁶⁸. In Mausmodellen wurde unter anderem gezeigt, dass ein Knockdown von Smad4, dem Co-Mediator SMAD, oder die Aktivierung von *K-ras* oder *H-ras* mit *Tgfβ RII* Verlust in der Mundschleimhaut zu Tumorbildung führt^{69,70}. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Inaktivierung des TGFβ-Signalwegs zu einer Aktivierung von nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NFκB1, NF-κB) führt⁴⁴.

Der NF-κB Signalweg ist bei Entzündungs- und Immunantworten sowie Zellproliferation und -überleben beteiligt⁷¹. NF-κB ist in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs auch über andere als den oben genannten Mechanismus häufig hochreguliert und spielt in frühen Stadien der Tumorprogression eine Rolle^{72,73}. Außerdem scheint NF-κB in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs mit dem STAT3 Signalweg (siehe oben) zu interagieren⁵⁹.

Die Rolle des Wnt-Signalwegs in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ist weniger gut erforscht. Es ist jedoch bekannt, dass verschiedene Wnt Rezeptoren und weitere Signalkomponenten im Vergleich zum Normalgewebe häufig hoch exprimiert werden⁷⁴ und Anti-Wnt-1 Antikörper die Proliferation von Zellen dieser Tumorentität hemmen⁷⁵. Weiterhin können Wnt Antagonisten durch epigenetische sowie adenomatous polyposis coli (*APC*) durch genetische und epigenetische Mechanismen ausgeschaltet werden^{76,77,78}.

Neben diesen veränderten Signalwegen wurden weitere Gene in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs identifiziert, die zum einen wichtig sind für die Fähigkeit Metastasen zu bilden und zum anderen um Angiogenese zu induzieren. Für ersteres wurde gezeigt, dass bestimmte Expressionsprofile im Primärtumor die An- und Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen bestimmen können⁷⁹. Wichtige Gene scheinen bei diesem Prozess in dieser Tumorentität neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 (*NTRK2*) mit dem Ligand brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) zu sein⁸⁰. Auch verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die ebenfalls wichtig für Zelladhäsion und Migration sind, wurden mit infiltrierendem Wachstum sowie Lymphknotenmetastasen in Verbindung gebracht^{81,82}. Für zweiteres spielt der vascular endothelial growth factor (VEGF), der die Angiogenese induziert, eine Rolle in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs und ist mit schlechterem Überleben assoziiert⁸³.

Neben genetischen Veränderungen sind epigenetische Veränderungen in Tumoren von Interesse. Auch in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs konnten Mutationen in histonmodifizierenden Genen nachgewiesen werden: lysine (K)-specific methyltransferase 2D (*KMT2D*, *MLL2*) und enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit (*EZH2*), beides Histon-Methyltransferasen, zeigen häufig inaktivierende Mutationen was ihre Rolle als Tumorsuppressor unterstreicht³⁰.

Wie bereits oben erwähnt bilden HPV-positive Tumore des Kopf-Hals Bereichs eine eigene Subgruppe, befinden sich häufig im Oropharynx und unterscheiden sich durch weniger Mutationen und eine bessere Prognose von HPV-negativen Tumoren². Vor allem HPV-16 spielt eine wichtige Rolle⁸⁴. In diesen Tumoren wird TP53 durch das virale Onkogen E6 und RB durch E7 gehemmt was durch Störung des Zellzyklus zum Beginn der Karzinogenese führt⁸⁵. *TP53* Mutationen und *CDKN2A* Deletionen werden dementsprechend fast gar nicht in HPV-positiven Tumoren gefunden^{2,86}. Dennoch zeigt sich, dass sowohl in HPV-negativen als auch positiven Tumoren die gleichen Signalwege (TP53, *CDKN2A*/RB) an der Tumorentstehung beteiligt sind. Neben dem direkten Effekt der viralen Onkogene E6 und E7 können durch die Insertion der Virus DNA Tumorsuppressorgene verloren gehen oder Onkogene amplifiziert beziehungsweise durch virale Promotoren vermehrt transkribiert werden⁸⁷. Neben der Mutationsfrequenz unterscheiden sich HPV-positive Tumore des Kopf-Hals Bereichs auch hinsichtlich der gefundenen Mutationen von HPV-negativen. Eine vorläufige Studie konnte in 3 von 15 HPV-positiven Tumoren *PIK3CA* oder Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha) (*PIK3R1*) als einzig mutierte Gene identifizieren was vermuten lässt, dass dieser Signalweg auch in der Tumorgenese von HPV-positiven Tumoren ein wichtige Rolle spielt⁴³. Dies wird durch eine weitere Studie unterstützt, die *PIK3CA* Mutationen oder Amplifikation und *PTEN* Inaktivierung in >55 % der HPV-positiven und nur in 31 % der HPV-negativen Tumore finden konnte⁸⁶. Des Weiteren sind der fibroblast growth factor receptor 2 und 3 (*FGFR2* und 3) in 17,6 % der HPV-positiven Tumore mutiert. DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, X-linked (*DDX3X*) und cylindromatosis (turban tumor syndrome) (*CYLD*) Mutationen wurden ebenfalls nur in HPV-positiven Tumoren gefunden⁸⁸. Bei ersterem handelt es sich um ATP-abhängige RNA Helicase, die bei der RNA Prozessierung eine Rolle spielt und durch Promotortransaktivierung die β -Catenin Aktivität steigern kann⁸⁹, wohingegen *CYLD* bei der Differenzierung und dem NF- κ B Signalweg beteiligt ist⁹⁰. Auch Deletionen und trunkierende Mutationen im TNF receptor-associated factor 3 (*TRAF*), was zur vermehrten Signalweiterleitung über NF- κ B führt, sowie Amplifikationen von E2F

transcription factor 1 (*E2F1*) wurden in HPV-positiven Tumoren gefunden ⁹¹. Weiterhin sind verschiedene DNA Reparaturgene vor allem in HPV-positiven Tumoren verändert ⁸⁸. Dennoch werden Mutationen in vielen der bereits oben genannten Gene wie zum Beispiel *NOTCH1*, *RAS*, *MLL* und *TP63* sowohl in HPV-positiven als auch negativen Tumoren des Kopf-Hals Bereichs gefunden ^{88,91}.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es viele verschiedene genomische Abberationen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs gibt. Nichtsdestotrotz haben diese Kenntnisse bisher kaum zu einer Verbesserung der Therapieoptionen geführt. Vermutlich liegt dies auch daran, dass meist mehrere Signalwege betroffen sind, die miteinander interagieren. Außerdem sind noch nicht alle gefundenen genetischen Veränderungen funktionell untersucht und ihre Relevanz bestätigt worden.

1.3 Rezeptortyrosinkinasen

Es gibt 58 bekannte humanen Rezeptortyrosinkinasen, die sich in 20 Familien einteilen lassen. Ihnen ist gemein, dass sie aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne bestehen, gefolgt von einer einfachen Transmembranhelix und intrazellulär (carboxyterminal) eine zytoplasmatische Region mit der Tyrosinkinasedomäne sowie regulatorischen Regionen haben. Viele von ihnen sind wichtig bei verschiedenen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben, Metabolismus, Migration und Zellzykluskontrolle ⁹². Ligandenbindung führt in den meisten Fällen zur Homo- und Heterodimerisierung zweier Monomere. Die Dimerisierung kann dabei entweder komplett ligandenvermittelt sein, sodass sich die beiden Rezeptoren nicht berühren (z. B. neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1, NTRK1) ⁹³, komplett rezeptorvermittelt sodass der Ligand nicht an der Dimerisierungsfläche bindet (z. B. EGFR) ⁹⁴ oder eine Kombination aus liganden- und rezeptorvermittelter Dimerisierung sein (z. B. FGFR) ⁹⁵. Nach Dimerisierung erfolgt die Autophosphorylierung bei der sich die Rezeptortyrosinkinasen an einem oder mehreren Tyrosinresten gegenseitig phosphorylieren ⁹⁶. Die erste Phase der Phosphorylierung dient dabei der Verstärkung der katalytischen Aktivität ⁹². Dabei wird der „Aktivierungsloop“ innerhalb der Tyrosinkinasedomäne, der in inaktivem Zustand die Rezeptortyrosinkinase autoinhibiert, phosphoryliert, was zu einer aktivierten Konfiguration der Rezeptortyrosinkinase führt ⁹⁷. Weiterhin kann es inhibitorische Mechanismen außerhalb der Tyrosinkinasedomäne geben, die durch Trans-phosphorylierung aufgehoben werden. In der zweiten Phase entstehen

Phosphotyrosinbindestellen für „Dockingproteine“ mit Src homology-2- (SH2) und Phosphotyrosinbinde-Domäne (PTB) ⁹⁸. Beispiele sind fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2), insulin receptor substrate-1 (IRS1) und Grb2-associated binder (GAB1) ⁹². Bei einigen Rezeptortyrosinkinasen kann in einer dritten Phosphorylierungsphase die Fähigkeit Signalproteine zu phosphorylieren verstärkt werden ⁹². Die anschließende Signalweiterleitung erfolgt über verschiedenen Signalwege. Wichtig sind hierbei zum einen die verschiedenen MAPK-Wege, die zur Aktivierung verschiedener Zielproteine führen. Zum anderen werden über den PI3K-Weg durch AKT Zielproteine phosphoryliert. Weitere Signalwege führen beispielsweise über STAT1 und STAT3, die Proteinkinase C (PKC) oder die Fokale Adhäsionskinase (FAK), die Einfluss auf das Zytoskelett hat, wobei alle diese Signalwege miteinander interagieren können ^{92,99} (Abb. 1-3). Außerdem gibt es verschiedene positive und negative Feedbackloops, die die Signalweiterleitung verstärken bzw. abschwächen können ⁹². Positive Feedbackloops können beispielsweise durch die Inhibition von Proteinphosphatasen ¹⁰⁰ oder autokrine Aktivierung entstehen ¹⁰¹.

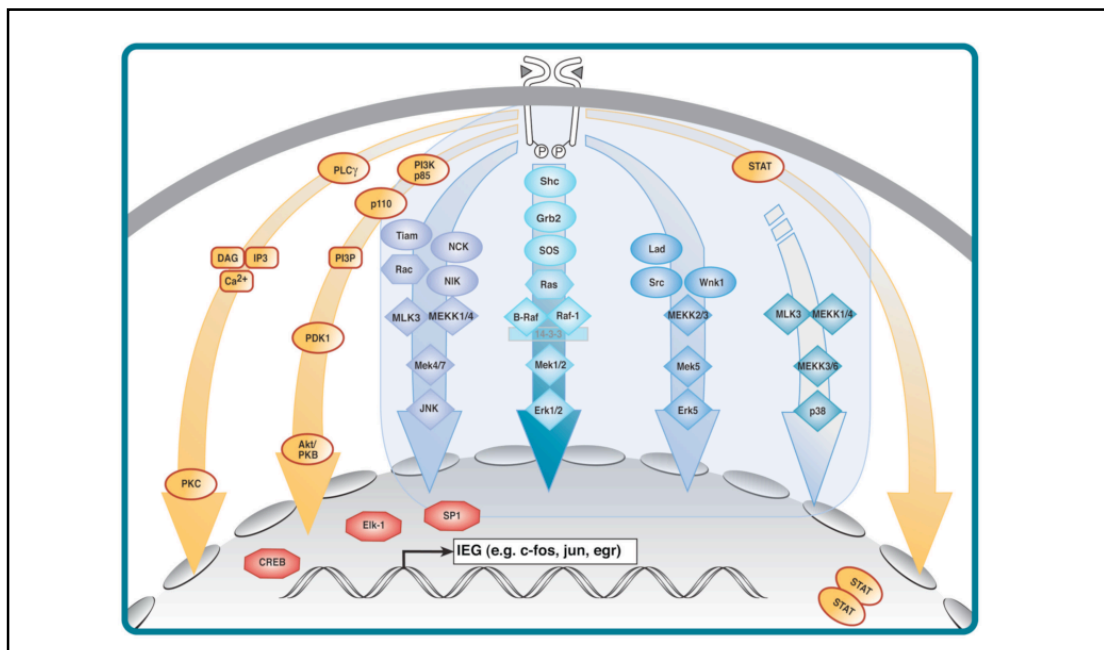


Abbildung 1-3. Signalwege, die von Wachstumsfaktoren über Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden.

Dargestellt sind die verschiedenen MAPK Signalwege, wobei der p38 Weg selten aktiviert wird. Weiterhin gezeigt sind der PI3K-AKT, der Phospholipase C γ -PKC sowie STAT Signalwege. Alle Signalwege führen zur Transkription von "immediate early genes". (IEGs, immediate early genes) ⁹⁹

Die wichtigsten negativen Feedback Mechanismen sind die Aktivierung von Proteintyrosinphosphatasen ⁹² sowie Herunterregulation der Rezeptoren. Bei letzterem wird der Rezeptor nach Ligandenbindung mit diesem endozytiert, wobei aktivierte Rezeptortyrosinkinasen auch noch von den Vesikeln aus Signalwege aktivieren können ¹⁰². Im Endosom werden die Rezeptoren dephosphoryliert und ubiquitiniert und der Ligand dissoziiert. Anschließend werden die Rezeptoren abgebaut oder wieder zurück an die Zellmembran gebracht (Abb. 1-4) ⁹². Ein dritter negativer Feedbackloop ist die signalabhängige Transkription von negative Regulatoren ¹⁰³.

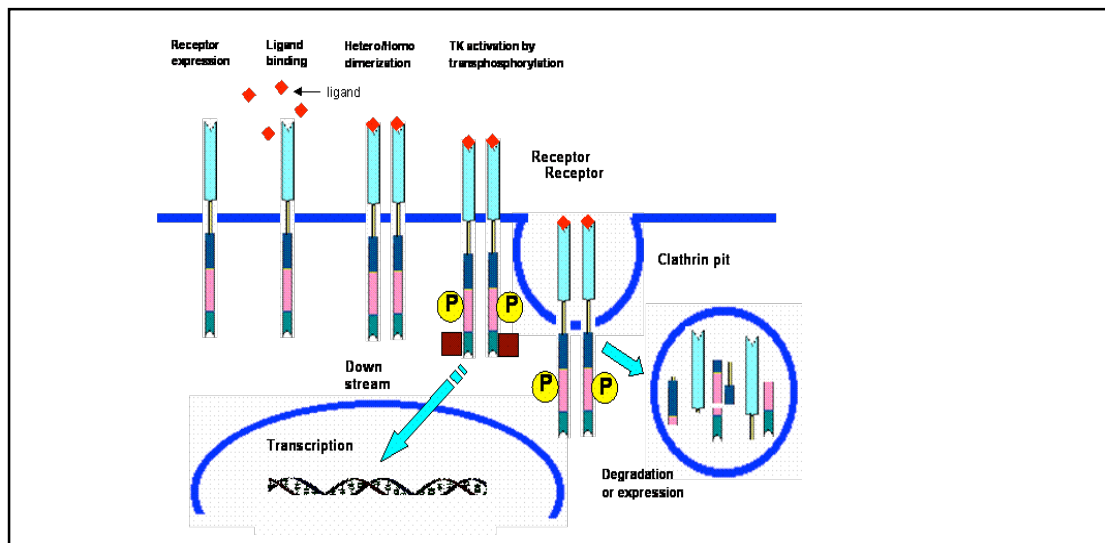


Abbildung 1-4. Wirkungsweise von Rezeptortyrosinkinasen.

Nach Ligandenbindung bilden sich Homo- und Heterodimere was zur Trans-phosphorylierung mit Signalweiterleitung führt. Der Rezeptor wird anschließend internalisiert und abgebaut oder re-exprimiert ¹⁰⁴.

Veränderungen in Rezeptortyrosinkinasen oder deren Signalwegen wurden in den letzten Jahren mit verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes, Entzündung, Knochenveränderungen sowie Atherosklerose und Angiogenese in Verbindung gebracht ⁹². Fast alle Rezeptortyrosinkinasen sind wichtige Onkogene in verschiedenen Tumoren, deren abnormale Aktivierung durch aktivierende Mutationen, Überexpression, chromosomale Translokation oder auto- und parakrine Signalwege mit Ligandenüberexpression entstehen kann ^{40,92,99,105}. Als Beispiele seien die Überexpression der erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2, HER2) in Brustkrebs ¹⁰⁶ und aktivierende Mutationen von v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (*KIT*) in gastrointestinalen Stromatumoren ¹⁰⁷ sowie bei akuter myeloischer Leukämie genannt ¹⁰⁸. Aber nicht nur Rezeptortyrosinkinasen selbst sondern auch Proteintyrosinphosphatasen, die diese regulieren, können durch

inaktivierende Mutationen, Deletion oder Promotormethylierung, aber auch Amplifikation, deren Rolle noch unklar ist, zur Tumorprogression beitragen ^{109,110}.

Durch ihre Lokalisation an der Zelloberfläche bieten Rezeptortyrosinkinasen optimale Strukturen für eine gezielte, personalisierte Therapie, nicht nur für Tumore sondern auch für andere Erkrankungen, mit weniger Nebenwirkungen als konventionelle Therapien wie Chemo- oder Strahlentherapie. Dabei kommen zum einen niedermolekulare Inhibitoren, die intrazellulär an die Tyrosinkinasedomäne binden und meist nicht selektiv für eine Tyrosinkinase sind, zum Einsatz ¹¹¹. Zum anderen werden monoklonale Antikörper verwendet, die mit der Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen interferieren und diese zum Abbau durch das Immunsystem markieren (Abb. 1-5) ¹¹². Wichtige Beispiele sind Imatinib welches dem platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) auch KIT und die ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase (ABL) inhibiert ¹¹¹ und Sunitinib welches KIT, den kinase insert domain receptor (KDR, VEGFR2), PDGFR, die fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3) und das ret proto-oncogene (RET) inhibiert ¹¹³. Erlotinib und Gefitinib hingegen hemmen selektiv die Tyrosinkinasefunktion des EGF Rezeptors. Monoklonale Antikörper gegen HER2 wie Trastuzumab werden beispielsweise bei der Behandlung des Mammakarzinoms als Monotherapie oder in Kombinationen mit Chemotherapie eingesetzt ¹¹⁴. Hingegen wird Cetuximab, ein Antikörper gegen EGFR in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs in Kombination mit konventionellen Therapien angewandt ¹¹⁵. In den meisten Patienten entwickeln sich jedoch schnell Resistenzen gegen die Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren. Diese können entweder durch Mutationen, die den Inhibitor unwirksam machen ¹¹⁶ oder durch Überexpression einer anderen Rezeptortyrosinkinase entstehen ¹¹⁷.

Eine letzte Möglichkeit die Signalwege von Rezeptortyrosinkinasen zu inhibieren sind so genannte „Ligand-Traps“. Hierbei handelt es sich um lösliche Fusionsproteine aus dem extrazellulären Teil der Rezeptors und dem Fc Teil (crystallisable fragment) von Immunglobulin G1 (IgG1), die so die Liganden abfangen und ein Binden an den Rezeptor verhindern (Abb. 1-5) ¹¹⁸.

Es lässt sich festhalten, dass Rezeptortyrosinkinasen optimale Strukturen für eine personalisierte, nebenwirkungsarme Therapie sind. Nichtsdestotrotz entwickeln sich häufig Resistenzen, sodass es in Zukunft wichtig ist sinnvolle Kombinationstherapien zu finden.

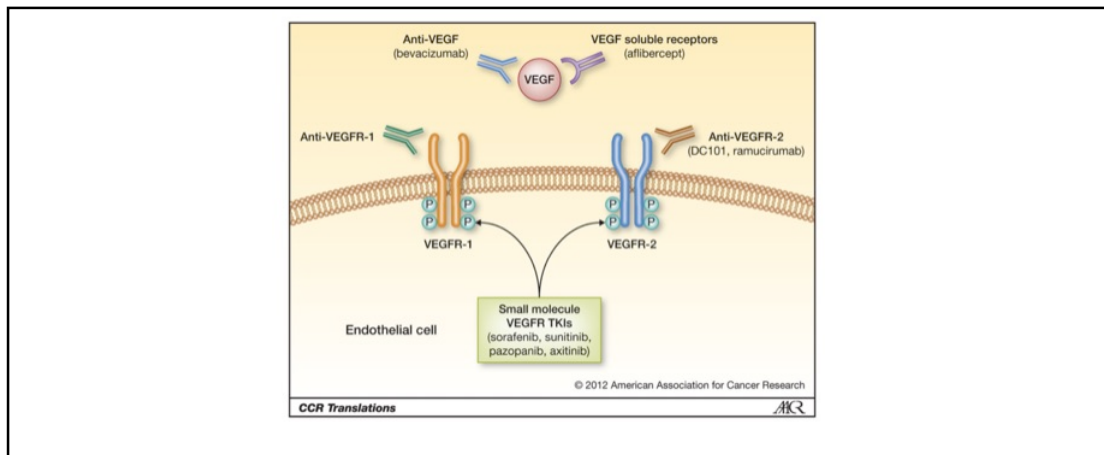


Abbildung 1-5. Verschiedene Möglichkeiten Rezeptortyrosinkinasen zu inhibieren am Beispiel von VEGF/VEGFR.

Dargestellt sind monoklonale Antikörper, niedermolekulare Inhibitoren und "Ligand-Traps" ¹¹⁹.

1.4 Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs

Wie bereits erwähnt spielen Rezeptortyrosinkinasen bei der Entstehung und Progression verschiedener Tumore eine Rolle. Auch in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs wurden bereits einige Rezeptortyrosinkinasen und deren Bedeutung als potentielle therapeutische Ziele untersucht. Die am meisten erforschte Rezeptortyrosinkinase in dieser Tumorentität ist EGFR. Eine Amplifikation mit Überexpression von EGFR wird häufig in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs gefunden ⁴¹. Aus diesem Grund gab es verschiedene klinische Studien mit monoklonalen Antikörpern (z. B. Cetuximab) und niedermolekularen Inhibitoren (z. B. Afatinib) bei der Therapie von Patienten mit EGFR Veränderungen. Cetuximab ist ein für die Behandlung von Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs zugelassener Antikörper ¹²⁰. Dieser verstärkt den Effekt verschiedener Standardtherapien wie zum Beispiel Cisplatin, erhöht die Sensitivität gegenüber Chemotherapie ¹²¹ und führt zu längerem Überleben der Patienten ¹²². Ein vielversprechender Inhibitor ist Afatinib, welcher in Tumoren der Kopf-Hals Bereichs eine zu Cetuximab vergleichbare Anti-Tumoraktivität zeigt ¹²⁰. Nichtsdestotrotz gibt es bisher keine zuverlässigen Faktoren wie zum Beispiel EGFR Überexpression, die ein Ansprechen auf eine Anti-EGFR Therapie vorhersagen könnten ¹²⁰. Ein weiteres Problem sind Resistenzen, die entweder schon zu Therapiebeginn vorliegen können oder während dieser entstehen. Für Tumore des Kopf-Hals Bereichs sind nur letztere bekannt. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass das trunkierte EGFR Protein (EGFRvIII), welches Signale ligandenunabhängig weiterleiten kann, zur Resistenz gegenüber Cetuximab beiträgt ¹²³. Weitere

Mechanismen sind die Aktivierung anderer Signalwege. Zum einen können Rezeptoren wie HER2 und 3, MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (MET)¹²⁴, AXL receptor tyrosine kinase (AXL)¹²⁵ oder die Aurora Kinase¹²⁶ hochreguliert werden. Zum anderen ist auch eine vermehrte Expression von Liganden wie VEGF möglich¹²⁷. Aber auch Mutationen in Signalmolekülen unterhalb der oben genannten Kinasen wie zum Beispiel *PI3KA*¹²⁸ oder epithelial-mesenchymale Transition (EMT) kann zu Resistenz gegenüber EGFR Inhibition führen¹²⁹.

Weiterhin wird HER2 in vielen EGFR positiven Tumoren exprimiert, wobei diese Rezeptortyrosinkinasen Heterodimere bilden¹³⁰. Nach vielversprechenden *in-vitro* Daten mit Lapatinib, einem oral verfügbaren Inhibitor gegen EGFR und HER2, gab und gibt es verschiedene klinische Studien, die die Effektivität dieses Inhibitors als Mono- oder in verschiedenen Kombinationstherapien testen¹³¹.

Ein weiteres potentiell therapeutisches Ziel in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ist der insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R). IGF1R ist in 94 % aller Patienten mit Tumoren der Kopf-Hals Bereichs exprimiert und fördert Proliferation und Migration in dieser Tumorentität^{132,133}. IGF1R bildet mit EGFR Heterodimere und *in-vitro* sowie in Xenograft Modellen konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Antikörpern gegen beide Rezeptortyrosinkinasen kombinatorisch wirkt¹³³. IMC-A12, ein humanisierter anti-IGF1R Antikörper, wurde bereits in einer klinischen Studie mit und ohne Cetuximab getestet, wobei die Ergebnisse noch nicht vorliegen¹³⁴.

Eine weitere Rezeptortyrosinkinase, die bereits in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ein therapeutisches Ziel darstellt ist MET mit ihrem einzigen Ligand hepatocyte growth factor (HGF). Dieser Signalweg ist in dieser Tumorentität häufig hochreguliert führt zu vermehrter Proliferation, Migration und Invasion, korreliert mit Lymphknotenmetastasen und Rückfällen sowie Resistenzen gegenüber verschiedene Therapien^{135,136}. Es können sowohl der Rezeptor in Tumorzellen als auch der Ligand in den umgebenden Fibroblasten überexprimiert sein, sodass es zur parakriner Aktivierung des Signalwegs kommt^{137,138}. Dieser Signalweg interagiert wie auch IGF1R und HER2 mit EGFR² und beeinflusst die Proliferation und Beweglichkeit der Zellen sowie Angiogenese und kann *in-vivo* inhibiert werden^{138,137}. In einer Phase II klinischen Studie wird zur Zeit die Effektivität von Foretinib, welches MET und den VEGFR inhibiert, evaluiert¹³⁹. Es gibt jedoch auch weitere spezifische Inhibitoren bzw. monoklonale Antikörper gegen MET und HGF, von denen sich die meisten in Phase 1 klinischen Studien befinden¹³⁶.

Wie auch in anderen soliden Tumoren spielt Angiogenese bei der Pathogenese von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine wichtige Rolle, was sich daran zeigt, dass sowohl der VEGF als auch seine Rezeptoren in den meisten Patienten exprimiert sind¹³⁰. Erste klinische Studien mit Sorafinib und Sunitinib, zwei Multikinaseinhibitoren, die unter anderem VEGFR2 hemmen, als auch mit Bevacicumab, einem Antikörper gegen VEGF allein oder in Kombination mit Chemotherapeutika sollen zur Zeit den therapeutischen Nutzen der Angiogenesehemmung in Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ermitteln¹³⁰. Für FGFR1 konnte *in-vitro* als auch *in-vivo* gezeigt werden, dass diese Rezeptortyrosinkinase gegenüber niedermolekularen Inhibitoren sensitiv ist und somit ein potentielles therapeutisches Ziel in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs darstellt¹⁴⁰. NTRK2 und der Ligand BDNF werden in mehr als 50 % aller Tumore der Kopf-Hals Region überexprimiert und die Inhibition von NTRK2 führte *in-vitro* zu verminderter Migration sowie Invasion und unterdrückte *in-vivo* das Tumorwachstum¹⁴¹.

Neben Rezeptortyrosinkinasen, spielen auch Rezeptorprotein-Tyrosinphosphatasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine Rolle und sind bei einem Drittel aller Patienten mutiert. Beispielsweise führen Mutationen von *PTPRT* zu erhöhter Phosphorylierung von STAT3 und fördern das Zellüberleben¹⁴². Weiterhin wurde *PTPRD* als Tumorsuppressor in Larynxkarzinomen identifiziert¹⁴³ sowie *PTPRG* in Nasopharynxkarzinomen¹⁴⁴.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bereits einige Rezeptortyrosinkinasen als potentielle therapeutische Ziele in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs gefunden wurden, deren Inhibition in klinischen Studien meist nur ein geringes Toxizitätsprofil aufweist¹³⁰. Nichtsdestotrotz ist es wichtig auch die Funktion weiterer Rezeptortyrosinkinasen bei der Tumorentstehung und –progression zu erforschen. Zum einen profitieren nicht alle Patienten von den bereits verfügbaren Therapien, zum anderen sind die Signalwege von Rezeptortyrosinkinasen miteinander vernetzt und es kommt bei vielen Therapien zu Resistenzen, sodass viele Patienten von Kombinationstherapien profitieren würden.

1.5 Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3)

FGFR3 gehört mit FGFR1, 2 und 4 zur Familie der FGF Rezeptoren. Der extrazelluläre Teil besteht aus drei Ig-ähnlichen Domänen (I-III), wobei II und III die Bindestelle für die monomeren fibroblast growth factor (FGF) Liganden bilden

(Abb. 1-6) ¹⁴⁵. Die zweite Hälfte der IgIII Domäne kann bei FGFR1-3 alternativ gespleißt und die Isoformen gewebespezifisch exprimiert werden, sodass es eine mesenchymale IIIc (Isoform 1) und eine epitheliale IIIb (Isoform 3) Form gibt, die unterschiedliche Affinitäten für die verschiedenen FGF-Liganden haben ¹⁴⁵. Isoform 2 fehlt der C-terminale Teil des Proteins und ist somit vermutlich ein löslicher Rezeptor ¹⁴⁶. Insgesamt gibt es 18 verschiedene FGFs, die in der extrazellulären Matrix als Komplex mit Heparinsulfat vorliegen und durch Proteasen oder FGF-Bindeproteine von dieser getrennt werden ^{145,118}. Nach Bindung von FGF an den FGFR und anschließender Dimerisierung wird der FGFR-Dimer durch Rezeptor-Liganden, Rezeptor-Heparin, Liganden-Heparin und Rezeptor-Rezeptor Interaktionen stabilisiert ¹⁴⁷ und kann so das Signal weiterleiten. Der Hauptsignalweg von FGFRs ist dabei der MAPK Signalweg, wobei aber auch andere Wege z. B. der PI3K/AKT Signalweg oder Signalwege über STATs aktiviert werden können (Abb. 1-6) ^{118,148}. FGFRs werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert und sind bei Proliferation, Differenzierung und Überleben wichtig. Sie spielen sowohl in der Entwicklung als im adulten Organismus eine Rolle, wo sie zum Beispiel Angiogenese und Wundheilung regulieren ¹⁴⁹.

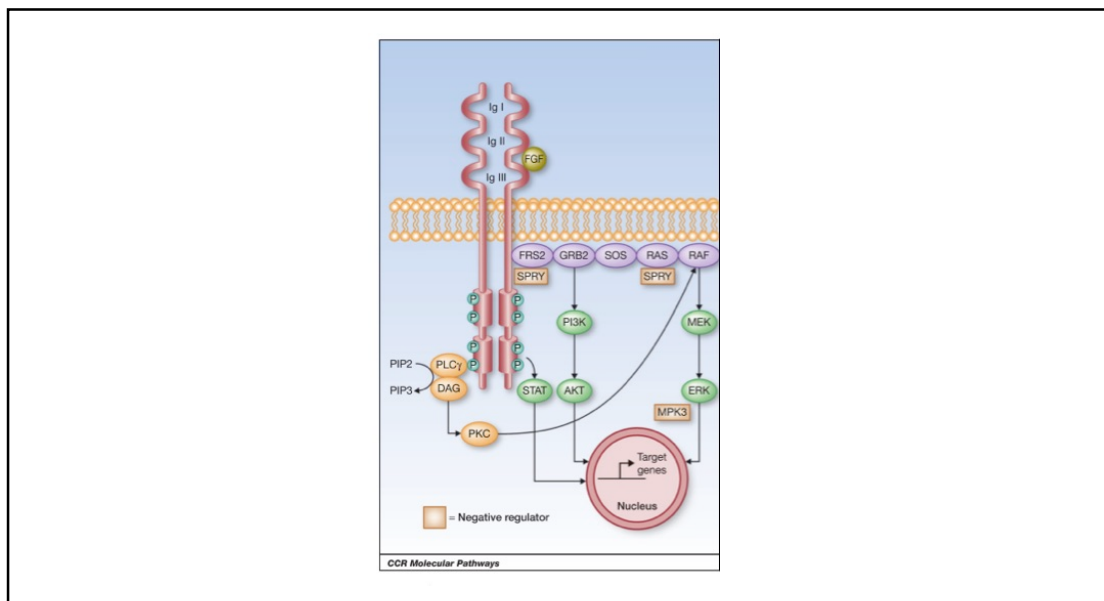


Abbildung 1-6. Struktur von FGFRs und deren Signalwege.

Extrazellulär finden sich drei Ig Domänen, an die der Ligand bindet. Es werden hauptsächlich der RAS-abhängige MAPK Signalweg und der PI3K-AKT Signalweg aktiviert. (FGFR, Fibroblast Growth Factor Rezeptor; Ig, Immunglobulin; FGF, Fibroblast Growth Factor), verändert nach ¹¹⁸

FGFR3 wird physiologisch in der Niere, Lunge, Hirn, Knorpel, Darm, Pankreas und Hoden exprimiert ¹⁵⁰, aber spielt auch bei genetischen Erkrankungen und Tumoren

eine Rolle. Es sind verschiedene *FGFR3* Keimbahnmutationen bekannt, die mit Skeletterkrankungen wie zum Beispiel unterschiedlichen Formen des Kleinwuchses oder Kraniosynostose assoziiert sind ¹⁵⁰. Somatische *FGFR3* Mutationen kommen am häufigsten beim Blasenkarzinom vor, aber auch in Zervix-, Kolon- und Lungentumoren, sowie im Multiplen Myelom ^{150,151,152}. Bei letzterem kann es durch Translokation von *FGFR3* in den Immunglobin-Schwerekettenloкус zu einer Überexpression von *FGFR3* kommen, was mit einer schlechteren Prognose korreliert ^{150,153}. Im Blasenkarzinom hingegen scheinen *FGFR3* Mutationen mit besserem Überleben assoziiert zu sein ¹⁵⁴. Die am häufigsten gefundene Mutation im *FGFR3* Gen führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Cystein an Position 249 (p.S249C). Dadurch bilden sich über Disulfidbrücken ligandenunabhängige, stabile Dimere und es kommt zur konstitutiven Signalweiterleitung ¹⁵⁵. In immortalisierten normalen humanen Urothelzellen führt die Expression von *FGFR3* p.S249C Mutanten zur erhöhten Proliferation ¹⁵⁶. In Lungenepithelkarzinomen konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass diese Mutation zur erhöhten Sensitivität gegenüber niedermolekularen Inhibitoren führt ¹⁵². Neben Mutationen konnten in Lungen- und Blasenkarzinomen, aber auch Glioblastomen Fusionen von *FGFR3* mit dem transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 (*TACC3*), das vermutlich eine Rolle bei der Stabilisation der mitotischen Spindel spielt, gefunden werden ^{157,158,159}.

Die Rolle von *FGFR3* in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ist bis jetzt nur unzureichend analysiert ¹⁶⁰. Die Expression von *FGFR3* wurde bisher nur an Zelllinien von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs untersucht und konnte in vier von neun Zelllinien auf mRNA Ebenen und in zwei von neun Zelllinien auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Autoren konnten zeigen, dass sich diese Zelllinien in EGFR- und *FGFR*- Inhibitorsensitiv einteilen lassen, wobei die genaue Funktion von *FGFR3* in der Tumorgenese nicht untersucht wurde ¹⁶¹. Durch Sequenzierung von mehreren hundert Tumoren des Kopf-Hals Bereichs konnte gezeigt werden, dass *FGFR3* zwar nur in 1-2 % der HPV-negativen, jedoch in 11-12 % der HPV-positiven Fälle mutiert ist. Am häufigsten wurde dabei die oben beschriebene p.S249C Veränderung gefunden, aber auch weitere bisher nicht beschriebene Mutationen im *FGFR3* Gen ^{162,163}. Zhang et al. fanden eine p.G697C Mutation in 62 % der untersuchten oralen Epithelzellkarzinomen ¹⁶⁴, was jedoch durch eine nachfolgende Studie von Aubertin et al. sowie kürzlich publizierte Sequenzierungsstudien nicht bestätigt werden konnte ^{162,163,165}. Neben Mutationen konnten in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs auch *FGFR3-TACC3* Fusionen gefunden werden ^{163,166}. Die Fusion führt *in-vitro* unter anderem zu erhöhter Zellproliferation und Koloniebildung welches

wiederum durch den FGFR1 und 3 Inhibitor PD173074 gehemmt werden kann ¹⁶⁶. Während PD173074 ein reiner *in-vitro* Inhibitor ist, gibt es mit AZD4547 (AstraZeneca) ¹⁶⁷ und BGJ398 (Novartis) ¹⁶⁸ zwei selektive FGFR1-3 Inhibitoren, die bereits in Phase 2 klinischen Studien Anwendung finden ¹¹⁸.

Diese Daten zeigen, dass FGFR3 ein potentiell Ziel für eine personalisierte Therapie in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs sein könnte, dessen Rolle jedoch noch genauer untersucht werden muss.

1.6 Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2)

Zur Familie der Discoidin Domain Rezeptoren (DDR) gehören DDR1 und DDR2. Beide Rezeptoren haben extrazellulär eine Discoidin und eine Discoidin-ähnliche Domäne gefolgt von einer juxtamembranären Domäne. Intrazellulär finden sich ebenfalls wie bei anderen Rezeptortyrosinkinasen eine juxtamembranäre Domäne und die Kinase (Abb. 1-7) ¹⁶⁹. Während DDR1 in fünf verschiedenen Spleißvarianten vorkommt, gibt es von DDR2 nur eine bekannte Isoform ¹⁷⁰.

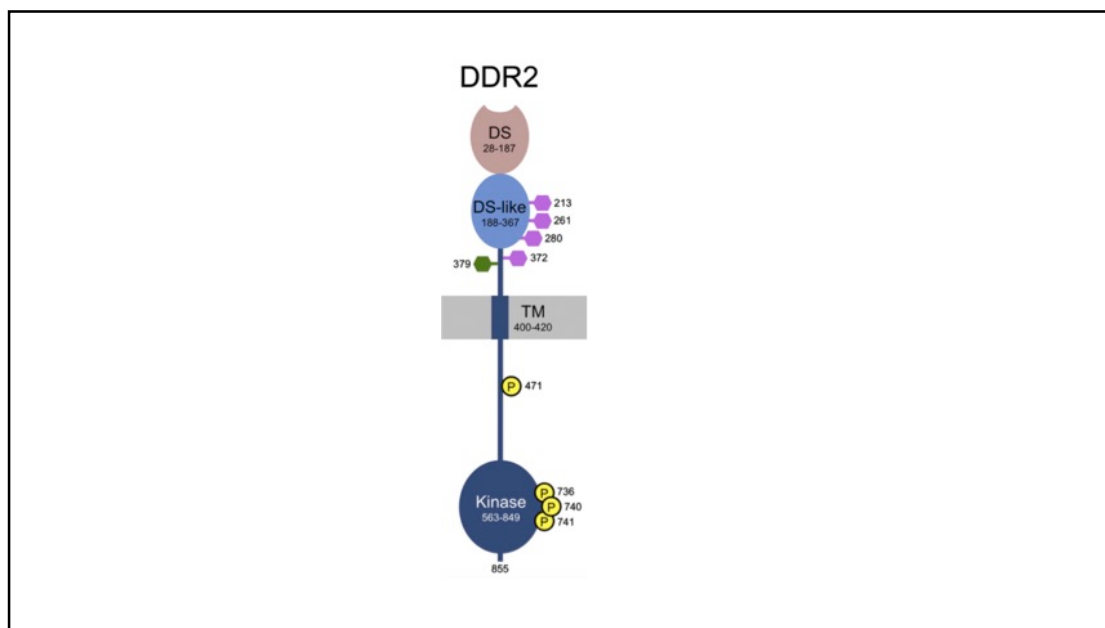


Abbildung 1-7. Struktur von DDR2.

Extrazellulär befindet sich eine Discoidin und eine Discoidin-ähnliche Domäne. Phosphorylierungsstellen sind in gelb und N- und O- Glycosylierungsstellen sind in violett bzw. grün dargestellt.

(DS, Discoidin; TM, Transmembran), verändert nach ¹⁷¹

DDRs unterscheiden sich in verschiedenen Eigenschaften von prototypischen Rezeptortyrosinkinasen.

Sie formen konstitutive Dimere in der Zellmembran¹⁷² und sind die einzigen bekannten Rezeptortyrosinkinasen, die durch Kollagen aktiviert werden, wobei DDR2 Kollagen Typ I, II, III, V und X bindet^{173,174}. Ligandenbindung führt bei DDRs zu einer langsamen und konstanten Phosphorylierung innerhalb von Stunden im Gegensatz zur sekunden- bis minutenschnellen Phosphorylierung bei anderen Rezeptortyrosinkinasen¹⁷³. Die maximale Phosphorylierung von DDR2 ist nur durch die SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase (SRC) möglich und fördert die Interaktion von DDR2 mit dem Adaptermolekül src homology 2 domain containing transforming protein 2 (SHC2)¹⁷⁵. Der exakte Signalweg ist jedoch unbekannt. DDR2 wird vor allem in Zellen mit mesenchymalen Ursprung exprimiert¹⁷⁶. Physiologisch kommt dieser Rezeptor in der Haut, im Skelettmuskel, im Herz, in der Lunge, in den kortikalen Nierenkanälchen, den Sternzellen der Leber und im Stroma des Endometriums vor¹⁷⁷. Je nach Kontext und Zelltyp kann DDR2 sowohl proliferativ als auch antiproliferativ wirken¹⁶⁹. Gleiches gilt für die Differenzierung. DDR2 Expression ist sowohl bei der Chondrozytenreifung als auch bei der Osteoblastendifferenzierung wichtig und spielt damit eine Schlüsselrolle bei der Knochenentwicklung¹⁷⁸. Bei der Differenzierung von Adipozyten hingegen wird DDR2 herunterreguliert¹⁷⁹. DDR2 ist weiterhin sowohl für EMT in der Entwicklung verschiedener Zelltypen¹⁶⁹ als auch bei der Wundheilung¹⁸⁰ und bei Migration unterschiedlicher Tumorzellen wichtig¹⁸¹. DDR2 wird mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht wie zum Beispiel Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis^{182,183}. Außerdem zeigen Patienten mit metastasiertem Schilddrüsenkarzinom und Hodgkin Lymphom hohe DDR2 Expression^{184,185}. Bei Brustkrebs assoziiert eine hohe DDR2 Expression im Tumor mit einer besseren Prognose¹⁸⁶, obwohl andere Studien zeigen konnten, dass DDR2 in dieser Tumorentität mit der Induktion von EMT¹⁸⁷ sowie Migration und Invasion¹⁸⁸ assoziiert ist. Auch Knockdown von DDR2 in hepatozellulären Tumorzellen hemmt Proliferation, Migration und Invasion¹⁸⁹. Während es über die Expression von DDR2 in Lungenkrebs keine einheitlichen Daten gibt^{190,191}, wurden in dieser Tumorentität verschiedene *DDR2* Mutationen in allen Proteindomänen beschrieben von denen einige auf Behandlung mit Dasatinib, einem Multikinaseinhibitor, ansprechen^{192,193,194}. In Tumoren des Kopf-Hals Bereichs wurde bereits für verschiedene Lokalisationen wie z. B. Zunge, Mundhöhle Oro- und Nasopharynx eine hohe DDR2 Expression gefunden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von DDR2 zu vermehrten Migration und Invasion führt^{195,196}. Auch verschiedene

DDR2 Mutationen wurden in 2-6 % aller Tumore des Kopf-Hals Bereichs gefunden, wobei diese nicht rekurrent waren ¹⁶².

Es gibt zwar bis jetzt keinen spezifischen DDR2 Inhibitor ¹⁹⁷, jedoch inhibieren beispielsweise die bereits für andere Tumore zugelassenen Substanzen Imatinib und Dasatinib neben PDGFR, ABL, KIT und SRC ^{198,199} auch DDR1 (Dasatinib: IC₅₀ 0,5 nM) und DDR2 (Dasatinib: IC₅₀ 1,4 nM) ²⁰⁰. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Actinomycin D die Aktivierung von DDR2 durch Bindung an die Discoidin-ähnliche Domäne inhibiert (IC₅₀ 9 µM) ²⁰¹.

Zusammenfassend kann man sagen, dass DDR2 zwar bereits in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs beschrieben wurde, jedoch bisher weder eine große Patientenkohorte mit Metastasen und Rezidiven untersucht wurde, noch die Möglichkeit von niedermolekularen Inhibitoren als Therapieoption.

1.7 MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK)

MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK) gehört neben AXL und der TYRO3 protein tyrosine kinase (TYRO3) zur Familie der TAM Rezeptortyrosinkinasen. Extrazellulär befinden sich N-Terminal zwei Ig-ähnliche Domänen und anschließend zwei Fibronectin (FN) Typ III Domänen gefolgt von der Transmembrandomäne und der intrazellulären Kinasedomäne ²⁰². Lösliche Formen des Rezeptors können durch proteolytische Spaltung in der extrazellulären Domäne durch Metalloproteinasen entstehen (Abb. 1-8). Diese können als Antagonist des membrangebundenen Rezeptors Liganden binden und so dessen Funktion hemmen ²⁰³.

MERTK Expression findet sich physiologisch im Ovar, Prostata, Hoden, Lunge, Retina und Niere ²⁰⁴ sowie in hämatopoetischen Zellen wie zum Beispiel Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK Zellen), Megakaryozyten und Thrombozyten ²⁰⁵. Als Liganden wurden Growth arrest-specific protein 6 (GAS6) ²⁰⁶, Protein S ²⁰⁷, tubby, tubby-like protein 1 (TULP1) ²⁰⁸ und Galectin-3 ²⁰⁹ beschrieben, deren Bindung je nach Zelltyp und Mikroumgebung verschiedene Signalwege wie zum Beispiel PI3K/AKT, Mitogen-activated protein kinase 3 und 1 (MAPK3/1, ERK1/2), B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL-2), NFκB, Ras homolog family member A (RhoA) oder FAK aktivieren ²¹⁰. GAS6 und Protein S sind beide γ-carboxylierte und somit Vitamin K-abhängige Proteine. Diese binden carboxyterminal an den Rezeptor und aminoterminal an Phosphatidylserin. Dadurch spielt MERTK

eine wichtige Rolle bei der Efferozytose (Phagozytose apoptotischer Zellen). GAS6 bindet Phosphatidylserin auf der Zellmembran apoptotischer Zellen welches MERTK auf Makrophagen aktiviert ²¹¹. So zeigen Mertk Knockdown Mäuse eine vergrößerte Milz durch die Anhäufung apoptotischer Zellreste ²¹². MERTK Aktivierung führt in Makrophagen weiterhin zu einer Unterdrückung der Entzündungsantwort und fördert die Wundheilung ²¹¹. Knockdown von Mertk resultiert dementsprechend in Autoimmunität mit chronischer Entzündung, die zu Neoplasien führen kann ^{213,214}. Wie bei Makrophagen, vermindert MERTK auch in NK Zellen die Antitumor-Aktivität, wodurch sich vermehrter Metastasen bilden ²¹⁵. Auch in epithelialen Zellen wie zum Beispiel bei Brustkrebs fördert MERTK die Efferozytose was in diesem Zusammenhang zu Tumortoleranz führen kann ²¹⁶.

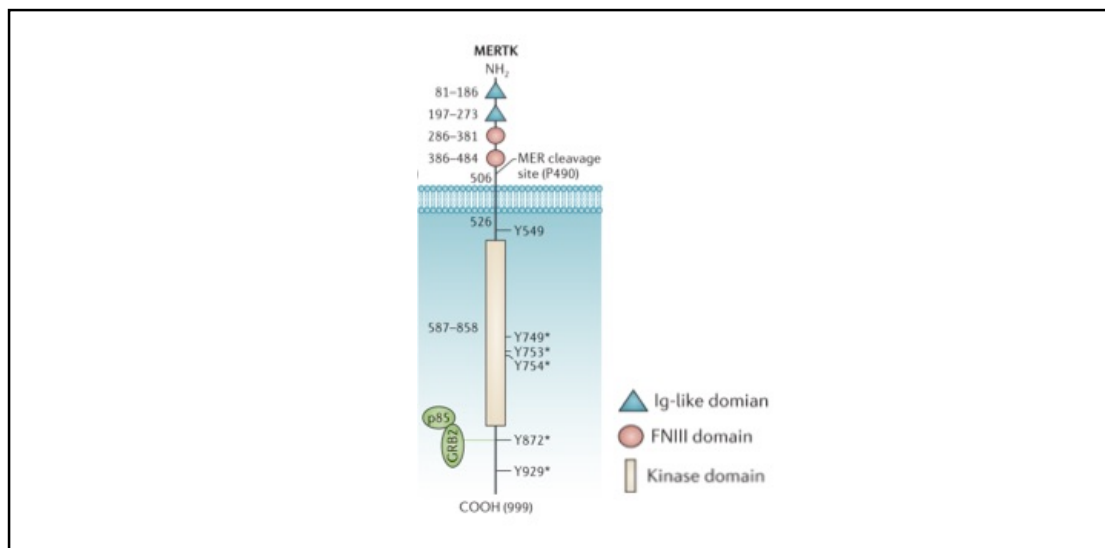


Abbildung 1-8. Struktur von MERTK.

Extrazellulär befinden sich zwei Ig-ähnliche und zwei Fibronektion Typ III Domänen und die Schnittstelle für Metalloproteinasen. Phosphorylierungsstellen sind mit Sternchen (*) markiert. (Ig, Immunglobulin; FN, Fibronektin; GRB2, Growth Factor Rezeptor-bound Protein 2), verändert nach ²¹¹

Eine Überexpression von MERTK findet sich in verschiedenen Tumoren. So zeigen 69 % aller nicht-kleinzelligen Lungen-karzinome vermehrte MERTK Expression, bei denen es eine Rolle bei verschiedenen onkogenen Prozessen wie Wachstum, Proliferation, Überleben und Migration aber auch Chemosensitivität spielt ²¹⁷. Auch beim Astrozytom konnte eine verbesserte Chemosensitivität sowie erhöhte Apoptoserate nach MERTK Knockdown gezeigt werden ²¹⁸. Weiterhin wurde eine MERTK Überexpression unter anderem beim Melanom ²¹⁹, Glioblastom ²²⁰, bei akuter lymphatischer Leukämie im Kindesalter ²²¹ sowie bei Magen- ²²², Brust- ²²³ und Prostatakarzinom ²²⁴ beschrieben. Genetische Veränderung wie Amplifikation,

Mutationen oder Translokationen sind jedoch selten²¹¹. Auch die Überexpression der MERTK Liganden GAS6, Protein S und Galectin-3 ist von verschiedenen Tumoren bekannt²¹¹, wobei GAS6 eine höhere Affinität für AXL hat, sodass die beobachteten Effekte vermutlich über diese Rezeptortyrosinkinase vermittelt sind²⁰⁶. Die Rolle von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ist bis jetzt unbekannt.

Es gibt verschiedene niedermolekulare Inhibitoren, die neben ihrem eigentlichen Ziel auch MERTK inhibieren²¹¹. Zum Beispiel hemmt Foretinib, ein Inhibitor gegen MET und VEGFR2 *in-vitro* das MERTK-abhängige Überleben, Migration und Invasion von Glioblastomzellen, sowie das Tumorwachstum in Mäusen²²⁵. Selektive MERTK Inhibitoren sind noch in der präklinischen Entwicklung. Beispiele sind UNC569, bzw. sein Derivat UNC1062 (IC₅₀ 1,1 nM) welches potenter und weniger toxisch ist²²⁶. Letzteres inhibiert MERTK Phosphorylierung und verankerungsunabhängiges Wachstum in verschiedenen Tumorzelllinien^{226,219,222}. Weiterhin konnte in Melanomzellen durch UNC1062 Apoptose induziert und Invasion gehemmt werden²¹⁹. In Magenkarzinomzellen wiederum wurde die Proliferation inhibiert²²². UNC2025, der neuste MERTK Inhibitor ist im Gegensatz zu UNC1062 auch für Tierversuche geeignet, inhibiert jedoch auch FLT3²²⁷.

Diese Daten weisen darauf hin, dass MERTK eine Bedeutung in verschiedenen Tumoren spielt und dementsprechend auch ein therapeutisches Ziel in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs sein könnte.

1.8 AXL receptor tyrosine kinase (AXL)

AXL receptor tyrosine kinase (AXL) gehört wie MERTK zur Familie der TAM-Rezeptortyrosinkinasen und zeichnet sich durch einen ähnlichen Aufbau mit zwei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen sowie zwei FN Typ III Domänen mit anschließender Transmembran- und intrazellulärer Kinasedomäne aus (Abb. 1-9)²⁰².

Physiologisch wird AXL in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wie z. B. im Kleinhirn, Makrophagen, Endothelzellen, Herz, Skelettmuskel, Leber, Niere und Hoden^{205,228,229}. Durch alternatives Spleißen in Exon 10 können zwei verschiedene AXL Varianten entstehen, wobei die biologische Bedeutung dieser Varianten nicht näher erforscht ist²²⁹. Der Ligand für AXL ist das Vitamin-K-abhängige GAS6, welches nach Bindung zur Aktivierung verschiedener Signalwege führt²⁰². Wichtig sind der MAPK- sowie der PI3K/AKT-Signalweg. Ersterer führt zu einer vermehrten

Proliferation^{230,231} und letzterer zu besserem Zellüberleben durch Inhibition von Apoptose^{232,233}. Die extrazelluläre Domäne kann weiterhin durch die ADAM metallopeptidase domain 10 (ADAM10) proteolytisch gespalten werden, sodass eine lösliche Form des AXL-Rezeptors entsteht (Abb. 1-9)²³⁴. Es gibt Hinweise darauf, dass diese lösliche Form die Migration von Zellen und die Aktivierung des membran-gebundenen AXL fördert z. B. über die Verlängerung der Halbwertszeit des Liganden GAS6²⁰². Wie auch MERTK spielt AXL über die Bindung von GAS6 an Phosphatidylserin auf der Zellemembran apoptotischer Zellen eine Rolle bei der Efferozytose, wobei AXL im Gegensatz zu MERTK in Dendritischen Zellen und nicht in Makrophagen wichtig ist²³⁵. Weiterhin moduliert die Hochregulation von AXL in aktivierten Dendritischen Zellen die Signalwege von proinflammatorisch zu immunsuppressiv²³⁶ und *Axl* Knockout Mäuse zeigen verschiedene Autoimmunsymptome, wobei diese deutlich verstärkt sind wenn zusätzlich *Mertk* und *Tyro3* fehlen²³⁷.

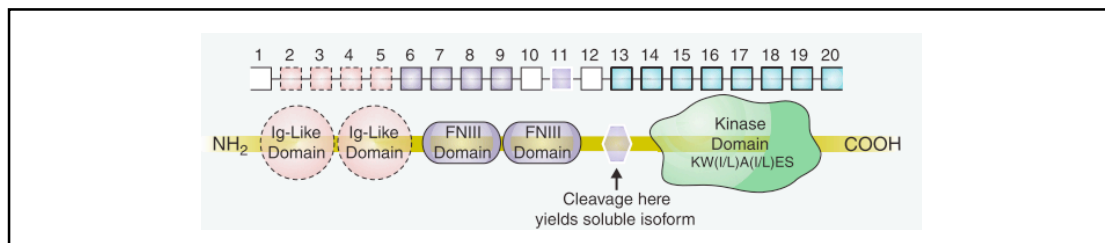


Abbildung 1-9. Genomische- und Proteinstruktur.

AXL besteht aus 20 Exons. Das Protein besteht extrazellulär aus zwei Ig-ähnliche und zwei Fibronektion Typ III Domänen und der Schnittstelle für die lösliche Form des Rezeptors. (Ig, Immunglobulin; FN, Fibronektin), verändert nach²⁰²

Eine erhöhte Expression von AXL, zum Teil auch mit vermehrter GAS6 Produktion, wurde bereits in verschiedensten soliden und nicht-soliden Tumoren gefunden, sodass hier nur einige Beispiele genannt werden sollen. Im Pankreaskarzinom wird AXL in 55 % der Patienten exprimiert und korreliert mit schlechterem Überleben. *In-vitro* Versuche zeigten hier eine Rolle für AXL bei der Proliferation, verankerungs-unabhängigem Wachstum, Migration und Invasion²³⁸. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Studien mit hepatozellulären Karzinomzellen erzielt²³⁹. Auch in Gliomen ist AXL für die Proliferation, Migration und Invasion wichtig²⁴⁰. Weiterhin wurde in Brustkrebs gezeigt, dass AXL die Invasion fördert und an Resistenzmechanismen gegenüber Lapatinib beteiligt ist^{241,242}. In Tumoren der Lunge ist AXL ein schlechter prognostischer Marker, spielt auch hier eine Rolle bei der Invasion²⁴³ und Inhibition von AXL führt beispielsweise zu verringertem Tumorwachstum in Xenograft-Modellen²⁴¹. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in nicht-kleinzelligen Lungen-

tumoren die Hochregulation von AXL ein wichtiger Mechanismus bei der Resistenzentwicklung gegenüber Inhibitoren von EGFR und PI3KCA ist ^{244,245,246}. Zwei andere Studien zeigten, dass in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs AXL sowohl in Cetixumab- ²⁴⁶ als auch in Erlotinib-resistenten Zelllinien vermehrt exprimiert wird. In letzterer wurde weiterhin gezeigt, dass eine hohe AXL mRNA Expression im Tumor mit schlechterem Überleben korreliert ²⁴⁷. Wie auch in Lungentumoren vermittelt AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs weiterhin Resistenzen gegenüber PI3KCA Inhibition. AXL interagiert hierbei mit EGFR was über PKC zu einer PI3KCA unabhängigen Aktivierung des mTOR Signalwegs führt ²⁴⁸. Auch in gastrointestinalen Stromatumoren wurde eine AXL Hochregulation als Resistenzmechanismus beschrieben. In diesem Fall gegenüber Imatinib ²⁴⁹. Neben dem direkten Einfluss auf Tumorzellen, konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass AXL *in-vivo* für die Angiogenese wichtig ist. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass AXL Knockdown zu verminderten Migration und Überexpression zu Wachstum und Lumenbildung in menschlichen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) führt ²⁵⁰.

Diese Daten verdeutlichen, dass die Inhibition von AXL alleine oder in Kombination mit anderen Molekülen ein vielversprechender therapeutischer Ansatz in verschiedenen Tumorentitäten ist. Dafür werden zur Zeit vor allem niedermolekulare Inhibitoren verwendet, da Antikörper gegen AXL zwar spezifisch sind, aber eine schlechte Pharmakokinetik im Menschen haben ²⁵¹. BGB324 (R428) ist der einzige AXL Inhibitor der bereits in Phase 1 klinischen Studien zugelassen ist und bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungentumoren und akuter myeloischer Leukämie eingesetzt wird ^{252,253}.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Rolle von AXL bei der Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Inhibitoren in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs bereits beschrieben wurde. Da sich die Inhibition von AXL jedoch als vielversprechender Ansatz in anderen Tumoren gezeigt hat, war der Fokus dieser Arbeit die Untersuchung von AXL selbst als therapeutisches Ziel in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

1.9 Zielsetzung

Obwohl Tumore des Kopf-Hals Bereichs die sechst häufigste Tumorursache weltweit darstellen, sind die Therapieoptionen limitiert und das Fünf-Jahres Überleben beträgt im Durchschnitt nur 60 %. Aus diesem Grund ist es wichtig neue therapeutische

Optionen für diese Tumorentität zu finden. Rezeptortyrosinkinasen eignen sich durch ihre Lokalisation an der Zelloberfläche besonders hierfür. Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von Rezeptortyrosinkinasen, die bei den verschiedenen Prozessen der Pathogenese von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs von Bedeutung sind. Weiterhin soll die Möglichkeit diese Rezeptortyrosinkinasen als neue therapeutische Angriffspunkte nutzen zu können, untersucht werden.

Um erste Hinweise darauf zu bekommen, welche Rezeptortyrosinkinasen eine Rolle bei der Tumorgenese von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs spielen, werden zunächst „Whole Genome“ Sequenzdaten des Cancer Genome Atlas (TCGA) von Patienten mit diesen Tumoren ausgewertet und die Rate der einzelnen Mutationen ermittelt. Im Anschluss werden für vielversprechende Kandidaten immunhistochemische Färbungen durchgeführt um aufzuklären ob diese in Tumoren exprimiert werden und somit wichtig sind. Auf dieser Grundlage werden die Kandidatengene weiter eingegrenzt. Für die verbleibenden Rezeptortyrosinkinasen soll eine umfassende Auswertung der immunhistochemischen Färbungen inklusive der Korrelation mit klinischen Daten erfolgen. Weiterhin sollen diese *in-vitro* untersucht werden, um ihren Beitrag zur Tumorprogression zu untersuchen. Dafür wird zunächst ihre endogene Expression in verschiedenen Zelllinien in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs analysiert. Die Funktionen der Rezeptortyrosinkinasen sollen durch Überexpressionsstudien sowie einen induzierbaren Knockdown mit shRNA aufgeklärt werden. Dabei werden Zelllinien, die entsprechenden Rezeptortyrosinkinasen nicht exprimieren bzw. solche mit hoher Expression untersucht. Weiterhin soll *in-vitro* nachgestellt werden, wie sich die identifizierten Mutationen auf die Funktion der Rezeptortyrosinkinasen auswirken. Dafür werden die mit Hilfe der TCGA Daten identifizierten Mutationen in die entsprechenden Wildtyp Sequenzen eingefügt und ebenfalls in Zelllinien überexprimiert. Mit Hilfe dieser Zellen werden verschiedene tumorigene Eigenschaften wie Proliferation, Migration, Invasion, verankerungsunabhängiges Wachstum und Adhäsion untersucht. Um zu ermitteln, ob die identifizierten Rezeptortyrosinkinasen potentielle therapeutische Ziele in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs darstellen, kommen verschiedene niedermolekulare Inhibitoren der entsprechenden Rezeptortyrosinkinasen zum Einsatz, von denen einige bereits in anderen Tumorentitäten zugelassen oder in klinischen Studien sind. Dabei sollen die oben genannten tumorigenen Eigenschaften nach Inhibition analysiert werden. Weiterhin sollen Untersuchungen verschiedener Signalwege sowie von Apoptose und Zellzyklus Aufschluss über den Wirkmechanismus der Inhibitoren geben.

2. Material

2.1 Geräte und Software

Tabelle 2-1. Verwendete Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Amersham Imager 600	GE Healthcare, München, Deutschland
BBD 6220 CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BD FACSAria™ III	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Centromat H Inkubationshood	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Centromat MO Kreis-Schüttler	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
CKX41 (inverses Mikroskop)	Olympus, Hamburg, Deutschland
CX41 (Aufrecht Mikroskop)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Definiens Tissue Studio 2.1 image analysis software	Definiens, München, Deutschland
Epoch Mikroplatten Spektralphotometer	BioTek, Winooski, VT, USA
Eppendorf Thermomixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FlowJo Software	Tree Star, Ashland, OR, USA
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
Hypoxiekammer MIC-101	Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, USA
Hyrax M 55 Rotationsmikrotom	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Light-Cycler 480 II	Roche, Mannheim, 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
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer improved-Zählkammer	LO – Laboroptik, Lancing, UK
Pannoramic Desk Scanner	3DHitech, Budapest, Ungarn

Fortsetzung Tabelle 2-1

Gerät	Hersteller
peqSTAR 96X Universal Thermocycler	Peqlab, Erlangen, Deutschland
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
Universal Hood II Gel Doc	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Ventana Discovery XT automated staining system	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Zeiss Axio Observer D1 (inverses Fluoreszenzmikroskop)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,2 ml PCR Gefäß	Axygen, Union City, CA, USA
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.S™ 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 ²)	VWR, Darmstadt, Deutschland
FrameStar® 480/96 Platten für Roche LightCycler® 480 mit Verschlussfolie	4titude®, Wotton, UK
Gelloading Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kollagen I beschichtete Platten (96 und 6 Loch)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger, Stärke 1 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Röhrchen für FACS (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 2-2

Material	Hersteller
Roti®-PVDF (Polyvinylidenfluorid), 0,45 µM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiblabo®-Spritzenfilter, PVDF, steril, 0,45 µM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Spritzen (5 ml), Injekt® Solo, Luer Ansatz	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter, Celluloseacetat Membran, 0,2 µM	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wattestäbchen	Labomedic, Bonn, Deutschland
Whatman 3MM Chr Papier	GE Healthcare, München, Deutschland
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2-3. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
10 M Natronlauge (NaOH)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
10 M Salzsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
4 % Agarose	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
4 % Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose Basic	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS, 10 % w/v in dH ₂ O)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin (50 mg/ml in dH ₂ O)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Aquatex ®	Merck, Darmstadt, Deutschland
ATX Ponceau S red staining solution	Fluka, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
BGB324	BerGenBio, Bergen, Norwegen
BGJ398	Active Biochem, Wanchai/Honkong, China
Bluing Reagent	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Amresco, Solon, OH, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cell Conditioning 1 (CC1)	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Cell Conditioning 2 (CC2)	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA
Chloramphenicol (12,5 mg/ml in 100 % EtOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CRYSTAL Gemisch (N ₂ N50, CO ₂ N45 5 %, O ₂ N45 1 %)	Air Liquide, Paris, Frankreich
Cytoseal 60	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Fortsetzung Tabelle 2-3

Chemikalien	Hersteller
D (+) Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dasatinib	Selleckchem, Houston, TX, USA
Dimethylformamid (DMF)	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Biozol, Eching, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA Gel Loading Dye (6 x)	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix, 10 mM each	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Doxycyclin (2 mg/ml in dH ₂ O, steril filtriert)	Sigma-Aldrich, München, 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
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
FACSFlow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACSRinse Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μL)	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
FastDigest Enzyme (Agel, Ascl, BamHI, EcoRI, HindIII, NotI PstI, XbaI)	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS), hitzinkaktiviert, 56 °C, 30 Minuten	Biochrom, Berlin, Deutschland
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Geneticin® Selective Antibiotic (G418 Sulfate)	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Glycerol (wasserfrei)	AppliChem, Darmstadt, 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
Hexadimethrinbromid (Polybrene, 10 mg/ml in dH ₂ O steril filtriert)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl thiogalactosid (IPTG, 0,1 M in dH ₂ O)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kanamycin Sulfat (50 mg/ml dH ₂ O)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
LB-Agar Pulver nach Miller	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium Pulver nach Miller	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin Hemisulfat	Tocris, Bristol, UK
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 2-3

Chemikalien	Hersteller
Matrigel™ Invasion Chambers 8,0-µm-Einsätze	VWR, Darmstadt, Germany
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
N,N,N,N- Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxychelate	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat Pellets (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat (100 mM)	PAA, GE Healthcare, München, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (100 x, 5000 U/ml)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin A	Tocris, Bristol, UK
PeqGREEN	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (100 mM in 100 % EtOH)	Fluka, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco® Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Phosphatseinhistorcocktail II und III	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Propidium Iodid Solution (PI)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RNAse A	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
ROTI®-LOAD 1 reduzierend, 4 x	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
S.O.C. Medium	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Spectinomycin (100 mg/ml in DMSO/H ₂ O, 1:1)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	Life technologies, 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
UNC1062	AOBIOUS, Gloucester, MA, USA

Fortsetzung Tabelle 2-3

Chemikalien	Hersteller
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, 40 mg/ml in DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.4 Reaktionskits**Tabelle 2-4. Reaktionskits**

Reaktionskit	Hersteller
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, München, Deutschland
Annexin V Apoptose Detection Kit FITC	eBioscience, Inc., Diego, CA, USA
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
GeneJET Gel Extraction Kit	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
GeneJET Plasmid Maxiprep Kit	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Human Phospho-RTK Array Kit	R&D Systems Minneapolis, MN, USA
iScript cDNA Synthese Kit	Biorad, Hercules, CA, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Power SYBR Green Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
ScreenFect® A Transfektionsreagenz	Genaxxon, Ulm, Deutschland
StarGate® Combi Newcomer Set	IBA, Göttingen, Deutschland
UltraView Universal DAB Detection kit	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA

2.5 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 Natriumdesoxychelat
 0,1 % w/v SDS
 2 mM EDTA
 PBS

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M Trizma Base
 0,4 % w/v SDS
 dH₂O

Tabelle 2-5. Sammelgel für Gelelektrophorese

Sammelgel (2 Gele)	
dH ₂ 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
 dH₂O

Tabelle 2-6. Trenngele für Gelelektrophorese

Trenngel (2 Gele)			
	8,5 %	10 %	15 %
dH ₂ O	5 ml	4,25	1,75 ml
Trenngelpuffer	5,6 ml	5,6 ml	5,6 ml
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	4,25 ml	5ml	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
 dH₂O

1 x Laufpuffer

10 % 10 x Laufpuffer
 90 % dH₂O

10 x Transferpuffer (pH 8,3)

250 mM Trizma Base
 1,92 M Glycin
 dH₂O

- 1 x Transferpuffer
10 % 10 x Transferpuffer
10 % Methanol
80 % dH₂O
- 10 x TBS (pH 7,5)
0,5 M Tris-HCl
1,5 M NaCl
dH₂O
- 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
- Sample Puffer
0.1 % w/v Glucose
PBS
- PI Färbelösung
50 µg/ml Propidium Iodid
50 µg/ml RNaseA
Sample buffer
- 2 x HBS Puffer (pH 7,1)
50 mM HEPES
280 mM NaCl
1.5 mM Na₂HPO₄
dH₂O
- 10 x Annealing Puffer(pH 7,4)
1M NaCl
100 mM Tris-HCl

2.6 Medien für die Zellkultur

Medium zur Kultivierung von HN, HSC-3, FaDu und Detroit 562 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)

Medium zur Kultivierung von HEK293T Zellen
 DMEM mit L-Glutamin
 10 % FBS
 1 x Penicillin/Streptomycin (50 U/ml)
 1 mM Natriumpyruvat

Einfriermedium
 800 µl des jeweiligen Kultivierungsmedium
 100 µl FBS
 100 µl DMSO

2.7 Nukleinsäuren

Tabelle 2-7. Nukleinsäuren

Name	Sequenz (in 5' → 3')
shRNAs	
shAXL574 fwd	CCGGCGAAAGAAGGAGACCCGTTATCTCGA GATAACGGGTCTCCTTCTTTTCGTTTTG
shAXL574 rev	AATTCAAAAACGAAAGAAGGAGACCCGTTAT CTCGAGATAACGGGTCTCCTTCTTTTCG
shAXL575 fwd	CCGGCGAAATCCTCTATGTCAACATCTCGAG ATGTTGACATAGAGGATTTTCGTTTTG
shAXL575 rev	AATTCAAAAACGAAATCCTCTATGTCAACATC TCGAGATGTTGACATAGAGGATTTTCG
shMERTK862 fwd	CCGGGCTTCTGGTCTTGATGTATTTCTCGAG AAATACATCAAGACCAGAAGCTTTTTG
shMERTK862 rev	AATTCAAAAAGCTTCTGGTCTTGATGTATTTTC TCGAGAAATACATCAAGACCAGAAGC
shMERTK865 fwd	CCGGCCTGCATACTTACTTACTTTACTCGAG TAAAGTAAGTAAGTATGCAGGTTTTTG
shMERTK865 rev	AATTCAAAAACCTGCATACTTACTTACTTTAC TCGAGTAAAGTAAGTAAGTATGCAGG
shGFP fwd	CCGGCAACAGCCACAACGTCTATATCTGCA GATATAGACGTT GTGGCTGTTGTTTTG
shGFP rev	AATTCAAAAACAACAGCCACAACGTCTATAT CTGCAGATATA GACGTTGTGGCTGTTG
Primer für qRT-PCR	
FGFR3 isoform 1 fwd	GACGGCACACCCTACGTTAC
FGFR3 isoform 1 rev	GGTGACGTTGTGCAAGGAGA
FGFR3 isoform 2 fwd	CGTTACCGTGCTCAAGGTGT
FGFR3 isoform 2 rev	CTCGAGCTCGGAGACATTGG
FGFR3 isoform 3 fwd	TCTGTGAGCCACCAATTTCA
FGFR3 isoform 3 rev	GAAGAAGCCCACCCCGTAG
β-actin fwd	AGTCCTGTGGCATCCACGAAA
β-actin rev	CACTGTGTTGGCGTACAGGTCTT
Mutationspezifische Primer	
FGFR3 Mutation A fwd (Annealing 72 °C)	GGAGCAGTTGATCTTCGGCAGCGG
FGFR3 Mutation A rev (Annealing 72 °C)	TGCTGGCCGGGCTCTGGG

Fortsetzung Tabelle 2-7

Name	Sequenz (in 5' → 3')
FGFR3 Mutation B fwd (Annealing 65 °C)	GCTCCATCCTTGGGAGATGAC
FGFR3 Mutation B rev (Annealing 65 °C)	GTCTGTACCCGCACACT
FGFR3 Mutation C fwd (Annealing 72 °C)	CTGGAGCGCTGCCCCGACCCGG
FGFR3 Mutation C rev (Annealing 72 °C)	CACGTCCAGCGTGTACGTCTGCC
FGFR3 Mutation D fwd (Annealing 68 °C)	GCTGGTGACCAAGGACAACGTG
FGFR3 Mutation D rev (Annealing 68 °C)	ACATTGCGGGCAGCCAGG
FGFR3 Mutation E fwd (Annealing 68 °C)	CGAGTACCTGCACCTGTCCGGC
FGFR3 Mutation E rev (Annealing 68 °C)	TCGGTGGACGTCACGGTA
FGFR3 Mutation F fwd (Annealing 67 °C)	CTCAGGGGACAACTCCGTGTTTG
FGFR3 Mutation F rev (Annealing 67 °C)	GAGCTGGAGCTGGGGGTG
Umklonierungsprimer	
GFP fwd	AGCGGCTCTTCAATGGTGAGCAAGGGCGAG Gag
GFP rev	AGCGGCTCTTCTCCCTTACTTGTACAGCTCG TCCat
MERTK fwd	AGCGGCTCTTCAATGGGGCCGGCCCCGCTg c
MERTK rev	AGCGGCTCTTCTCCCTCACATCAGGACTTCT GAgc
AXL AscI	GCCGGCGCGCCAATGGCGTGGCGGTGCC CAGGAT
AXL NotI	GCGACGCGGCCGCGTACGCGTGGCACCAT CCTCCTGCCCTGGGGC
DDR2 AscI	GCCGGCGCGCCAATGATCCTGATTCCCAGA ATGCT
DDR2 NotI	GCGACGCGGCCGCGTACGCGCTCGTCGCC TTGTTGAAGGAGCAG
FGFR3 AscI	GCCGGCGCGCCAATGGGCGCCCCTGCCTG CGCC
FGFR3 NotI	GCGACGCGGCCGCGTACGCGTCGTCCGCG AGCCCCACTGCTGGG
Sequenzierungsprimer	
AXL Seq 1	AAGCCATAACGCCAAG
AXL Seq 2	AGCTGGTGAAGGAACCTTC
AXL Seq 3	CCACTCAGATGCTAGTG
DDR2 Seq 1	TGGGCAGCAGTTTGTACTC
DDR2 Seq 2	GCAGTTCTGGCAGAAAATG
DDR2 Seq 3	CTGTGTGTATCACTGATG
FGFR3 Seq 1	CATCTCCTGGCTGAAGAAC
FGFR3 Seq 2	ACCGTGCACAAGATCTC
FGFR3 Seq 3	CAGAAGTGCATCCACAG

Fortsetzung Tabelle 2-7

Name	Sequenz (in 5' → 3')
MERTK Seq 1	ACCAGAAACACAGCCTTC
MERTK Seq 2	ACATCAGATGGATGAAGCC
MERTK Seq 3	AAGATGGGACCTCTCTG
MERTK Seq 4	GTATGACTATCTTCTCC
pLKO-Tet-On Seq	GGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGA
pENTRY-IBA51 Seq	GCGAAACGATCCTCGAAG
CMV fwd Seq	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

2.8 Plasmide

Tabelle 2-8. Plasmide

Vektor	cDNA/shRNA	Firma
pMD2.G	VSV-G	
psPAX2	gag, pol	
pDONR223	AXL	Addgene ²⁵⁴
pDONR223	DDR2	Addgene ²⁵⁴
pEGFP-N1	EGFP	
pUC57	FGFR3 IIIb (NM_001163213)	Genesript
pDONR223	MERTK	Addgene ²⁵⁴
pLenti-C-mGFP	/	Origene
pENTRY-IBA51	/	IBA
pCSG-IBAw1	/	IBA
pLKO-Tet-On	/	
pLenti-C-mGFP	AXL	
pLenti-C-mGFP	DDR2	
pLenti-C-mGFP	FGFR3 IIIb (Wildtyp)	
pLenti-C-mGFP	FGFR3 IIIb c.148G>A (p.V50I, Mutation A)	
pLenti-C-mGFP	FGFR3 IIIb c.392C>T (p.S131L, Mutation B)	
pLenti-C-mGFP	FGFR3 IIIb c.746C>G (p.S249C, Mutation C)	
pLenti-C-mGFP	FGFR3 IIIb c.1885G>A (p.E629K, Mutation D)	
pLenti-C-mGFP	FGFR3 IIIb c.2290G>C (p.D764H, Mutation E)	
pLenti-C-mGFP	FGFR3 IIIb c.2362G>A (p.D788N, Mutation F)	
pENTRY-IBA51	EGFP	
pENTRY-IBA51	MERTK	
pCSG-IBAw1	EGFP	
pCSG-IBAw1	MERTK	
pLKO-Tet-On	shAXL574 (TRCN0000000574)	
pLKO-Tet-On	shAXL575 (TRCN0000000575)	
pLKO-Tet-On	shGFP	
pLKO-Tet-On	shMERTK862 (TRCN0000000862)	
pLKO-Tet-On	shMERTK865 (TRCN0000000865)	

2.9 Antikörper

Tabelle 2-9. Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung (Westernblot)	Verdünnung (IHC)
Primärantikörper			
Akt	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA TBS-T	
ALK (D5F3)	Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA		ready to use
Axl (AF154)	R&D Systems Minneapolis, MN, USA		1:500
Axl (C89E7)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA TBS-T	
DDR2	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % Milch TBS-T	
DDR2 (H-108)	Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA		1:20
FAK (Klon 77)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:500 5 % Milch TBS-T	
FAK pY397 (Klon 14)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:500 5 % BSA TBS-T	
FGFR1 (D8E4)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA Signal Boost I	
FGFR2 (C-17)	Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA	1:200 5 % Milch TBS-T	
FGFR3 (B-9)	Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA	1:200 5 % Milch TBS-T	1:10
FGFR3 (C51F2)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA TBS-T	
FGFR3 (phospho Y724) [EPR2281(3)]	Abcam, Cambridge, UK	1:000 5 % BSA Signal Boost I	
MERTK (D21F11)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA Signal Boost I	
MERTK	Sigma-Aldrich, München, Deutschland		1:100

Fortsetzung Tabelle 2-9

Antikörper	Firma	Verdünnung (Westernblot)	Verdünnung (IHC)
MERTK (phospho Y681 + Y749)	Abcam, Cambridge, UK	1:500 5 % BSA Signal Boost I	
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA TBS-T	
Phospho-Akt (Ser473) (D9E)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA Signal Boost I	
Phospho-EGF Receptor (Tyr1086)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:000 5 % BSA Signal Boost I	
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA TBS-T	
RET (C-3)	Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA		1:20
RhoA (67B9)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande	1:1000 5 % BSA TBS-T	
ROS1 (D4D6)	Cell Signaling Technology Leiden, Niederlande		1:50
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

2.10 Zelllinien

Tabelle 2-10. Zelllinien

Zelllinie	Lokalisation	Firma	Referenz
HSC-3	Zervikale Metastase (Primärtumor: Epithelzellkarzinom der Zunge)	Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB Cell Bank), Osaka, Japan	Momose et al., Journal of Oral Pathology and Medicine, 1989 ²⁵⁵
HN	Zervikale Lymphknotenmetas- tase (Primärtumor: Epithelzellkarzinom des Gaumens)	Leibnitz Institute DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig, Deutschland	Kawamata et al., International Journal of Cancer, 1997 ²⁵⁶
Detroit 562	Metastase, Pleuraerguss (Primärtumor: Epithelzellkarzinom des Pharynx)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA	Peterson et al., Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 1971 ²⁵⁷
FaDu	Epithelzellkarzinom des Pharynx	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA	Rangan, Cancer, 1972 ²⁵⁸
SCC-25	Epithelzellkarzinom der Zunge	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA	Rheinwald et al., Cancer research, 1981 ²⁵⁹
HEK293T	embryonale Nierenzellen mit SV40 large T antigen transformiert	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Graham et al., The Journal of general virology, 1997 ²⁶⁰

Zellpellets von 584A2, CAL 27 und JHU 011 Zellen wurden zur Proteinisolierung von Lynn Heasley (Department of Craniofacial Biology, University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, USA) zur Verfügung gestellt.

2.11 Patientenkollektiv

Alle Patienten hatten Plattenepithelzellkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs und wurden palliativ oder kurativ zwischen 1997 und 2011 am Universitätsklinikum Bonn behandelt. Die Studie wurde vom Reviewboard des Instituts für Pathologie genehmigt (#148/11). Tabelle 2-11 zeigt die klinisch-pathologischen Daten der Patienten.

Tabelle 2-11. Patientenkollektiv

	FGFR3	DDR2	MERTK	AXL
	<u>verfügbares Gewebe</u>			
Patienten	n=536	n=554	n=554	n=364
Verfügbares Gewebe				
Normale Mukosa	36 (18*)	34 (18*)	33 (18*)	24 (13*)
Primärtumor	455 (51*)	479 (49*)	468 (53*)	281 (17*)
Lymphknotenmetastase	199 (19*)	208 (17*)	199 (16*)	146 (14*)
Rezidiv	53 (7*)	60 (7*)	53 (7*)	44 (5*)
	<u>Patienten mit klinischen Daten</u>			
Patienten	n=449	n=469	n=451	n=321
Geschlecht				
männlich	333 (74 %)	351 (75 %)	341 (76 %)	240 (74,8 %)
weiblich	116 (26 %)	118 (25 %)	110 (24 %)	81 (25,2 %)
Alter [Jahre, SD]	62,5 (11,1)	62.3 (10,9)	62.39 (11,1)	61,7 (11,7)
Lokalisation des Primärtumors				
Mundhöhle	115 (26 %)	115 (25 %)	112 (25 %)	80 (25 %)
Oropharynx	143 (31 %)	147 (31 %)	142 (31 %)	117 (36 %)
Hypopharynx/ Larynx	184 (41 %)	198 (42 %)	189 (42 %)	116 (36 %)
unbekannt	7 (2 %)	9 (2 %)	8 (2 %)	8 (3 %)
Tabak				
Nicht-Raucher	42 (10 %)	44 (9 %)	41 (9 %)	27 (8 %)
Raucher	302 (67 %)	318 (68 %)	305 (68 %)	223 (70 %)
unbekannt	105 (23 %)	107 (23 %)	105 (23 %)	71 (22 %)

Fortsetzung Tabelle 2-11

	FGFR3	DDR2	MERTK	AXL
Alkohol				
Nicht-Trinker	126 (28 %)	130 (28 %)	122 (27 %)	89 (28 %)
manchmal	77 (17 %)	78 (17 %)	67 (15 %)	58 (18 %)
mittel bis stark	120 (27 %)	132 (28 %)	126 (28 %)	85 (26 %)
unbekannt	126 (28 %)	129 (27 %)	136 (30 %)	89 (28 %)
HPV Status				
positiv	39 (9 %)	38 (8 %)	36 (8 %)	30 (9 %)
negativ	410 (91 %)	431 (92 %)	415 (92 %)	291 (91 %)
T-Stadium des Primärtumors				
T1	120 (27 %)	121 (26 %)	117 (26 %)	76 (24 %)
T2	154 (34 %)	158 (34 %)	152 (34 %)	119 (37 %)
T3	106 (24 %)	109 (23 %)	104 (23 %)	72 (22 %)
T4	65 (15 %)	76 (16 %)	74 (16 %)	50 (16 %)
unbekannt	4 (1 %)	5 (1 %)	4 (1 %)	4 (1 %)
N Stadium des Primärtumors				
N0	212 (47 %)	214 (46 %)	205 (46 %)	137 (43 %)
N1	69 (15 %)	73 (15 %)	71 (16 %)	48 (15 %)
N2	153 (34 %)	165 (35 %)	160 (35 %)	124 (38 %)
N3	6 (1 %)	7 (2 %)	6 (1 %)	5 (2 %)
unbekannt	9 (2 %)	10 (2 %)	9 (2 %)	7 (2 %)
M Stadium des Primärtumors				
M0	431 (96 %)	451 (96 %)	434 (96 %)	305 (95 %)
M1	16 (4 %)	16 (4 %)	16 (4 %)	14 (4 %)
unbekannt	2 (0,3 %)	2 (0,4%)	1 (0,2 %)	2 (1 %)

Tabelle 2-11. Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Daten der Patientenkohorte. Für manche Patienten war Gewebe von mehr als einer Entität verfügbar z. B. Normalgewebe und Primärtumor. (* Anzahl der Gewebeproben, für die keine klinischen Daten verfügbar waren. SD, Standardabweichung)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Herstellung chemokompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter TOP 10 E. coli wurden 200 ml LB Medium ohne Antibiotika mit 500 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD600 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert und bei 3220 g und 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml sterilem, kaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und erneut bei 3220 g und 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde das Zellpellet in 4 ml sterilem kaltem 100 mM CaCl₂ mit 15 % v/v Glycerol resuspendiert und die Zellen in 120 µl Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Aufarbeitung von Plasmiden

Zur Transformation wurden 50 µl kompetente E. coli TOP 10 auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 100 ng Plasmid, 10 µl Entry- bzw. Zielvektoransatz (3.1.3), 5 µl Ligationsansatz nach Mutagenese (3.1.4), bzw. nach Klonierung in den pLenti-C-mGFP Vektor (3.1.5), 10 µl des Ligationsansatzes nach Klonierung in den pLKO-Tet-On Vektor (3.1.6) oder entsprechende Mengen dH₂O als Kontrolle dazu pipettiert und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend ein Hitzeschock bei 37 °C für 5 Minuten durchgeführt. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis wurde 250 µl 37 °C-warmes S.O.C. Medium dazugegeben und die Bakterien bei 37 °C und 300 rpm für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 100 rpm wachsen gelassen. Die Plasmidextraktion erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid DNA wurden 300 µl des oben beschriebenen 5 ml Ansatzes in 300 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Die anschließende Isolierung des Plasmides erfolgte mit dem GeneJET Plasmid Maxiprep Kit nach Herstellerangaben.

3.1.3 StarGate® Klonierung

Zur Herstellung eines MERTK Überexpressionsplasmids wurden MERTK und GFP („Green fluorescent protein“) als Kontrolle nach Herstellerangabe in den pCSG-IBAw1 Vektor kloniert.

Dafür wurde zunächst die cDNA der Zielgene (GFP und MERTK) durch PCR mit StarCombinase1TM- Erkennungssequenzen ausgestattet.

Der folgende PCR Ansatz (50 µl) wurde zusammen pipettiert (Primer siehe Tabelle 2-7):

- 10 µl 5 x HF Puffer
- 200 µM dNTPs
- 0,5 µM forward Primer
- 0,5 µM reverse Primer
- 5 ng Template DNA (Plasmid DNA)
- 1 U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase
- nukleasefreies dH₂O

Folgende PCR Bedingungen wurden benutzt:

Für GFP:

- 98 °C 3 Minuten Denaturierung
- 23 Zyklen:
 - 98 °C 10 Sekunden Denaturierung
 - 72 °C 20 Sekunden Annealing und DNA Synthese
- 72 °C 7 Minuten finale Extension
- 4 °C ∞

Für MERTK:

- 98 °C 3 Minuten Denaturierung
- 23 Zyklen:
 - 98 °C 10 Sekunden Denaturierung
 - 72 °C 100 Sekunden Annealing und DNA Synthese
- 72 °C 7 Minuten finale Extension
- 4 °C ∞

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kits nach Herstellerangabe aufgereinigt. Der DNA Gehalt wurde im Nanodrop gemessen und die Konzentration mit dH₂O auf 2 nM eingestellt (1,05 ng/μl für GFP; 5,5 ng/μl für MERTK). Für die Generierung des Donor Vektors wurde der folgende Ansatz zusammen pipettiert:

- 10 μl pENTRY-IBA51 Vektor
- 12 μl PCR Produkt
- 1 μl StarSolution M1
- 1 μl StarSolution M2
- 1 μl StarSolution M3

Nach Mischen und Inkubation für 1 Stunde bei 30 °C wurden 10 μl dieses Ansatzes in kompetente Zellen gebracht (3.1.2) und auf LB-Agarplatten mit 50 mg/l Kanamycin gegeben, die zuvor mit je 40 μl X-Gal und IPTG beschichtet wurden. Am nächsten Tag wurden 3 weiße Kolonien gepickt (durch Insertion des gewünschten Gens wird das LacZ Gen ersetzt), diese vermehrt und aufgearbeitet (3.1.2). Anschließend wurde ein XbaI/HindIII Verdau (20 μl) zur Überprüfung der erfolgreichen Insertion durchgeführt.

500 ng Plasmid DNA
0,5 µl XbaI
0,5 µl HindIII
2 µl 10 x FastDigest Puffer
nukleasefreies dH₂O

37 °C, 10 Minuten

Positive Klone wurden sangersequenziert (GATC, Konstanz, Deutschland) und auf 2 ng/µl mit dH₂O verdünnt. Zum Transfer in den pCSG-IBAw1 Vektor wurde folgender Ansatz hergestellt:

10 µl pCSG-IBAw1 Vektor
12 µl pENTRY-IBA51 Vektor mit Zielgen (2 ng/µl)
1 µl StarSolution A1
1 µl StarSolution A2
1 µl StarSolution A3

Nach Mischen und Inkubation für 1 Stunde bei 30 °C wurden 10 µl dieses Ansatzes in kompetente Zellen gebracht (3.1.2) und auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin gegeben, die zuvor mit je 40 µl X-Gal und IPTG beschichtet wurden. Wie oben beschrieben wurden 3 weiße Kolonien gepickt, aufgearbeitet und XbaI/HindIII verdaut. Positive Klone wurden anschließend sangersequenziert und mit Hilfe von ScreenFect® A (3.2.4) in die Zielzellen gebracht.

3.1.4 Herstellung von FGFR3 Mutanten

Mutierte Versionen des *FGFR3* Wildtypgens wurden mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit hergestellt. Dafür wurden PCRs mit mutationsspezifischen Primern (siehe Tabelle 2-7) durchgeführt. Der folgende PCR Ansatz (25 µl) wurde für jede Mutation zusammen pipettiert:

12,5 µl Q5 Hot Start High-Fidelity 2 x Master Mix
0,5 µM forward Primer
0,5 µM reverse Primer
15 ng Template DNA
nukleasefreies dH₂O

Folgende PCR Bedingungen wurden benutzt:

- 98 °C 3 Minuten Denaturierung
- 25 Zyklen:
 - 98 °C 10 Sekunden Denaturierung
 - 65-72 °C 20 Sekunden Annealing (je nach Mutation)
 - 72 °C 128 Sekunden DNA Synthese (25 Sekunden/kb)
- 72 °C 2 Minuten finale Extension
- 4 °C ∞

5 µl des PCR Produkts wurden zur Überprüfung auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde das Plasmid ligiert und das Template entfernt. Hierfür wurde der folgende Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

1 µl PCR Produkt
5 µl 2 x KLD Reaktionspuffer
1 µl 10 x KLD Enzymmix
3 µl nukleasefreies dH₂O

5 µl des Ansatzes wurden anschließend für die bakterielle Transformation verwendet und je drei Kolonien gepickt und aufgearbeitet (3.1.2). Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sangersequenzierung überprüft.

3.1.5 Klonierung in den pLenti-C-mGFP Vektor

Zur Überexpression von AXL, DDR2 und FGFR3 mit den entsprechenden Mutanten wurden diese in den pLenti-C-mGFP Vektor kloniert. Dafür wurden die entsprechenden Gene zunächst mit Hilfe von PCR Reaktionen mit Schnittstellen für

Ascl und NotI versehen (Primer siehe Tabelle 2-7). Der folgende Ansatz (20 µl) wurde pro Vektor viermal zusammen pipettiert:

5 µl 5 x HF Puffer

200 µM dNTPs

0,3 µM forward Primer

0,3 µM reverse Primer

100 ng Template DNA (Plasmid DNA)

0,4 u Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

nukleasefreies dH₂O

Folgende PCR Bedingungen wurden benutzt:

Für AXL:

- 98 °C 3 Minuten Denaturierung
- 25 Zyklen:
 - 98 °C 10 Sekunden Denaturierung
 - 72 °C 35 Sekunden Annealing und DNA Synthese
- 72 °C 7 Minuten finale Extension
- 4 °C ∞

Für DDR2 und FGFR3 Wildtyp und Mutanten:

- 98 °C 3 Minuten Denaturierung
- 25 Zyklen:
 - 98 °C 10 Sekunden Denaturierung
 - 72 °C 30 Sekunden Annealing und DNA Synthese
- 72 °C 7 Minuten finale Extension
- 4 °C ∞

Die PCR Produkte wurden gepoolt und über ein 1 % Agarosegel mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kit aufgereinigt und anschließend mit Ascl und NotI verdaut. Dafür wurde der folgende Ansatz (30 µl) 1 Stunde bei 37 °C inkubiert:

- 500 ng PCR Produkt
- 3 µl 10 x FastDigest Puffer
- 2 µl Ascl
- 2 µl NotI
- nukleasefreies dH₂O

Anschließend wurde erneut über ein 1 % Agarosegel aufgereinigt.

Der pLenti-C-mGFP Vektor wurde ebenfalls mit Ascl und NotI verdaut und dephosphoryliert. Dafür wurde der folgende Ansatz (20 µl) zusammen pipettiert:

- 1 µg Vektor DNA
- 2 µl 10 x FastDigest Puffer
- 1 µl Ascl
- 1 µl NotI
- 1 µl FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase
- nukleasefreies dH₂O

Anschließend wurde der Ansatz 10 Minuten bei 37 °C und anschließend 20 Minuten bei 80 °C inkubiert und über ein 1 % Agarosegel mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kit aufgereinigt.

Abschließend wurde das verdaute PCR-Produkt mit dem verdauten Vektor für 2 Stunden bei Raumtemperatur ligiert (10 µl).

- 1 µl 10 x Ligationspuffer
- 10 ng verdauter Vektor
- 30 ng verdautes PCR Produkt
- 0,5 µl T4 DNA Ligase
- nukleasefreies dH₂O

5 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation verwendet (3.1.2). Die erfolgreiche Insertion wurde durch enzymatischen Verdau sowie anschließende Sangersequenzierung überprüft. Die Vektoren wurden über lentivirale Transduktion (3.2.6) in Zielzellen gebracht.

3.1.6 Klonierung in pLKO-Tet-On Vektor

Short-hairpin RNA (shRNA) Sequenzen gegen AXL, MERTK und GFP mit AgeI und EcoRI Schnittstellen wurden vom RNAi Consortium übernommen wobei die XhoI Schnittstelle durch PstI ersetzt wurde (siehe Tabelle 2-7). Die Oligonucleotide wurden auf 0,1 nmol/µl mit dH₂O eingestellt und anschließend je 11,25 µl der komplementären Sequenzen sowie 2,5 µl 10 x Annealing Puffer gemischt. Diese wurden im Wasserbad von 95 °C auf 30 °C abgekühlt und anschließend die Oligonucleotide 1:400 in 0,5 x Annealing Puffer verdünnt. Der pLKO-Tet-On Vektor wurde mit AgeI und EcoRI verdaut, sodass das 1,8 kb „stuffer“ Fragment freigesetzt wurde, und mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kit aufreignet. Dafür wurde der folgende Ansatz (20 µl) zusammenpipettiert und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert:

- 1 µg Plasmid DNA
- 1 µl AgeI
- 1 µl EcoRI
- 2 µl 10 x FastDigest Puffer
- nukleasefreies dH₂O

Anschließend wurde der folgende Ligationsansatz (10 µl) zusammen pipettiert und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert:

- 1 µl Oligonucleotid Verdünnung oder 0,5 x Annealing Puffer (negativ Kontrolle)
- 20 ng verdauter pLKO-Tet-On Vektor
- 1 µl 10 X Ligasepuffer
- 1µl T4 DNA Ligase
- nukleasefreies dH₂O

Der komplette Ligationsansatz wurde zur Transformation verwendet (3.1.2). Positive Klone wurden über PstI/BamHI Verdau (20 µl) und anschließende Sangersequenzierung identifiziert.

500 ng Plasmid DNA
0,5 µl PstI
0,5 µl BamHI
2 µl 10 x FastDigest Puffer
nukleasefreies dH₂O

37°C, 10 Minuten

Die Vektoren wurden über lentivirale Transduktion (3.2.6) in Zielzellen gebracht.

3.1.7 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT PCR)

Nach dem Ernten der Zellen wurde die RNA nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit isoliert, die Konzentration mit Hilfe des Nanodrops gemessen und anschließend in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde der folgende Ansatz (20 µl) zusammen pipettiert:

4 µl 5 x iScript Reaktionsmix
1 µl iScript Reverse Transkriptase
1 µg RNA
nukleasefreies dH₂O

Anschließend wurde wie folgt inkubiert:

- 25 °C 5 Minuten
- 42 °C 30 Minuten
- 85 °C 5 Minuten
- 4 °C ∞

Die cDNA wurde jeweils in Triplikaten mit dem Power SYBR Green Kit analysiert. Dafür wurde der folgende Ansatz (20 µl) zusammen pipettiert (Primer siehe Tabelle 2-7):

10 µl 2 x Power SYBR® Green PCR Master Mix
0,5 µM forward Primer
0,5 µM reverse Primer
1 µl cDNA
nukleasefreies dH₂O

Folgende PCR Bedingungen wurden benutzt:

- 95 °C 10 Minuten Denaturierung
- 40 Zyklen:
 95 °C 10 Sekunden Denaturierung
 60 °C 30 Sekunden Annealing
 72 °C 30 Sekunden DNA Synthese
- 4 °C ∞

Es wurde der Mittelwert der Triplikate bestimmt und der mRNA Gehalt über die 2^ΔΔCt-Methode bestimmt, wobei β-actin als Referenz benutzt wurde.

3.2 Zellbiologie

3.2.1 Kultivieren von Zellen

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre gehalten. Die Arbeiten mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem vom Lieferanten beschriebenen Medium (2.6) kultiviert. Zellen mit Plasmiden für einen induzierbaren Knockdown wurden dabei in tetrazyklinfreiem FBS gehalten. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin von der Platte gelöst und mit 5 ml Medium aufgenommen.

Je nach Zelltyp wurden 10-25 % der Zellen in eine neue Kulturschale überführt und auf 10 ml mit frischem Medium aufgefüllt.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach Herstellung von gentechnischen veränderten Zellen wurde ein Teil der Zellen kryokonserviert. Dafür wurden die Zellen einer 10 cm Kulturschale nach dem Trypsinisieren abzentrifugiert (5 min, 200 g) und in 1 ml Einfriermedium in ein Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden diese durch Einwickeln in ein Papiertuch in einem Handschuh langsam auf -80 °C abgekühlt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem -80 °C Schrank genommen und schnell mit warmen Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, abzentrifugiert (5 min, 200 g) und in 7 ml frischem Medium in einer T25 Zellkulturflaschen ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

3.2.3 Zählen von Zellen

Zum Zählen der Zellen wurde diese abtrypsinisiert, abzentrifugiert (5 min, 200 g) und je nach Größe des Zellpellets in 0,5-5 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden die vier Großquadrate gezählt und die Anzahl der Zellen dabei nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\Sigma \text{ Zellen/Anzahl der Felder}) * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

3.2.4 Transfektion von Zellen mit ScreenFect® A

Für die Transfektion von HN Zellen mit dem pCSG-IBAw1 Vektor wurden 1×10^5 Zellen in eine 6-Lochplatte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden 1 µg des Vektors mit 120 µl Dilution Buffer gemischt. Weiterhin wurden 120 µl Dilution Buffer mit 5 µl ScreenFect® A gemischt nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur zu dem Vektorgemisch gegeben und gemischt. Nach erneuter Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 1250 µl Medium ohne Antibiotika hinzugegeben und der gesamt Ansatz (ca. 1,5 ml) auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und weitere 24 Stunden später begann die Antibiotikaselektion der transfizierten Zellen und Kontrollzellen ohne Plasmid mit 1 µg/ml Geneticin. Da es sich beim pCSG-IBAw1 Vektor um ein episomales Plasmid handelt wurden die Zellen dauerhaft mit Antibiotika behandelt.

3.2.5 Herstellung von Viruspartikeln

Zur Herstellung von Viruspartikeln wurden 1×10^6 HEK293T Zellen in eine 10 cm Kulturschale ausplattiert. 4 Stunden vor Transfektion wurde das Medium gewechselt und 5 ml frisches Medium hinzugefügt. Für den Transfektionsansatz (1 ml) wurden 6 μg pMD2.G (Hüllplasmid), 15 μg psPAX2 (Verpackerplasmid) und 20 μg Zielvektor mit dH_2O gemischt. Anschließend wurde 122 mM CaCl_2 dazugegeben, gemischt und abschließend 500 μl 2 x HBS Puffer hinzugefügt und gevortext. Der Transfektionsansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend schneckenförmig auf die HEK293T Zellen getropft. Nach circa 16 Stunden wurde das Medium durch 5 ml frisches Medium ersetzt und nach weiteren 24 und 48 Stunden der Virusüberstand gefiltert (0,45 μM) und anschließend direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.2.6 Lentivirale Transduktion

Zur Transduktion wurden 1×10^5 Zellen in eine 6-Lochplatte ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch 1 ml des oben beschriebenen unverdünnten Virusüberstands mit 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybrenen ersetzt. Anschließend wurden die Zellen 2 Stunden bei 750 g bei 25°C zentrifugiert (Spin transfection). Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Je nach Zielvektor wurden erfolgreich transduzierte Zellen über GFP und Durchflusszytometrie für pLenti-C-mGFP Vektoren oder Behandlung mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin für pLKO-Tet-On Vektoren selektioniert. Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zellen ohne zusätzliche Antibiotikagabe weiterkultiviert.

3.2.7 Induktion des Knockdowns mit Doxycyclin

Zur Induktion des AXL und MERTK Knockdowns wurden 5×10^5 oder 1×10^6 Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Am nächsten Tag wurde 0,01-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin hinzugegeben. Nach weiteren 48 oder 72 Stunden wurden die Versuche ohne erneute Doxycyclingabe durchgeführt. Der erfolgreiche Knockdown wurde mit Hilfe von Westernblots überprüft.

3.2.8 MTT Tetrazolium Reduktionsversuch

Das Wachstum von Zellen wurde mit Hilfe von MTT Tetrazolium bestimmt. Das Prinzip des Versuchs beruht darauf, dass lebende Zellen mit aktivem Stoffwechsel MTT in ein violett-farbendes, unlösliches Formazan Produkt umwandeln. Dieses wird

durch Zugabe von Dimethylformamid und SDS gelöst und am nächsten Tag die Absorption bei 595 nm gemessen ²⁶¹. Je nach Zelltyp wurden 1500-5000 Zellen in 100 µl Medium in eine 96-Lochplatte ausplattiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten 500 µg/ml MTT dazugeben. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 100 µl MTT-Solvent hinzugegeben und die Platte bis zum nächsten Tag im Brutschrank gelassen.

Für Inhibitionsversuche wurden 2000-5000 Zellen in 50 µl Medium in eine 96-Lochplatte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden unterschiedliche Mengen Inhibitor in 50 µl Medium hinzugegeben. Nach weiteren 24, 48 und 72 Stunden wurde die MTT Zugabe wie oben beschrieben durchgeführt.

3.2.9 Untersuchung von Migration und Invasion

Migration und Invasion wurden mit Hilfe von PET Zellkultureinsätzen bzw. Matrigel beschichteten Invasionskammern mit 8 µm Porengröße bestimmt. Dafür wurden die Einsätze 2 Stunden mit Medium ohne FBS aktiviert und anschließend 1×10^5 Zellen in 500 µl Medium mit 2 oder 0 % FBS in die obere Kammer ausplattiert. Die untere Kammer wurde mit 750 µl Medium mit 10 % FBS befüllt um die Zellen zur Migration bzw. Invasion anzuregen. Nach 24 oder 48 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die nicht-migrierten/invadierten Zellen mit einem Wattestäbchen entfernt. Anschließend wurden die migrierten Zellen für je 10 Minuten mit 4 % PFA fixiert, mit Hämalaun gefärbt und mit Wasser entfärbt. Die Membranen wurden mit Aquatex auf Objektträger fixiert und 10 repräsentative Gesichtsfelder gezählt.

3.2.10 Soft Agar Assay

Das verankerungsunabhängige Wachstum wurde mit Hilfe von Soft Agar Assays untersucht. Dabei wurde in eine 6-Lochplatte zunächst 2 ml 1 % Agarose (4 %-Agarose mit Medium verdünnt) gegeben und auspolymisiert. Anschließend wurden 2 ml 0,4 % Agarose mit 5000 Zellen darauf gegeben und nach Aushärten dieser Schicht 2 ml Medium, welches wöchentlich gewechselt wurde. Nach 3 Wochen wurden die entstandenen Kolonien mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt.

3.2.11 Adhäsion

Zur Bestimmung der Adhäsion wurden die Zellen in 6-Well Platten, die entweder mit Kollagen I beschichtet oder nur zellkulturbehandelt waren, ausplattiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden nicht adhärierte Zellen abgesaugt, die Platte mit

PBS gewaschen und anschließend die adhärenierten Zellen in 10 repräsentativen Gesichtsfeldern gezählt.

3.2.12 Zellzyklusanalyse (PI Färbung)

Nach dem Ernten wurden die Zellen zunächst zweimal in Sample Puffer gewaschen (5 min, 200 g, 4 °C) und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit gevortext. Anschließend wurde zum Fixieren der Zellen unter Vortexen 1 ml eiskaltes 70 % Ethanol tropfenweise hinzugefügt und danach für mindestens 18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Zum Färben wurden die Zellen erneut gevortext und bei 1810 g und 4 °C 5 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgegossen und das Zellpellt je nach Größe in 250-500 µl PI Färbelösung aufgenommen und vorsichtig gevortext. Abschließend wurden die Proben mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur, dunkel inkubiert und durchflusszytometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software.

3.2.13 Apoptose Analyse (Annexin V/PI Färbung)

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wurden diese inklusive Überstand geerntet und mit Hilfe des Annexin V Apoptose Detektionskit nach Herstellerangaben gefärbt. Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS und anschließend mit 1 x Bindepuffer gewaschen (5 min, 200 g). Das Zellpellet einer 10 cm Zellkulturschale wurde danach in 150 µl 1 x Bindepuffer mit 5 µl Annexin V resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 1 x Bindepuffer gewaschen (5 min, 353 g) und das Zellpellet mit 200 µl 1 x Bindepuffer mit 5 µl PI Färbelösung resuspendiert bevor durchflusszytometrisch gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software.

3.3 Biochemie

3.3.1 Proteinextraktion und -bestimmung

Nach dem Ernten der Zellen durch Abschaben wurde diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Das Pellet wurde je nach Größe in 30-100 µl RIPA Puffer mit Proteaseinhibitorcocktail, Phosphataseinhibitorcocktail II und III und PMSF (je 1:100) resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 13.000 x g und 4 °C für 30 Minuten

zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden zur Konzentrationsbestimmung 1:10 in RIPA Puffer verdünnt und mit BSA in RIPA Puffer eine Standardreihe von 1,2 mg/ml bis 0,075 mg/ml erstellt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben mit 10 µl Proteinlösung und 200 µl „Working Reagent“ in einer 96-Lochplatte bestimmt und die Absorption bei 562 nm gemessen.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer auf PVDF-Membranen

Zum Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden je nach Größe Polyacrylamidgele mit einer Acrylamidkonzentration zwischen 8,5 und 15 % (siehe Tabelle 2-6) angefertigt. Es wurden 50-100 µg Protein in 20-27 µl Gesamtvolumen aufgetragen. Die Proteine wurden zuvor mit ROTI®-LOAD 1 (reduzierend, 4x konzentriert) und RIPA Puffer gemischt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Nach dem Auftragen auf das Gel wurde die SDS-Gelelektrophorese mit 1 x Laufpuffer bei 120-150 Volt für 75-120 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran durch das Nass-Blot-Verfahren in 1 x Transferpuffer transferiert. Dafür wurde auf die Anode ein in Transferpuffer getränkter Schwamm, zwei getränkte Whatmanpapiere und das Gel gelegt. Auf das Gel wurde die PVDF-Membran platziert, die zuvor 1 Minute mit Methanol aktiviert und anschließend 1 Minute in dH₂O und 1 x Transferpuffer inkubiert wurde. Abschließend wurden erneut zwei getränkte Whatmanpapiere und ein Schwamm auf die Membran gelegt. Der Transfer wurde gekühlt bei 100 Volt für 1 Stunde durchgeführt. Der erfolgreiche Transfer wurde mit einer unspezifischen Proteinfärbung mit Hilfe von Ponceau S durchgeführt, das anschließend mit Wasser entfernt wurde.

3.3.3 Immunblotanalyse und Detektion durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran je nach Antikörper für 1 Stunde mit 5 % Milch TBS-T oder 5 % BSA TBS-T geblockt und über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert (Verdünnungen siehe Tabelle 2-9). Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 3 Mal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Sekundärantikörper inkubiert (Verdünnungen siehe Tabelle 2-9). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Immundetektion mit dem Amersham ECL Western Blotting Detection

Reagent durchgeführt. Die Membran wurde für 2 Minuten mit 1,5 ml einer 1:2 Mischung aus Reagenz 1 und 2 inkubiert und die Chemiluminiszenz mit dem Amersham Imager 600 sichtbar gemacht.

3.3.4 Humaner Phospho-Rezeptortyrosinkinase (RTK) Array

Um den Phosphorylierungsstatus von 49 verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen in Tumorzelllinien des Kopf-Hals Bereichs zu ermitteln, wurde ein humaner Phospho-RTK-Array durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Membran auf die Antikörper gegen verschiedene Rezeptortyrosinkinasen und Kontrollantikörper punktweise aufgetragen wurden. Diese Membran wird mit dem Proteinlysate der Zellen inkubiert und der anschließende Nachweis erfolgt mit Hilfe eines Pan-Phosphotyrosin-Antikörpers. Der Versuch wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden 24 Stunden in Medium ohne FBS kultiviert und anschließend die Proteine isoliert. 200 µg Protein wurden in 1,5 ml Array Buffer 1 über Nacht auf die Membran gegeben und am nächsten Tag wurden phosphorylierte Rezeptortyrosinkinasen mit Hilfe des Pan-Phosphotyrosin-Antikörpers sichtbar gemacht.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Immunhistochemische Färbungen

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Ventana Discovery XT automated staining system durchgeführt. Hierfür wurden die Tissue-Microarrays (TMAs) in 4 µm dünn geschnitten, auf Objektträger gebracht und deparaffinisiert. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte mit EDTA Puffer für 24 Minuten (ALK) bzw. 36 Minuten (FGFR3, RET, ROS1) oder Natrium Citrat Puffer für 20 Minuten (AXL, MERTK) bzw. 36 Minuten (DDR2) inkubiert.

Anschließend wurde der Primärantikörper für 40 (ALK, AXL, MERTK) oder 60 (DDR2, FGFR3, MERTK, RET, ROS1) Minuten auf die Schnitte gegeben (Verdünnungen siehe Tabelle 2-9). Für AXL erfolgte vor der Sekundärfärbung die Inkubation mit einem Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) Antikörper für 32 Minuten. Sekundärfärbungen wurden entweder mit dem DAB Map Detection Kit (DDR2) oder Ultra Map Detection kit (ALK, AXL, FGFR3, MERTK, RET, ROS1) durchgeführt und die anschließende Farbreaktion mit dem UltraView Universal DAB Detection kit. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hematoxylin II and Bluing Reagent

bevor die Schnitte mit Cytoseal 60 eindeckelt wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe des Panoramic Desk Scanners digitalisiert und mit der Definiens Tissue Studio 2.1 image analysis software ausgewertet, deren Ausgabeformat kontinuierliche Werte einer willkürlichen Einheit sind, wobei die Werte höher sind je stärker die Färbung ist.

3.5 Bioinformatik

3.5.1 Bestimmung der Mutationsfrequenz von Rezeptortyrosinkinasen

Die Mutationsfrequenz aller Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs wurde mit Hilfe von cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) bestimmt^{262,263}. Auch weitere Mutationen konnten so in ausgewählten Patienten ermittelt werden. Die Effekte der Mutationen im *FGFR3* Gen auf die Proteinfunktion wurden mit dem auf cBioPortal verfügbaren „Mutation Assessor“ bestimmt. Es wurden nur TCGA ausgewertet, die bis Dezember 2013 verfügbar waren.

3.6 Statistik

3.6.1 Statistische Auswertung

Unterschiede in kontinuierlichen Variablen zwischen Gruppen wurden mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests für normalverteilte Daten und mit dem Mann-Whitney U Test für nicht normalverteilte Daten auf Signifikanz untersucht. Verbundene, nicht normalverteilte Proben wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert. Vergleiche von mehr als zwei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Das Überleben wurde mit Hilfe des Kaplan-Meier Schätzers dargestellt und mit dem Log-rank Test auf Unterschiede getestet. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der „R Software“, IBM SPSS Statistics 22 oder „Microsoft® Excel® for Mac 2011“ durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung von potentiell wichtigen Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

4.1.1 Mutationsfrequenz von Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Um aus den bekannten 58 Rezeptortyrosinkinasen diejenigen zu identifizieren, die Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine Rolle spielen, wurde zunächst die Mutationsfrequenz aller Rezeptortyrosinkinasen in dieser Tumorentität bestimmt. Dafür wurden die Daten von 306 Patienten des „Cancer Genome Atlas“ (TCGA) verwendet. Es wurden nicht-synonyme „missense“-Mutationen, bei denen ein Aminosäureaustausch stattfindet, sowie „nonsenes“-Mutationen, bei der ein vorzeitiges Stopcodon auftritt, berücksichtigt. Weiterhin wurden auch Deletionen und Insertionen von maximal sechs Nucleotiden gefunden. Für alle Rezeptortyrosinkinasen, die in mehr als 2 % der Fälle mutiert waren, wurde anschließend eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt um zu ermitteln, welche dieser potentiellen Kandidatengene noch nicht umfassend in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs erforscht wurden. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Auf dieser Basis wurden Rezeptortyrosinkinasen ausgewählt um mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen (IHC) zu ermitteln, ob diese in Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs exprimiert werden, da nur Gene, die auch in Proteine transkribiert und translatiert werden eine Bedeutung für die Tumorgenese haben. Dabei wurden vor allem Rezeptortyrosinkinasen näher untersucht, gegen die bereits niedermolekulare Inhibitoren in verschiedenen Entwicklungsphasen von präklinisch bis bereits zugelassen verfügbar sind. Letztendlich wurden folgende sieben Rezeptortyrosinkinasen weiter analysiert: ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase (ROS1), Ret proto-oncogene (RET), Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (ALK), AXL receptor tyrosine kinase (AXL), MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK), Discoidin domain receptor tyrosine kinase 2 (DDR2) und Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3).

Tabelle 4-1. Mutationsfrequenz von Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Rezeptor-tyrosinkinase	Anzahl der Mutationen	Frequenz der Mutationen in %
ROS1	17	5,6
ERBB4	15	4,9
EPHA2	15	4,9
EGFR	13	4,3
EPHA3	13	4,3
EPHA5	12	3,9
VEGFR1/FLT1	10	3,3
EPHA6	10	3,3
EPHA7	10	3,3
EPHB1	9	2,9
ERBB2	8	2,6
ERBB3	8	2,6
EPHA4	8	2,6
RET	8	2,6
ALK	8	2,6
TRKC/NTRK3	7	2,3
INSRR	6	2,0
PDGFRA	6	2,0
VEGFR3/FLT4	6	2,0
FGFR3	6	2,0
MERTK	6	2,0
DDR2	6	2,0
MUSK	6	2,0
AXL	6	2,0

Tabelle 4-1. Gezeigt ist die Mutationsfrequenz aller Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs (n=306), die in mehr als 2 % aller Fälle mutiert sind. Grau hinterlegt sind Rezeptortyrosinkinasen, deren Rolle in dieser Tumorentität noch nicht umfassend bekannt ist.

4.1.2 Proteinexpression von Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Um zu ermitteln, ob ROS1, RET, ALK, FGFR3, MERTK, DDR2 und AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs exprimiert werden, wurden immunhistochemische Färbungen der sieben Rezeptortyrosinkinasen an 336 Primärtumoren sowie 25 normalen Geweben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Einteilen der Fälle in positiv und negativ (Abb. 4-1). FGFR3 und DDR3 wurden in einem viertel bzw. einem fünftel der Primärtumore exprimiert jedoch nur in 8 % der normalen Gewebe. MERTK Expression wurde bei einem drittel der Primärtumore und 16 % der normalen Gewebe gefunden und AXL bei mehr als 50 % der Patienten, wobei auch das Normalgewebe in einem viertel der Fälle eine positive Färbung zeigte. Für

ROS1, ALK und RET konnte weder im Normalgewebe noch im Tumor eine positive Färbung nachgewiesen werden (Tabelle 4-2).

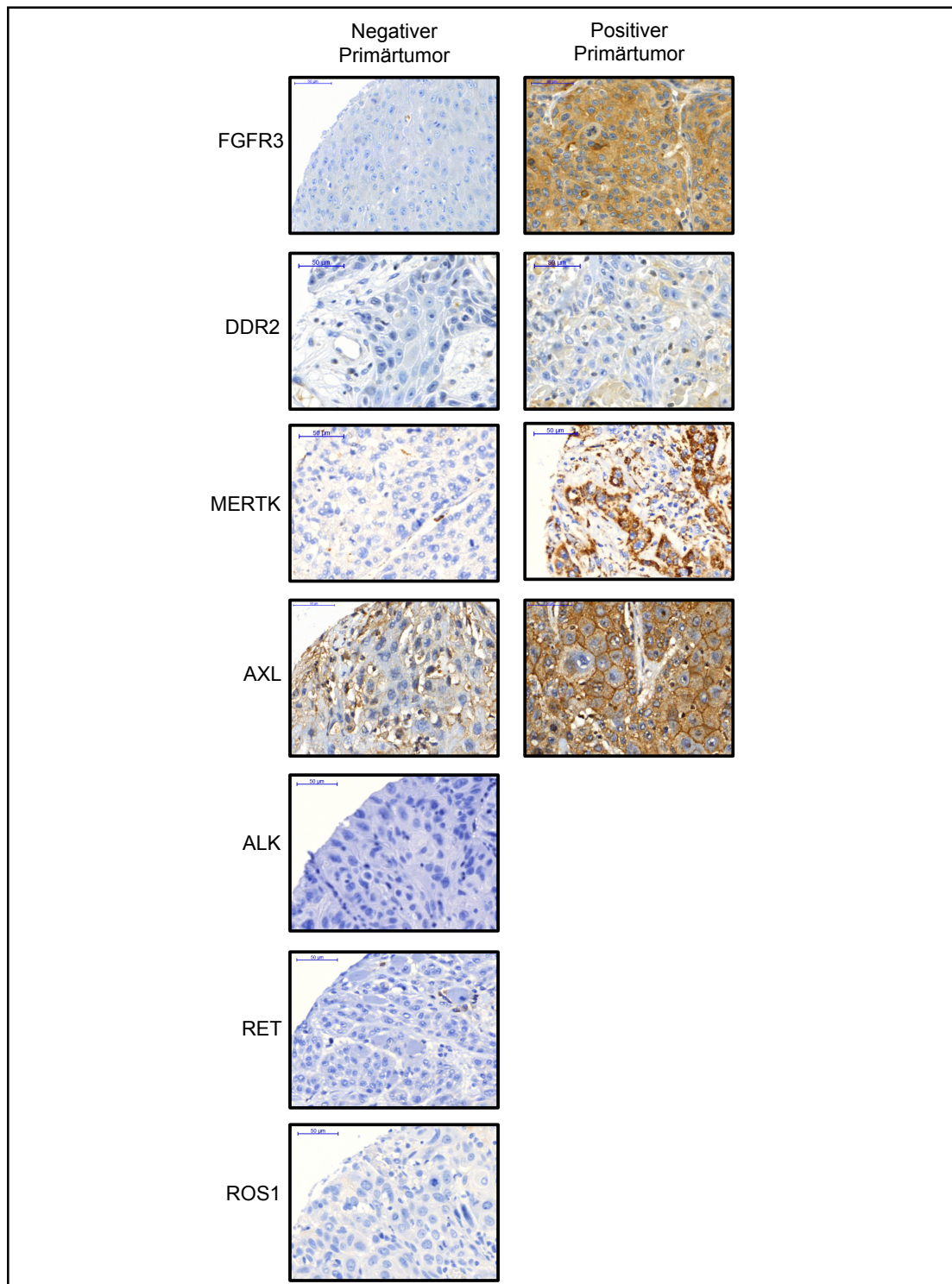


Abbildung 4-1. Expression verschiedener Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

Gezeigt ist je ein Beispiel für einen negativen und einen positiven Primärtumor für die immunhistochemische Färbung der untersuchten Rezeptortyrosinkinasen. Für ALK, RET und ROS1 konnten keine positiven Fälle gefunden werden.

(Größenbalken 50 µM)

Tabelle 4-2. Expression von ausgewählten Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Rezeptortyrosinkinase	Positive IHC in %	
	Primärtumor (n=336)	Normalgewebe (n=25)
FGFR3	24 %	8 %
DDR2	20 %	8 %
MERTK	30 %	16 %
AXL	54 %	28 %
ALK	/	/
RET	/	/
ROS1	/	/

Rezeptortyrosinkinasen werden nach ihrer Aktivierung phosphoryliert und sind nur dann aktiv ⁹⁶. Aus diesem Grund sollte auch die Expression von phosphorylierten Rezeptortyrosinkinasen bestimmt werden. Dies wurde an verschiedenen Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs mit Hilfe eines humanen Phospho-Rezeptortyrosinkinase Arrays durchgeführt (Abb. 4-2). Alle untersuchten Zelllinien exprimierten pEGFR und drei von sieben Zelllinien zeigten eine Expression für weitere Mitglieder dieser Familie (pHER2 und 3). Von den zuvor in Patienten gefundenen Rezeptortyrosinkinasen wurde pAXL in 584A2 Zellen identifiziert und pMERTK in CAL 27 und Detroit 562 Zellen. Außerdem exprimierten CAL 27 und SCC-25 Zellen pALK, welches jedoch zuvor nicht an Patientenmaterial gefunden wurde (Tabelle 4-3).

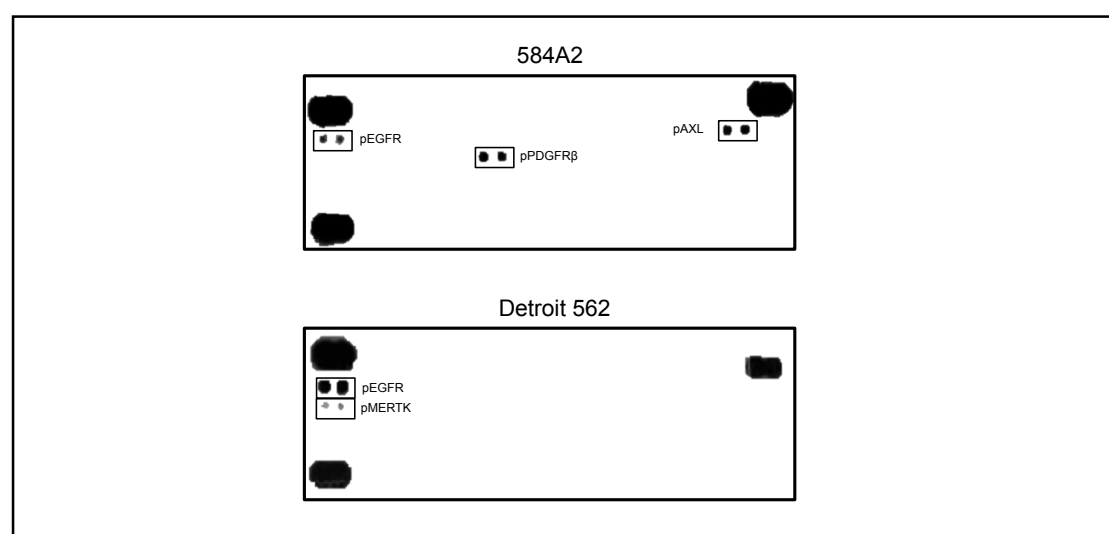


Abbildung 4-2. Phospho-RTK Array für 584A2 und Detroit 562 Zellen.

Der Phosphorylierungsstatus verschiedener RTKs wurde an Zelllinien untersucht. Gezeigt sind 584A2 und Detroit 562 Zellen als Beispiele. Deutlich gefärbte Punkte oben und unten links sowie oben rechts dienen als Kontrolle für die erfolgreiche Versuchsdurchführung.

Tabelle 4-3. Expression von phosphorylierten Rezeptortyrosinkinasen in verschiedenen Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Zelllinie	Phosphorylierte Rezeptortyrosinkinasen
584A2	pEGFR, pPDGFR β , pAXL
CAL 27	pEGFR, pALK, pMERTK
Detroit 562	pEGFR, pMERTK
FaDu	pEGFR, pHER3
HN	pEGFR, pALK, pRYK, pHGFR
JHU-011	pEGFR, pHER3
SCC-25	pEGFR, pHER3, pHER2, pALK

Auf Grund dieser an Patientenmaterial und Zelllinien gewonnen Daten, wurden FGFR3, DDR2, MERTK und AXL für weitere *in-vitro* Analysen ausgewählt.

Im nächsten Schritt wurde zunächst die Proteinexpression der vier Rezeptortyrosinkinasen in acht verschiedenen Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs bestimmt. Während DDR2 und FGFR3 in keiner der untersuchten Zelllinien nachweisbar war, konnte MERTK in drei von acht und AXL in sieben von acht Zelllinien nachgewiesen werden. Für MERTK zeigten CAL 27, SCC-25 und Detroit 562 Zellen ein positives Signal, wobei in letzteren die höchste Expression vorlag, wohingegen für AXL in HN Zellen die höchste Expression gefunden wurde und JHU 011 Zellen komplett und SCC-25 Zellen fast negativ waren (Abb. 4-3).

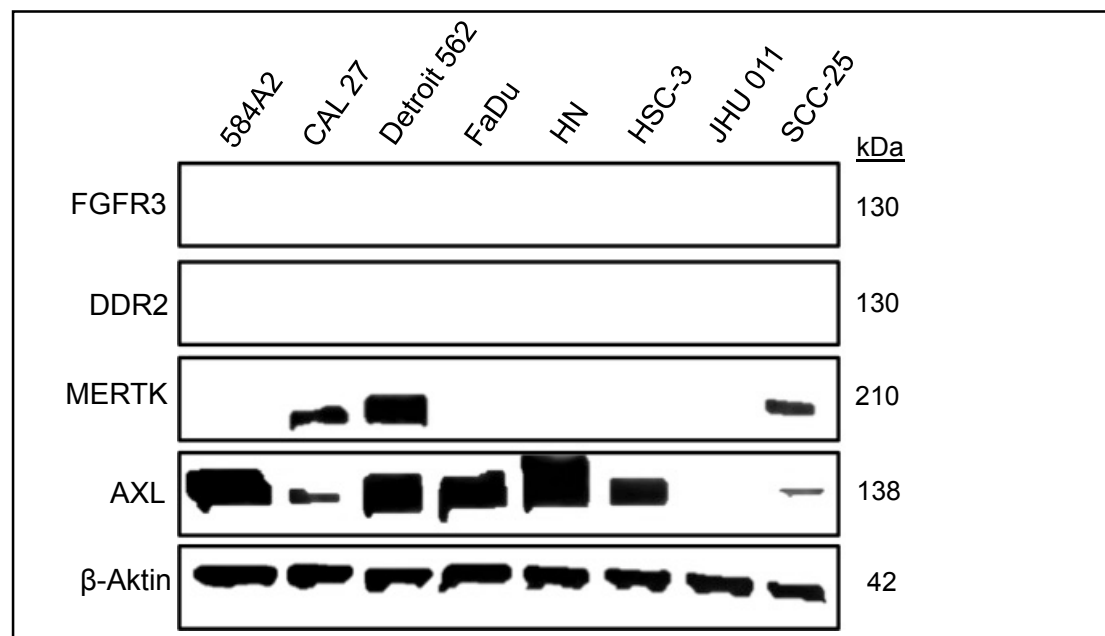


Abbildung 4-3. Expression von FGFR3, DDR2, MERTK und AXL in Zelllinien von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

Im Folgenden wurden die vier ausgewählten Rezeptortyrosinkinasen FGFR3, DDR2, MERTK und AXL auf ihre Bedeutung in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs hin untersucht.

4.2 Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3)

4.2.1 Immunhistochemische Analyse

Da die oben beschriebenen IHC, nur zur Auswahl von Rezeptortyrosinkinasen diente, wurden zunächst in weiteren Primärtumoren und Normalgewebe, aber auch Lymphknotenmetastasen sowie Rezidiven von Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs die Expression von FGFR3 untersucht (Patientenkollektiv siehe Tabelle 2-11). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Definiens Tissue Studio 2.1 Software.

Es zeigte sich, dass die stärkste Färbung für FGFR3 in der normalen Mukosa gefunden wurde und signifikant niedriger in malignen Tumoren war (Abb. 4-4A). Dies konnte durch Analyse von Tumor- und Normalgewebe aus den selben Patienten bestätigt werden (Abb. 4-4B). Auch in der weiteren Tumorprogression von Primärtumor über Lymphknotenmetastasen bis hin zum Rezidiv nahm die FGFR3 Expression ab (Abb. 4-4A). Dennoch gab es 7,5 % der Patienten die eine FGFR3 Proteinexpression im Primärtumor, die höher als der 1,5-fache Interquartilsabstand war, hatten (Abb. 4-4A).

Weiterhin wurden verschiedene klinische Parameter untersucht. Dabei zeigte sich, dass FGFR3 in HPV-positiven Patienten signifikant höher exprimiert wurde (Abb. 4-4C), jedoch 90 % der Tumore mit FGFR3 Expression über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand HPV-negativ waren. Keine Korrelationen waren mit Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Tabak und Alkohol Konsum oder dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen feststellbar. Außerdem konnte kein Unterschied im Überleben von Patienten mit hoher oder niedriger FGFR3 Expression festgestellt werden (Abb. 4-4D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass obwohl die Expression von FGFR3 in der Tumorgenese abnimmt, es dennoch in 7,5 % der Patienten eine deutlich erhöhte FGFR3 Expression im Tumor gibt.

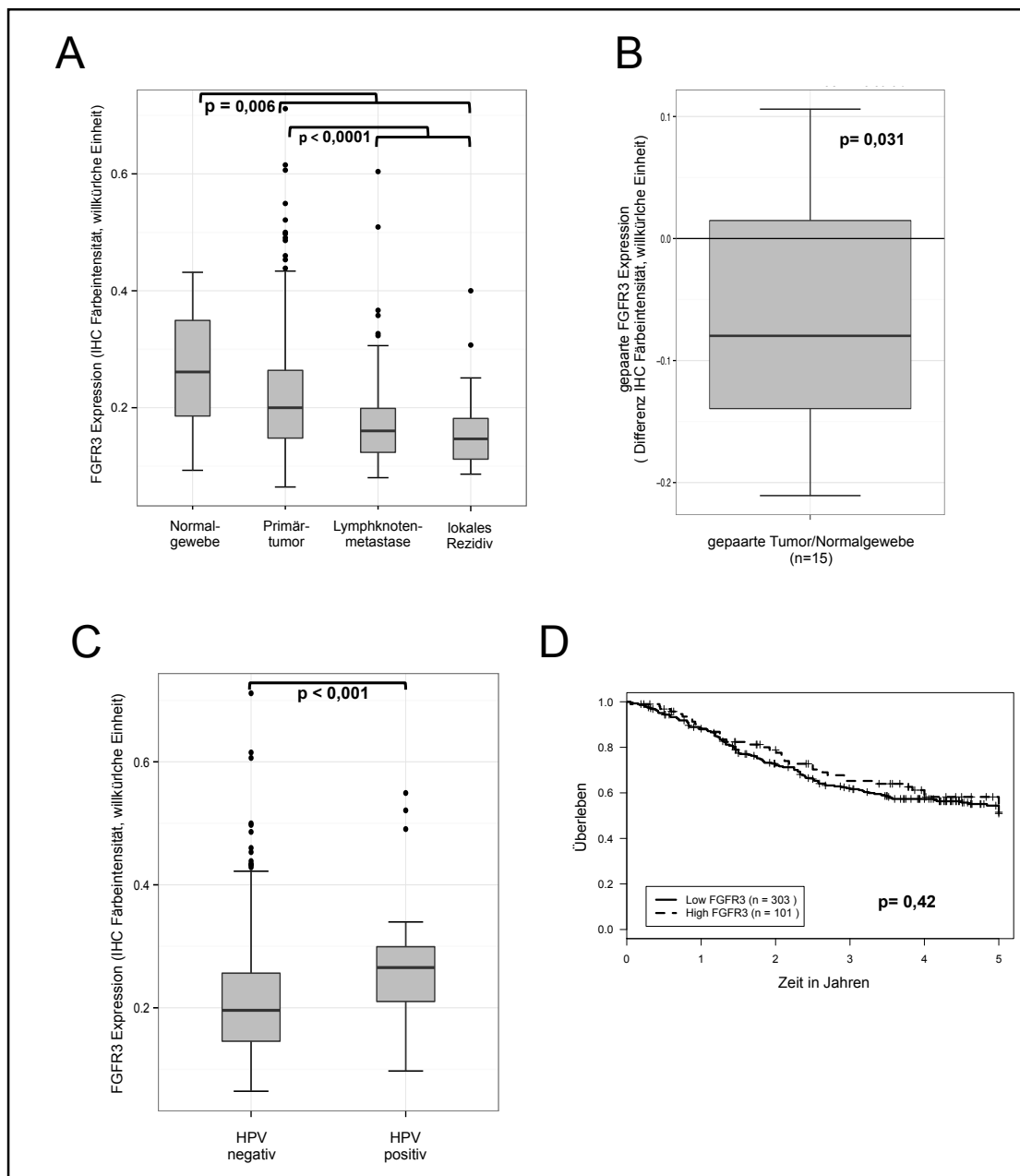


Abbildung 4-4. FGFR3 Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) FGFR3 Expression während der Tumorprogression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs. (B) Korrelation der FGFR3 Expression von gepaarten Normalgewebe-/Primärtumor-Proben. (C) Korrelation von FGFR3 Expression mit HPV-Status. (D) Überleben der Patienten nach FGFR3 Expression. Es wurden die 25 % der Patienten mit der höchsten FGFR3 Expression mit den verbleibenden 75 % verglichen.

4.3 Funktion von Wildtyp-FGFR3 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Aufgrund der vorangegangenen IHC Untersuchungen, wurde im Folgenden die Rolle von FGFR3 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs untersucht.

Da es drei unterschiedliche Isoformen von FGFR3 gibt, wurde zunächst mit Hilfe von quantitativer Echtzeit-PCR die Expression der Isoformen mit Hilfe von spezifischen Primern in Zelllinien von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs bestimmt. Obwohl auf Proteinebene keine Expression nachweisbar war (Abb. 4-2), zeigte sich, dass Isoform 3 (IIIb) in allen untersuchten Zelllinien am Meisten exprimiert wurde, wohingegen Isoform 1 (IIIc) und 2 schwächer exprimiert oder gar nicht nachweisbar waren (Abb. 4-5). Dies stimmt mit Studien überein, die zeigen konnte, dass FGFR3 IIIb vor allem in Epithelzellen exprimiert wird ¹⁴⁵.

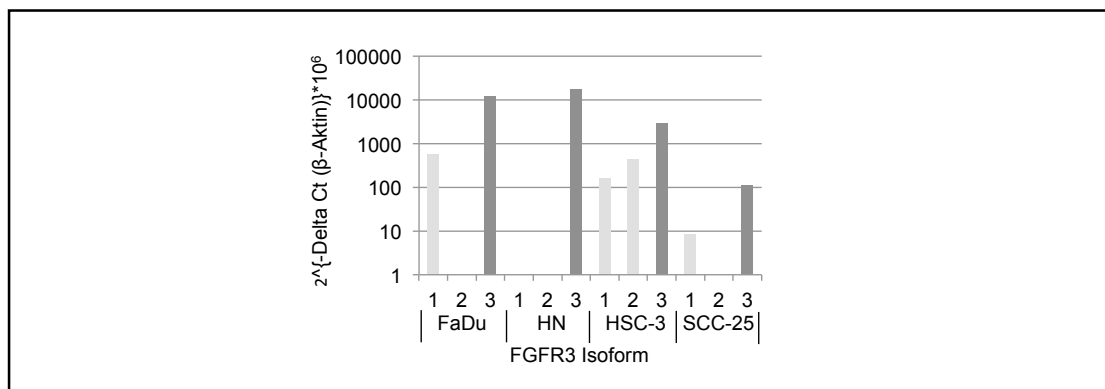


Abbildung 4-5. Expression von FGFR3 Isoformen in Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

Quantitative Echt-Zeit PCR wurde mit Isoform-spezifischen Primern durchgeführt und anschließend die Ct-Werte auf β -Aktin normalisiert. Manche Isoformen konnten in einigen Zelllinien nicht detektiert werden.

FGF3 IIIb wurde anschließend in den pLenti-C-mGFP Vektor kloniert und stabil in HSC-3 und HN Zellen überexprimiert, wobei positive Zellen durch regelmäßiges Sortieren der GFP-positiven Zellen selektioniert wurden. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (nur GFP) transduziert.

Die Überexpression wurde mit Hilfe von Westernblots überprüft und es konnte gezeigt werden, dass drei verschieden große Proteine detektiert wurden, bei denen es sich vermutlich um unterschiedliche Glycosilierungsformen handelt (Abb. 4-6A). Im ersten Schritt wurde die Proliferation untersucht, wobei sowohl für HSC-3 als auch HN Zellen die Proliferation von FGFR3 Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen signifikant höher war (Abb. 4-6B und C). Im Gegensatz dazu war die Migration von HSC-3 FGFR3 Überexpressionszellen nicht verändert (Abb. 4-6D). Um diese Daten zu untermauern, wurde die Expression von Proteinen, die eine Rolle bei der Proliferation und Migration spielen, mit Hilfe von Westernblot Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass HSC-3 Zellen, die FGFR3 überexprimieren mehr

phosphoryliertes ERK haben als GFP Kontrollzellen, die Phosphorylierung von AKT und FAK jedoch unverändert waren (Abb. 4-6E).

FGFR3 scheint demnach in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs die Proliferation positiv zu fördern, jedoch nicht die Migration.

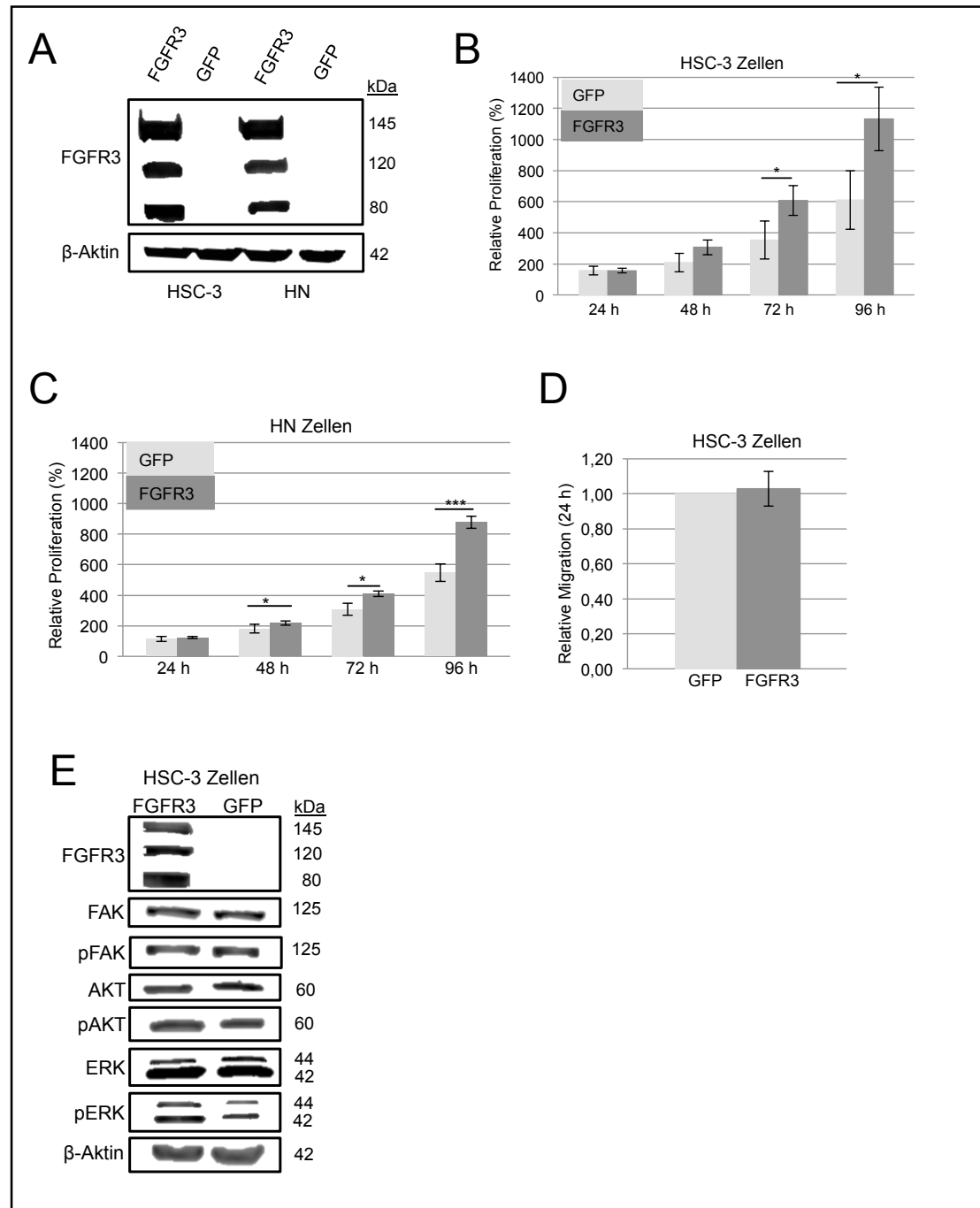


Abbildung 4-6. Funktion von FGFR3 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) FGFR3 Überexpression in HSC-3 und HN Zellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. (B, C) Relative Proliferation von FGFR3 Überexpressionszellen und GFP Kontrollzellen. (D) Relative Migration von FGFR3 Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. (E) Expression verschiedener Signalmoleküle in FGFR3 Überexpressionszellen.

* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

4.3.1 Funktion von FGFR3 Mutanten in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Mithilfe des Cancer Genome Atlas (TCGA) wurden verschiedene Mutationen in Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs identifiziert. Da bereits bekannt ist, dass *FGFR 2* und *3* Mutationen im Lungenkarzinom von Bedeutung sind¹⁵² und diese ähnliche Risikofaktoren haben wie Tumore des Kopf-Hals Bereichs, sollte in dieser Arbeit die Rolle von *FGFR3* Mutationen in dieser Tumorentität untersucht werden. Insgesamt wurden sechs verschiedene „missense“-Mutationen in 306 Patienten gefunden und deren Auswirkung auf die Proteinstruktur mit Hilfe des bei cBioPortal verfügbaren „Mutation Assessor“ untersucht. Hierbei handelt es sich um eine Datenbank und „Scoring“-System zur Vorhersage der funktionellen Bedeutung von Mutationen. Die funktionelle Bedeutung wird dabei in neutral, niedrig, mittel oder hoch eingeteilt. Die identifizierten *FGFR3* Veränderungen wurden bei vier von sechs Mutationen als mittel und bei den restlichen beiden als neutral eingestuft (Tabelle 4-4). Alle Patienten mit *FGFR3* Mutationen zeigten mindestens eine weitere Veränderung in potentiellen „Driver“-Genen für Tumore des Kopf-Hals Bereichs^{29,30} (Abb. 4-7A). Außerdem betrafen die Mutationen verschiedene Regionen des *FGFR3* Proteins (Abb. 4-7B). Die einzige bereits bekannte Mutation war ein Aminosäureaustausch von Serin zu Cystein an Position 249 (p.S249C, Mutation C), die unter anderem im Blasen-, Zervix- und Lungenkarzinom gefunden wurde^{151,152}. Bis auf diese Mutation wurden alle Mutationen in HPV-negativen Patienten gefunden, sodass diese schwerpunktmäßig untersucht wurden.

Tabelle 4-4. FGFR3 IIIb Mutationen in Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Mutation	Basenaustausch (FGFR3 IIIb)	Aminosäureaustausch (FGFR3 IIIb)	Mutation Assessor
A	c.148G>A	p.V50I	neutral
B	c.392C>T	p.S131L	mittel
C	c.746C>G	p.S249C	mittel
D	c.1885G>A	p.E629K	neutral
E	c.2290G>C	p.D764H	mittel
F	c.2362G>A	p.D788N	mittel

Anschließend wurden alle identifizierten Mutationen in die Wildtyp FGFR3 IIIb cDNA eingefügt, in den pLenti-C-mGFP Vektor kloniert und die Sequenz überprüft. Um die funktionellen Konsequenzen dieser Mutationen zu untersuchen, wurden diese in HSC-3 Zellen überexprimiert. Dabei zeigte sich, dass Mutation E (p.D764H) nicht mehr von einem Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne erkannt werden konnte, was auf strukturelle Veränderungen in dieser Region hinweist. Mit Hilfe eines gegen die Aminosäuren 25-124 gerichteten Antikörpers, konnte jedoch gezeigt werden, dass die Überexpression von allen sechs FGFR3 IIIb Mutanten, sowie dem Wildtyp-Protein gleichmäßig war (Abb. 4-7C).

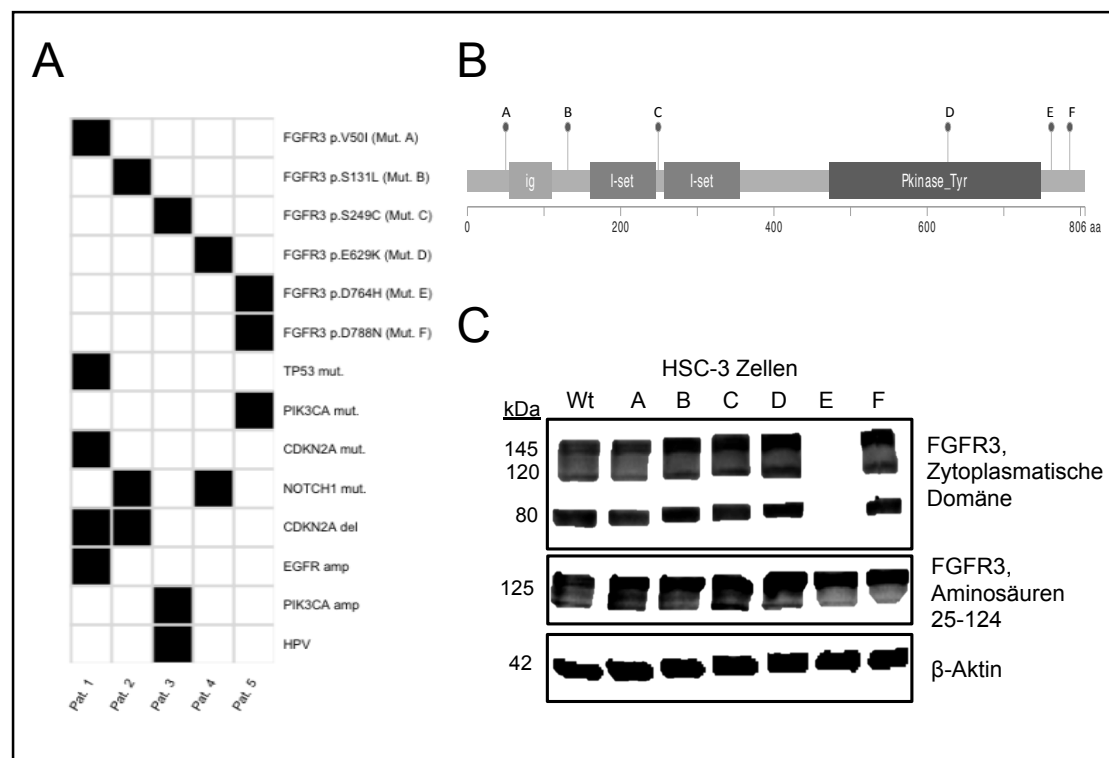


Abbildung 4-7. FGFR3 Mutationen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) Mutationsprofil von Patienten mit FGFR3 Mutationen. (B) Lokalisationen der gefundenen Mutationen im FGFR3 Protein. (C) Nachweis der Überexpression von Wildtyp-FGFR3 und der identifizierten Mutationen in HSC-3 Zellen mit gegen verschiedene Teile des Proteins gerichteten Antikörpern.

(Wt, Wildtyp)

Die Proliferation der HSC-3 Zellen, war für FGFR3 Mutanten nach 72 Stunden in Medium mit 10 % FBS entweder gleichbleibend (Mutation A und C) oder geringer (Mutation B, D, E und F). Hingegen wurde in Medium mit nur 2 % FBS, welches eher der Tumormikroumgebung mit weniger Nährstoffen ähnelt, beobachtet, dass die Zellen mit mutierten FGFR3 Varianten besser proliferierten, als solche mit Wildtyp-FGFR3. Dabei zeigte Mutation C das größte Wachstum (Abb. 4-8A). Um zu

ermitteln, ob Zellen mit mutiertem FGFR3 allgemein unter Stressbedingungen besser wachsen, wurde das Wachstumsverhalten nach Adhäsion der Zellen für 72 Stunden unter Hypoxie untersucht. Hierbei zeigte sich erneut, dass HSC-3 Zellen, die FGFR3 Mutanten überexprimieren unter normoxischen Bedingungen schlechter als Zellen mit dem Wildtyp-Protein proliferierten. Unter Hypoxie Bedingungen ist der gleiche Effekt zu sehen (Abb. 4-8B). Demnach scheint der Wachstumsvorteil von FGFR3 Mutanten vermutlich durch die verringerte Konzentration an Nährstoffen, als durch unspezifischen Stress hervorgerufen zu sein.

Insgesamt scheinen Zellen mit mutiertem FGFR3 Tumoren unter Bedingungen mit weniger Nährstoffen einen Wachstumsvorteil zu bieten.

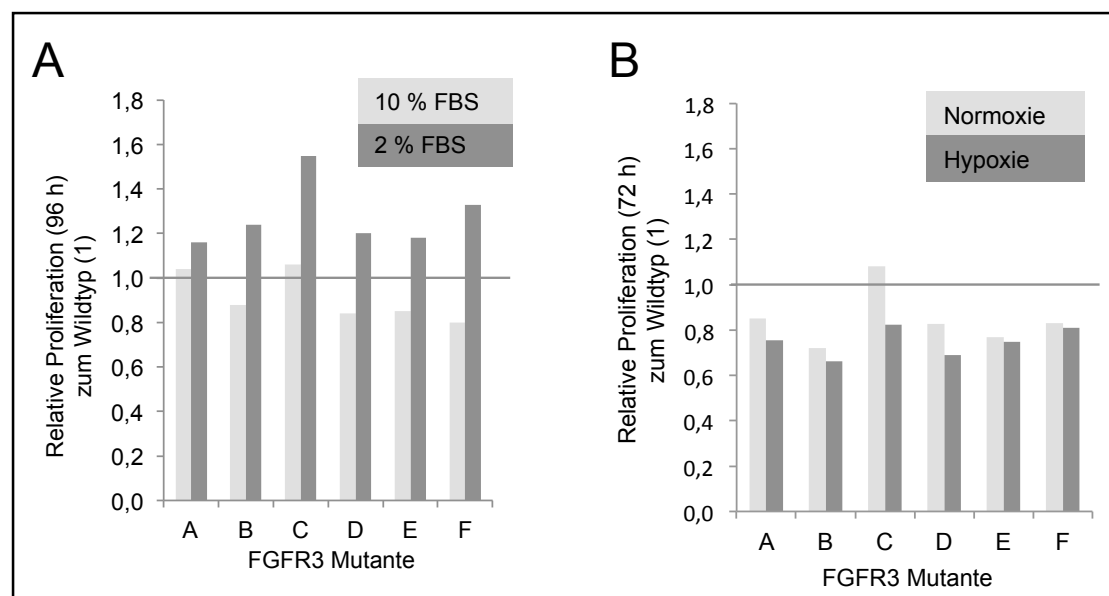


Abbildung 4-8. Proliferation von FGFR3-Mutanten Überexpressionszellen.
 (A) Relative Proliferation von HSC-3 Zellen mit FGFR3 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (1) in Medium mit 10 und 2 % FBS. (B) Relative Proliferation von HSC-3 Zellen mit FGFR3 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (1) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.

4.3.2 Effekt von BGJ398 auf FGFR3 Überexpressionszellen

Um den therapeutischen Nutzen von FGFR3 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs zu ermitteln, wurden HSC-3 Zellen, die Wildtyp-FGFR3 überexprimieren sowie Kontrollzellen mit BGJ398, einem selektiven, oral verfügbaren niedermolekularen Inhibitor gegen FGFR1-3 (IC_{50} 0,0009-0,0014 μ M), behandelt¹⁶⁸. Für geringe Konzentrationen (0,5 und 1 μ M) zeigte sich, dass nach 72 Stunden HSC-3 FGFR3 Zellen signifikant in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Bei höheren Konzentrationen hingegen, war kein Unterschied mehr erkennbar (Abb. 4-9A). Dies könnte durch

unspezifische Effekte des Inhibitors oder durch Inhibition von FGFR1 und/oder FGFR2 sein. Bei der Analyse der Expression beider Proteine wurde festgestellt, dass HSC-3 Zellen zwar kein FGFR1 jedoch geringe Mengen an FGFR2 exprimieren (Abb. 4-9B).

Als nächstes wurde untersucht, ob auch die Migration mit BGJ398 unterdrückt werden kann. Dabei wurden die Zellen mit 0,5 μ M BGJ398 für 24 Stunden vorbehandelt, einer Konzentrationen bei der ein geringer, aber kein zu großer Effekt auf die Proliferation der FGFR3 Überexpressionszellen zu beobachten war (Abb. 4-9A). Im Gegensatz zur Proliferation war die Migration nach Behandlung der FGFR3 Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen unverändert (Abb. 4-9C).

Da bekannt ist, dass Rezeptortyrosinkinase-Mutationen die Sensitivität gegenüber niedermolekularen Inhibitoren beeinflussen, wurde untersucht inwieweit sich FGFR3 Mutationen auf die BGJ398-Sensitivität auswirken. Dabei wurden nur die Mutationen ausgewählt, die einen Effekt auf die Proteinstruktur haben (Mutation B, C, E, F), wobei Mutation C nicht weiter analysiert wurde, da schon bekannt ist, dass diese FGFR3 p.S249C Mutation sensitiver gegenüber dem oben genannten Inhibitor ist¹⁵² und nur in HPV-positiven Patienten auftrat. Es konnte gezeigt werden, dass nach 72 Stunden HSC-3 Zellen mit den Mutationen E und F genauso sensitiv gegenüber BGJ398 waren wie Wildtyp-FGFR3 wohingegen HSC-3 Zellen mit Mutation B bei allen Konzentrationen resistenter waren und nach 72 Stunden noch mehr lebende Zellen vorhanden waren (Abb. 4-9D). Diese Resistenz konnte jedoch bei Durchführung des Versuchs in Medium mit 2 % FBS aufgehoben werden. Für Mutation E und F wurden in 2 % FBS keine Veränderungen in der Sensitivität gegenüber dem Wildtyp-Protein festgestellt (Abb. 4-9E).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass die FGFR3-vermittelte Proliferation sowohl in Zellen mit der Wildtyp-Form als auch mit den untersuchten mutierten Versionen durch BGJ398 gehemmt werden kann.

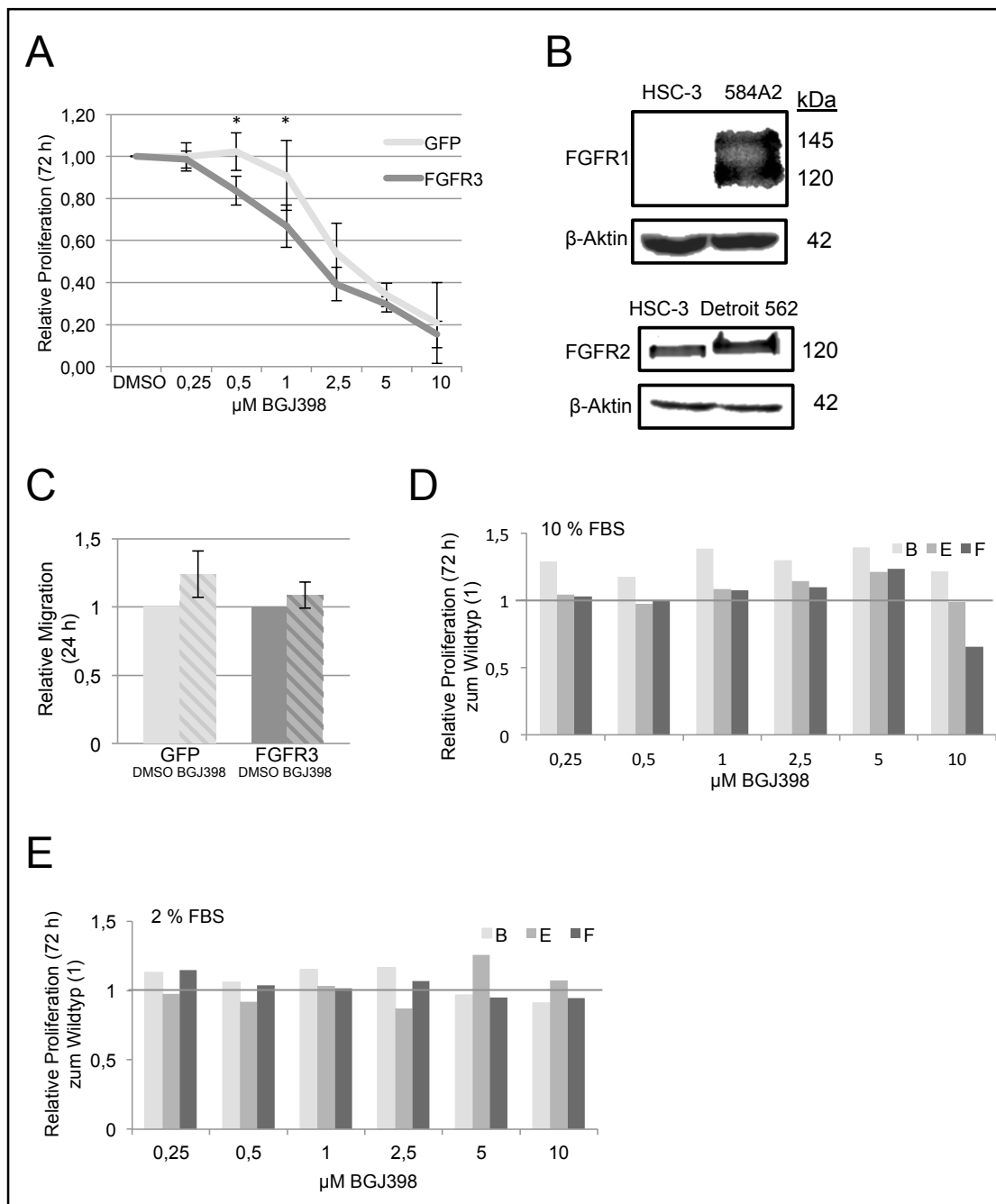


Abbildung 4-9. BGJ398 Behandlung von FGFR3 Überexpressionszellen.

(A) Relative Proliferation von HSC-3 FGFR3 Überexpressions- und GFP Kontrollzellen nach Behandlung mit BGJ398. (B) FGFR1 und 2 Expression in HSC-3 Zellen mit 584A2 und Detroit 562 Zellen als positiv Kontrollen. (C) Relative Migration von HSC-3 FGFR3 Überexpressions- und Kontrollzellen nach Vorbehandlung mit 0,5 µM BGJ398. (D) Relative Proliferation von HSC-3 Zellen mit FGFR3 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (1) nach Behandlung mit BGJ398 in Medium mit 10 % FBS. (E) Relative Proliferation von HSC-3 Zellen mit FGFR3 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (1) nach Behandlung mit BGJ398 in Medium mit 2 % FBS.

* $p < 0,05$

4.4 Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2)

4.4.1 Immunhistochemische Analyse

Wie auch für FGFR3 wurde zunächst auch für DDR2 eine genauere Analyse der IHC mit Hilfe der Definiens Tissue Studio 2.1 Software durchgeführt (Patientenkollektiv siehe Tabelle 2-11). Die DDR2 Expression stieg im Primärtumor im Vergleich zur normalen Mukosa signifikant an. Außerdem konnte eine signifikant höhere DDR2 Expression im Rezidiv im Vergleich zum Primärtumor festgestellt werden. Die DDR2 Expression in Lymphknotenmetastasen hingegen war der des Primärtumors ähnlich (Abb. 4-10A). Für gepaarte Proben war der Anstieg der DDR2 Expression von Primärtumor zum Rezidiv signifikant und auch hier zeigte sich die gleiche Expression von DDR2 in Lymphknotenmetastasen und Primärtumor (Abb. 4-10B). Die DDR2 Expression korrelierte weder mit Differenzierungsgrad, Alkohol Konsum, HPV-Status oder dem Vorhandensein von Lymphnotenmetastasen. Eine niedrigere DDR2 Expression wurden bei hohem T-Stadium (T4) sowie bei Rauchern gefunden. DDR2 war in dieser Studie kein prognostischer Marker für besseres oder schlechteres Überleben (Abb. 4-10C). Die IHC wurde freundlicherweise von Christine Sanders ausgewertet.

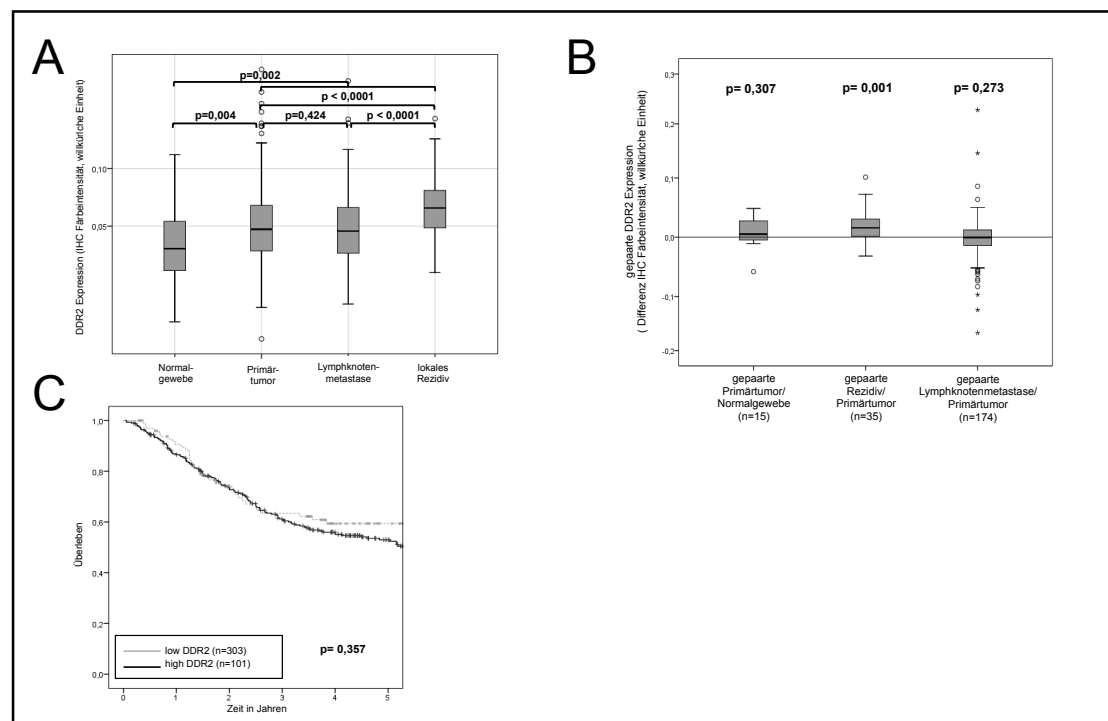


Abbildung 4-10. DDR2 Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) DDR2 Expression während der Tumorprogression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs. (B) Korrelation der Expression von gepaarten Proben. (C) Überleben der Patienten nach DDR2 Expression. Es wurden die 25 % der Patienten mit der höchsten DDR2 Expression mit den verbleiben den 75 % verglichen.

4.4.2 Funktion von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Im nächsten Schritt sollten die biologischen Funktionen von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs näher untersucht werden. Dafür wurde DDR2 in den pLenti-C-mGFP Vektor kloniert und stabil in FaDu und HSC-3 Zellen, die beide kein DDR2 exprimieren, überexprimiert. Als Kontrolle wurde der Leervektor verwendet. Die Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen erfolgte über Durchflusszytometrie und wurde mit Hilfe von Westernblotanalysen überprüft (Abb. 4-11A). Zunächst wurde die Proliferation über vier Tage untersucht. Dabei wurden die Zellen sowohl auf zellkultur-beschichteten 96-Lochplatten ausplattiert, als auch auf Platten, die mit Kollagen I beschichtet waren, da Kollagen I ein Ligand für DDR2 ist. Für FaDu Zellen wurde dabei ein geringer, aber signifikanter Anstieg der Proliferation in DDR2 Überexpressions- im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet, der bei Stimulation der Zellen durch Kollagen I nicht stärker wurde. Für HSC-3 Zellen mit DDR2 Überexpression konnte weder auf zellkultur- noch auf kollagen-beschichteten Platten ein Unterschied in der Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 4-11B).

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit verankerungs-unabhängig wachsen zu können. Dies wurde mit Hilfe von Soft-Agar Assays untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die Fähigkeit Kolonien zu bilden in FaDu Zellen mit DDR2 Überexpression im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich verstärkt war. HSC-3 hingegen konnten sowohl mit als auch ohne DDR2 keine Kolonien bilden (Abb. 4-11C).

Als weitere tumorigene Eigenschaften wurden Migration und Invasion analysiert. Es konnte sowohl für FaDu als auch für HSC-3 Zellen DDR2 Überexpressionszellen ein signifikanter Anstieg der Migration und Invasion im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet werden. FaDu Zellen mit DDR2 Überexpression migrierten dreimal mehr, wohin gegen der Anstieg für die HSC-3 Zellen 10 % war (Abb. 4-11D). Die Fähigkeit durch Matrigel zu invadieren waren in FaDu DDR2-Zellen 2,5 -fach höher als in GFP-Kontrollzellen und HSC-3 Zellen 1,4-mal so hoch (Abb. 4-11E).

Abschließend sollte noch der Einfluss von DDR2 auf die Adhäsion untersucht werden, da DDR2 mit dem Kollagen der Extrazellulären Matrix interagiert. Die Adhäsion wurde wie auch die Proliferation auf zellkultur- und Kollagen I-beschichteten Platten untersucht. Da die Zellen auf den Kollagenplatten schneller adhärten wurde hier die adhärten Zellen bereits nach 40 Minuten ausgezählt.

Auf den zellkulturbeschichteten Platten wurden die FaDu Zellen nach 180 Minuten und die schneller adhätierenden HSC-3 Zellen nach 70 Minuten untersucht. Während auf Kollagenplatten kein Unterschied in der Adhäsion beobachtet wurde, adhätierten auf den zellkulturbeschichteten Platten 2-mal mehr FaDu - und 1,5-mal mehr HSC-3 DDR2 Überexpressions- im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 4-11F).

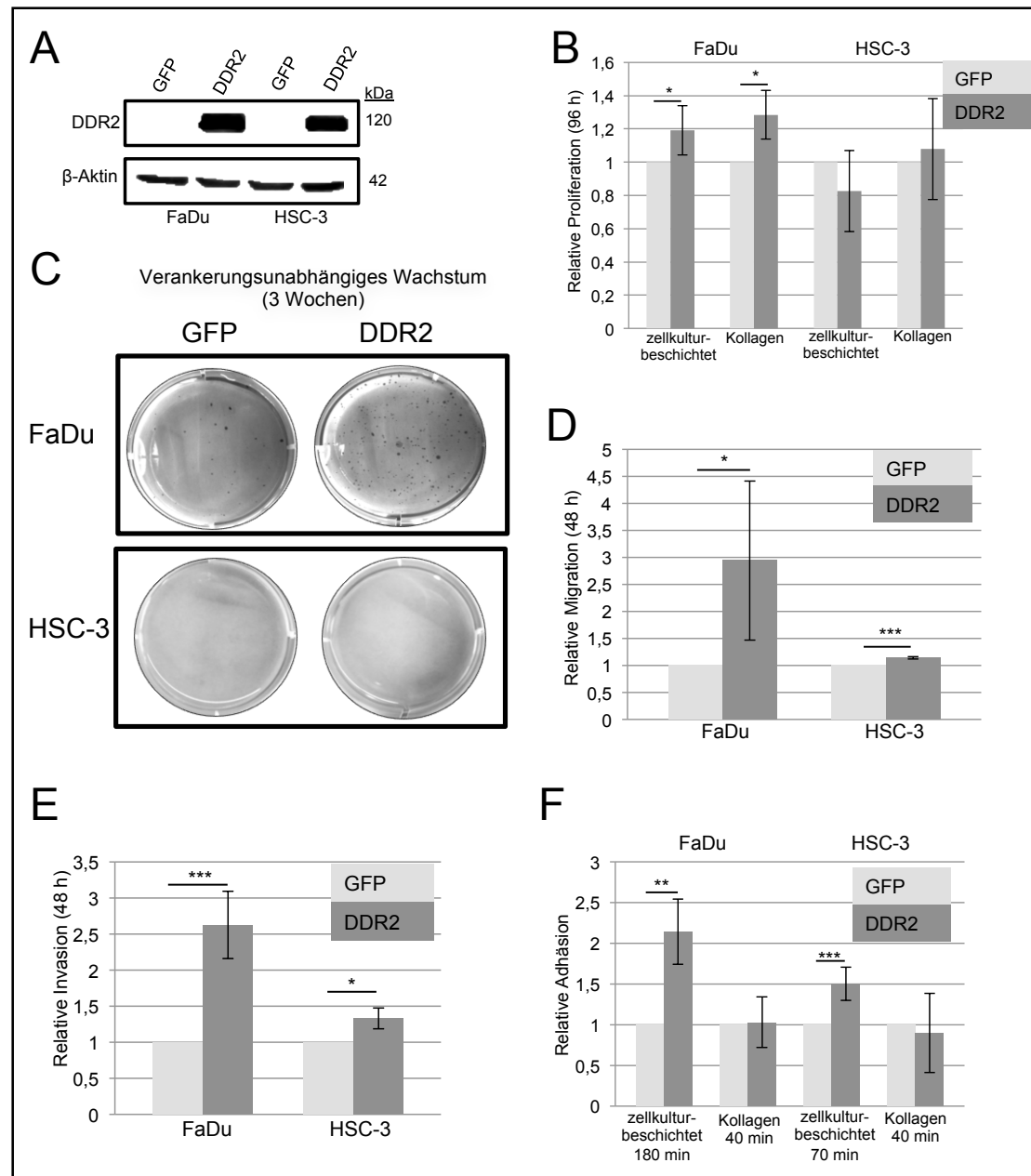


Abbildung 4-11. Funktion von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) DDR2 Überexpression in FaDu und HSC-3 Zellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. (B) Relative Proliferation von DDR2 Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen auf zellkultur- und Kollagen I-beschichteten Platten. (C) Verankerungsunabhängiges Wachstum von DDR2 Überexpressionszellen und GFP Kontrollzellen. (D) Relative Migration von DDR2 Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. (E) Relative Invasion von DDR2 Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. (F) Relative Adhäsion von DDR2 Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen auf zellkultur- und Kollagen I-beschichteten Platten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Überexpression von DDR2 viele tumorigene Eigenschaften wie Migration und Invasion von Zellen aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs verstärkt.

4.4.3 Inhibition von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs mit Dasatinib

Um zu überprüfen, ob sich DDR2 als therapeutische Zielstruktur in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eignet, wurden DDR2 Überexpressions- und Kontrollzellen mit Dasatinib behandelt und erneut die oben genannten Versuche durchgeführt. Für Dasatinib wurde bereits gezeigt, dass es auch die Aktivierung von DDR2 inhibiert (IC_{50} 1,4 nM)²⁰⁰. Zunächst wurden Wildtyp FaDu und HSC-3 Zellen mit Dasatinib behandelt und nach 72 Stunden die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt, da es sich bei Dasatinib um einen Multikinaseinhibitor handelt und die Sensitivität der Zellen gegenüber Dasatinib von der Expression verschiedener Tyrosinkinase abhängt. HSC-3 Zellen waren dabei 10-fach sensitiver gegenüber Dasatinib als FaDu Zellen mit einer IC_{50} von 0,25 μ M im Vergleich zu 2,5 μ M bei FaDu Zellen (Abb. 4-12).

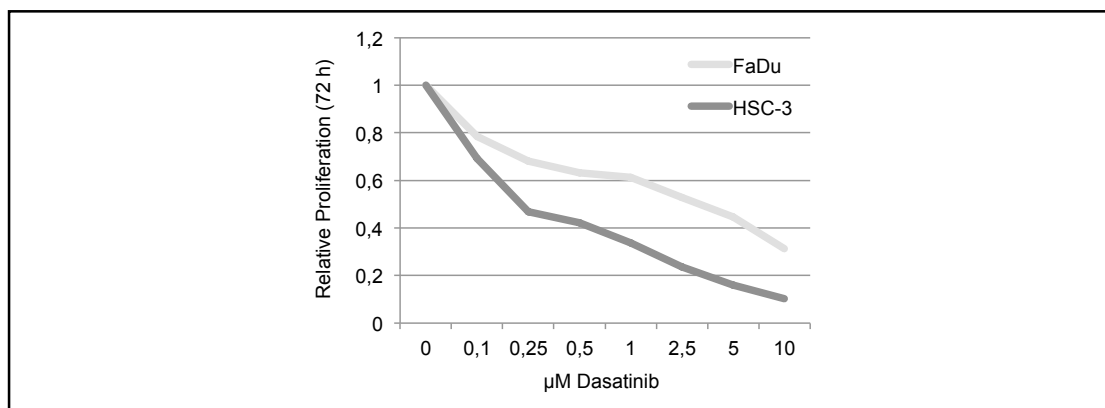


Abbildung 4-12. Sensitivität von FaDu und HSC-3 Zellen gegenüber Dasatinib.

FaDu und HSC-3 Zellen wurden über 72 Stunden mit verschiedenen Dasatinib Konzentrationen behandelt.

Anschließend wurden FaDu und HSC-3 DDR2 Überexpressions- als auch Kontrollzellen auf zellkultur- und Kollagen I- beschichteten Platten mit unterschiedlichen Dasatinibkonzentrationen behandelt und nach 72 Stunden die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen waren dabei für HSC-3 Zellen aufgrund der höheren Sensitivität 5-fach niedriger als für FaDu Zellen. Auf zellkulturbeschichteten Platten wurden weder für FaDu noch für HSC-3 Zellen eine

zunehmende Sensitivität gegenüber Dasatinib nach DDR2-Überexpression beobachtet (Abb. 4-13A). Beim selben Versuch auf kollagen-beschichteten Platten konnte für FaDu Zellen gezeigt werden, dass Zellen mit DDR2 Überexpression im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant in ihrer Proliferation gehemmt wurden. Für HSC-3 Zellen hingegen wurde kein Unterschied beobachtet (Abb. 4-13B).

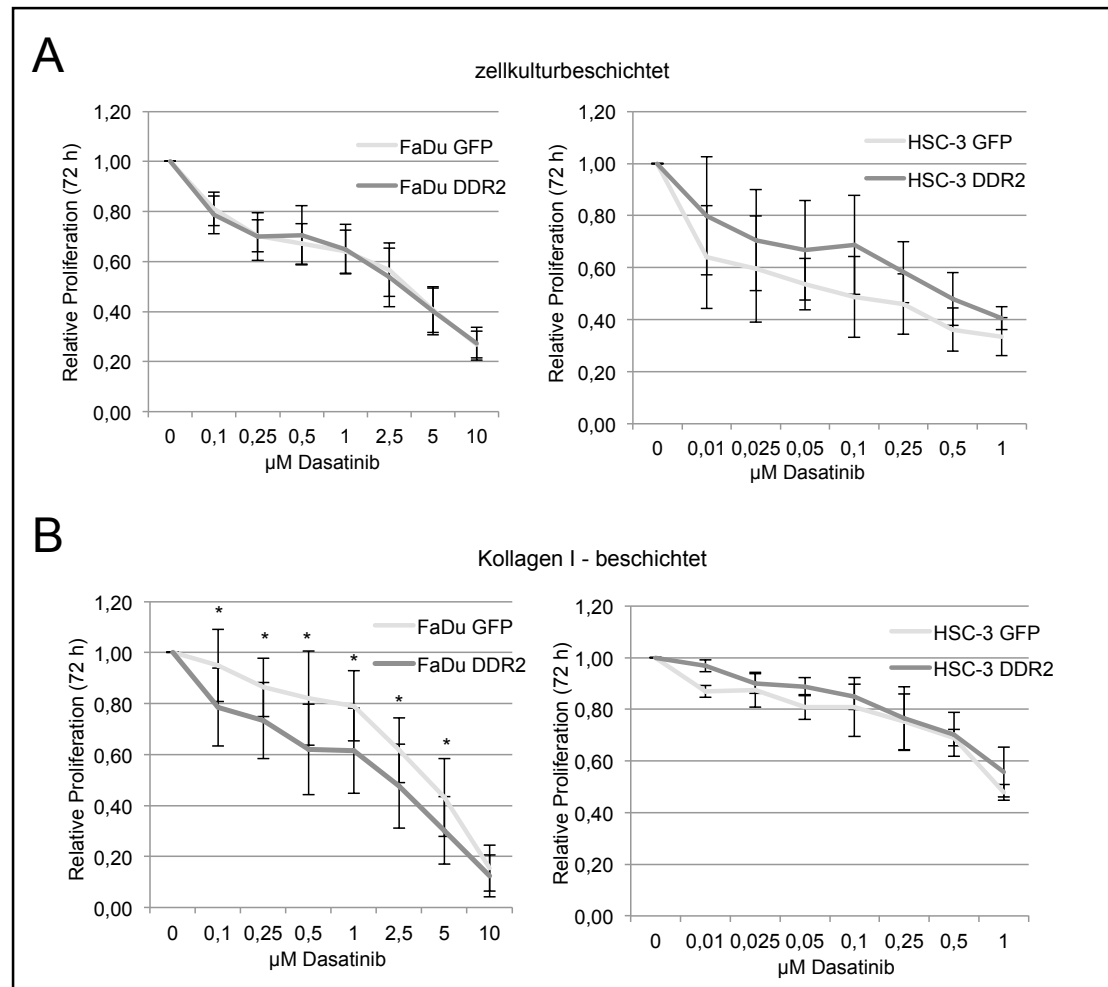


Abbildung 4-13. Effekt von Dasatinib auf die Proliferation von DDR2 Überexpressionszellen.

(A) Relative Proliferation von DDR2 Überexpressionszellen und Kontrollzellen nach Behandlung mit Dasatinib auf zellkulturbeschichteten Platten. (B) Relative Proliferation von DDR2 Überexpressionszellen und Kontrollzellen nach Behandlung mit Dasatinib auf Kollagen I - beschichteten Platten. * $p < 0,05$

Weiterhin wurde untersucht, ob Dasatinib die Migration, Invasion und Adhäsion hemmen kann. Dafür wurden DDR2 Überexpressions- und Kontrollzellen vor dem Durchführen der Versuche für 24 Stunden mit Dasatinib vorbehandelt. Für FaDu Zellen wurden 0,5 nM Dasatinib und für HSC-3 Zellen 0,1 nM Dasatinib verwendet. Sowohl die Migration als auch die Invasion konnte in DDR2 Überexpressions- im

Vergleich zu Kontrollzellen für beide Zelllinien signifikant gehemmt werden, wobei der Effekt für FaDu Zellen mit einer Reduktion auf 20 % bei der Migration und 10 % bei der Invasion deutlich größer war als bei HSC-3 Zellen mit einer Reduktion auf 65 bzw. 60 % (Abb. 4-14A und B). Die Inhibition der Adhäsion wurde wie bereits zuvor beschrieben sowohl auf zellkultur- als auch auf Kollagen I – beschichteten Platten durchgeführt. Auf zellkulturbeschichteten Platten, zeigte sich bei den FaDu Zellen nach Dasatinib Behandlung sowohl bei den DDR2 Überexpressions- als auch bei den Kontrollzellen eine Abnahme der Adhäsion auf 60 bzw. 70 %, die jedoch nur für die DDR2 Überexpressionszellen signifikant war. Im gleichen Versuch nahm auch die Adhäsion der HSC-3 DDR2 Überexpressionszellen auf 60 % ab, wobei dies nicht signifikant war. Die Adhäsion der Kontrollzellen war hier unverändert (Abb. 4-14C). Auf Kollagen I – beschichteten Platten nahm die Adhäsion der DDR2 Überexpressionszellen nach Dasatinib Behandlung sowohl für FaDu als auch für HSC-3 Zellen signifikant ab, wohingegen die Kontrollzellen unverändert blieben (Abb. 4-14D).

Diese Versuche zeigen erstmals, dass sich die verschiedenen durch DDR2 induzierten tumorigenen Eigenschaften wie Migrations und Invasion, durch minimale Dasatinib Konzentrationen hemmen lassen. Die funktionelle Analyse der HSC-3 DDR2 Überexpressionszellen wurde von Christine Sanders unter meiner Anleitung durchgeführt.

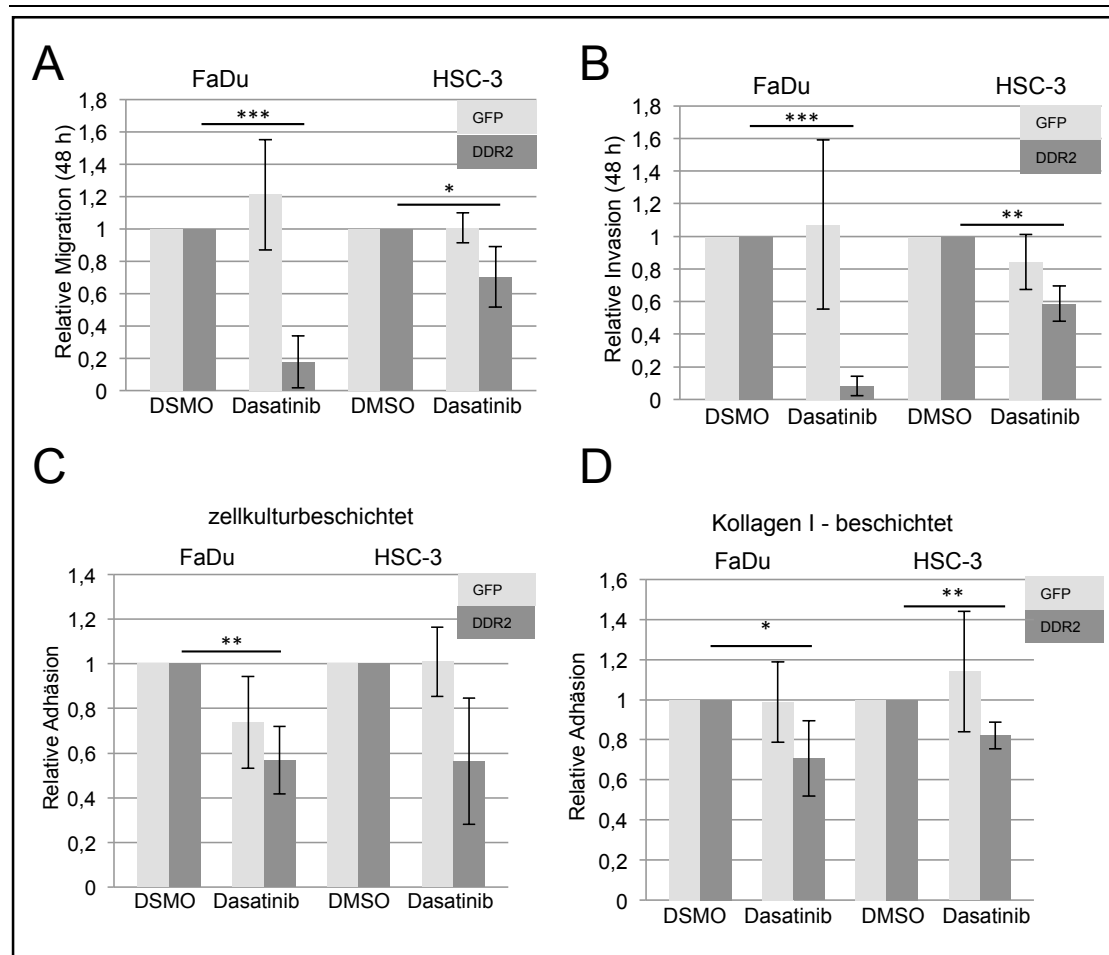


Abbildung 4-14. Effekt von Dasatinib auf Migration, Invasion und Adhäsion von DDR2 Überexpressionszellen.

(A) Relative Migration von DDR2 Überexpressionszellen und Kontrollzellen nach Vorbehandlung mit Dasatinib (FaDu: 0,5 nM, HSC-3: 0,1 nM). (B) Relative Invasion von DDR2 Überexpressionszellen und Kontrollzellen nach Vorbehandlung mit Dasatinib (FaDu: 0,5 nM, HSC-3: 0,1 nM). (C) Relative Adhäsion von DDR2 Überexpressionszellen und Kontrollzellen auf zellkulturbeschichteten Platten nach Vorbehandlung mit Dasatinib (FaDu: 0,5 nM, HSC-3: 0,1 nM). (D) Relative Adhäsion von DDR2 Überexpressionszellen und Kontrollzellen auf Kollagen I - beschichteten Platten nach Vorbehandlung mit Dasatinib (FaDu: 0,5 nM, HSC-3: 0,1 nM).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

4.5 MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK)

4.5.1 Immunhistochemische Analyse

Zunächst wurde die MERTK Expression in 554 Patienten untersucht (Patientenkollektiv siehe Tabelle 2-11). Dabei zeigte sich, dass die Expression im Primärtumor signifikant über der des normalen Gewebes lag und bei 8 % der Patienten lag die MERTK Expression im Primärtumor deutlich über dem der restlichen Kohorte. Auch in Lymphknotenmetastasen und in Rezidiven konnte eine signifikant höhere MERTK Expression als in der normalen Mukosa festgestellt werden. Zwischen Primärtumor

und Lymphknotenmetastasen nahm die MERTK Expression hingegen ab (Abb. 4-15A). Die höhere Expression von MERTK im Tumor konnte durch gepaarte Proben von Normalgewebe und Tumor aus dem selben Patienten gezeigt werden und auch der Abfall der MERTK Expression in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor wurde mit gepaarten Proben bestätigt (Abb. 4-15B). Die Expression von MERTK korrelierte weder mit Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Tabak, Alkohol Konsum, HPV-Status oder dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. Auch im Überleben zeigte sich kein Unterschied zwischen Patienten mit hoher und niedriger/keiner MERTK Expression (Abb. 4-15C). Die IHC wurde freundlicherweise von Christine Sanders ausgewertet.

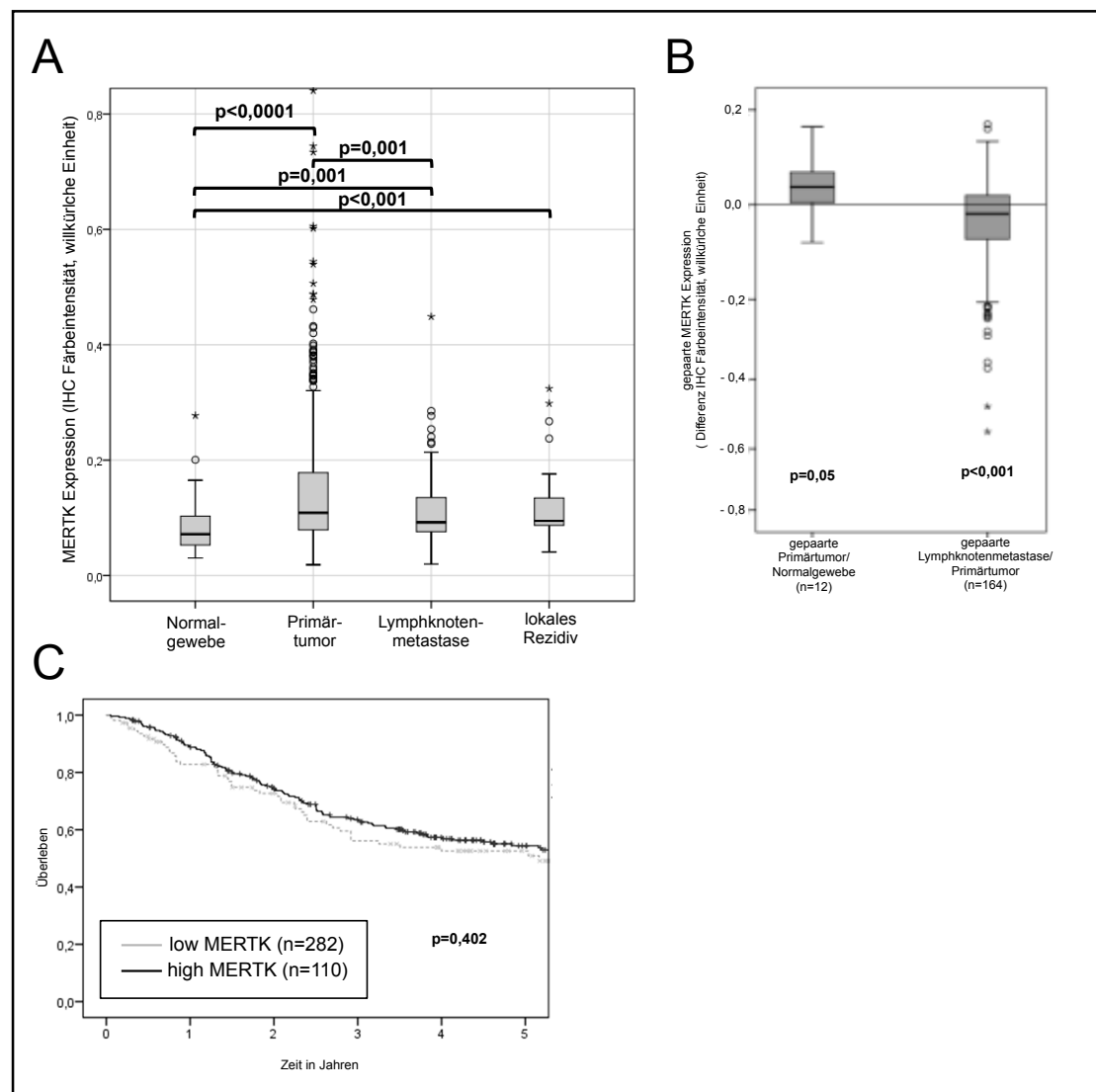


Abbildung 4-15. MERTK Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) MERTK Expression während der Tumorprogression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs. (B) Korrelation der MERTK Expression von gepaarten Proben. (C) Überleben der Patienten nach MERTK Expression. Es wurden die 25 % der Patienten mit der höchsten MERTK Expression mit den verbleibenden 75 % verglichen.

4.5.2 Funktion von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Über die Funktion von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ist bis heute noch nichts bekannt. Aus diesem Grund wurde zunächst MERTK in den in Zellen episomal vorliegenden pCSG-IBAw1 Vektor kloniert und in HN Zellen, die kein MERTK exprimieren (Abb. 4-3) überexprimiert. Als Kontrolle wurde GFP in den gleichen Vektor kloniert (Abb. 4-16A). MERTK Überexpressionszellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen einen signifikanten, aber nur minimalen Anstieg in der Proliferation (Abb. 4-16B). Die Anzahl der migrierten Zellen war in den MERTK Überexpressionszellen doppelt so hoch wie bei Kontrollzellen (Abb. 4-16C) und die Invasion war 2,5-fach erhöht (Abb. 4-16D). Im Weiteren wurde untersucht über welche Signalwege diese Effekte vermittelt sein könnten. MERTK Überexpressionszellen zeigten dabei eine vermehrte Expression von pERK wohingegen pAKT nur leicht erhöht im Vergleich zu Kontrollzellen waren. Außerdem konnte eine Zunahme der FAK nicht jedoch pFAK Expression nach MERTK Überexpression festgestellt werden. Eine deutliche Zunahme zeigte sich für RhoA in MERTK Überexpressionszellen (Abb. 4-16A).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs einen positiven Einfluss auf wichtige tumorigene Eigenschaften wie Proliferation, Migration und Invasion hat. Die funktionelle Analyse der HN MERTK Überexpressionszellen wurde von Christine Sanders unter meiner Anleitung durchgeführt.

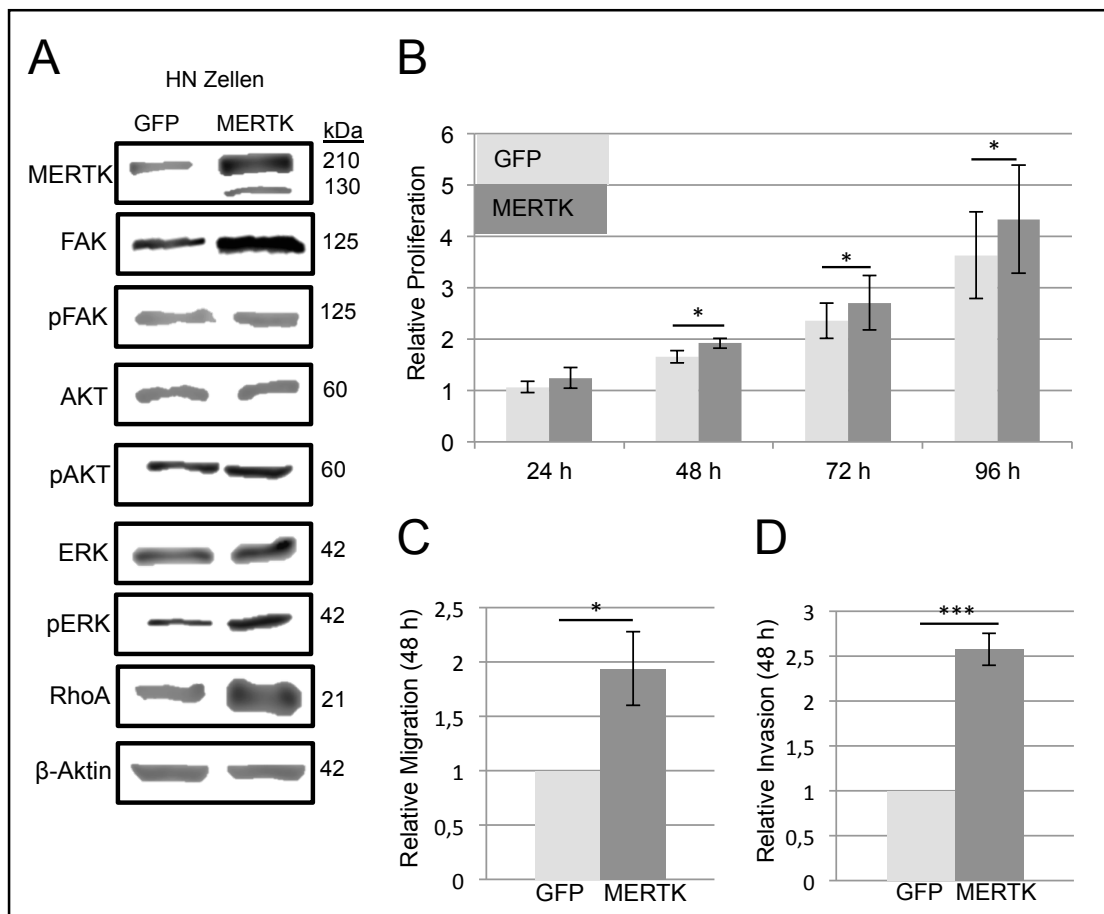


Abbildung 4-16. Funktion von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) MERTK Überexpression in HN Zellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen mit Expression verschiedener Signalmoleküle. (B) Relative Proliferation von MERTK Überexpressionszellen und GFP Kontrollzellen. (C) Relative Migration von MERTK Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. (D) Relative Invasion von MERTK Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen.

* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$

4.5.3 Inhibition von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Im nächsten Schritte sollte überprüft werden, ob sich MERTK als therapeutische Zielstruktur in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eignet. Dafür wurden zum einen Detroit 562 Zellen mit einer starken MERTK Expression sowie HN Zellen ohne MERTK Expression (Abb. 4-3) mit UNC1062, einem selektiven MERTK Inhibitor ($K_i = 0,33 \text{ nM}$)²²⁶, behandelt. Weiterhin wurden zwei verschiedenen shRNAs gegen MERTK sowie eine shRNA gegen GFP als Kontrolle in den pLKO-Tet-On Vektor kloniert und Detroit 562 Zellen mit diesen Vektoren lentiviral transduziert. Es handelt sich somit hierbei um einen Knockdown, der durch die Gabe von Doxycyclin induziert wird. Anschließend wurden sowohl nach UNC1062 Behandlung als auch nach MERTK Knockdown die bereits oben beschriebenen tumorigenen Eigenschaften sowie Signalwege untersucht.

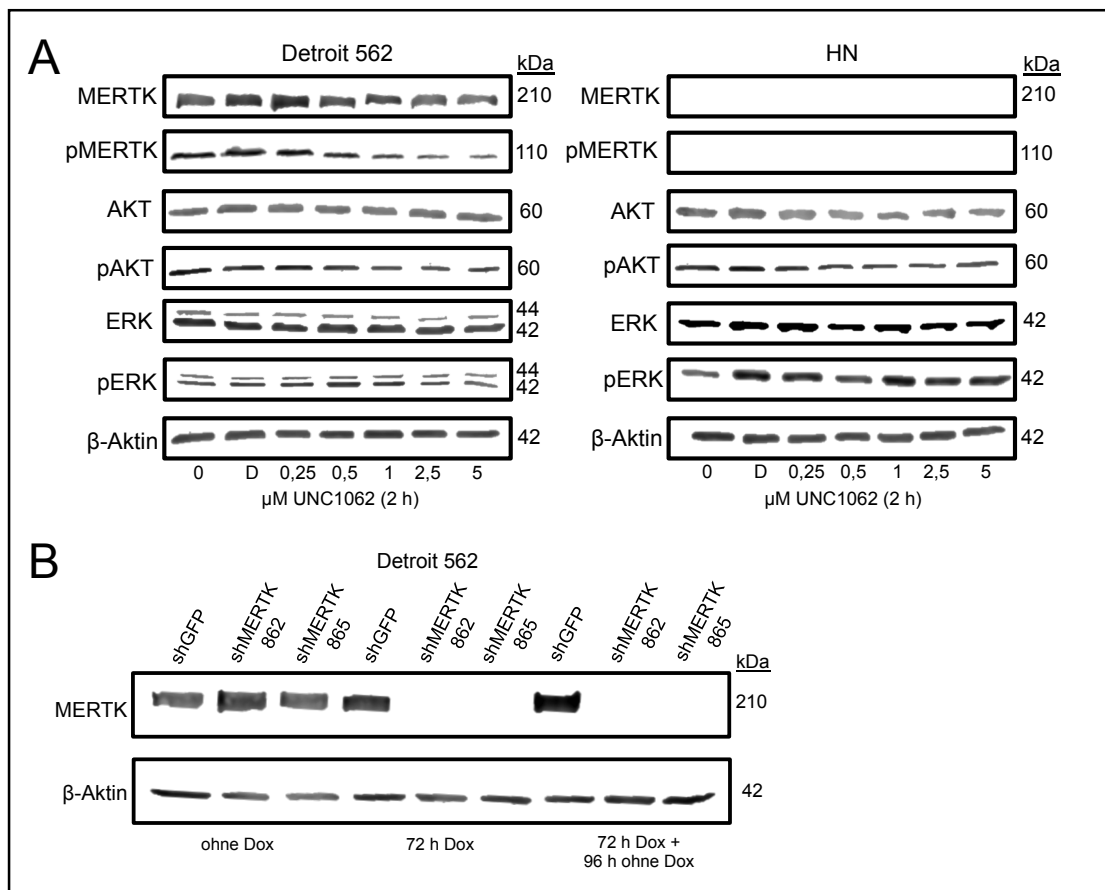


Abbildung 4-17. MERTK Inhibition und Knockdown.

(A) Detroit 562 und HN Zellen wurden für 2 Stunden in Medium ohne FBS kultiviert bevor für weitere 2 Stunden unterschiedliche Konzentrationen UNC1062 oder DMSO hinzugeben und die Proteine isoliert wurden. (B) Detroit 562 Zellen mit shRNA gegen GFP oder MERTK wurden für 72 Stunden mit oder ohne 1 μ g/ml Doxycyclin behandelt und anschließend für weitere vier Tage ohne Doxycyclin. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Proteine isoliert.

(D, DMSO ; Dox, Doxycyclin)

Die Behandlung von Detroit 562 Zellen mit unterschiedlichen UNC1062 Konzentrationen zeigte nach zwei Stunden eine Abnahme sowohl von totalem MERTK als auch der phosphorylierten Form. Gleichzeitig nahm die Phosphorylierung von AKT und ERK ab, wobei der Effekt bei pERK ausgeprägter war. Die Expression von AKT und ERK hingegen blieb gleich. Im Gegensatz dazu blieb die Phosphorylierung von ERK und AKT in HN Zellen nach Behandlung mit UNC1062 gleich (Abb. 4-17A).

Der MERTK Knockdown wurde mit zwei verschiedenen shRNAs in Detroit 562 Zellen mit 1 μ g/ml Doxycyclin für 72 Stunden induziert und war auch noch nach vier Tagen ohne weitere Doxycyclin Behandlung stabil, wohingegen Kontrollzellen, die mit einer shRNA gegen GFP transduziert wurden keine Unterschiede in der MERTK Expression zeigten (Abb. 4-17B).

Zunächst wurde die Proliferation untersucht. Nach Behandlung von Detroit 562 und HN Zellen mit verschiedenen UNC1062 Konzentrationen nahm nach 24 und 72 Stunden die Zellzahl in Detroit 562 und HN Zellen ab, aber es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden (Abb. 4-18A). Auch der MERTK Knockdown hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen (Abb. 4-18B).

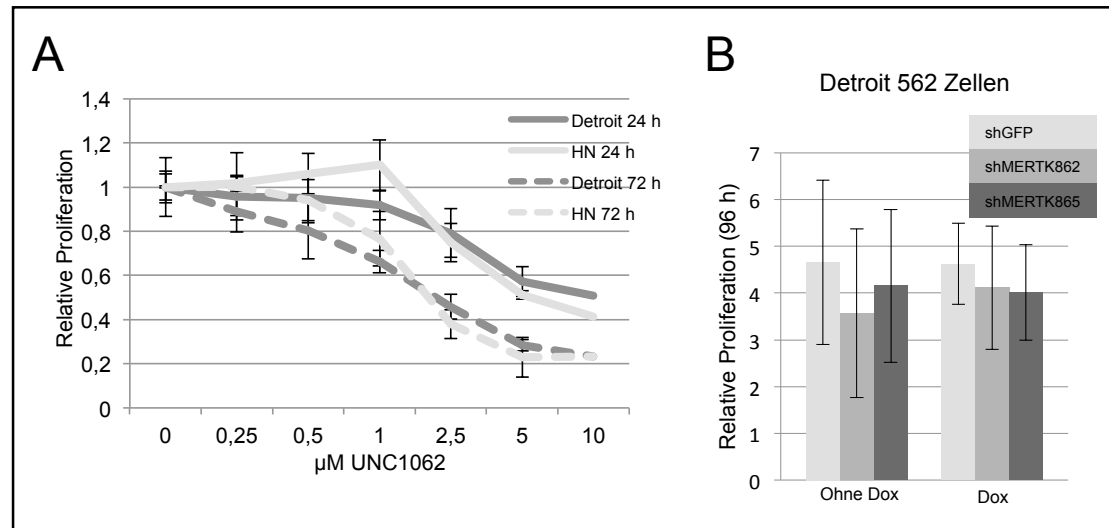


Abbildung 4-18. Einfluss von MERTK auf die Proliferation

(A) Detroit 562 und HN Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen UNC1062 behandelt und nach 24 und 72 Stunden die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. (B) Detroit 562 Zellen mit shRNA gegen GFP oder MERTK wurden für 72 Stunden mit 1 µg/ml Doxycyclin behandelt und anschließend für weitere 4 Tage ohne Doxycyclin kultiviert bevor die Anzahl lebender Zellen bestimmt wurde.

(Dox, Doxycyclin)

Im Folgenden wurde die Expression von ERK und AKT sowie deren Phosphorylierungsstatus untersucht. Dabei zeigte sich, dass 24 Stunden nach Behandlung von Detroit 562 Zellen die Phosphorylierung von MERTK, AKT und ERK für hohe Konzentrationen ab 2,5 µM UNC1062 abnahm, wohingegen in HN Zellen kein Unterschied feststellbar war (Abb. 4-19A). Dies konnte auch nach 72 Stunden beobachtet werden, wobei die Effekte auf pAKT und pERK in Detroit 562 Zellen deutlich stärker waren und zusätzlich auch die Gesamtmenge an MERTK abnahm. Die Signalwege in HN Zellen waren unverändert (Abb. 4-19B). Der Knockdown von MERTK hatte keinen Einfluss auf die Expression und Phosphorylierung von ERK und AKT (Abb. 4-19C).

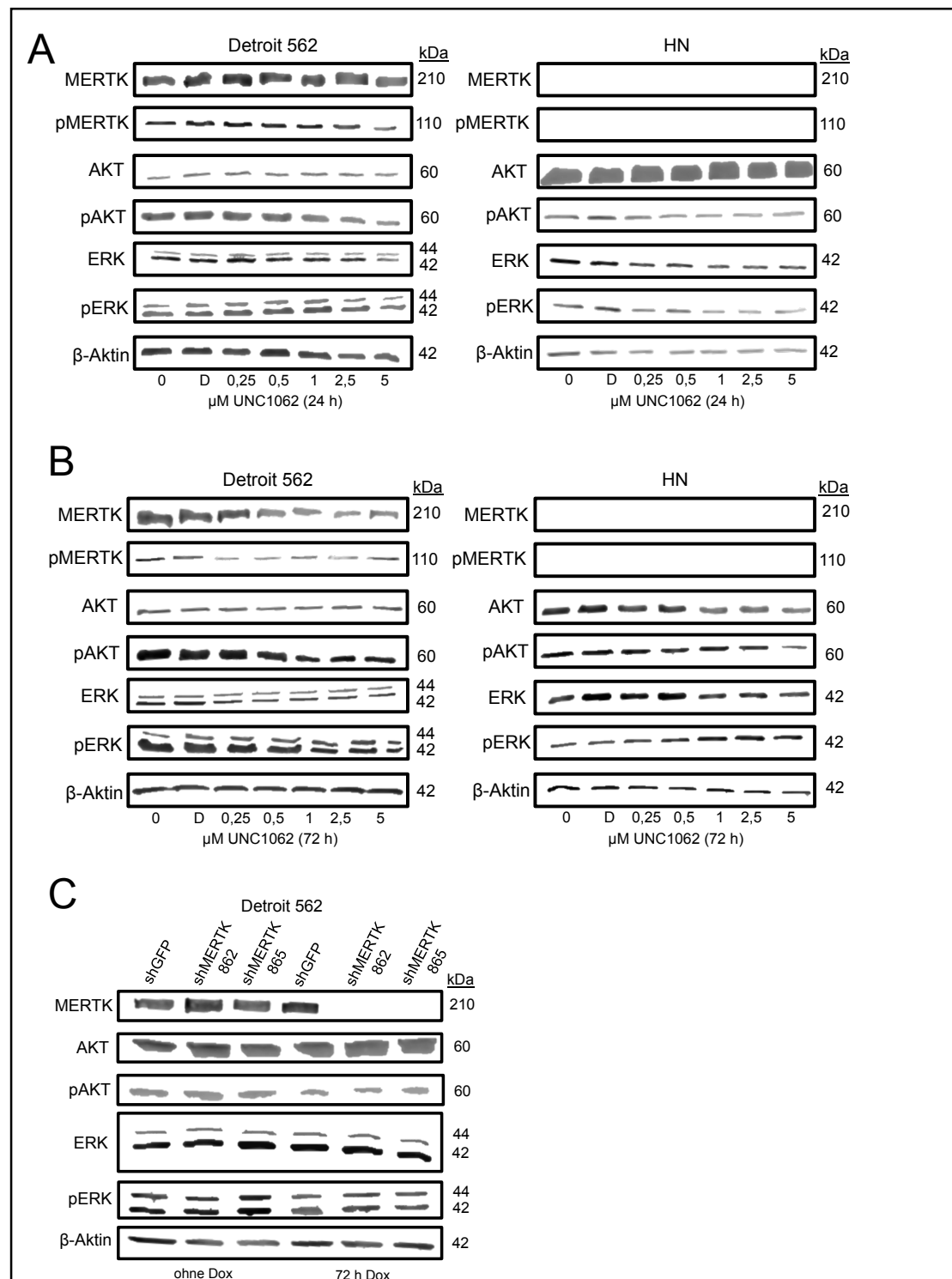


Abbildung 4-19. Einfluss von MERTK Inhibition und Knockdown auf AKT und ERK.

(A, B) Detroit 562 und HN Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen UNC1062 oder DMSO kultiviert und die Proteine nach 24 (A) oder 72 Stunden (B) isoliert. (C) Detroit 562 Zellen mit shRNA gegen GFP oder MERTK wurden für 72 Stunden mit oder ohne 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin behandelt und anschließend die Proteine isoliert. (D, DMSO ; Dox, Doxycyclin)

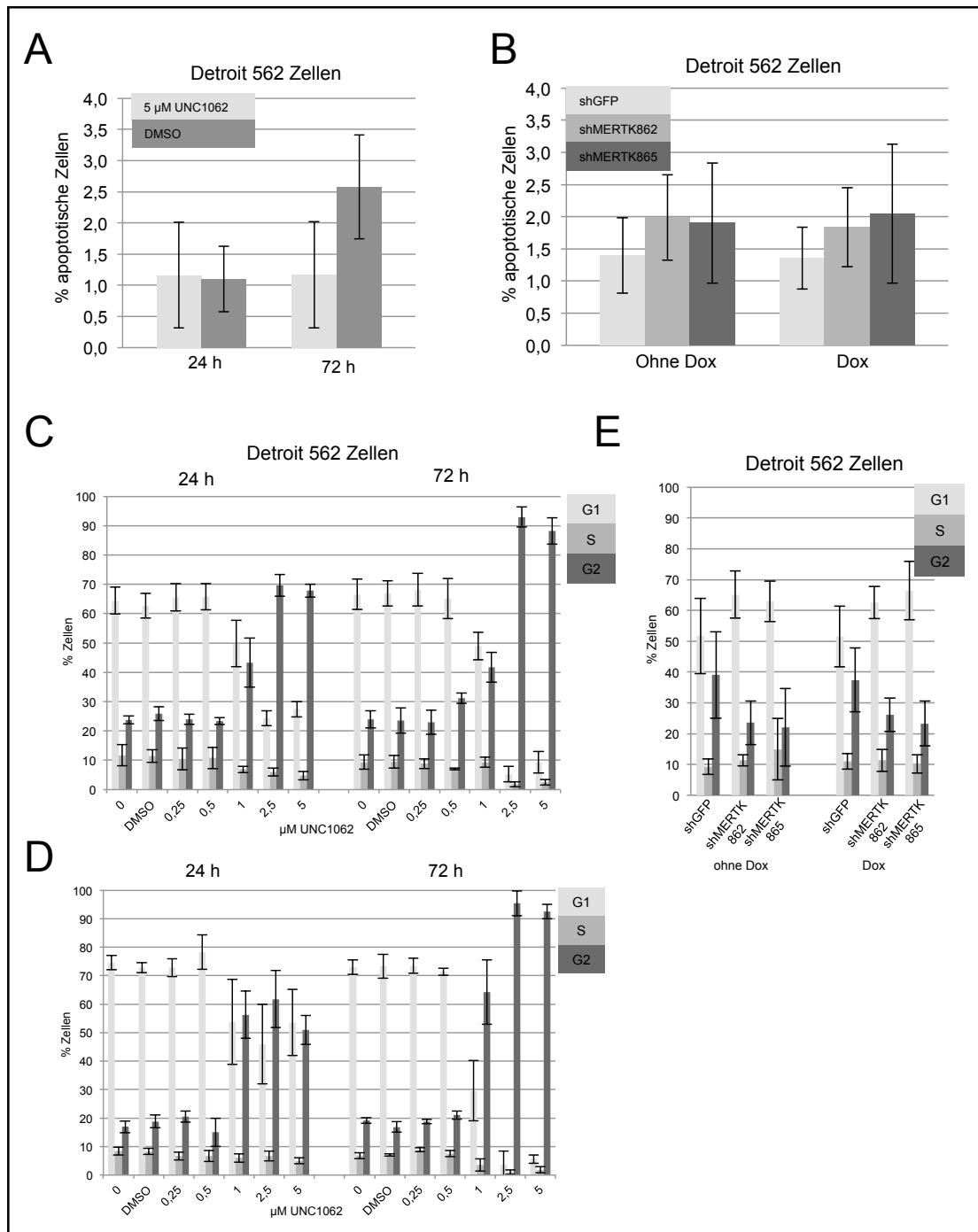


Abbildung 4-20. Einfluss von MERTK Inhibition und Knockdown auf Apoptose und Zellzyklus.

(A) Detroit 562 Zellen wurden mit 5 µM UNC1062 oder DMSO für 24 oder 72 Stunden behandelt und anschließend die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt. (B) Detroit 562 Zellen mit shRNA gegen GFP oder MERTK wurden für 48 Stunden mit Doxycyclin behandelt und anschließend die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt. (C) Detroit 562 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen UNC1062 oder DMSO für 24 oder 72 Stunden behandelt und der Zellzyklus analysiert. (D) HN Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen UNC1062 oder DMSO für 24 oder 72 Stunden behandelt und der Zellzyklus analysiert. (E) Detroit 562 Zellen mit shRNA gegen GFP oder MERTK wurden für 72 Stunden mit Doxycyclin behandelt und der Zellzyklus analysiert. (Dox, Doxycyclin)

Im Weiteren wurde untersucht wodurch die Abnahme der Zellzahl nach Inhibitorbehandlung zustanden kommt. Da bekannt ist, dass MERTK in verschiedenen Tumoren einen Einfluss auf die Apoptose hat (siehe 1.7), wurde zunächst in Detroit 562 Zellen die Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung mit 5 μM UNC1062 oder MERTK Knockdown analysiert. Dabei zeigte sich weder nach 24 noch nach 72 Stunden nach Inhibitorbehandlung ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate (Abb. 4-20A). Auch der Knockdown von MERTK induzierte keine Apoptose (Abb. 4-20B). Eine weitere Möglichkeit für eine Reduktion der Zellzahl ist Zellzyklusarrest. Detroit 562 Zellen zeigten bereits 24 Stunden nach Behandlung mit UNC1062 einen G2 Phase Arrest, der vor allem für Konzentrationen ab 1 μM und nach 72 Stunden noch ausgeprägter war (Abb. 4-20C). Da sich jedoch das gleiche Phänomen bei HN Zellen zeigte (Abb. 4-20D) und MERTK Knockdown keinen Einfluss auf den Zellzyklus hatte (Abb. 4-20E), handelt es sich hierbei vermutlich um unspezifische Effekte des Inhibitors, die nicht über MERTK vermittelt werden.

In folgenden Experimenten wurde der Einfluss von MERTK Inhibition und Knockdown auf die Migration und Invasion untersucht. Die Vorbehandlung von Detroit 562 Zellen mit 0,25 μM UNC1062 führte im Gegensatz zu HN Zellen zu einer Abnahme der Migration auf 63 % (Abb. 4-21A). MERTK Knockdown führte nur bei einer shRNA (shMERTK862) zu einer signifikanten Abnahme der Migration auf 45 %, wobei shGFP Kontrollzellen eine Abnahme auf 80 % nach Doxycyclinbehandlung zeigten (Abb. 4-21B). Der Knockdown wurde für diese Versuche für 48 Stunden mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert, da bei höheren Konzentrationen auch die Kontrollzellen nicht mehr migrierten. Die Invasion konnte in Detroit 562 Zellen nach Vorbehandlung mit 0,25 μM UNC1062 in Detroit 562 Zellen auf 44 % gesenkt werden, wohingegen die Behandlung keinen Einfluss auf HN Zellen hatte (Abb. 4-21C). Der Einfluss von MERTK Knockdown auf die Invasion wurde nur mit dem shMERTK862-Vektor, welches bei der Migration erfolgreicher war, untersucht. MERTK Knockdown führte zu einer Abnahme der Invasion auf 35 % (Abb. 4-21D).

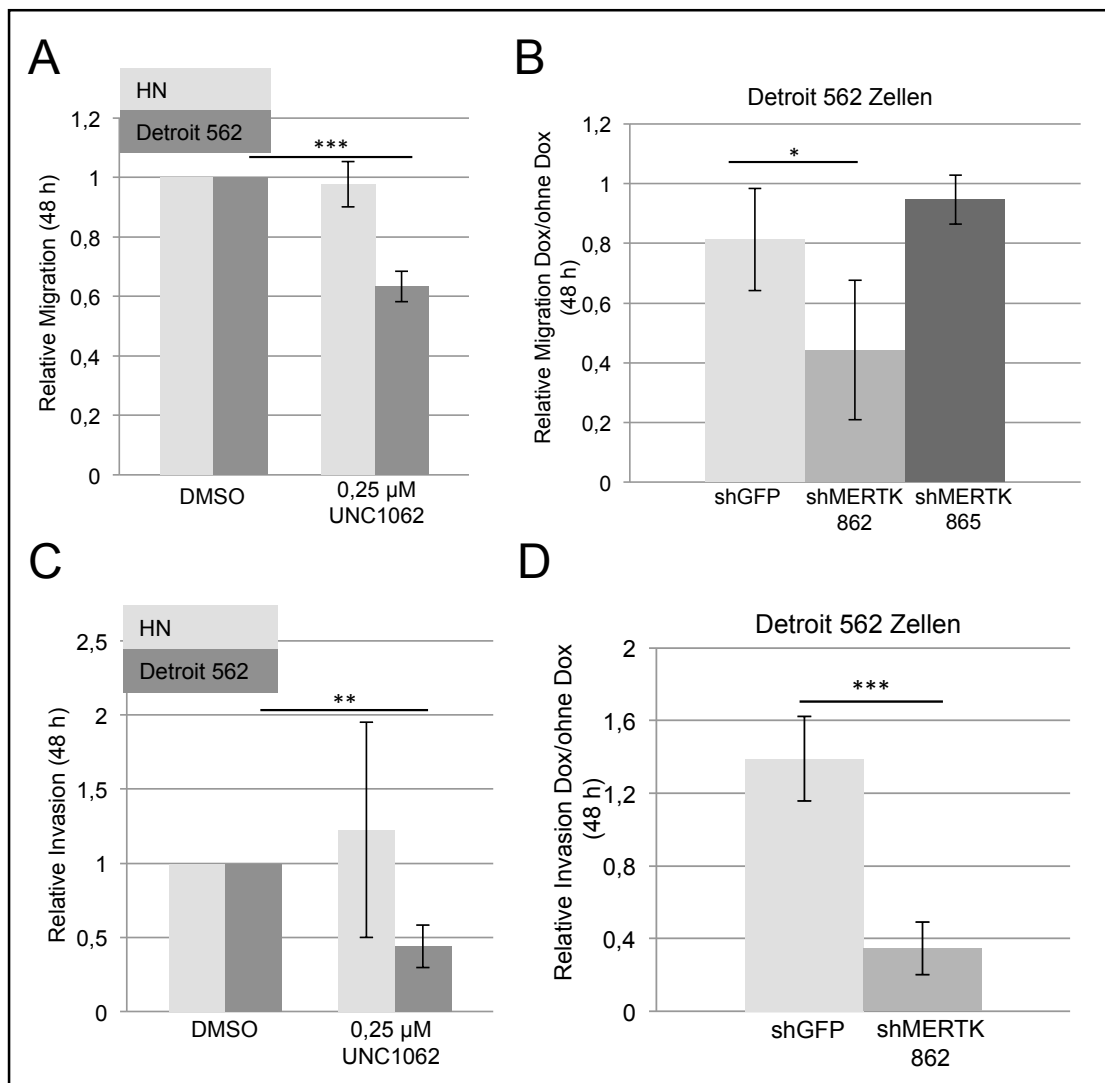


Abbildung 4-21. Einfluss von MERTK auf die Migration und Invasion.

(A) Detroit 562 und HN Zellen wurden 24 Stunden mit 0,25 µM UNC1062 oder DMSO vorbehandelt und anschließend die Migration bestimmt. (B) Detroit 562 Zellen mit shRNA gegen GFP oder MERTK wurden 48 Stunden mit oder ohne 0,01 µg/ml Doxycyclin behandelt und anschließend die Migration bestimmt. (C) Detroit 562 und HN Zellen wurden 24 Stunden mit 0,25 µM UNC1062 oder DMSO vorbehandelt und anschließend die Invasion bestimmt. (D) Detroit 562 Zellen mit shRNA gegen GFP oder MERTK wurden 48 Stunden mit oder ohne 0,01 µg/ml Doxycyclin behandelt und anschließend die Invasion bestimmt. (Dox, Doxycyclin) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Als Marker für die Migration und Invasion wurden FAK, pFAK sowie RhoA untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung von Detroit 562 und HN Zellen mit UNC1062 nach 72 Stunden zu einer Abnahme der RhoA und pFAK Expression führte. Für pFAK war dieser Effekt in Detroit 562 Zellen ausgeprägter als in HN Zellen. Die Expression von RhoA nahm in Detroit 562 Zellen bereits bei 0,25 µM UNC1062 ab, wohingegen bei HN Zellen dies erst ab 1 µM sichtbar war (Abb. 4-22A). Die Induktion des MERTK Knockdowns führte mit 0,01 µg/ml zu einem etwas

stärkeren Knockdown mit dem shMERTK862-Vektor im Vergleich zum shMERTK865-Vektor. Weiterhin konnte nach MERTK Knockdown kein Unterschied in der FAK Expression, sowie deren Phosphorylierung festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Abnahme von RhoA für den shMERTK862-Vektor im Vergleich zum shMERTK865-Vektor (Abb. 4-22B).

Diese Daten zeigen erstmals, dass die Inhibition von MERTK verschiedene tumorigene Eigenschaften wie Migration und Invasion in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs hemmen. Die Versuche aus Abbildung 4-18, 19 und 21 wurden von Christine Sanders und Britta Thewes unter meiner Anleitung durchgeführt.

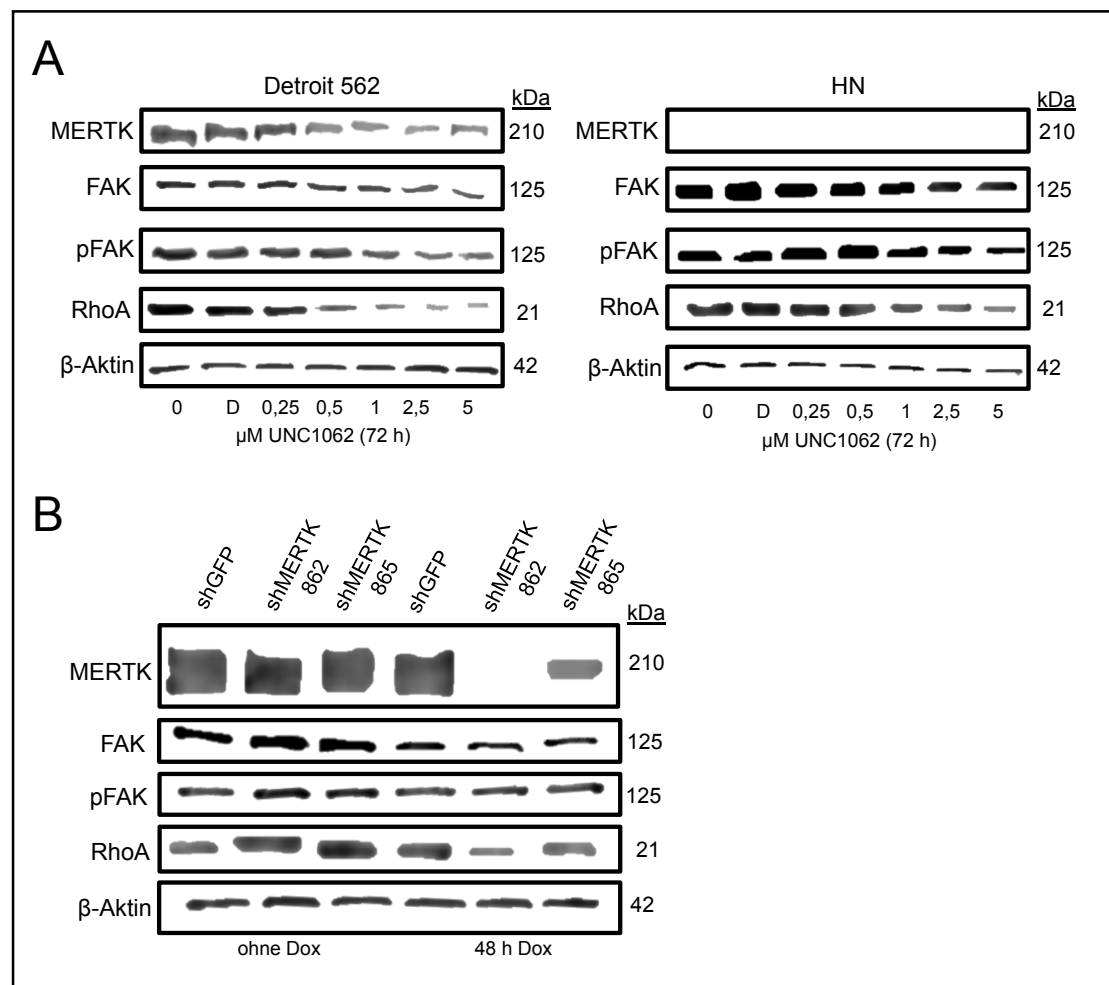


Abbildung 4-22. Einfluss von MERTK Inhibition und Knockdown auf FAK und RhoA.

(A) Detroit 562 und HN Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen UNC1062 oder DMSO kultiviert und die Proteine nach 72 Stunden isoliert. (B) Detroit 562 Zellen mit shRNA gegen GFP oder MERTK wurden für 48 Stunden mit oder ohne 0,01 μ g/ml Doxycyclin behandelt und anschließend die Proteine isoliert.

(D, DMSO ; Dox, Doxycyclin)

4.6 AXL receptor tyrosine kinase (AXL)

4.6.1 Immunhistochemische Analyse

Um zu ermitteln welche Rolle AXL in der Progression von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs spielt, wurde zunächst die Expression in insgesamt 495 Gewebeproben von 364 Patienten bestimmt (Patientenkollektiv siehe Tabelle 2-11). Der Anstieg der AXL Expression war dabei von Normalgewebe zu Primärtumor weder für gepaarte Proben, noch für die Gesamtkohorte signifikant (Abb. 4-23A und 4-23B). Es zeigte sich aber eine signifikant höhere AXL Expression in der weiteren Tumorprogression hin zu Lymphknotenmetastasen und Rezidiven (Abb. 4-23A). Dies konnte auch für gepaarte Primärtumor und Lymphknotenmetastasen bestätigt werden (Abb. 4-23C), nicht jedoch für gepaarte Lymphknotenmetastasen mit Rezidiven (Abb. 4-23D).

Weitere Untersuchungen ergaben keinen Korrelation der AXL Expression mit Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Tabak, Alkohol Konsum, HPV-Status oder dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. Auch auf das Fünf-Jahres Überleben hatte AXL keinen Einfluss (Abb. 4-23E). Die IHC wurde freundlicherweise von Hannah Billig ausgewertet.

4.6.2 Funktion von AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Um die Funktion von AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs zu untersuchen wurde AXL in den pLenti-C-mGFP Vektor kloniert, in SCC-25 Zellen stabil überexprimiert (Abb. 4-24A) und die Zellen auf tumorigene Eigenschaften untersucht. Während die Proliferation zwischen AXL Überexpressions- und GFP Kontrollzellen gleich war (Abb. 4-24B) war sowohl die Migration als auch die Invasion in AXL Überexpressionszellen im Vergleich zu Kontrollzellen verdoppelt (Abb. 4-24C und D). Diesen Daten weisen auf einen Einfluss von AXL in der Tumorprogression hin.

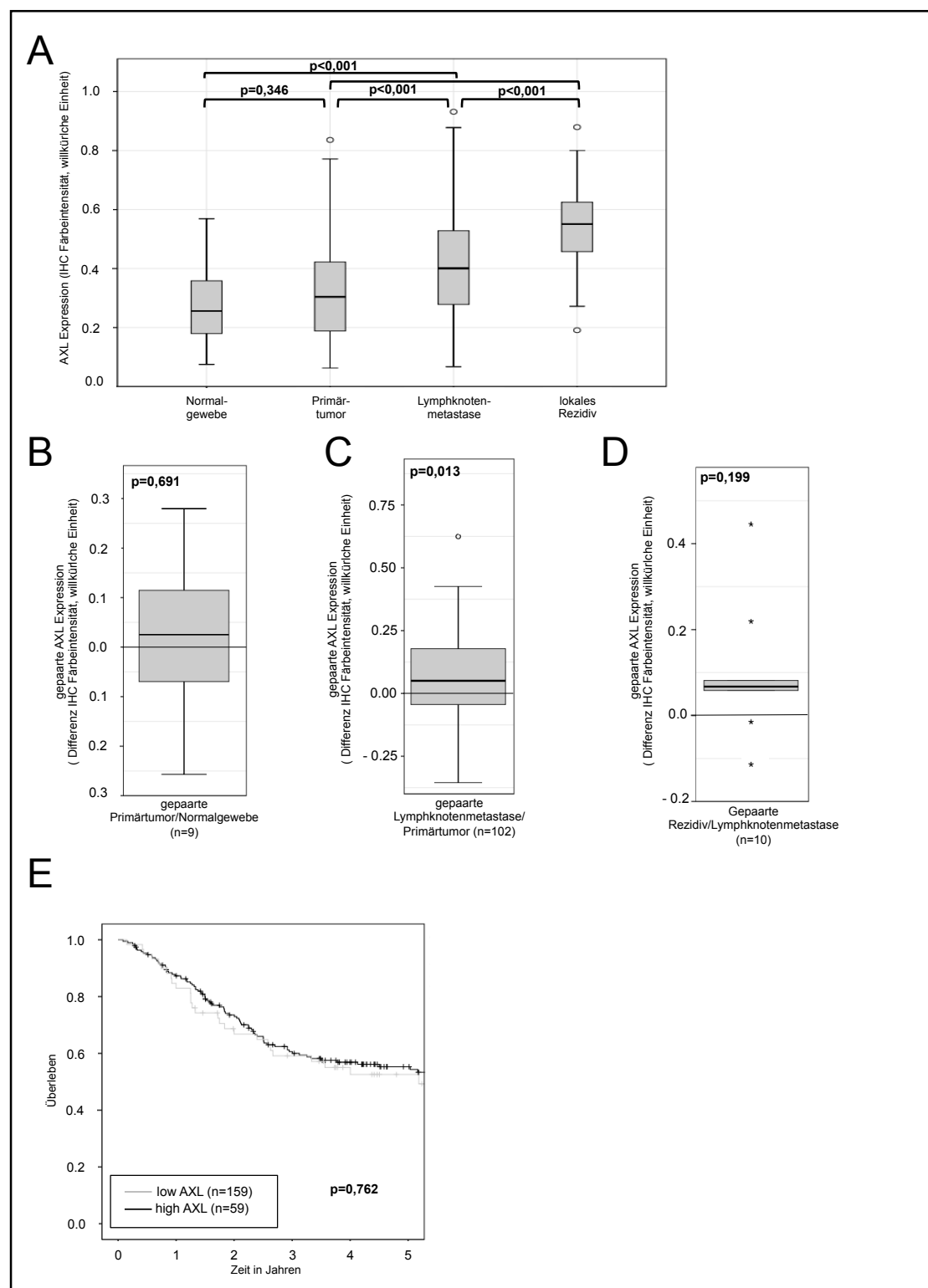


Abbildung 4-23. AXL Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) AXL Expression während der Tumorphysion in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs. (B) Korrelation der AXL Expression von gepaarten Normalgewebe-/Primärtumor-Proben. (C) Korrelation der AXL Expression von gepaarten Primärtumor-/Lymphknotenmetastasen-Proben. (D) Korrelation der AXL Expression von gepaarten Lymphknotenmetastasen/Rezidiv-Proben. (E) Überleben der Patienten nach AXL Expression. Es wurden die 25 % der Patienten mit der höchsten AXL Expression mit den verbleibenden 75 % verglichen.

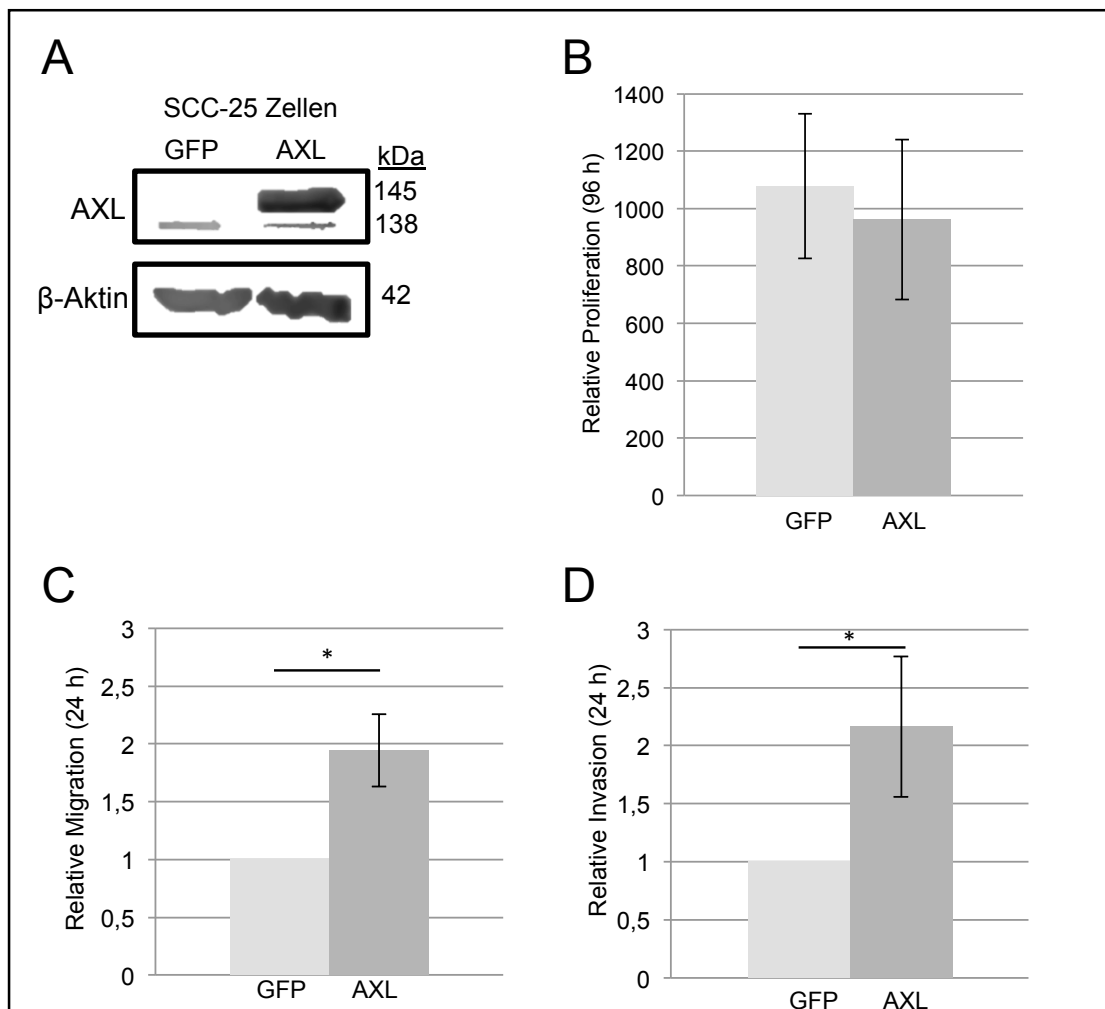


Abbildung 4-24. Funktion von AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.

(A) AXL Überexpression in SCC-25 Zellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. (B) Relative Proliferation von AXL Überexpressionszellen und GFP Kontrollzellen. (C) Relative Migration von AXL Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. (D) Relative Invasion von AXL Überexpressionszellen im Vergleich zu GFP Kontrollzellen. * $p < 0,05$

4.6.3 Inhibition von AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

Als nächstes wurde analysiert in wie weit sich AXL als therapeutisches Ziel in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eignet. Dafür wurden Zellen aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs mit unterschiedlicher AXL Expression (Abb. 4-25B) mit BGB324, einem selektiven AXL Inhibitor (IC_{50} 14 nM), behandelt und der Anteil lebender Zellen nach 24 und 72 Stunden bestimmt, wobei es nach keinem Zeitpunkt Unterschiede im Überleben zwischen den untersuchten Zelllinien (FaDu, HN, SCC-25) gab (Abb. 4-25A).

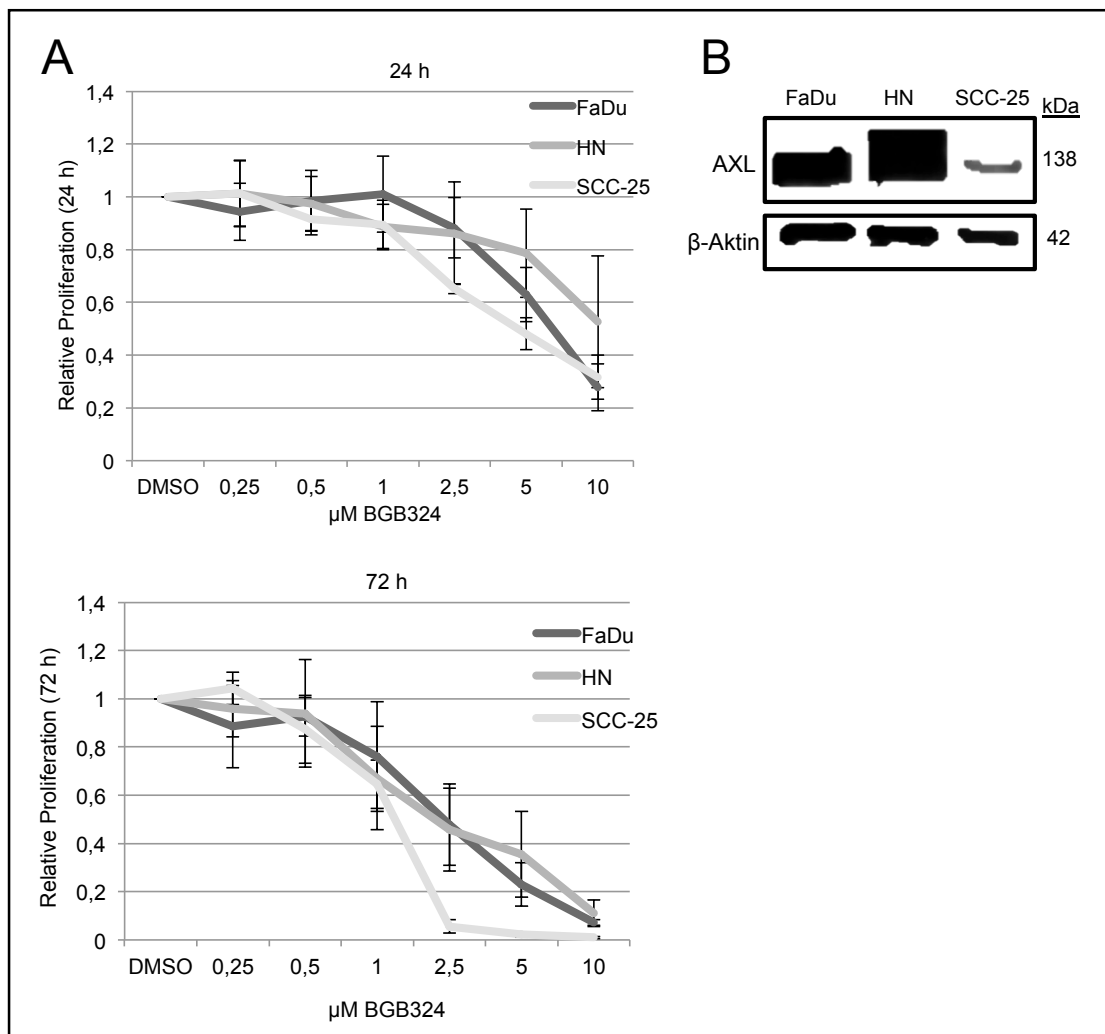


Abbildung 4-25. Einfluss von AXL Inhibition mit BGB324 auf die Proliferation.

(A) FaDu, HN und SCC-25 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen BGB324 behandelt und nach 24 und 72 Stunden die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. (B) Expression von AXL in FaDu, HN und SCC-25 Zellen.

Um die Bedeutung von AXL für die Proliferation und andere tumorigene Eigenschaften in Tumoren des Kopf-Hals Bereich weiter zu untersuchen, wurden zwei verschiedene shRNAs gegen AXL sowie eine shRNA gegen GFP als Kontrolle in den pLKO-Tet-On Vektor kloniert. Diese Vektoren wurden anschließend über lentivirale Transduktion in verschiedene Zelllinien (FaDu, HN, HSC-3) gebracht und der Knockdown durch Zugabe von Doxycyclin induziert. 48 Stunden nach Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin war der Knockdown in allen Zelllinien vorhanden, wobei das shAXL574 Konstrukt zu einem partiellen und das shAXL575 Konstrukt zu einem kompletten Knockdown führte (Abb. 4-26A und B). Außerdem war der Knockdown auch weitere vier Tage ohne Doxycyclin stabil (Abb. 4-26C). Anschließend wurde die Proliferation nach Induktion mit Doxycyclin untersucht. Dabei zeigte sich, dass es bereits ohne Induktion des Knockdowns in HN und HSC-3 Zellen minimale

Unterschiede in der Proliferation zwischen den verschiedenen Vektorkonstrukten gab (Abb. 4-26D). Nach Induktion des Knockdowns mit Doxycyclin, proliferierten Zellen mit AXL Knockdown in allen Zelllinien für beide Vektorkonstrukte mehr als Zellen mit shRNA gegen GFP, wobei dieser Effekt unterschiedlich stark ausgeprägt war. Am deutlichsten zeigte sich dies bei HN Zellen wo es eine positive Korrelation der Knockdownstärke mit vermehrter Proliferation gab (Abb. 4-26E).

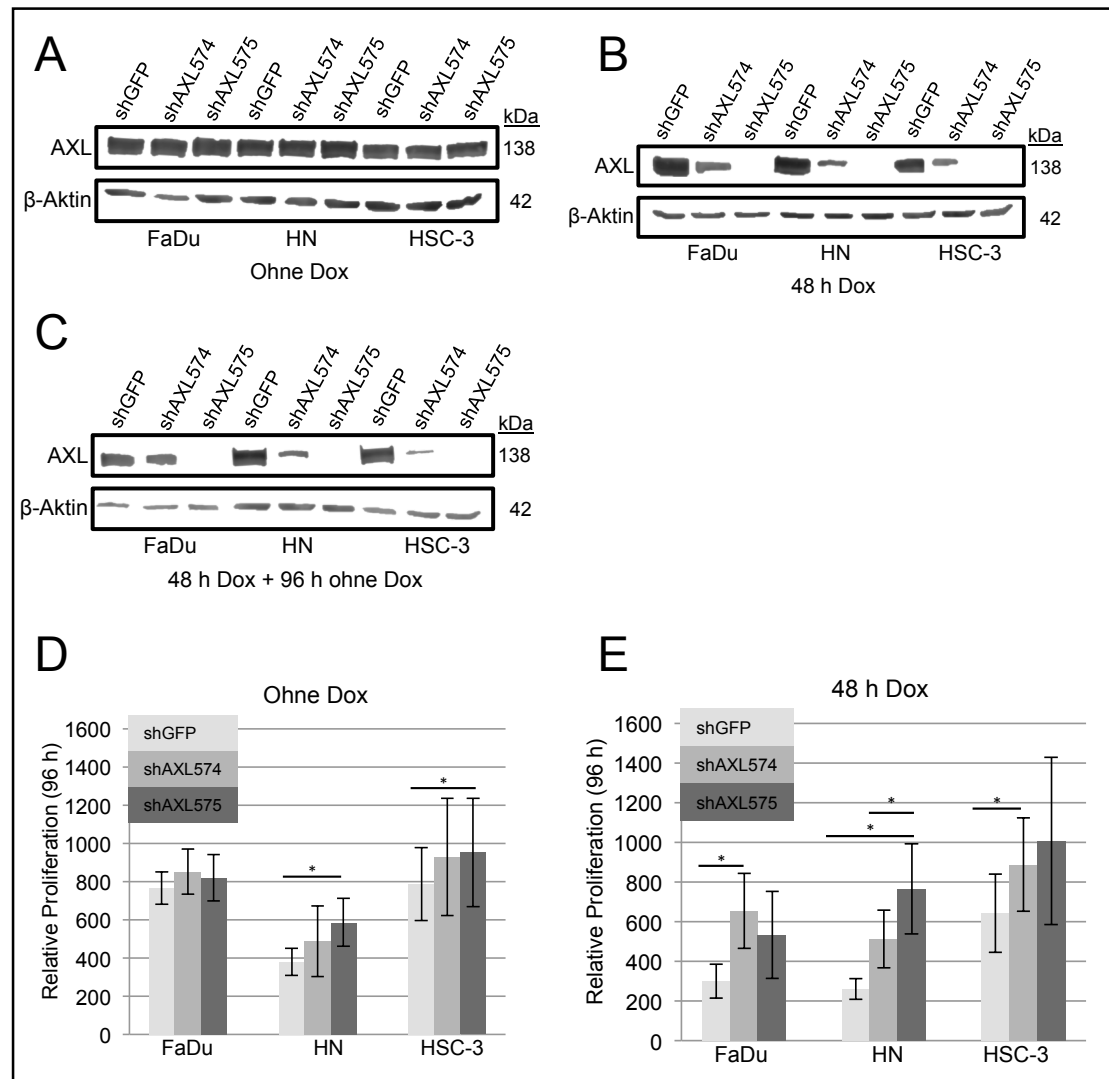


Abbildung 4-26. Einfluss von AXL Knockdown auf die Proliferation.

(A, B, C) AXL Expression in FaDu, HN und HSC-3 Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL ohne Behandlung mit Doxycyclin (A), für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin (B) und für 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin und anschließend für 96 h ohne Doxycyclin (C). (D, E) FaDu, HN und HSC-3 Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL wurden für 48 h Stunden ohne (D) oder mit (E) 1 µg/ml Doxycyclin vorbehandelt und anschließend für weitere 4 Tage ohne Doxycyclin kultiviert bevor die Anzahl lebender Zellen bestimmt wurde.

(Dox, Doxycyclin) * $p < 0,05$

Als nächstes sollte untersucht werden, über welche Signalwege es zu dieser verstärkten Proliferation nach AXL Knockdown kam. Dazu wurden HN Zellen, bei denen der Effekt am größten war, weiter analysiert. Nach 48 Stunden Induktion mit Doxycyclin konnte eine vermehrte Phosphorylierung von ERK nach AXL Knockdown beobachtet werden, die über weitere vier Tage ohne Doxycyclin stabil blieb. In Kontrollzellen hingegen nahm pERK deutlich ab. Keine Unterschiede gab es in der Expression von AKT, pAKT und ERK (Abb. 4-27A). Um zu überprüfen, ob eine Inhibition von AXL zu ähnlichen Veränderungen in den oben beschriebenen Signalwegen führen, wurden HN Zellen für 24 Stunden mit steigenden BGB324 Konzentrationen behandelt. Im Gegensatz zum AXL Knockdown führte die Inhibitorbehandlung zu einer Abnahme von pAKT wohingegen AKT, ERK und pERK unverändert blieben (Abb. 4-27B).

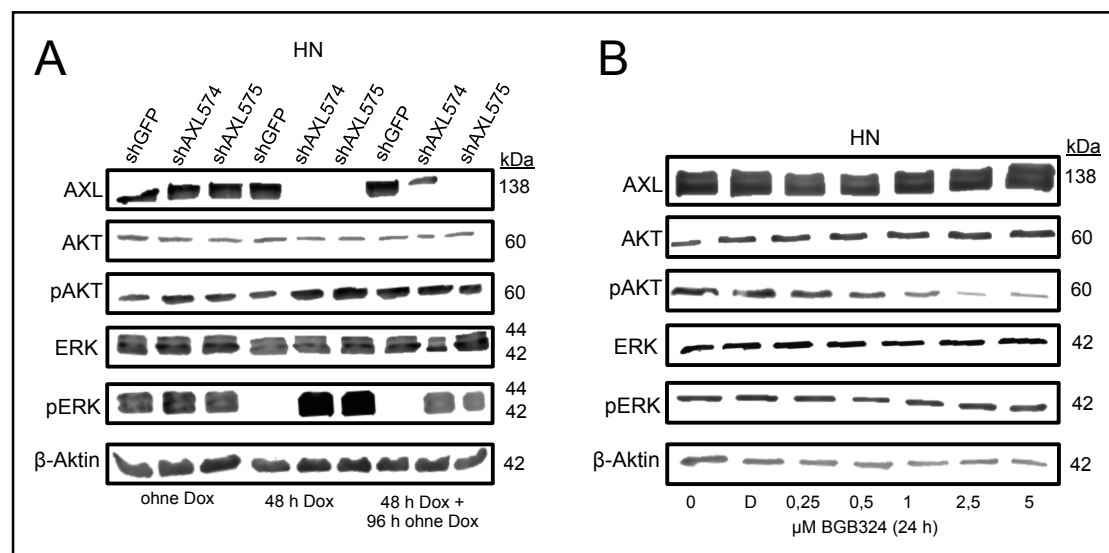


Abbildung 4-27. Einfluss von AXL Inhibition und Knockdown auf AKT und ERK.

(A) HN Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL wurden für 48 Stunden mit oder ohne 1 μg/ml Doxycyclin behandelt und anschließend die Proteine isoliert oder erst nach weiteren 96 Stunden ohne Doxycyclin. (B) HN Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen BGB324 oder DMSO kultiviert und die Proteine nach 24 Stunden isoliert.

(D, DMSO ; Dox, Doxycyclin)

Es ist bekannt, dass Rezeptortyrosinkinasen miteinander interagieren und die Inhibition einer Rezeptortyrosinkinase zur Aktivierung einer anderen führen kann. Dies könnte die vermehrte Proliferation nach AXL Knockdown erklären. Um diese Hypothese prüfen, wurden HN Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL für 48 Stunden mit 1 μg/ml Doxycyclin induziert (Abb. 4-28A) und anschließend der Phosphorylierungsstatus verschiedener Rezeptortyrosinkinasen mit Hilfe eines Phospho-RTK Arrays bestimmt. Dabei zeigten sowohl Kontrollzellen mit shRNA

gegen GFP als auch die Zellen mit beiden Knockdown Konstrukten eine EGFR Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von RET war nur bei Kontrollzellen und beim partiellen AXL Knockdown vorhanden. Es ließ sich jedoch eine Expression von pFGFR3 nach AXL Knockdown unabhängig davon ob partiell oder komplett nachweisen (Abb. 4-28B). Eine anschließende Überprüfung der Ergebnisse mit Hilfe spezifischer Antikörpern gegen pEGFR und pFGFR3, zeigte jedoch keine Unterschiede im Phosphorylierungsstatus der beiden Rezeptortyrosinkinasen (Abb. 4-29).

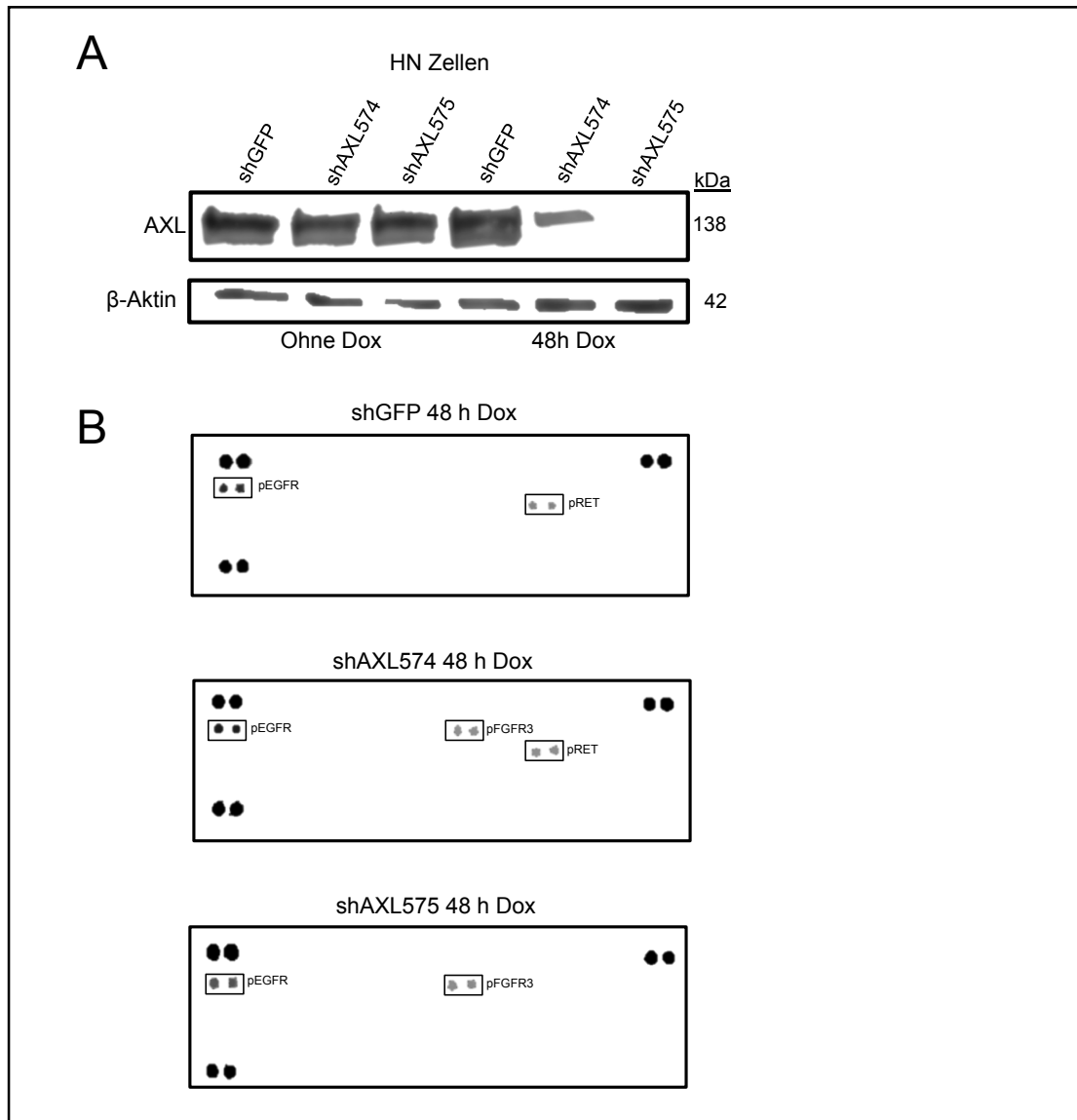


Abbildung 4-28. Phospho-RTK Array für AXL Knockdown- und Kontrollzellen.

(A) AXL Expression in HN Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL nach Inkubation für 48 h mit oder ohne 1 μ g/ml Doxycyclin. (B) Phospho-RTK Array für HN Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL nach Inkubation für 48 h mit 1 μ g/ml Doxycyclin. Deutlich gefärbte Punkte oben und unten links sowie oben rechts sind dienen als Kontrolle für die erfolgreiche Versuchsdurchführung.

(Dox, Doxycyclin)

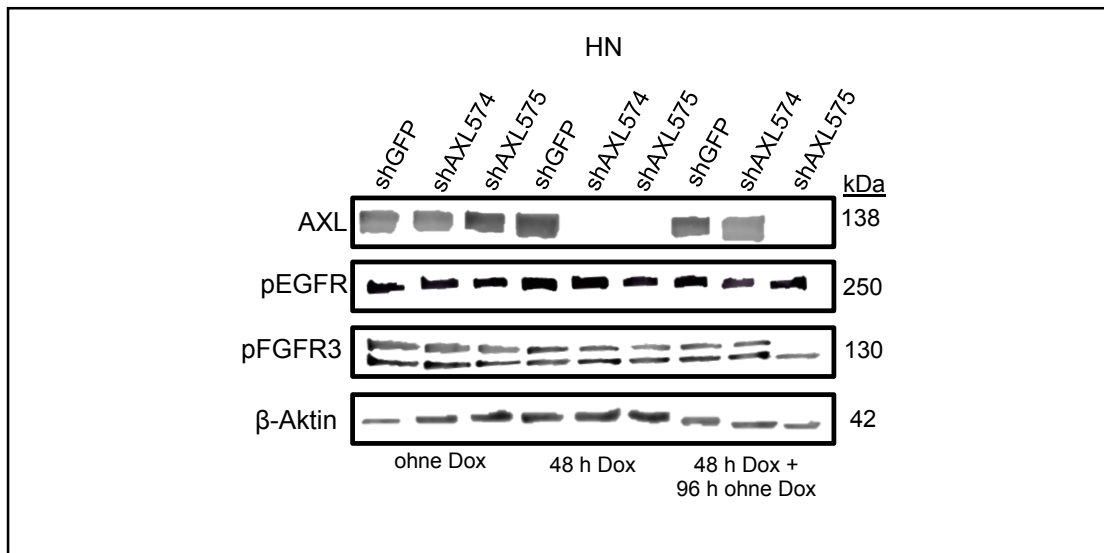


Abbildung 4-29. Einfluss von AXL Knockdown auf pEGFR und pFGFR3.

HN Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL wurden für 48 Stunden mit oder ohne 1 µg/ml Doxycyclin behandelt und anschließend die Proteine isoliert oder erst nach weiteren 96 Stunden ohne Doxycyclin.
(Dox, Doxycyclin)

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Migration und Invasion durch AXL Inhibition mit BGB324 oder Knockdown beeinflusst wird. Nach BGB324-Behandlung von HN Zellen mit AXL Expression konnte die Migration auf 40 % und die Invasion auf 60 % gesenkt werden. Im Vergleich dazu waren beide Eigenschaften in SCC-25 Zellen mit sehr geringer AXL Expression unverändert (Abb. 4-30A und C). Die Migration konnte nach Induktion des AXL Knockdowns ebenfalls auf 40 % gesenkt werden, jedoch nur bei kompletten Knockdown (shAXL575) wohingegen ein partieller Knockdown (shAXL574) zu keiner Veränderung führte (Abb. 4-30B). Der Einfluss auf die Invasion wurde nur für den kompletten AXL Knockdown untersucht. Hier zeigte sich jedoch weder für Kontrollzellen noch für AXL Knockdown ein Unterschied (Abb. 4-30D). Um zu ermitteln über welche Signalwege AXL die Zellmotilität beeinflusst, wurde die Expression von FAK, pFAK und RhoA in HN Zellen nach Behandlung für 72 Stunden mit BGB324 und AXL Knockdown untersucht. Nach Inhibition konnte sowohl eine Abnahme der FAK Phosphorylierung, als auch der RhoA Expression festgestellt werden (Abb. 4-31A). Nach AXL Knockdown verringerte sich nur nach komplettem Knockdown die RhoA Expression wohingegen pFAK unverändert blieb. Der partielle Knockdown hatte keinen Einfluss auf die Expression beider Moleküle (Abb. 4-31B).

Die Daten der Versuche zeigen, dass die Inhibition von AXL verschiedene tumorigene Eigenschaften hemmen kann, eine schnelle Resistenzbildung jedoch

wahrscheinlich ist. Die Versuche aus Abbildung 4-27B, 29 und 30 wurden von Hannah Billig und Britta Thewes unter meiner Anleitung durchgeführt.

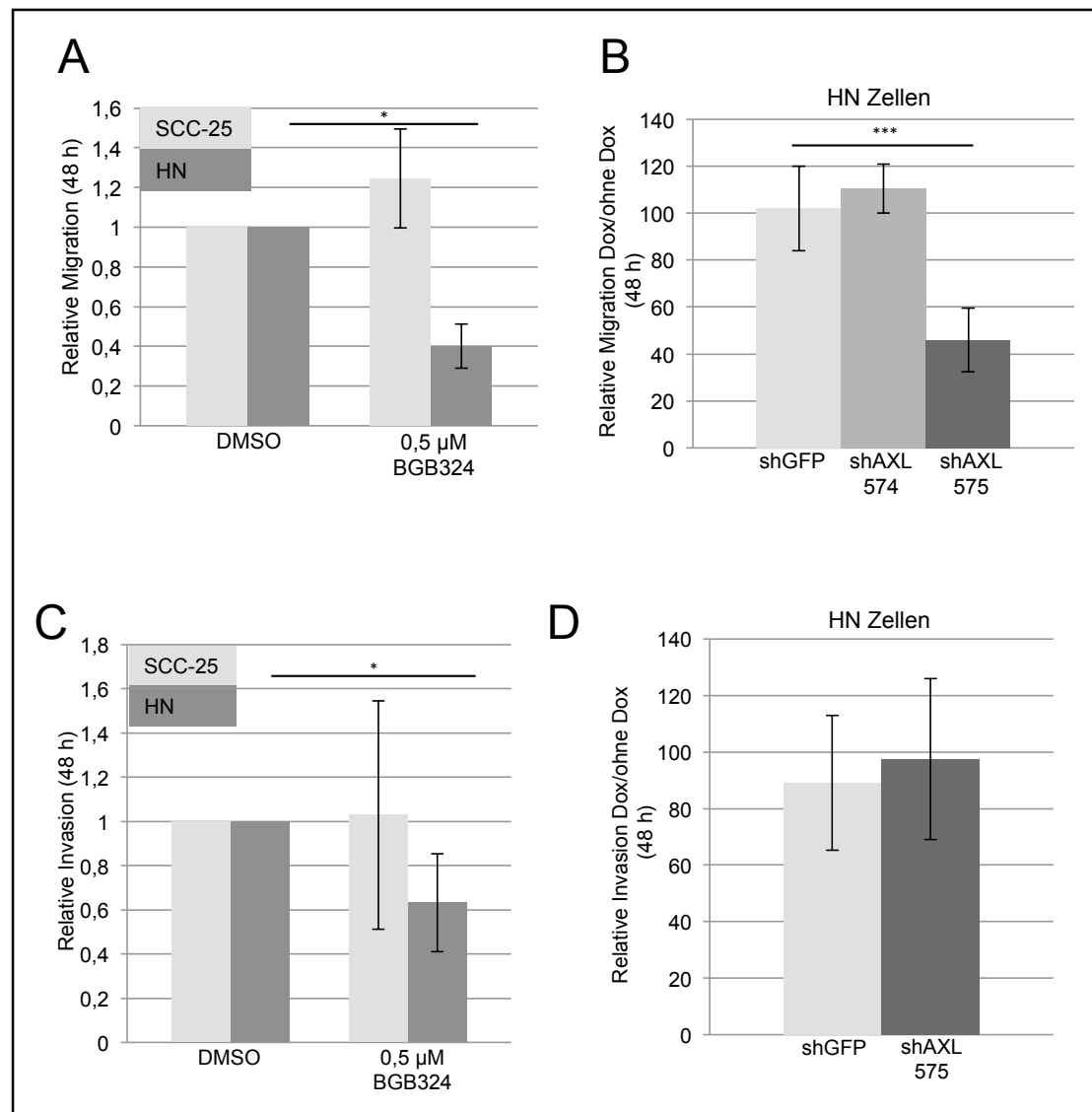


Abbildung 4-30. Einfluss von AXL auf die Migration und Invasion.

(A) HN und SCC-25 Zellen wurden 24 Stunden mit 0,5 µM BGB324 oder DMSO vorbehandelt und anschließend die Migration bestimmt. (B) HN Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL wurden 48 Stunden mit oder ohne 0,5 µg/ml Doxycyclin behandelt und anschließend die Migration bestimmt. (C) HN und SCC-25 Zellen wurden 24 Stunden mit 0,5 µM BGB324 oder DMSO vorbehandelt und anschließend die Invasion bestimmt. (D) HN Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL wurden 48 Stunden mit oder ohne 0,5 µg/ml Doxycyclin behandelt und anschließend die Invasion bestimmt.

(Dox, Doxycyclin) * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

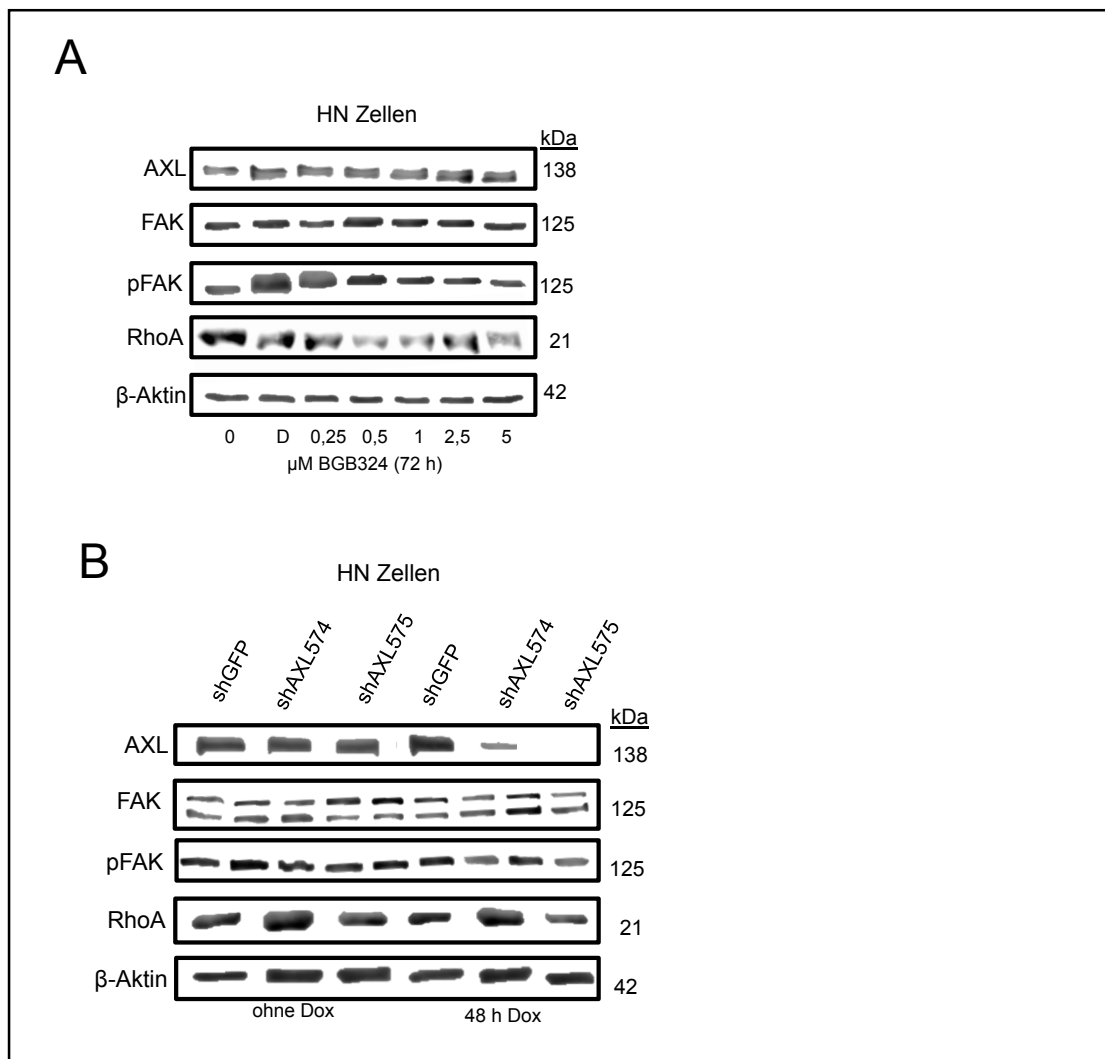


Abbildung 4-31. Einfluss von AXL Inhibition und Knockdown auf FAK und RhoA.

(A) HN Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen BGB324 oder DMSO kultiviert und die Proteine nach 72 Stunden isoliert. (B) HN Zellen mit shRNA gegen GFP oder AXL wurden für 48 Stunden mit oder ohne 0,5 μ g/ml Doxycyclin behandelt und anschließend die Proteine isoliert.

(D, DMSO ; Dox, Doxycyclin)

5. Diskussion

Tumore des Kopf-Hals Bereichs sind die sechst häufigste Tumorentität weltweit ¹. Dennoch sind die Therapieoptionen meist auf operative Entfernung des Tumors, Bestrahlung sowie Chemotherapie beschränkt und das Fünf-Jahres Überleben liegt bei nur 50-60 % ^{1,264}. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer zielgerichteter, nebenwirkungsarmer Therapien dringend erforderlich. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Rezeptortyrosinkinasen identifiziert, die als neue therapeutische Ziele in dieser Tumorentität dienen könnten und *in-vitro* untersucht.

Die Kandidatengene wurden über ihre Mutationsfrequenz mit Hilfe des Cancer Genome Atlas und anschließende immunhistochemische Färbung einer großen Patientenkohorte identifiziert. Dabei zeigte sich, wie wichtig eine Validierung der Ergebnisse aus genomischen Projekten ist. ROS1, welches mit 5,6 % die höchste Mutationsfrequenz hatte, zeigte keine Proteinexpression in Patienten und spielt somit vermutlich keine Rolle in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs. Eine Expression im Tumorgewebe konnte für FGFR3, DDR2, MERTK und AXL gezeigt werden, sodass diese weiter *in-vitro* untersucht wurden.

5.1 Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3)

Mit Hilfe des oben beschriebenen Ansatzes wurde FGFR3 als potentielles therapeutisches Ziel in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs identifiziert. Bis jetzt gibt es keine Studien, die FGFR3 in dieser Tumorentität untersucht haben ¹⁶⁰. In dieser Arbeit wurde FGFR3 sowohl als prognostischer Biomarker, als auch seine Rolle als therapeutische Zielstruktur evaluiert, wobei für letzteres sowohl Wildtyp-FGFR3, als auch die beschriebenen Mutationen überexprimiert und *in-vitro* untersucht wurden.

Die zunächst durchgeführte immunhistochemische Färbung an Geweben von über 500 Patienten, bestehend aus Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen und Rezidiven zeigte, dass FGFR3 im malignen Gewebe exprimiert ist. Im Allgemeinen ließ sich jedoch ein Rückgang der FGFR3 Expression von normaler Mukosa zum Primärtumor und Lymphknotenmetastasen sowie Rezidiven feststellen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen im Blasenkrebs, wo gezeigt werden konnte, dass die FGFR3 Expression mit höherem T-Stadium sowie schlechterer Differenzierung abnahm ²⁶⁵. Im Magenkarzinom war die FGFR3 Expression in undifferenzierten

Tumoren niedriger als in differenzierten ²⁶⁶ und auch im Kolonkarzinom konnte eine verringerte mRNA Expression der FGFR3 IIIb Spleißvariante im Tumor im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe gefunden werden, wohingegen die Expression der FGFR3 IIIc Spleißvariante zunahm ²⁶⁷. Um welche FGFR3 Spleißvariante es sich bei der Abnahme der FGFR3 Expression in der untersuchten Kohorte handelt, ist mit Hilfe der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen nicht unterscheidbar, sollte jedoch in weiteren Studien untersucht werden. Marshall et al. konnten weiterhin anhand von Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs sowie humanen oralen Keratinozyten zeigen, dass die FGFR2 und 3 Expression in Tumoren und nicht-transformiertem oralen Epithel ähnlich ist ¹⁶¹, was die IHC Daten unterstützt. Diese Daten von Marshall et al. sollten jedoch nicht überinterpretiert werden, da nur eine limitierte Anzahl von Zelllinien untersucht wurde.

7,5 % der in dieser Arbeit untersuchten Patienten zeigten eine deutlich höhere FGFR3 Expression als der Rest der Kohorte, sodass in diesen FGFR3 eine größere Bedeutung haben könnte. Von der untersuchten Kohorte war jedoch leider nur wenig Normalgewebe vorhanden, sodass unklar bleibt, ob es tatsächlich einen Anstieg der FGFR3 Expression von normaler Mukosa zum Primärtumor gibt.

Diese Daten verdeutlichen, dass die Bedeutung von FGFR3 im Gegensatz zu FGFR1 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs, wo eine höhere Expression in Tumoren mit schlechterer Differenzierung und Invasionsgrad einhergeht ²⁶⁸, nicht ganz eindeutig ist. Aus diesem Grund wurde FGFR3 *in-vitro* weiter untersucht, um die Bedeutung dieser Rezeptortyrosinkinase in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs zu analysieren. Die Überexpression von FGFR3 IIIb führte dabei zu vermehrter Proliferation in Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs, was von einem pERK1/2 Anstieg begleitet wurde. Diese Beobachtungen stimmen mit der Tatsache überein, dass FGF induzierte RAS-MAPK Aktivierung zu einer gesteigerten Proliferation führen ²⁶⁹. Auch Yuan et al. konnten zeigen, dass die *FGFR3-TACC3* Fusion in Tumoren des Kopf Hals Bereichs die Zellproliferation vermutlich durch Aktivität der FGFR Kinase fördern ¹⁶⁶. In Kolonkarzinomzellen hingegen hatte nur die Überexpression von FGFR3 IIIc und nicht FGFR3 IIIb einen Effekt auf die Proliferation ²⁶⁷. Um zu überprüfen ob FGFR3 IIIc auch in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine Rolle spielt, sollte zunächst die Expression verschiedener FGFR3 Spleißvarianten an einer größeren Anzahl als der hier untersuchten Zelllinien analysiert werden. Bei den hier untersuchten Zelllinien hatte FGFR3 IIIb die höchste Expression und wurde deswegen für die weiteren Untersuchungen verwendet.

In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Proliferation von FGFR3 Überexpressionszellen durch BGJ398 gehemmt werden kann. BGJ398 ist ein oral verfügbarer FGFR1-3 Inhibitor, der sich bereits in klinischen Studien befindet¹¹⁸ und in Blasenkarzinom Xenograft Modellen mit Wildtyp-FGFR3 Expression zum Rückgang des Tumorwachstums führte¹⁶⁸. Dementsprechend lassen sich gewonnen *in-vitro* Daten schnell *in-vivo* validieren und am Patienten Anwendung finden. Dass sich ein signifikanter Unterschied in der Proliferation nur für bestimmte Konzentrationen zeigte, kann damit erklärt werden, dass in höheren Konzentrationen vermutlich eine Inhibition von FGFR2, welches von HSC-3 Zellen exprimiert wird, stattfindet. Im Gegensatz zur Proliferation, war die Migration in HSC-3 Zellen mit FGFR3 Überexpression unverändert. Dass FGFR3 keinen Einfluss auf die Migration in dieser Tumorentität hat, wurde dadurch bestätigt, dass es keinen Unterschied in der Phosphorylierung von FAK, welches eine wichtige Rolle bei der Migration von normalen und Krebszellen spielt²⁷⁰, zwischen FGFR3 Überexpressions- und Kontrollzellen gab. Außerdem konnte die Migration nicht durch BGJ398 gehemmt werden, wobei Konzentrationen benutzt wurden, bei denen der Einfluss auf die Proliferation noch gering war.

Neben Überexpression, sind nicht-synonyme Mutationen ein weiterer Mechanismus durch den Onkogene aktiviert werden können. Aus diesem Grund wurden alle sechs identifizierten „missense“-Mutationen in HSC-3 Zellen überexprimiert und weiter untersucht. Alle Patienten mit *FGFR3* Mutation hatten mindestens eine weitere genomische Veränderung in Genen, die als wichtig in der Tumorgenese bei Tumoren des Kopf-Hals Bereichs beschrieben wurden wie *TP53*, *CDKN2A*, *PIK3CA*, *NOTCH1* und *EGFR*. Diese sind jedoch nicht alle bis heute therapeutisch angreifbar, sodass es wichtig ist auch in diesen Patienten weitere therapeutische Ziele zu identifizieren. Außerdem könnten patientenspezifische Kombinationen an Medikamenten die Effizienz von gezielten Therapien verbessern.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei bei der Bedeutung von *FGFR3* Mutationen in HPV-negativen Patienten, da zur Zeit der Datenanalyse, alle bis auf eine Mutation (p.S249C) in HPV-negativen Tumoren identifiziert wurden. Spätere Studien, die zum Ziel hatten die genomischen Unterschiede zwischen HPV-negativen und –positiven Tumoren zu entschlüsseln konnten die p.S249C in sechs von 51 HPV-positiven Tumoren finden¹⁶², was darauf hinweist, dass diese Mutation eine wichtige Rolle in dieser molekularen Untergruppe spielt. Auch die immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit zeigten eine höhere FGFR3 Expression in HPV-positiven Tumoren. Aus

diesem Grund sollte in weiteren Studien die Bedeutung von FGFR3 in diesen Tumoren näher untersucht werden. Dass 90 % der Patienten mit hoher FGFR3 Expression HPV-negativ waren, verdeutlicht jedoch, dass auch diese Patienten von einer gezielten Anti-FGFR3 Therapie profitieren könnten.

In den in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro* Versuchen hatten FGFR3 Mutationen keinen weiteren Effekt auf die Proliferation im Vergleich zum Wildtyp-Protein in Medium mit 10 % FBS. Unter Serum-reduzierten Bedingungen mit 2 % FBS, die eher die Tumor-Mikroumgebung widerspiegeln, proliferierten alle Zellen mit mutiertem FGFR3 besser als solche mit dem FGFR3 Wildtyp-Protein. Unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen konnte dies nicht festgestellt werden und Zellen mit FGFR3 Mutanten proliferierten immer weniger als solche mit Wildtyp-FGFR3. Daraus lässt sich schließen, dass die beobachteten Effekte vermutlich Liganden- und nicht allgemein Stressvermittelt sind. Im Medium mit 10 % FBS liegt ausreichend Ligand für Wildtyp-FGFR3 vor, wohingegen im Medium mit 2 % FBS die Sättigung nicht mehr erreicht wird und der Einfluss der Mutationen auf die Rezeptoraktivierung deutlicher wird. Die stärkste Proliferation wurde bei HSC-3 Zellen mit der p.S249C (Mutation C) beobachtet. Von dieser Mutation ist bereits bekannt, dass sich über die Cystein-Reste stabile Dimere bilden, sodass es zu einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Signalweiterleitung kommt ¹⁵⁵. Außerdem zeigten NIH-3T3 Zellen, die mit dieser Mutante transduziert wurden, eine verstärkte Fähigkeit Kolonien zu bilden ¹⁵². Es ist jedoch wichtig die identifizierten Mutationen auch in den Tumorentitäten zu untersuchen in denen sie identifiziert wurden. So konnten di Martino et al. zeigen, dass die Expression von FGFR3 Mutanten in immortalisierten normalen humanen Urothelzellen zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 führen, nicht jedoch von AKT und SRC. In NIH-3T3 Zellen hingegen führte die Expression der gleichen FGFR3 Mutanten zur Phosphorylierung von AKT und SRC ¹⁵⁶.

Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen sind wichtige Faktoren, die die Sensitivität oder Resistenz gegenüber niedermolekularen Inhibitoren beeinflussen können. Für FGFR3 p.S249C konnte bereits gezeigt werden, dass diese Mutation zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber BGJ398 ¹⁵² und PD173074 ²⁷¹ führt. In dieser Arbeit wurden FGFR3 Mutationen aus HPV-negativen Patienten weiter untersucht, die vermutlich einen Einfluss auf die Proteinfunktion haben. Die Mutationen E (p.D746H) und F (p.D788N) waren dabei genauso sensitiv wie Wildtyp-FGFR3 gegenüber BGJ398, was zeigt, dass dieses Medikament auch für Patienten mit FGFR3

Mutationen benutzt werden kann. Nichtsdestotrotz zeigte Mutation B (p.S131L) eine erhöhte Resistenz gegenüber BGJ398 im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Dies verdeutlicht, dass *FGFR3* Mutationen einzeln betrachtet werden müssen und nicht alle identifizierten mutierten Proteine generell eine therapeutische Zielstruktur darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit zum ersten Mal umfassend die Rolle von *FGFR3* in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs im Hinblick auf Patientendaten, aber auch funktionell untersucht wurde. Aufgrund der hohen *FGFR3* Expression in einigen Patienten sowie der *in-vitro* gewonnenen Daten von Überexpression von Wildtyp- und mutiertem *FGFR3*, sollte *FGFR3* als therapeutisches Ziel in ausgewählten Patienten weiter verfolgt werden (siehe 5.6).

5.2 Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2)

In dieser Arbeit wurde evaluiert, in wie weit *DDR2* in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs exprimiert wird und sich als therapeutisches Ziel durch Dasatinib inhibieren lässt.

Dabei zeigte die immunhistochemische Analyse eine höhere *DDR2* Expression in allen Tumorstadien im Vergleich zur normalen Mukosa. Dass dies nicht durch gepaarte Proben bestätigt werden konnte, liegt vermutlich an der kleinen Fallzahl. An entsprechenden gepaarten Proben konnte ein Anstieg während der Tumorphase zwar von Primärtumor zum Rezidiv beobachtet werden nicht jedoch zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen. Eine höhere *DDR2* Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs konnte auch von Xu et al. gezeigt werden¹⁹⁶. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit durchgeführten Studie fanden die Autoren eine signifikante Korrelation von hoher *DDR2* Expression mit Tumordifferenzierung und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. Gründe für diese Unstimmigkeiten könnten zum einen die deutlich kleinere Fallzahl bei Xu et al. sein, sowie die manuelle Auswertung im Gegensatz zur automatischen Analyse mit Hilfe der Definiens Software, aber auch z. B. ethnische Unterschiede in den Kohorten. Dennoch lassen beide Studien den Schluss zu, dass *DDR2* in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zu Studien in Brustkrebs¹⁸⁶ und Schilddrüsenkarzinom¹⁸⁵ scheint die *DDR2* Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs kein prognostischer Marker zu sein, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die funktionellen Untersuchungen von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs, zeigten, dass diese Rezeptortyrosinkinase in dieser Tumorentität keinen Einfluss auf die Proliferation hat. Zwar proliferierten FaDu Zellen mit DDR2 Überexpression etwas mehr als Kontrollzellen, jedoch konnte dies nicht durch Ligandenzugabe (Kollagen I) verstärkt werden und auch nicht in HSC-3 Zellen bestätigt werden. Dies unterstützt die Studie von Xu et al., die ebenfalls keinen Einfluss von DDR2 auf die Proliferation in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs finden konnte ¹⁹⁶. Die Behandlung von DDR2 Überexpressionszellen mit Dasatinib hatte nur bei FaDu Zellen auf Kollagen I – beschichteten Platten einen Einfluss auf die Proliferation. Dies unterstreicht die Tatsache, dass die Rolle von DDR2 in der Proliferation abhängig von Zelltyp und dem umgebenden Gewebe ist ¹⁶⁹. Hammerman et al. konnten weiterhin zeigen, dass Dasatinib nur die Proliferation von Lungenkarzinomzelllinien mit DDR2 Mutationen und nicht mit Wildtyp-DDR2 hemmt ¹⁹², was die hier vorliegenden Ergebnisse unterstützt. Es wird jedoch nicht gezeigt, inwieweit die verschiedenen Zelllinien DDR2 exprimieren und sich Sensitivitätsunterschiede dadurch erklären lassen. Bezüglich des verankerungsunabhängigen Wachstums, scheint DDR2 dieses verstärken zu können (FaDu Zellen), aber die alleinige Expression reicht nicht aus um diese Fähigkeit zu induzieren (HSC-3 Zellen). Wie bereits Xu et al. zeigen konnten ¹⁹⁶, führte die Überexpression von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs auch in dieser Arbeit zu einer verstärkten Migration und Invasion. Dies war jedoch in FaDu und HSC-3 Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt. Weiterhin war in FaDu Zellen, bei denen ein größerer Effekt auf die Migration und Invasion als bei HSC-3 Zellen festgestellt wurde, auch die Inhibition dieser beiden Eigenschaften deutlich stärker. Dies deutet darauf hin, dass DDR2 in verschiedenen Tumorzellen tumorigene Eigenschaften unterschiedlich stark fördert. Ob es sich in diesem Fall um den Unterschied Primärtumor (FaDu) oder Metastase (HSC-3) handelt, müsste mit Hilfe größerer angelegter Studien bewiesen werden. Zieht man jedoch die Ergebnisse der immunhistochemischen Daten hinzu, könnte man die Hypothese aufstellen, dass DDR2 beim Metastasieren des Primärtumors wichtig ist, jedoch in den Metastasen selbst eine eher untergeordnete Rolle spielt, da hier die Expression nicht weiter ansteigt. Die Wichtigkeit von DDR2 bei der Metastasenbildung wurde bereits in Melanomzellen in gezeigt ¹⁸¹ und auch in Leberkrebszellen konnte die Migration und Invasion durch small interfering RNA (siRNA) gegen DDR2 inhibiert werden ¹⁸⁹. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass DDR2 Signalwege, die über Kollagen I aktiviert werden, wichtig für EMT sind, wobei EMT ein wichtiger Prozess für die Metastasenbildung bei Tumoren ist ²⁷². Für Brustkrebs wurde

gezeigt, dass DDR2 snail family zinc finger 1 (SNAI1) in Zellen, die EMT durchlaufen haben, stabilisiert und so die Invasion fördert¹⁸⁸.

Um Metastasen in Lymphknoten oder anderen Organen zu bilden, müssen Tumorzellen zunächst in die Lymph- bzw. Blutgefäße invadieren, aber diese auch wieder verlassen können. Hierfür müssen die Zellen an die Gefäße adhären. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Adhäsion an zellkulturbeschichtete Platten, aber auch an Platten mit dem DDR2 Ligand Kollagen I untersucht. Dabei adhärten DDR2 Überexpressionszellen besser an zellkulturbeschichtete Platten, wohingegen es auf den Kollagen I – beschichteten Platten keinen Unterschied gab. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass die Zeit nach der die adhären Zellen gezählt wurden, auf den Kollagenplatten kürzer war und die Zeit nicht ausgereicht hat um DDR2 zu aktivieren, da dies Stunden braucht¹⁷³. Es war jedoch nicht möglich die Adhäsionszeit auf den Kollagenplatten zu verlängern, da dann bereits alle Zellen adhären waren. Die Vorbehandlung mit Dasatinib verringerte die Adhäsion sowohl auf zellkultur- als auch auf Kollagen I –beschichteten Platten in beiden untersuchten Zelllinien. Diese Daten weisen darauf hin, dass DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs für die Adhäsion eine wichtige Rolle spielt. Eine Studie von Kim et al. konnte zeigen, dass DDR2 in Fibroblasten wichtig für die Adhäsion an Kollagen ist²⁷³. Die Adhäsion scheint dabei über eine vermehrte Aktivierung von Integrinen vermittelt zu sein²⁷⁴. Im Gegensatz dazu war die Adhäsion von glatten Gefäß-muskelzellen und Fibroblasten aus *Ddr2*-Knockout Mäusen weder auf Kollagen Typ I noch auf Fibronectin verändert²⁷⁵. In dieser Studie konnte jedoch auch kein Unterschied in der Migration festgestellt werden, was ebenfalls anderen Daten aus der Literatur widerspricht.

Insgesamt deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass DDR2 eine potentielle Zielstruktur in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs darstellt und Dasatinib als Medikament genutzt werden könnte. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass in Lungenkarzinomzellen bereits verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber Dasatinib beschrieben wurden. Zum einen können andere Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR, IGF1R und HER2 nach Behandlung mit Dasatinib hochreguliert werden²⁷⁶. Zum anderen zeigten Beauchamp et al. dass DDR2 p.T654I „Gatekeeper-Mutationen“ mit erhöhter Affinität für ATP nach Behandlung mit Dasatinib auftreten können oder durch Neurofibromin 1 (NF-1) Verlust alternative Signalwege mit erhöhter RAS und ERK Aktivität aktiviert werden können²⁷⁷. Eine Phase II klinische Studie mit dem Ziel Dasatinib in Patienten mit Lungenkarzinom zu evaluieren,

wurden aufgrund der hohen Toxizität und Pleuraergüssen abgebrochen ²⁷⁸. Diese Daten verdeutlichen, dass obwohl sich DDR2 in präklinischen Studien als ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zeigte, die Anwendung am Patienten nicht direkt übertragbar ist. Dies liegt vermutlich daran, dass es sich bei Dasatinib um einen Multikinaseinhibitor handelt und zeigt wie wichtig die Entwicklung eines spezifischen DDR2 Inhibitors ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass DDR2 vor allem für die Metastasierung von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine wichtige Rolle spielt. DDR2 eignet sich als therapeutisches Ziel in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs, für die Anwendung am Patienten wären jedoch vermutlich spezifischere Inhibitoren als Dasatinib besser.

5.3 MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK)

In dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs beschrieben und funktionell untersucht. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die MERTK Expression im Primärtumor, in Lymphknotenmetastasen, aber auch in Rezidiven signifikant über der des Normalgewebes lag. An gepaarten Proben von Normalgewebe und Primärtumor konnte dies bestätigt werden. Wie auch im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom korrelierte die Proteinexpression von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs weder mit Überleben, Tumorstadium oder Differenzierungsgrad ²¹⁷, wohingegen Patienten mit Magenkarzinom bei stärkerer MERTK Expression ein signifikant kürzeres Überleben sowie höhere Tumorstadien zeigten ²²². In der hier untersuchten Kohorte gab es einen leichten Abfall der MERTK Expression vom Primärtumor zu Lymphknotenmetastasen, wohingegen eine Studie im Melanom eine höhere MERTK Expression im metastatischen Tumoren fand ²¹⁹. Dies könnte damit zusammenhängen, dass MERTK in verschiedenen Tumoren wie auch in unterschiedlichen Geweben andere Funktionen hat. So könnte es sein, dass MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs zwar für den Metastasierungsprozess wichtig ist, nicht jedoch in den Metastasen selbst. Insgesamt deuten die Daten der immunohistochemischen Analyse darauf hin, dass MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine wichtige Rolle spielen könnte. Aus diesem Grund wurde MERTK mit Hilfe von Überexpressions-, Knockdown- und Inhibitionsversuchen weiter aufgearbeitet. Die Behandlung von Detroit 562 Zellen mit dem MERTK Inhibitor UNC1062 führte dabei zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der

Phosphorylierung von MERTK, aber auch von totalem MERTK was die Selektivität des Inhibitors zeigt. Dass UNC1062 zu einer Abnahme der Phosphorylierung von MERTK führt, konnte bereits an verschiedenen Tumorzelllinien wie zum Beispiel aus Melanomen, rhabdoiden Tumoren oder der Lunge gezeigt werden. Die beobachteten Effekte auf das totale MERTK waren dabei variabel. Es konnten sowohl Ab- und Zunahmen, aber auch eine gleichbleibende Expression beobachtet werden ^{219,226}.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs vermutlich keine Rolle bei der Proliferation in dieser Tumorentität spielt. HN Zellen mit der MERTK Überexpression proliferierten zwar signifikant mehr als GFP Kontrollzellen, jedoch war dieser Unterschied sehr gering, sodass die biologische Bedeutung fraglich ist. Weiterhin gab es keinen Unterschied in der Viabilität zwischen Zellen mit und ohne Expression von MERTK nach Behandlung mit UNC1062 und auch Zellen mit MERTK Knockdown proliferierten genauso gut wie Kontrollzellen. Obwohl es keine Unterschiede in der Proliferation gab, konnten in verschiedenen Versuchen Zusammenhänge zwischen MERTK und dem Proliferationsmarker pERK gesehen werden. So nahm die Phosphorylierung von ERK in MERTK Überexpressionszellen zu und nach Inhibition mit UNC1062 ab. Der Knockdown von MERTK hingegen führte zu keiner Veränderung im Phosphorylierungsstatus von ERK. Ob MERTK das Tumorzellwachstum beeinflusst und welche Signalwege dabei aktiviert werden, scheint sowohl vom Zelltyp als auch von der Gewebemikroumgebung abzuhängen. Ähnlich wie bei den hier durchgeführten Versuchen, führte in Leukämie Zellen die Aktivierung von MERTK unter anderem zu einer Phosphorylierung von ERK, veränderte jedoch nicht die Proliferation ²⁷⁹. Die Überexpression von MERTK in einer nicht-tumorigenen Brustkrebsepithelzelllinie hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Proliferation ²¹⁶. Im Xenograft Mausmodell hingegen konnte für nicht-kleinzelligen Lungentumoren und Melanome gezeigt werden, dass der Knockdown von MERTK das Tumorstadium vermindert ^{217,219}. Auch im Magenkarzinom führte die Behandlung mit UNC1062 von Tumorzellen, die MERTK exprimieren im Gegensatz zu solchen ohne MERTK Expression zu einer Abnahme der Proliferation. In dieser Studie wurde eine Abnahme von pERK nach UNC1062 Behandlung gesehen, wobei diese sowohl in MERTK-positiven als auch negativen Zelllinien auftrat, sodass nicht klar ist, ob dieser Effekt durch die Inhibition von MERTK zustande kommt ²²².

Hinsichtlich der Behandlung mit UNC1062 konnte in dieser Arbeit weiterhin gezeigt werden, dass diese ab Konzentrationen von 1 μM zu einem Arrest in der G2 Phase

führt. Da dies jedoch sowohl bei MERTK-positiven Detroit 562, als auch bei MERTK-negativen HN Zellen beobachtet wurde, handelt es sich hierbei vermutlich um einen unspezifischen Effekt, der jedoch für beide Zelllinien die verminderte Viabilität mit steigenden UNC1062 Konzentrationen erklärt. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Inhibition und der Knockdown von MERTK keinen Einfluss auf die Apoptose haben. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass pAKT, als Marker für den PI3K/AKT Überlebens-Signalweg nach Überexpression von MERTK nur leicht hochreguliert wurde, MERTK Knockdown keinen Einfluss auf pAKT hatte und die Behandlung mit UNC1062 zu einer verminderten AKT Phosphorylierung führte. Diese Daten stehen eher im Gegensatz zu bisherigen Studien, in denen gezeigt wurde, dass MERTK beim Zellüberleben eine wichtige Rolle spielt. In Melanomzellen wurde gezeigt, dass UNC1062 Behandlung die Apoptose 4-6 fach induziert ²¹⁹. Im Magenkarzinom führte der Knockdown von MERTK dazu, dass sich 3-4 mal mehr Zellen in der apoptotischen Sub-G1 Phase befanden ²²² und auch bei Lungenkarzinomzellen wurde nach MERTK Knockdown ein Anstieg der apoptotischen Zellen von 0,1 auf 35,6 % beobachtet ²¹⁷. Im Astrozytom konnte gezeigt werden, dass Knockdown von MERTK in Verbindung mit Serumentzug den Anteil apoptotischer Zellen von 1,5 auf 5,6 % erhöht ²¹⁸. Diese Daten verdeutlichen jedoch auch, dass der Einfluss von MERTK auf die Apoptose vom Zelltyp und der Gewebeumgebung abhängt und nicht immer gleich stark ist. Weiterhin konnte in diesen Studien ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von AKT und MERTK festgestellt werden. So führte der Knockdown bzw. die Inhibition von MERTK im Astrozytom, beim Magenkarzinom und im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom zu einer Abnahme von pAKT ^{217,218,222}. Eine weitere Studie zu Melanomen konnte zeigen, dass MERTK Überexpression zu einer deutlichen Zunahme und MERTK Knockdown zu einer Abnahme von pAKT führte ²⁸⁰. Vermutlich ist der in dieser Arbeit beobachtete Effekt auf pAKT nicht stark genug um einen Einfluss auf die Apoptose zu haben. Um auszuschließen, dass MERTK keinen Einfluss auf das Zellüberleben in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs hat, müssten jedoch weitere Zelllinien untersucht werden.

Abschließend konnte mit Hilfe verschiedener Ansätze gezeigt werden, dass MERTK die Migration und Invasion von Tumorzellen des Kopf-Hals Bereichs positiv beeinflusst und dies vermutlich über RhoA und nicht über FAK geschieht. Der Einfluss auf die Invasion war dabei in allen Versuchen größer als auf die Migration. MERTK Überexpressionzellen migrierten und invadierten mehr als GFP Kontrollzellen und exprimierten mehr RhoA. Zwar wurde auch FAK hochreguliert, nicht jedoch die phosphorylierte Form. Die Behandlung von MERTK-positiven Zellen

(Detroit 562) mit UNC1062 führte im Gegensatz zu solchen ohne MERTK Expression (HN) zu verminderten Migration und Invasion. 72 Stunden nach Inhibitorbehandlung nahm die RhoA Expression zwar sowohl in Detroit 562 als auch in HN Zellen ab, jedoch war dieser Effekt für die MERTK-positiven Detroit 562 Zellen bereits bei niedrigeren Konzentrationen als bei den MERTK-negativen HN Zellen sichtbar. Auch der konzentrationsabhängige Abfall der pFAK Expression war in Detroit 562 Zellen stärker als in HN Zellen. Hinsichtlich des MERTK Knockdowns konnte ein Effekt auf die Zellmotilität nur bei komplettem Knockdown beobachtet werden, was mit einer stärkeren Abnahme von RhoA als beim inkompletten Knockdown korrelierte. Ein Unterschied in der Phosphorylierung von FAK konnte nicht beobachtet werden. Vermutlich ist daher der Einfluss auf pFAK nach Inhibitorbehandlung eher ein Nebeneffekt, da dies weder bei Überexpression noch bei Knockdown beobachtet wurde. Dass MERTK die Zellmotilität beeinflusst, konnte bereits an verschiedenen Tumoren gezeigt werden. Eine Studie konnte zeigen, dass MERTK Überexpression in einer nicht-tumorigenen Brustkrebsepithelzelllinie die Migration förderte ²¹⁶. In Melanomzellen führt die Behandlung mit UNC1062 zu verminderter Invasion ²¹⁹ und der Knockdown von MERTK inhibierte die Migration ²⁸⁰. Im Glioblastom invadierten MERTK Überexpressionszellen mehr, wohingegen der Knockdown die Migration verminderte ²⁸¹. Bei einer weiteren Studie in dieser Tumorentität führte der Knockdown von MERTK ebenfalls zur verminderten Zellmigration was mit erhöhter pFAK und RhoA Expression einherging ²²⁰. In Tumoren des Kopf-Hals Bereichs scheint RhoA jedoch die Migration zu fördern. RhoA wird im Vergleich zu normalen Keratinozyten vermehrt in Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs exprimiert und auch immunhistochemische Färbungen bestätigten eine höhere RhoA Expression im Tumor als im normalen Gewebe ²⁸². *In-vitro* Versuche konnten weiterhin zeigen, dass der Hyaluronrezeptor CD44 nach Aktivierung über RhoA die Tumorzellmigration in HSC-3 Zellen fördert ²⁸³. Für weitere Studien wäre es interessant, ob noch andere Rho GTPasen bei den MERTK vermittelten Effekten auf die Zellmotilität eine Rolle spielen.

Dass FAK die Zellmigration fördert konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden ²⁸⁴, sodass es sich bei den in Glioblastomen gemachten Beobachtungen vermutlich eher um eine Ausnahme handelt. Ein positiver Zusammenhang zwischen MERTK Aktivierung und FAK Phosphorylierung wurde in nicht-kleinzelligen Lungentumoren beschrieben ²¹⁷. Um abschließend zu klären, ob MERTK auch in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs zu einer Aktivierung von FAK führt, müssten in

weiteren Studien mehr Zelllinien evaluiert werden. Die Daten dieser Arbeit sprechen jedoch eher dagegen.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass MERTK ein potentielles therapeutisches Ziel in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs ist. Sollte diese Strategie in der Praxis Anwendung finden, müsste jedoch sehr genau kontrolliert werden, welche Effekte eine MERTK Inhibition auf das Immunsystem des Patienten hat. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass *Mertk* Knockdown zu Autoimmunität führen kann²¹³. Ob solche Effekte auch bei Kurzzeit MERTK Inhibition im Menschen entstehen können, wurde bisher noch nicht untersucht, da es noch keine MERTK Inhibitoren in klinischen Studien gibt.

5.4 AXL receptor tyrosine kinase (AXL)

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Rezeptortyrosinkinase AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs detailliert untersucht. Dabei wurde erstmals die Expression von AXL nicht nur in Primärtumoren des Kopf-Hals Bereichs sondern auch in Lymphknotenmetastasen und Rezidiven untersucht. Es konnte dabei kein Anstieg der AXL Proteinexpression zwischen normaler Mukosa und Primärtumoren festgestellt werden, jedoch nahm die Expression über Lymphknotenmetastasen bis zum Rezidiv signifikant zu. Diese Daten deuten darauf hin, dass AXL eher später in der Tumorprogression eine Rolle spielt. AXL war in der untersuchten Kohorte kein prognostischer Marker. Bisher gibt es zwei Studien in denen, die AXL Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs untersucht wurde. Die Ergebnisse lassen sich jedoch nicht direkt mit denen dieser Arbeit vergleichen. Giles et al. zeigten, dass hohe mRNA Level von AXL mit schlechterem Überleben korreliert, wobei hier von allen Patienten gepaartes Normalgewebe vorhanden war, mit dessen Hilfe die Einteilung in hohe und niedrige Expression vorgenommen wurde²⁴⁷. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kohorte waren jedoch nur neun gepaarte Fälle vorhanden, sodass eine solche Auswertung nicht möglich war. Brand et al. untersuchten die Proteinexpression von AXL in Primärtumoren und fanden ebenfalls eine Korrelation mit schlechterem Überleben²⁸⁵. Diese Studie umfasste jedoch nur 63 Patienten und kaum Normalgewebe und wurde manuell und nicht semi-automatisch ausgewertet.

Weiterhin gibt es auch andere Tumorentitäten in denen die Ergebnisse hinsichtlich AXL Expression und Überleben divergent sind. Linger et al. zeigten in nicht-

kleinzelligen Lungenkarzinomen, dass die Expression von AXL im Tumor weder mit Überleben noch Stadium oder Differenzierungsgrad korreliert ²¹⁷ was mit den Ergebnissen dieser Studie übereinstimmt. Im Gegensatz dazu fanden Shinh et al. eine höhere AXL Expression in höheren Tumorstadien ²⁴³.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von AXL bei verschiedenen tumorigenen Eigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich kein Einfluss auf die Proliferation bei AXL Überexpression oder BGB324 Behandlung, wohingegen Zellen mit AXL Knockdown mehr als Kontrollzellen proliferierten. Der Einfluss von AXL auf die Proliferation ist bereits in verschiedenen Tumoren beschrieben und scheint von verschiedenen Faktoren wie Tumorart, Mikroumgebung und Art der Untersuchung abzuhängen. In Pankreas- und Lebertumoren hemmt der Knockdown von AXL mit siRNA die Proliferation ^{238,239}. In nicht-kleinzelligen Lungentumoren führt ein sh-vermittelter Knockdown von AXL zu keiner Abnahme der Koloniezahl im Soft-Agar sondern nur zu einer verringerten Größe der Kolonien ²¹⁷. Eine Überexpression von AXL zeigte weder im Gliom noch im Melanom *in-vitro* einen Effekt auf die Proliferation ^{240,280} und bestätigt damit die Ergebnisse dieser Arbeit. Eine Arbeit von Brand et al. aus diesem Jahr konnte zeigen, dass die Behandlung mit BGB324 von verschiedenen Tumorzellen des Kopf-Hals Bereichs mit AXL Expression im Gegensatz zu solchen ohne AXL zu einer verringerten Proliferation führt ²⁸⁵. Dabei wurden nach 72 bis 96 Stunden vergleichbare IC₅₀ Werte wie in der vorliegenden Arbeit gefunden. Weiterhin wurde auch hier kein Zusammenhang zwischen der Stärke der AXL Expression und dem Effekt des Inhibitors festgestellt. Als Kontrollzellen wurden Zellen ohne AXL Expression untersucht, während die in dieser Arbeit verwendeten SCC-25 Zellen eine schwache AXL Expression zeigten, die die beobachtete Sensitivität gegenüber BGB324 erklären könnte.

Dass ein sh-vermittelter Knockdown von AXL zu einer gesteigerten Proliferation führt, wurde bis jetzt noch nicht beobachtet. Dieser Effekt wurde in drei verschiedenen Zelllinien mit zwei unterschiedlichen shRNAs beobachtet. Die Daten weisen darauf hin, dass Doxycyclin einen inhibitorischen Einfluss auf die Proliferation hat, den die Zellen mit AXL Knockdown jedoch besser kompensieren können und somit die Proliferation im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen nicht so stark beeinflusst oder sogar vermehrt wird. Die Reduktion von pERK in Kontrollzellen und der Anstieg in Knockdown Zellen bestätigen dies. In verschiedenen Tumoren ist bekannt, dass Rezeptortyrosinkinasen sich gegenseitig bei Inhibition kompensieren können. Ein wichtiges Beispiel hierbei ist AXL selbst, dass in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

nach EGFR Inhibition hochreguliert wird ^{246,247}. Ein weiterer Resistenzmechanismus nach Anti-EGFR Behandlung sind die Aktivierung von HER2 und 3 sowie MET ^{124,286}. FGFR Inhibition kann ebenfalls durch HER2 und MET in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs kompensiert werden ²⁸⁷. Weiterhin wurde in Lungentumoren gezeigt, dass die Behandlung von Zelllinien mit DDR2 Mutationen mit Dasatinib zu einer vermehrte Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen IGF1R, EGFR und HER2 führte ²⁷⁶. Eine Studie mit 20 Zelllinien aus verschiedenen Tumoren konnte zeigen, dass die Inhibition von AXL in der Hälfte der Fälle zu einer Hochregulation von pHER3 führte ²⁸⁸.

Mit Hilfe eines phospho-RTK Arrays wurde in dieser Arbeit pFGFR3 als möglicher Kompensationsmechanismus nach AXL Inhibition identifiziert, konnte jedoch in nachfolgenden Western Blots nicht bestätigt werden. Ähnliche Probleme hatten auch Torka et al. bei ihrer Studie, in der sie nach AXL Inhibition neben der Hochregulation von pHER3 auch eine Hochregulation der Phosphorylierung von HER2, IGF1R und des Insulin Rezeptors im phospho-RTK Array beobachten konnten, sich jedoch nur die Phosphorylierung von HER3 in Western Blots nachweisen ließ. Weiterhin zeigt diese Studie, dass die Änderung in der Phosphorylierung anderer Rezeptortyrosinkinasen unterschiedlich ist, je nachdem ob AXL mit Hilfe eines niedermolekularen Inhibitors oder siRNA inhibiert wird ²⁸⁸. Von daher ist es ebenfalls möglich, dass die Inhibition von AXL unterschiedliche Effekte nach Behandlung mit siRNA oder shRNA hat. Brand et al. benutzten bei ihren Versuchen siRNA und konnten so den antiproliferativen Effekt von BGB324 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs bestätigen ²⁸⁵ im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit ein induzierbarer sh-vermittelter Knockdown etabliert.

Neben anderen Rezeptortyrosinkinasen sind weitere Mechanismen beschrieben, die zu Resistenzen gegenüber gezielten Therapien führen können. In Patienten mit Kolonkarzinom, die mit Panitumumab, einem monoklonalen Antikörper gegen EGFR, behandelt wurden, konnten beispielsweise Mutationen im Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) Gen nachgewiesen werden ²⁸⁹. *In-vitro* konnte an nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen gezeigt werden, dass Resistenzen gegen EGFR Inhibitoren über NF- κ B oder STAT3 vermittelt werden können ^{290,291} während in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs beispielsweise in Hochregulation von IL-6 bei Erlotinib Resistenz gefunden wurde ²⁹². Um herauszufinden welche Mechanismen zu der vermehrten Proliferation von AXL Knockdown Zellen führen müssten dementsprechend weitere Untersuchungen wie z. B. DNA-Microarrays und/oder

umfassende Phosphoproteom Analysen durchgeführt werden. Weiterhin müsste untersucht werden, wann und ob diese Resistenzen auch nach Behandlung mit BGB324 auftreten.

Die Migration von Tumorzellen des Kopf-Hals Bereichs konnte sowohl nach AXL Inhibition mit BGB324 als auch durch den vollständigen Knockdown von AXL gehemmt werden. Eine verringerte Invasion wurde nur nach Behandlung mit BGB324 festgestellt, nicht jedoch nach AXL Knockdown. Grund hierfür könnten, wie auch bei der gesteigerten Proliferation, Kompensationsmechanismen der Zelle nach AXL Knockdown sein, die sich auf andere Signalwege als die für die Migration auswirken. Eine fördernde Rolle von AXL in der Migration und Invasion wurde bereits an verschiedenen Tumoren beschrieben wie z. B. in Ovarial- und Lungentumoren, Tumoren des Kopf-Hals Bereichs und im Neuroblastom^{243,285,293,294}. Dabei wurde dies in Neuroblastomen durch FAK vermittelt²⁹³, wobei in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs, wie in dieser Arbeit gezeigt, eher RhoA eine Rolle zu spielen scheint, welches sowohl nach Knockdown als auch nach BGB342 Behandlung herunter reguliert war. Ein Zusammenhang zwischen AXL und RhoA wurde bis jetzt noch nicht gezeigt, aber wie bereits erwähnt scheint RhoA in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs für die Migration wichtig^{282,283}.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass AXL vor allem in späteren Tumorstadien eine Rolle spielt und hier ein wichtiger therapeutischer Angriffspunkt sein könnte. Überprüft werden müssten in diesen Fall, ob und welche Resistenzen bei einer Anti-AXL Therapie auftreten um geeignete Kombinationstherapien zu finden.

5.5 Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der Rezeptortyrosinkinasen FGFR3, DDR2, MERTK und AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs untersucht und ob diese potentielle therapeutische Ziele sind. Es konnte festgestellt werden, dass die vier Rezeptortyrosinkinasen wahrscheinlich in unterschiedlichen Tumorstadien wichtig sind. Beispielsweise nahm die FGFR3 Expression während der Tumorprogression ab, die von AXL hingegen wurde stärker. Daher ist es wichtig bei der Wahl der Therapie das Tumorstadium bei Diagnose in Betracht zu ziehen. Während eine FGFR3 Inhibition in frühen Stadien sinnvoll erscheint, könnte in späteren Stadien eine Anti-AXL Therapie besser sein. Natürlich müsste in jedem Fall

berücksichtigt werden, ob die Patienten eine Expression der entsprechenden Rezeptortyrosinkinasen im Tumor haben.

Auch wenn keine Korrelation zwischen der Expression von FGFR3, DDR2, MERTK und AXL gefunden wurde, gab es Patienten, die mehrere Rezeptortyrosinkinasen exprimierten. Dies konnte ebenfalls an Zelllinien wie z. B. Detroit 562 Zellen bestätigt werden, die eine AXL und MERTK Expression zeigten. Hier würde sich eine Kombinationstherapie anbieten zumal in dieser Arbeit gezeigt wurde dass unterschiedliche Rezeptortyrosinkinasen bei verschiedenen onkogenen Prozessen beteiligt sind. Während FGFR3 eine Rolle in der Proliferation spielte, schienen DDR2, MERTK und AXL für die Zellmotilität wichtig. Durch eine gleichzeitige Inhibition könnten so verschiedene tumorigene Eigenschaften unterdrückt werden.

5.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mit Hilfe genomischer und immunhistochemischer Ansätze ausgewählten Rezeptortyrosinkinasen FGFR3, DDR2, MERTK und AXL neue therapeutische Ziele in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs sein könnten. Bei den hier durchgeführten Versuchen handelt es sich um *in-vitro* Versuche, die mit Hilfe von *in-vivo* Versuchen bestätigt werden müssten. Dabei könnten zum einen Maus Xenograft Modelle gewählt werden oder das Zebrafisch Modell. Letztere haben den Vorteil der deutlich kürzeren Versuchsdauer von einer Woche und einer einfachen Zugabe der Inhibitoren in das Wasser. Durch die verkürzte Versuchsdauer wäre es möglich auch die induzierbaren Knockdownzellen zu verwenden, sodass man hier unerwünschte Nebeneffekte aufgrund des dauerhaften Knockdowns umgehen könnte.

Im Weiteren müssten jedoch ebenfalls die genau diese Nebeneffekte untersucht werden, da es sehr wahrscheinlich ist, dass eine dauerhafte Inhibition oder Knockdown von Rezeptortyrosinkinasen zu Resistenzen führt, wie in dieser Arbeit bereits durch die vermehrte Proliferation von AXL Knockdown Zellen deutlich wurde. Um dies zu überprüfen, könnten DNA-Microarrays von Zelllinien gemacht werden, die entweder gegen bestimmte Inhibitoren resistent sind oder in denen eine bestimmte Rezeptortyrosinkinase dauerhaft herunter reguliert wurde. Hierbei wäre es weiterhin wichtig zu wissen, ob es sich immer um die gleichen Resistenzmechanismen handelt oder ob diese nur in bestimmten Zellen auftreten. Dies würde die Grundlage für spätere sinnvolle Kombinationstherapien geben. In diesem

Zusammenhang wäre es ebenfalls von Bedeutung herauszufinden, in wie weit eine Kombination von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren mit bereits in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs verwendeten Chemotherapeutika wirkt und ob so die verwendeten Dosen verringert werden könnten. Dies wurde für MERTK bereits in anderen Tumoren gezeigt.

Auch wurde in dieser Arbeit weder die Rolle der entsprechenden Liganden noch der Phosphatasen untersucht, die beide wichtig für Regulierung der Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen sind. Hier könnte zunächst die Expression im Gewebe von Patienten analysiert werden um herauszufinden ob beispielsweise eine hohe Rezeptorexpression mit einer hohen Ligandenexpression einhergeht. Dies könnte die Bedeutung der entsprechenden Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs noch verdeutlichen. Anschließend könnte überprüft werden, ob z. B. im Fall von FGFR3 die Mutationen zu einer veränderten Ligandenbindung führen oder diese nicht mehr von den entsprechenden Phosphatasen dephosphoryliert werden können und somit die Signalweiterleitung verändert ist.

Abschließend ist es wichtig zu beachten welchen Effekt eine Behandlung mit niedermolekularen Inhibitoren auf andere Zellen in der Gewebeumgebung des Tumors und im restlichen Körper hat. Wie bereits erwähnt spielt z. B. MERTK eine wichtige Rolle im Immunsystem, sodass hier Nebenwirkungen wie Autoimmunerkrankungen entstehen könnten. Diese Gefahr könnte jedoch durch Kombinationstherapien mit verringerten Dosen der einzelnen Medikamente gesenkt werden.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Rezeptortyrosinkinasen als therapeutische Angriffspunkte in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs, wobei durch genomische und immunhistochemische Untersuchungen an Patientengewebe FGFR3, DDR2, MERTK und AXL identifiziert und mit Hilfe von *in-vitro* Experimenten analysiert wurden.

Die Überexpression von AXL erhöhte die Migration und Invasion, nicht jedoch die Proliferation. Der Knockdown von AXL führte zu einer vermehrten Proliferation, wobei der zu Grunde liegende Mechanismus weiter untersucht werden muss. Die Behandlung von AXL-positiven Zellen mit dem selektiven AXL Inhibitor BGB324 führte zu einer verminderten Migration und Invasion, wobei nur erstes durch AXL Knockdown bestätigt werden konnte. Die Bedeutung von AXL in dieser Tumorentität müsste dementsprechend weiter analysiert werden.

Erstmals wurde die Rolle von FGFR3 in dieser Tumorentität untersucht. FGFR3 Überexpression führte zu einem Proliferationsanstieg, was durch den FGFR1-3-Inhibitor BGJ398 gehemmt werden konnte. Insgesamt wurden sechs verschiedene FGFR3 „missense“-Mutationen in insgesamt 2 % der Patienten gefunden. Zellen mit Überexpression dieser Mutanten zeigten unter Serumentzug eine bessere Proliferation als solche mit dem Wildtyp Protein. Weiterhin zeigten zwei FGFR3 Mutanten (p.D764H, p.D788N) eine gleich gute und nur eine (p.S131L) schlechtere Sensitivität gegenüber BGJ398 im Vergleich zum Wildtyp Protein.

Die Überexpression von DDR2 hatte keinen Einfluss auf die Proliferation, förderte jedoch das verankerungsunabhängige Wachstum, die Adhäsion, Migration und Invasion. Erstmals wurde gezeigt, dass der Multikinaseinhibitor Dasatinib die letzten drei Eigenschaften in Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs *in-vitro* hemmt.

Weiterhin wurde zum ersten Mal die Rolle von MERTK in dieser Tumorentität untersucht. MERTK Überexpression hatte keinen Einfluss auf die Proliferation, steigerte jedoch die Migration und Invasion. Durch den MERTK Inhibitor UNC1062 sowie MERTK Knockdown konnte in MERTK-positiven Zelllinien sowohl die Migration als auch Invasion gehemmt werden, wobei MERTK die Zellmotilität über RhoA beeinflusste.

Zusammenfassend zeigen diese Daten erstmals, dass FGFR3, DDR2 und MERTK bei verschiedenen tumorigenen Eigenschaften in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs eine Rolle spielen und vielversprechende Ansätze für eine gezielte Therapie sind.

A. Anhang

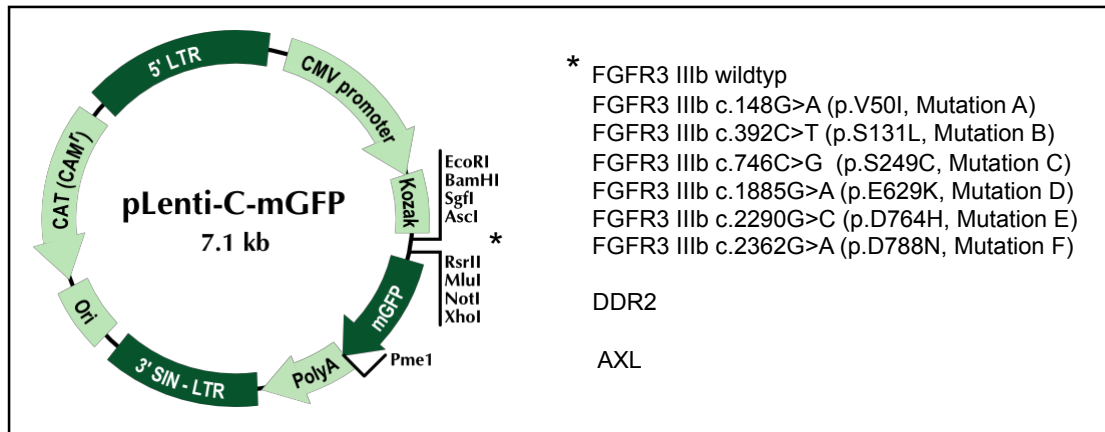


Abbildung A-1. pLenti-C-mGFP Vektor.

Dieser Vektor wurde für die Überexpression von FGFR3 IIIb Wildtyp und Mutanten, DDR2 und AXL verwendet.

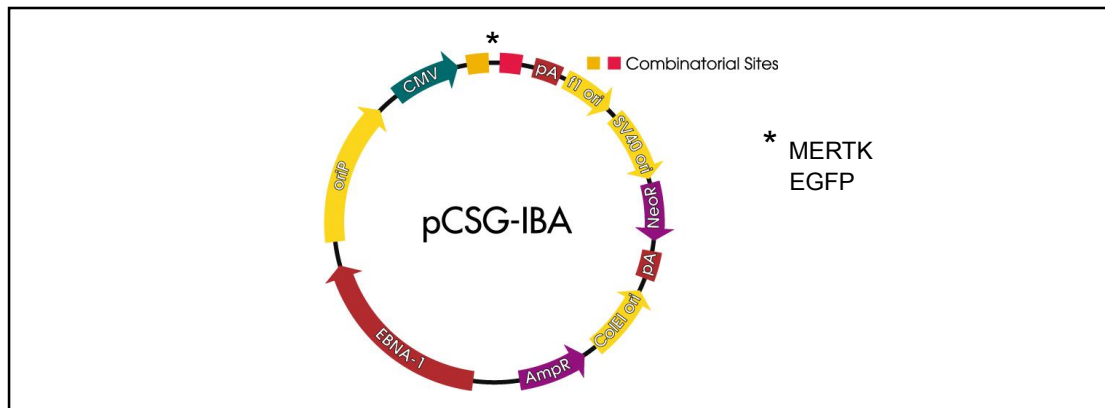


Abbildung A-2. p-CSG-IBAw1 Vektor.

Dieser Vektor wurde für die Überexpression von MERTK und EGFP verwendet.

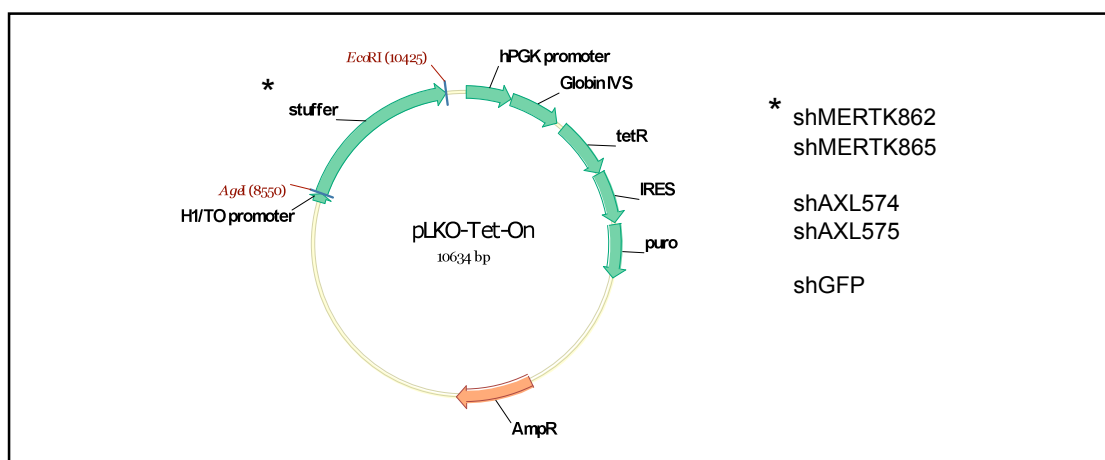


Abbildung A-3. pLKO-Tet-On Vektor.

Dieser Vektor wurde für den induzierbaren Knockdown von MERTK (shMERTK862 und 865) und AXL (shAXL574 und 575) verwendet. Als Kontrolle diente shGFP. Der "stuffer" wurde durch die entsprechenden Sequenzen ersetzt.

B. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Lokalisationen von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	1
Abbildung 1-2. Entwicklung eines invasiven Tumors aus der normalen Mukosa mit einhergehenden molekularen Veränderungen.	3
Abbildung 1-3. Signalwege, die von Wachstumsfaktoren über Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden.	10
Abbildung 1-4. Wirkungsweise von Rezeptortyrosinkinasen.	11
Abbildung 1-5. Verschiedene Möglichkeiten Rezeptortyrosinkinasen zu inhibieren am Beispiel von VEGF/VEGFR.	13
Abbildung 1-6. Struktur von FGFRs und deren Signalwege.	16
Abbildung 1-7. Struktur von DDR2.	18
Abbildung 1-8. Struktur von MERTK.	21
Abbildung 1-9. Genomische- und Proteinstruktur.	23
Abbildung 4-1. Expression verschiedener Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	61
Abbildung 4-2. Phospho-RTK Array für 584A2 und Detroit 562 Zellen.	62
Abbildung 4-3. Expression von FGFR3, DDR2, MERTK und AXL in Zelllinien von Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	63
Abbildung 4-4. FGFR3 Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	65
Abbildung 4-5. Expression von FGFR3 Isoformen in Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	66
Abbildung 4-6. Funktion von FGFR3 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	67
Abbildung 4-7. FGFR3 Mutationen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	69
Abbildung 4-8. Proliferation von FGFR3-Mutanten Überexpressionszellen.	70
Abbildung 4-9. BGJ398 Behandlung von FGFR3 Überexpressionszellen.	72
Abbildung 4-10. DDR2 Expression in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	73
Abbildung 4-11. Funktion von DDR2 in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.	75
Abbildung 4-12. Sensitivität von FaDu und HSC-3 Zellen gegenüber Dasatinib.	76

Abbildung 4-13. Effekt von Dasatinib auf die Proliferation von DDR2 Überexpressionszellen.	77
Abbildung 4-14. Effekt von Dasatinib auf Migration, Invasion und Adhäsion von DDR2 Überexpressionszellen.....	79
Abbildung 4-15. MERTK Expression in Tumoren des Kopf-Hals Breichs.....	80
Abbildung 4-16. Funktion von MERTK in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.....	82
Abbildung 4-17. MERTK Inhibition und Knockdown.	83
Abbildung 4-18. Einfluss von MERTK auf die Proliferation.....	84
Abbildung 4-19. Einfluss von MERTK Inhibition und Knockdown auf AKT und ERK.	85
Abbildung 4-20. Einfluss von MERTK Inhibition und Knockdown auf Apoptose und Zellzyklus.	86
Abbildung 4-21. Einfluss von MERTK auf die Migration und Invasion.....	88
Abbildung 4-22. Einfluss von MERTK Inhibition und Knockdown auf FAK und RhoA.	89
Abbildung 4-23. AXL Expression in Tumoren des Kopf-Hals Breichs.	91
Abbildung 4-24. Funktion von AXL in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.....	92
Abbildung 4-25. Einfluss von AXL Inhibition mit BGB324 auf die Proliferation.....	93
Abbildung 4-26. Einfluss von AXL Knockdown auf die Proliferation.	94
Abbildung 4-27. Einfluss von AXL Inhibition und Knockdown auf AKT und ERK.	95
Abbildung 4-28. Phospho-RTK Array für AXL Knockdown- und Kontrollzellen.	96
Abbildung 4-29. Einfluss von AXL Knockdown auf pEGFR und pFGFR3.	97
Abbildung 4-30. Einfluss von AXL auf die Migration und Invasion.....	98
Abbildung 4-31. Einfluss von AXL Inhibition und Knockdown auf FAK und RhoA.....	99
Abbildung A-1. pLenti-C-mGFP Vektor.....	118
Abbildung A-2. p-CSG-IBAw1 Vektor.	118
Abbildung A-3. pLKO-Tet-On Vektor.	118

C. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1. Verwendete Geräte und Software.....	26
Tabelle 2-2. Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 2-3. Chemikalien und Reagenzien	28
Tabelle 2-4. Reaktionskits.....	31
Tabelle 2-5. Sammelgel für Gelelektrophorese	32
Tabelle 2-6. Trenngele für Gelelektrophorese	32
Tabelle 2-7. Nukleinsäuren	34
Tabelle 2-8. Plasmide	36
Tabelle 2-9. Antikörper.....	37
Tabelle 2-10. Zelllinien.....	39
Tabelle 2-11. Patientenkollektiv	40
Tabelle 4-1. Mutationsfrequenz von Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	60
Tabelle 4-2. Expression von ausgewählten Rezeptortyrosinkinasen in Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	62
Tabelle 4-3. Expression von phosphorylierten Rezeptortyrosinkinasen in verschiedenen Zelllinien aus Tumoren des Kopf-Hals Bereichs.....	63
Tabelle 4-4. FGFR3 IIIb Mutationen in Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals Bereichs	68

D. Literaturverzeichnis

1. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA. Cancer J. Clin.* **60**, 277–300
2. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 9–22 (2011).
3. Bagan, J. V & Scully, C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol.* **44**, 103–8 (2008).
4. Mao, L., Hong, W. K. & Papadimitrakopoulou, V. A. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell* **5**, 311–316 (2004).
5. Forastiere, a, Koch, W., Trotti, a & Sidransky, D. Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1890–1900 (2001).
6. Cancer of the Oral Cavity and Pharynx - SEER Stat Fact Sheets. at <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>>
7. Pulte, D. & Brenner, H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist* **15**, 994–1001 (2010).
8. Koch, W. M., Lango, M., Sewell, D., Zahurak, M. & Sidransky, D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* **109**, 1544–51 (1999).
9. Head and Neck Cancer - National Cancer Institute. at <<http://www.cancer.gov/types/head-and-neck>>
10. Chaturvedi, A. K. *et al.* Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J. Clin. Oncol.* **29**, 4294–301 (2011).
11. Näsman, A. *et al.* Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: An epidemic of viral-induced carcinoma? *Int. J. Cancer* **125**, 362–366 (2009).
12. Gillison, M. L. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin. Oncol.* **31**, 744–54 (2004).
13. Head and Neck Cancer Treatment Protocols: Treatment Protocols. at <<http://emedicine.medscape.com/article/2006216-overview>>
14. Gleber-Netto, F. O. *et al.* Molecular events in relapsed oral squamous cell carcinoma: Recurrence vs secondary primary tumor. *Oral Oncol.* (2015). doi:10.1016/j.oraloncology.2015.04.016

15. Carvalho, A., Magrin, J. & Kowalski, L. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. *Oral Dis.* **9**, 112–118 (2003).
16. Yanamoto, S. *et al.* Clinicopathological risk factors for local recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **41**, 1195–200 (2012).
17. Koo, B. S., Lim, Y. C., Lee, J. S. & Choi, E. C. Recurrence and salvage treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* **42**, 789–94 (2006).
18. Hsu, S.-H. *et al.* Survival analysis of patients with oral squamous cell carcinoma with simultaneous second primary tumors. *Head Neck* **35**, 1801–7 (2013).
19. Esposito, E. D., Bevilacqua, L. & Guadagno, M. T. Multiple primary malignant neoplasm in patients with laryngeal carcinoma. *J. Surg. Oncol.* **74**, 83–6 (2000).
20. Jacobs, C. *et al.* A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.* **10**, 257–263 (1992).
21. Clavel, M. *et al.* Randomized comparison of cisplatin, methotrexate, bleomycin and vincristine (CABO) versus cisplatin and 5-fluorouracil (CF) versus cisplatin (C) in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: A phase III study of the EORTC Head a. *Ann. Onc.* **5**, 521–526 (1994).
22. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
23. Mountzios, G., Rampias, T. & Psyrri, A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Ann. Oncol.* **25**, 1889–900 (2014).
24. 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 Oncol.* **45**, 361–85 (2009).
25. Smeets, S. & Brakenhoff, R. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. *Anal. Cell. ...* (2009).
26. Chung, C. H. *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* **5**, 489–500 (2004).
27. Belbin, T. J. *et al.* Molecular Classification of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Using cDNA Microarrays. *Cancer Res.* **62**, 1184–1190 (2002).

28. Califano, J. *et al.* Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer : Implications for Field Cancerization Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer : Implications for. 2488–2492 (1996).
29. Agrawal, N. *et al.* Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **333**, 1154–7 (2011).
30. Stransky, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science (80-.)*. **333**, 1157–1160 (2012).
31. Pickering, C. R. *et al.* Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov.* **3**, 770–81 (2013).
32. Sun, W. *et al.* Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer. *Cancer Res.* **74**, 1091–104 (2014).
33. Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–9 (2013).
34. Skinner, H. D. *et al.* TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. *Clin. Cancer Res.* **18**, 290–300 (2012).
35. Brennan, J. *et al.* ASSOCIATION BETWEEN CIGARETTE SMOKING AND MUTATION OF THE p53 GENE IN SQUAMOUS-CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK. *N. Engl. J. Med.* **332**, 712–717 (1995).
36. Temam, S. *et al.* p53 Gene Status as a Predictor of Tumor Response to Induction Chemotherapy of Patients With Locoregionally Advanced Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *J. Clin. Oncol.* **18**, 385– (2000).
37. Ganly, I., Soutar, D. S., Brown, R. & Kaye, S. B. p53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. *Br. J. Cancer* **82**, 392–8 (2000).
38. Vousden, K. H. & Lane, D. P. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 275–83 (2007).
39. Reed, A. L. *et al.* High Frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) Inactivation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 3630–3633 (1996).
40. Molinolo, A. a. *et al.* Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* **45**, 324–334 (2009).
41. Grandis, J. R. & Tweardy, D. J. Elevated Levels of Transforming Growth Factor {alpha} and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* **53**, 3579–3584 (1993).

42. Morris, L. G. T. *et al.* Genomic dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/PI3K pathway reveals frequent deletion of the EGFR phosphatase PTPRS in head and neck cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19024–9 (2011).
43. Lui, V. W. Y. *et al.* Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov.* **3**, 761–9 (2013).
44. Cohen, J. *et al.* Attenuated transforming growth factor beta signaling promotes nuclear factor-kappaB activation in head and neck cancer. *Cancer Res.* **69**, 3415–24 (2009).
45. Janku, F. *et al.* PIK3CA mutation H1047R is associated with response to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors in early-phase clinical trials. *Cancer Res.* **73**, 276–84 (2013).
46. Lee, J. I. *et al.* Loss of PTEN Expression as a Prognostic Marker for Tongue Cancer. *Arch. Otolaryngol. Neck Surg.* **127**, 1441 (2001).
47. Squarize, C. H., Castilho, R. M. & Pinto, D. S. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J. Oral Pathol. Med.* **31**, 379–384 (2002).
48. Molinolo, A. A. *et al.* Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4964–73 (2007).
49. Amornphimoltham, P. *et al.* Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4029–37 (2004).
50. Massarelli, E. *et al.* Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer* **104**, 2430–6 (2005).
51. Yu, Z. *et al.* Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **16**, 553–8 (2007).
52. Patel, V. *et al.* Antitumor activity of UCN-01 in carcinomas of the head and neck is associated with altered expression of cyclin D3 and p27(KIP1). *Clin. Cancer Res.* **8**, 3549–60 (2002).
53. Sekulic, A. *et al.* A Direct Linkage between the Phosphoinositide 3-Kinase-AKT Signaling Pathway and the Mammalian Target of Rapamycin in Mitogen-stimulated and Transformed Cells. *Cancer Res.* **60**, 3504–3513 (2000).
54. Amornphimoltham, P. *et al.* Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* **65**, 9953–61 (2005).
55. Hay, N. & Sonenberg, N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **18**, 1926–45 (2004).

56. Sorrells, D. L., Ghali, G. E., De Benedetti, A., Nathan, C.-A. & Li, B. D. . Progressive amplification and overexpression of the eukaryotic initiation factor 4E gene in different zones of head and neck cancers. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **57**, 294–299 (1999).
57. Grandis, J. R. *et al.* Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4227–4232 (2000).
58. Grandis, J. R. *et al.* Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth In vitro. *J. Clin. Invest.* **102**, 1385–92 (1998).
59. Squarize, C. H., Castilho, R. M., Sriuranpong, V., Pinto, D. S. & Gutkind, J. S. Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **8**, 733–46 (2006).
60. Sriuranpong, V. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor-independent Constitutive Activation of STAT3 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Mediated by the Autocrine/Paracrine Stimulation of the Interleukin 6/gp130 Cytokine System. *Cancer Res.* **63**, 2948–2956 (2003).
61. Lai, S. Y. *et al.* Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* **24**, 4442–9 (2005).
62. Weber, A. *et al.* SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* **24**, 6699–708 (2005).
63. Leeman, R. J., Lui, V. W. Y. & Grandis, J. R. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. (2006). at
64. Masuda, M. *et al.* Constitutive Activation of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Correlates with Cyclin D1 Overexpression and May Provide a Novel Prognostic Marker in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **62**, 3351–3355 (2002).
65. Xi, S., Zhang, Q., Gooding, W. E., Smithgall, T. E. & Grandis, J. R. Constitutive Activation of Stat5b Contributes to Carcinogenesis in Vivo. *Cancer Res.* **63**, 6763–6771 (2003).
66. Huntley, S. P. *et al.* Attenuated type II TGF-beta receptor signalling in human malignant oral keratinocytes induces a less differentiated and more aggressive phenotype that is associated with metastatic dissemination. *Int. J. Cancer* **110**, 170–6 (2004).
67. Wang, D. Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis* **18**, 2285–2290 (1997).

68. Peng, H., Shintani, S., Kim, Y. & Wong, D. T. Loss of p12CDK2-AP1 expression in human oral squamous cell carcinoma with disrupted transforming growth factor-beta-Smad signaling pathway. *Neoplasia* **8**, 1028–36 (2006).
69. Bornstein, S. *et al.* Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *J. Clin. Invest.* **119**, 3408–19 (2009).
70. Lu, S.-L. *et al.* Loss of transforming growth factor-beta type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes Dev.* **20**, 1331–42 (2006).
71. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–62 (2008).
72. Bindhu, O. S., Ramadas, K., Sebastian, P. & Pillai, M. R. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* **28**, 916–925 (2006).
73. Sawhney, M. *et al.* Expression of NF-kappaB parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. *Int. J. Cancer* **120**, 2545–56 (2007).
74. Leethanakul, C., Patel, V. & Gillespie, J. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture. *Oncogene* (2000). at
75. Rhee, C., Sen, M., Lu, D., Wu, C. & Leoni, L. Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* (2002).
76. Marsit, C. J., McClean, M. D., Furniss, C. S. & Kelsey, K. T. Epigenetic inactivation of the SFRP genes is associated with drinking, smoking and HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **119**, 1761–1766 (2006).
77. Worsham, M. J. *et al.* Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **132**, 668–77 (2006).
78. Chang, K.-W. *et al.* Alterations of Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **29**, 223–226 (2000).
79. Roepman, P. *et al.* An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* **37**, 182–186 (2005).
80. Kupferman, M. E. *et al.* TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* **29**, 2047–59 (2010).

81. Kusakawa, J., Sasaguri, Y., Shima, I., Kameyama, T. & Morimatsu, M. Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am. J. Clin. Pathol.* **99**, 18–23 (1993).
82. O-charoenrat, P., Rhys-Evans, P. H. & Eccles, S. A. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors Correlates With Invasion and Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Arch. Otolaryngol. Neck Surg.* **127**, 813–820 (2001).
83. Kyzas, P. A., Cunha, I. W. & Ioannidis, J. P. A. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1434–40 (2005).
84. Gillison, M. L. Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 709–720 (2000).
85. Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342–50 (2002).
86. Lechner, M. *et al.* Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. *Genome Med.* **5**, 49 (2013).
87. Rusan, M., Li, Y. Y. & Hammerman, P. S. Genomic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Cancers. *Clin. Cancer Res.* 2009–2020 (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1101
88. Seiwert, T. Y. *et al.* Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical Cancer Research* (2014). doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3310
89. Pugh, T. J. *et al.* Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. *Nature* **488**, 106–10 (2012).
90. An, J. *et al.* Inactivation of the CYLD deubiquitinase by HPV E6 mediates hypoxia-induced NF-kappaB activation. *Cancer Cell* **14**, 394–407 (2008).
91. Lawrence, M. S. *et al.* Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576–582 (2015).
92. Lemmon, M. a. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
93. Wehrman, T. *et al.* Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**, 25–38 (2007).
94. Garrett, T. P. J. *et al.* Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor α . *Cell* **110**, 763–773 (2002).

95. Pellegrini, L., Burke, D. F., von Delft, F., Mulloy, B. & Blundell, T. L. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* **407**, 1029–34 (2000).
96. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203–212 (1990).
97. Nolen, B., Taylor, S. & Ghosh, G. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell* **15**, 661–75 (2004).
98. Schlessinger, J. & Lemmon, M. A. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE* **2003**, RE12 (2003).
99. Katz, M., Amit, I. & Yarden, Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1161–76 (2007).
100. Reynolds, A. R., Tischer, C., Verveer, P. J., Rocks, O. & Bastiaens, P. I. H. EGFR activation coupled to inhibition of tyrosine phosphatases causes lateral signal propagation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 447–53 (2003).
101. Harris, R. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* **284**, 2–13 (2003).
102. Von Zastrow, M. & Sorkin, A. Signaling on the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 436–45 (2007).
103. Amit, I. *et al.* A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* **39**, 503–12 (2007).
104. Paul, M. K. & Mukhopadhyay, A. K. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int. J. Med. Sci.* **1**, 101–115 (2004).
105. Hojjat-Farsangi, M. Small-Molecule Inhibitors of the Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 13768–13801 (2014).
106. Slamon, D. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (80-.)*. **235**, 177–182 (1987).
107. Nakahara, M. *et al.* A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* **115**, 1090–5 (1998).
108. Marcucci, G., Haferlach, T. & Döhner, H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol.* **29**, 475–86 (2011).
109. Du, Y. & Grandis, J. R. Receptor-type protein tyrosine phosphatases in cancer. *Chin. J. Cancer* **34**, 61–9 (2015).
110. Sastry, S. K. & Elferink, L. A. Checks and balances: interplay of RTKs and PTPs in cancer progression. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 435–40 (2011).

111. Shawver, L. K., Slamon, D. & Ullrich, A. Smart drugs: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* **1**, 117–123 (2002).
112. Reichert, J. M. & Valge-Archer, V. E. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 349–56 (2007).
113. Chow, L. Q. M. & Eckhardt, S. G. Sunitinib: From Rational Design to Clinical Efficacy. *J. Clin. Oncol.* **25**, 884–896 (2007).
114. Mammakarzinom der Frau — Onkopedia. at <<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@view/html/index.html>>
115. Specenier, P. & Vermorcken, J. B. Cetuximab: its unique place in head and neck cancer treatment. *Biologics* **7**, 77–90 (2013).
116. Bean, J. *et al.* Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors Associated with a Novel T854A Mutation in a Patient with EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **14**, 7519–7525 (2008).
117. Engelman, J. A. *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **316**, 1039–43 (2007).
118. Brooks, a. N., Kilgour, E. & Smith, P. D. Molecular pathways: Fibroblast growth factor signaling: A new therapeutic opportunity in cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1855–1862 (2012).
119. Chau, C. H. & Figg, W. D. Aflibercept in pediatric solid tumors: moving beyond the trap. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4868–71 (2012).
120. Markovic, A. & Chung, C. H. Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **12**, 1149–59 (2012).
121. Koutcher, L. *et al.* Concurrent cisplatin and radiation versus cetuximab and radiation for locally advanced head-and-neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **81**, 915–22 (2011).
122. Bonner, J. a *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* **354**, 567–578 (2006).
123. Sok, J. C. *et al.* Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5064–73 (2006).
124. Wheeler, D. L. *et al.* Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* **27**, 3944–56 (2008).
125. Brand, T. M. *et al.* AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res.* **74**, 5152–64 (2014).

126. Hoellein, A. *et al.* Aurora kinase inhibition overcomes cetuximab resistance in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncotarget* **2**, 599–609 (2011).
127. Bernier, J., Bentzen, S. M. & Vermorken, J. B. Molecular therapy in head and neck oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 266–277 (2009).
128. Elferink, L. a & Resto, V. a. Receptor-tyrosine-kinase-targeted therapies for head and neck cancer. *J. Signal Transduct.* **2011**, 982879 (2011).
129. Holz, C. *et al.* Epithelial-mesenchymal-transition induced by EGFR activation interferes with cell migration and response to irradiation and cetuximab in head and neck cancer cells. *Radiother. Oncol.* **101**, 158–64 (2011).
130. Goerner, M., Seiwert, T. Y. & Sudhoff, H. Molecular targeted therapies in head and neck cancer - An update of recent developments -. *Head Neck Oncol.* **2**, 8 (2010).
131. Gandhi, M. D. & Agulnik, M. Targeted treatment of head and neck squamous-cell carcinoma: potential of lapatinib. *Onco. Targets. Ther.* **7**, 245–51 (2014).
132. Friedrich, R. E., Hagel, C. & Bartel-Friedrich, S. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in primary and metastatic undifferentiated carcinoma of the head and neck: a possible target of immunotherapy. *Anticancer Res.* **30**, 1641–3 (2010).
133. Barnes, C. J., Ohshiro, K., Rayala, S. K., El-Naggar, A. K. & Kumar, R. Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4291–9 (2007).
134. Study of IMC-A12, Alone or in Combination With Cetuximab, in Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma (MSCC) of the Head and Neck. at <(http://www.clinicaltrials.gov/, Identifier NCT00617734).>
135. Kim, C.-H. *et al.* c-Met expression as an indicator of survival outcome in patients with oral tongue carcinoma. *Head Neck* **32**, 1655–64 (2010).
136. Burtneß, B., Bauman, J. E. & Galloway, T. Novel targets in HPV-negative head and neck cancer: overcoming resistance to EGFR inhibition. *Lancet. Oncol.* **14**, e302–9 (2013).
137. Seiwert, T. Y. *et al.* The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **69**, 3021–31 (2009).
138. Knowles, L. M. *et al.* HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3740–50 (2009).
139. Comoglio, P. M., Giordano, S. & Trusolino, L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 504–16 (2008).

140. Göke, F. *et al.* FGFR1 expression levels predict BGJ398-sensitivity of FGFR1-dependent head and neck squamous cell cancers. *Clin. Cancer Res.* (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3357
141. Kupferman, M. E. *et al.* TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* **29**, 2047–59 (2010).
142. Lui, V. W. Y. *et al.* Frequent mutation of receptor protein tyrosine phosphatases provides a mechanism for STAT3 hyperactivation in head and neck cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1114–9 (2014).
143. Giefing, M. *et al.* High resolution ArrayCGH and expression profiling identifies PTPRD and PCDH17/PCH68 as tumor suppressor gene candidates in laryngeal squamous cell carcinoma. *Genes. Chromosomes Cancer* **50**, 154–66 (2011).
144. Cheung, A. K. L. *et al.* Functional Analysis of a Cell Cycle-Associated, Tumor-Suppressive Gene, Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type G, in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Res.* **68**, 8137–8145 (2008).
145. Mohammadi, M., Olsen, S. K. & Ibrahimi, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 107–37 (2005).
146. Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), transcript v - Nucleotide - NCBI. at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_022965.3>
147. Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R. & Mohammadi, M. Structural Basis for FGF Receptor Dimerization and Activation. *Cell* **98**, 641–650 (1999).
148. Eswarakumar, V. P., Lax, I. & Schlessinger, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 139–149 (2005).
149. Turner, N. & Grose, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 116–29 (2010).
150. L'&Hôte, C. G. M. & Knowles, M. a. Cell responses to FGFR3 signalling: Growth, differentiation and apoptosis. *Exp. Cell Res.* **304**, 417–431 (2005).
151. Cappellen, D. *et al.* Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat. Genet.* **23**, 18–20 (1999).
152. Liao, R. G. *et al.* Inhibitor-sensitive FGFR2 and FGFR3 mutations in lung squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **73**, 5195–5205 (2013).
153. Kalff, A. & Spencer, A. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J.* **2**, e89 (2012).
154. Liu, X. *et al.* Clinical significance of fibroblast growth factor receptor-3 mutations in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Genet. Mol. Res.* **13**, 1109–20 (2014).

155. d'Avis, P. Y. *et al.* Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations responsible for the lethal skeletal dysplasia thanatophoric dysplasia type I. *Cell Growth Differ.* **9**, 71–8 (1998).
156. Di Martino, E., L'Hôte, C. G., Kennedy, W., Tomlinson, D. C. & Knowles, M. A. Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signaling and cellular transformation in a cell type- and mutation-specific manner. *Oncogene* **28**, 4306–16 (2009).
157. Williams, S. V, Hurst, C. D. & Knowles, M. A. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 795–803 (2013).
158. Parker, B. C. *et al.* The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma. *J. Clin. Invest.* **123**, 855–65 (2013).
159. Capelletti, M. *et al.* Identification of recurrent FGFR3-TACC3 fusion oncogenes from lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **20**, 6551–8 (2014).
160. Ipenburg, N. A. *et al.* Fibroblast Growth Factor Receptor Family Members as Prognostic Biomarkers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *Target. Oncol.* (2015). doi:10.1007/s11523-015-0374-9
161. Marshall, M. E. *et al.* Fibroblast growth factor receptors are components of autocrine signaling networks in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5016–5025 (2011).
162. Seiwert, T. Y. *et al.* Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **21**, 632–41 (2015).
163. Lawrence, M. S. *et al.* Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576–582 (2015).
164. Yan, Z. *et al.* Constitutive activating mutation of the FGFR3b in oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* **117**, 166–168 (2005).
165. 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. *Int. J. Cancer* **120**, 2058–2059; author reply 2060 (2007).
166. Yuan, L. *et al.* Recurrent FGFR3-TACC3 fusion gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **15**, 1613–21 (2014).
167. Gavine, P. R. *et al.* AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res.* **72**, 2045–56 (2012).
168. Guagnano, V. *et al.* Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J. Med. Chem.* **54**, 7066–83 (2011).

169. Valiathan, R. R., Marco, M., Leitinger, B., Kleer, C. G. & Fridman, R. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 295–321 (2012).
170. Alves, F. Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: differential expression in human colon cancer cell lines. *FASEB J.* **15**, 1321–1323 (2001).
171. Carafoli, F. & Hohenester, E. Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1834**, 2187–2197 (2013).
172. Abdulhussein, R., Koo, D. H. H. & Vogel, W. F. Identification of disulfide-linked dimers of the receptor tyrosine kinase DDR1. *J. Biol. Chem.* **283**, 12026–33 (2008).
173. Vogel, W., Gish, G. D., Alves, F. & Pawson, T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell* **1**, 13–23 (1997).
174. Leitinger, B. & Kwan, A. P. L. The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix Biol.* **25**, 355–64 (2006).
175. Ikeda, K. *et al.* Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen. *J. Biol. Chem.* **277**, 19206–12 (2002).
176. Alves, F. *et al.* Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene* **10**, 609–18 (1995).
177. Vogel, W. F., Abdulhussein, R. & Ford, C. E. Sensing extracellular matrix: An update on discoidin domain receptor function. *Cell. Signal.* **18**, 1108–1116 (2006).
178. Zhang, Y. *et al.* An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 604–17 (2011).
179. Zurakowski, H., Gagnon, A., Landry, A., Layne, M. D. & Sorisky, A. Discoidin domain receptor 2 impairs insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Horm. Metab. Res.* **39**, 575–81 (2007).
180. Labrador, J. P. *et al.* The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Rep.* **2**, 446–52 (2001).
181. Badiola, I., Villacé, P., Basaldua, I. & Olaso, E. Downregulation of discoidin domain receptor 2 in A375 human melanoma cells reduces its experimental liver metastasis ability. *Oncol. Rep.* **26**, 971–978 (2011).
182. Su, J. *et al.* Discoidin domain receptor 2 is associated with the increased expression of matrix metalloproteinase-13 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *Mol. Cell. Biochem.* **330**, 141–52 (2009).

183. Xu, L. *et al.* Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 2663–73 (2007).
184. Willenbrock, K., Kupperts, R. & Renné, C. Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. ... (2006).
185. Rodrigues, R. *et al.* Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas. *Oncol. Rep.* **18**, 917–926 (2007).
186. Ren, T., Zhang, J., Zhang, J., Liu, X. & Yao, L. Increased expression of discoidin domain receptor 2 (DDR2): a novel independent prognostic marker of worse outcome in breast cancer patients. *Med. Oncol.* **30**, 397 (2013).
187. Taube, J. H. *et al.* Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15449–54 (2010).
188. Zhang, K. *et al.* The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* **15**, 677–87 (2013).
189. Park, J.-W. *et al.* Downregulation of discoidin domain receptor 2 decreases tumor growth of hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2015). doi:10.1007/s00432-015-1967-5
190. Ford, C. E. *et al.* Expression and mutation analysis of the discoidin domain receptors 1 and 2 in non-small cell lung carcinoma. *Br. J. Cancer* **96**, 808–14 (2007).
191. Rikova, K. *et al.* Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* **131**, 1190–203 (2007).
192. Hammerman, P. S. *et al.* Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* **1**, 78–89 (2011).
193. Ding, L. *et al.* Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **455**, 1069–75 (2008).
194. Davies, H. *et al.* Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res.* **65**, 7591–5 (2005).
195. Chua, H.-H. *et al.* Upregulation of discoidin domain receptor 2 in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* **30**, 427–36 (2008).
196. Xu, J. *et al.* Overexpression of DDR2 contributes to cell invasion and migration in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **15**, 612–22 (2014).

197. Li, Y., Lu, X., Ren, X. & Ding, K. Small Molecule Discoidin Domain Receptor Kinase Inhibitors and Potential Medical Applications. *J. Med. Chem.* 150121153744003 (2015). doi:10.1021/jm5012319
198. Iqbal, N. & Iqbal, N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother. Res. Pract.* **2014**, 357027 (2014).
199. Lindauer, M. & Hochhaus, A. Dasatinib. *Recent Results Cancer Res.* **201**, 27–65 (2014).
200. Day, E. *et al.* Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur. J. Pharmacol.* **599**, 44–53 (2008).
201. Siddiqui, K. *et al.* Actinomycin D Identified as an Inhibitor of Discoidin Domain Receptor 2 Interaction with Collagen through an Insect Cell Based Screening of a Drug Compound Library. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 136–141 (2009).
202. Verma, a., Warner, S. L., Vankayalapati, H., Bearss, D. J. & Sharma, S. Targeting Axl and Mer Kinases in Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 1763–1773 (2011).
203. Sather, S. *et al.* A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood* **109**, 1026–33 (2007).
204. Graham, D. K., Dawson, T. L., Mullaney, D. L., Snodgrass, H. R. & Earp, H. S. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ.* **5**, 647–57 (1994).
205. Graham, D. K. *et al.* Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene* **10**, 2349–59 (1995).
206. Chen, J., Carey, K. & Godowski, P. J. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* **14**, 2033–9 (1997).
207. Prasad, D. *et al.* TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol. Cell. Neurosci.* **33**, 96–108 (2006).
208. Caberoy, N. B., Zhou, Y. & Li, W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J.* **29**, 3898–910 (2010).
209. Caberoy, N. B., Alvarado, G., Bigcas, J.-L. & Li, W. Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *J. Cell. Physiol.* **227**, 401–7 (2012).
210. Cummings, C. T., DeRyckere, D., Earp, H. S. & Graham, D. K. Molecular pathways: MERTK signaling in cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5275–5280 (2013).
211. Graham, D. K., DeRyckere, D., Davies, K. D. & Earp, H. S. The TAM family: phosphatidylserine-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 769–785 (2014).

212. Camenisch, T. D., Koller, B. H., Earp, H. S. & Matsushima, G. K. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J. Immunol.* **162**, 3498–503 (1999).
213. Cohen, P. L. *et al.* Delayed Apoptotic Cell Clearance and Lupus-like Autoimmunity in Mice Lacking the c-mer Membrane Tyrosine Kinase. *J. Exp. Med.* **196**, 135–140 (2002).
214. Lu, Q. & Lemke, G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* **293**, 306–11 (2001).
215. Paolino, M. *et al.* The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. *Nature* **507**, 508–12 (2014).
216. Nguyen, K.-Q. N. *et al.* Overexpression of MERTK Receptor Tyrosine Kinase in Epithelial Cancer Cells Drives Efferocytosis in a Gain-of-Function Capacity. *J. Biol. Chem.* 0–28 (2014). doi:10.1074/jbc.M114.570838
217. Linger, R. M. A. *et al.* Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene* **32**, 3420–31 (2013).
218. Keating, A. K. *et al.* Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases in astrocytoma cells leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 1298–1307 (2010).
219. Schlegel, J. *et al.* MERTK receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in melanoma. *J. Clin. Invest.* **123**, 2257–2267 (2013).
220. Rogers, A. E. J. *et al.* Mer receptor tyrosine kinase inhibition impedes glioblastoma multiforme migration and alters cellular morphology. *Oncogene* **31**, 4171–81 (2012).
221. Graham, D. K. *et al.* Ectopic expression of the proto-oncogene Mer in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2662–9 (2006).
222. Yi, J. H. *et al.* MerTK is a novel therapeutic target in gastric cancer. *Oncotarget* (2015).
223. Png, K. J., Halberg, N., Yoshida, M. & Tavazoie, S. F. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* **481**, 190–4 (2012).
224. Wu, Y.-M., Robinson, D. R. & Kung, H.-J. Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 7311–20 (2004).
225. Knubel, K. H. *et al.* MerTK inhibition is a novel therapeutic approach for glioblastoma multiforme. *Oncotarget* **5**, 1338–51 (2014).
226. Liu, J. *et al.* UNC1062, a new and potent Mer inhibitor. *Eur. J. Med. Chem.* **65**, 83–93 (2013).

-
227. Zhang, W. *et al.* UNC2025, a Potent and Orally Bioavailable MER/FLT3 Dual Inhibitor. *J. Med. Chem.* (2014). doi:10.1021/jm500749d
228. Angelillo-Scherrer, A. & Frutos, P. de. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat. Med.* (2001).
229. Neubauer, A. *et al.* Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* **84**, 1931–1941 (1994).
230. Fridell, Y. *et al.* Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 135–145 (1996).
231. Sainaghi, P. & Castello, L. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J. Cell. ...* (2005).
232. Goruppi, S., Ruaro, E., Varnum, B. & Schneider, C. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4442–4453 (1997).
233. Hasanbasic, I., Cuerquis, J., Varnum, B. & Blostein, M. D. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H1207–13 (2004).
234. Budagian, V. *et al.* Soluble Axl is generated by ADAM10-dependent cleavage and associates with Gas6 in mouse serum. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9324–39 (2005).
235. Seitz, H. M., Camenisch, T. D., Lemke, G., Earp, H. S. & Matsushima, G. K. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J. Immunol.* **178**, 5635–42 (2007).
236. Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B. A. & Lemke, G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**, 1124–36 (2007).
237. Lemke, G. & Rothlin, C. V. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 327–336 (2008).
238. Koorstra, J.-B. M. *et al.* The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 618–626 (2014).
239. He, L. *et al.* Differential expression of Axl in hepatocellular carcinoma and correlation with tumor lymphatic metastasis. *Mol. Carcinog.* **49**, 882–91 (2010).
240. Vajkoczy, P. *et al.* Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5799–5804 (2006).

241. Tai, K.-Y., Shieh, Y.-S., Lee, C.-S., Shiah, S.-G. & Wu, C.-W. Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF-kappaB and Brg-1. *Oncogene* **27**, 4044–55 (2008).
242. Liu, L. *et al.* Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res.* **69**, 6871–8 (2009).
243. Shinh, Y.-S. *et al.* Expression of Axl in Lung Adenocarcinoma and Correlation with Tumor Progression. *Neoplasia* **7**, 1058–1064 (2005).
244. Byers, L. A. *et al.* 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. *Clin. Cancer Res.* **19**, 279–90 (2013).
245. Zhang, Z. *et al.* Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat. Genet.* **44**, 852–60 (2012).
246. Brand, T. M. *et al.* AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res.* **74**, 5152–64 (2014).
247. Giles, K. M. *et al.* Axl Mediates Acquired Resistance of Head and Neck Cancer Cells to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 2541–2558 (2013).
248. Elkabets, M. *et al.* AXL Mediates Resistance to PI3K α Inhibition by Activating the EGFR/PKC/mTOR Axis in Head and Neck and Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Cell* **27**, 533–546 (2015).
249. Mahadevan, D. *et al.* A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* **26**, 3909–19 (2007).
250. Holland, S. J. *et al.* Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res.* **65**, 9294–303 (2005).
251. Korshunov, V. A. Axl-dependent signalling: a clinical update. *Clin. Sci.* **122**, 361–368 (2012).
252. A Study of BGB324 in Combination With Erlotinib in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. at <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02424617?term=BGB324&rank=2>>
253. Multicenter Open-label Study of BGB324 as a Single Agent and in Combination With Cytarabine in Patients With AML - Full Text View - ClinicalTrials.gov. at <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02488408?term=BGB324&rank=1>>
254. Johannessen, C. M. *et al.* COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* **468**, 968–72 (2010).

255. Momose, F. *et al.* Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* **18**, 391–395 (1989).
256. Kawamata, H. *et al.* 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. *Int. J. Cancer* **70**, 120–7 (1997).
257. Peterson, W. D., Stulberg, C. S. & Simpson, W. F. A permanent heteroploid human cell line with type B glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **136**, 1187–91 (1971).
258. Rangan, S. R. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* **29**, 117–21 (1972).
259. Rheinwald, J. G. & Beckett, M. A. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **41**, 1657–63 (1981).
260. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–74 (1977).
261. Riss, T. L., Niles, A. L. & Minor, L. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. *Assay Guid. Man.* 1–23 (2004).
262. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, pl1 (2013).
263. Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2**, 401–4 (2012).
264. Argiris, A., Karamouzis, M. V, Raben, D. & Ferris, R. L. Head and neck cancer. *Lancet* **371**, 1695–1709 (2008).
265. Tomlinson, D. C., Baldo, O., Hamden, P. & Knowles, M. A. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J. Pathol.* **213**, 91–98 (2007).
266. Murase, H. *et al.* Prognostic significance of the co-overexpression of fibroblast growth factor receptors 1, 2 and 4 in gastric cancer. *Mol. Clin. Oncol.* **2**, 509–517 (2014).
267. Sonvilla, G. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration. *Br. J. Cancer* **102**, 1145–1156 (2010).
268. Hase, T. *et al.* Correlation of basic fibroblast growth factor expression with the invasion and the prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **35**, 136–9 (2006).
269. Katoh, M. & Nakagama, H. FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med. Res. Rev.* **34**, 280–300 (2014).

270. Zhao, X. & Guan, J.-L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 610–615 (2011).
271. Miyake, M. *et al.* Selective Tyrosine Kinase Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor-3 (FGFR3), Inhibits Cell Proliferation of Bladder Cancer Carrying the FGFR3 Gene Mutation along with Up-Regulation of p27 / Kip1 and G 1 / G 0 Arrest. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 795–802 (2010).
272. Walsh, L. A., Nawshad, A. & Medici, D. Discoidin domain receptor 2 is a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition. *Matrix Biol.* **30**, 243–7 (2011).
273. Kim, D. *et al.* Discoidin domain receptor 2 regulates the adhesion of fibroblasts to 3D collagen matrices. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 1113–8 (2013).
274. Xu, H. *et al.* Discoidin domain receptors promote $\alpha 1\beta 1$ - and $\alpha 2\beta 1$ -integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation. *PLoS One* **7**, e52209 (2012).
275. Hou, G., Wang, D. & Bendeck, M. P. Deletion of discoidin domain receptor 2 does not affect smooth muscle cell adhesion, migration, or proliferation in response to type I collagen. *Cardiovasc. Pathol.* **21**, 214–8
276. Bai, Y. *et al.* Adaptive Responses to Dasatinib-Treated Lung Squamous Cell Cancer Cells Harboring DDR2 Mutations. *Cancer Res.* **74**, 7217–7228 (2014).
277. Beauchamp, E. M. *et al.* Acquired resistance to dasatinib in lung cancer cell lines conferred by DDR2 gatekeeper mutation and NF1 loss. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 475–82 (2014).
278. Brunner, A. M. *et al.* Treatment-related toxicities in a phase II trial of dasatinib in patients with squamous cell carcinoma of the lung. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1434–7 (2013).
279. Guttridge, K. L. *et al.* Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation. *J. Biol. Chem.* **277**, 24057–66 (2002).
280. Tworkoski, K. A. *et al.* MERTK controls melanoma cell migration and survival and differentially regulates cell behavior relative to AXL. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 527–41 (2013).
281. Wang, Y. *et al.* Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* **32**, 872–82 (2013).
282. Abraham, M. T. *et al.* Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope* **111**, 1285–1289 (2001).
283. Bourguignon, L. Y. W., Gilad, E., Brightman, A., Diedrich, F. & Singleton, P. Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C γ -Ca $^{2+}$ signaling, and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 14026–14040 (2006).

-
284. Zhao, X. & Guan, J.-L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 610–615 (2011).
285. Brand, T., Iida, M. & Stein, A. AXL is a logical molecular target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer ...* (2015). at <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2015/04/20/1078-0432.CCR-14-2648.short>>
286. Yonesaka, K. *et al.* Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci. Transl. Med.* **3**, 99ra86 (2011).
287. Singleton, K. R. *et al.* A receptor tyrosine kinase network composed of fibroblast growth factor receptors, epidermal growth factor receptor, v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, and hepatocyte growth factor receptor drives growth and survival of head and neck. *Mol. Pharmacol.* **83**, 882–93 (2013).
288. Torke, R. *et al.* Activation of HER3 interferes with antitumor effects of axl receptor tyrosine kinase inhibitors: Suggestion of combination therapy. *Neoplasia (United States)* **16**, 301–318 (2014).
289. Mirone, G., Shukla, A. & Marfe, G. Signaling mechanisms of resistance to EGFR- and Anti-Angiogenic Inhibitors cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2015). doi:10.1016/j.critrevonc.2015.08.012
290. Galvani, E. *et al.* NF- κ B drives acquired resistance to a novel mutant-selective EGFR inhibitor. *Oncotarget* **5**, (2015).
291. Tang, J. *et al.* Continuous exposure of non-small cell lung cancer cells with wild-type EGFR to an inhibitor of EGFR tyrosine kinase induces chemoresistance by activating STAT3. *Int. J. Oncol.* **46**, 2083–95 (2015).
292. Stanam, A., Love-Homan, L., Joseph, T. S., Espinosa-Cotton, M. & Simons, A. L. Upregulated interleukin-6 expression contributes to erlotinib resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Oncol.* **9**, 1371–83 (2015).
293. Li, Y., Wang, X., Bi, S., Zhao, K. & Yu, C. Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity in human neuroblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 461–6 (2015).
294. Rankin, E. B. *et al.* AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer. *Cancer Res.* **70**, 7570–9 (2010).

E. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Sven Perner für die angenehme Zusammenarbeit, sowie die wissenschaftliche Betreuung und Förderung mit der Freiheit eigene Ideen verfolgen zu können, bedanken. Vielen Dank für die Möglichkeit auf verschiedenen Kongressen wichtige Erfahrungen zu sammeln.

Prof. Dr. Walter Witke danke ich für das Interesse an meiner Doktorarbeit und die freundliche Übernahme des Zweitgutachters.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen weiteren Gutachtern PD Dr. Jutta Kirfel und Prof. Dr. Ulf Meißner.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Angela Queisser nicht nur für die tolle Zusammenarbeit und die vielen angeregten Diskussion in den letzten Jahren, sondern auch für die Freundschaft und die vielen gemeinsamen Erlebnisse innerhalb und außerhalb des Labors.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Johannes Brägelmann für die Zusammenarbeit mit regen Diskussionen im letzten Jahr bedanken sowie für die Beantwortung aller Fragen zur Statistik.

Bei Mario Deng bedanke ich mich für die Unterstützung bei allen beruflichen und privaten informatischen Fragestellungen.

Ein großes Dankeschön geht an Christine Sanders, Britta Thewes und Hannah Billig für die tolle Zusammenarbeit im letzten Jahr und die Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Wenzel Vogel für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, die Labor-Organisation und die entspannte Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ich möchte mich weiterhin bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Perner für angenehme Arbeitsatmosphäre und die schönen Zeiten während und nach der Arbeit bedanken.

Andreas Dolf und Peter Wurst aus der Flow Cytometry Core Facility möchte ich für die methodische Unterstützung beim Zellen sortieren danken.

Bei allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Bonn sowie den weiteren Arbeitsgruppen im Biomedizinischen Zentrum bedanke ich mich für die Unterstützung und Zusammenarbeit.

Meinen Freunden und vor allem meinem Mitbewohner danke ich für die offenen Ohren und die gemeinsamen Erlebnisse der letzten Jahre, die mich so manchen Ärger vergessen ließen und die Zeit meiner Doktorarbeit unvergesslich machen.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für die aufbauenden Worte bedanken und dafür, dass ich mich jederzeit auf ihre Hilfe und Unterstützung verlassen kann. Meinem Bruder danke ich dafür, dass er immer für mich da ist.

Bei meinem Freund bedanke ich mich für seine Unterstützung und Geduld sowie die Aufmunterungen in den letzten Jahren.

F. Aktive Konferenzbeiträge

- 17.06.2015 - 19.09.2015 7th Mildred Scheel Cancer Conference
Königswinter bei Bonn:
Posterpräsentation „ Receptor Tyrosine Kinases as
Novel Therapeutic Targets in Head and Neck
Squamous Cell Carcinoma“
- 28.05.2015 - 31.05.2015 99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Pathologie, Frankfurt am Main:
Vortrag „Rezeptor-Tyrosinkinase als neue
therapeutische Ziele in Plattenepithelkarzinomen des
Kopf-Hals-Bereichs“
- 21.03.2015 - 27.03.2015 United States & Canadian Academy of Pathology
(USCAP), Annual Meeting
Boston:
Posterpräsentation „ Receptor Tyrosine Kinases as
Novel Therapeutic Targets in Head and Neck
Squamous Cell Carcinoma“
- 05.07.2014 - 08.07.2014 23rd Biennial Congress of the European Association
for Cancer Research (EACR), München:
Posterpräsentation „ Receptor Tyrosine Kinases as
Novel Therapeutic Targets in Head and Neck
Squamous Cell Carcinoma“
- 31.05.2012 – 03.06.2012 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Pathologie, Berlin:
Posterpräsentation „Amplification of Fibroblast Growth
Factor Receptor 1 (FGFR1) in Pancreatic Ductal
Adenocarcinoma“

G. Publikationen

von Mässenhausen A*, Sanders C*, Brägelmann J, Konantz M, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Göke F, Franzen A, Lengerke C, Perner S
Targeting DDR2 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Dasatinib
manuscript in preparation

*) contributed equally

von Mässenhausen A*, Sandes C*, Thewes B, Deng M, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Göke F, Franzen A, Heasley L, Brägelmann J*, Perner S*

MERTK is a therapeutic target in Head and Neck Cancer
manuscript in preparation

*) contributed equally

von Mässenhausen A, Deng M, Billig H, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Schröck A, Bootz F, Göke F, Franzen A, Heasley L, Brägelmann J, Perner S
Evaluation of FGFR3 as a therapeutic target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Targeted Oncology, manuscript submitted

Göke F, Franzen A, Hinz TK, Marek LA, Yoon P, Sharma R, Bode M, **von Maessenhausen A**, Lankat-Buttgereit B, Göke A, Golletz C, Kirsten R, Boehm D, Vogel W, Kleczko EK, Eagles JR, Hirsch FR, Van Bremen T, Bootz F, Schroeck A, Kim J, Tan AC, Jimeno A, Heasley LE, Perner S

FGFR1 Expression Levels Predict BGJ398 Sensitivity of FGFR1-Dependent Head and Neck Squamous Cell Cancers.

Clinical Cancer Research 2015 May

Boehm D, **von Mässenhausen A**, Perner S

Analysis of Receptor Tyrosine Kinase Gene Amplification on the Example of FGFR1
Methods in Molecular Biology 2015;1233:67-79.

Marek L, Hinz T, **von Mässenhausen A**, Olszewski K, Kleczko E, Böhm D, Weiser-Evans M, Nemenoff R, Hoffmann H, Warth A, Gozgit J, Perner S, Heasley L

Non-Amplified FGFR1 is a Growth Driver in Malignant Pleural Mesothelioma Cells

Molecular Cancer Research 2014, June

von Mässenhausen A, Franzen A, Heasley L, Perner S

FGFR1 as a novel prognostic and predictive biomarker in squamous cell cancers of the lung and the head and neck area.

Ann Transl Med 2013;1(3):23, Editorial

Göke F, Göke A, **von Mässenhausen A**, Franzen A, Sharma R, Kirsten R, Böhm D, Kristiansen G, Stenzinger A, Wynes M, Hirsch FR, Weichert W, Heasley L, Buettner R, Perner S

Fibroblast Growth Factor Receptor 1 as a Putative Therapy Target in Colorectal Cancer.

Digestion 2013;88:172-181

Lehnen NC*, **von Mässenhausen A***, Kalthoff H, Zhou H, Glowka T, Schütte U, Höller T, Riesner K, Boehm D, Merkelbach-Bruse S, Kirfel J, Perner S, Gütgemann I
Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification in pancreatic ductal adenocarcinoma.

Histopathology 2013, 63, 157-166

*) contributed equally

Mueller K, **von Mässenhausen A**, Aichele U, Stärck L, Leisegang M, Uckert W, Pircher H.

Protective capacity of virus-specific T cell receptor (TCR)-transduced CD8 T cells in vivo.

Journal of Virology 2012 Oct;86(19):10866-9