

**DNA-Methylierung der FGF-Rezeptoren hinsichtlich
der mRNA-Expression, Amplifikation und Sensitivität
für Inhibitoren in Plattenepithelkarzinomen der Lunge**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Jost Henning Schulz

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. med. Friederike Schröck
2. Gutachterin: Prof. Dr. Jennifer Landsberg

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.12.2024

Aus der Klinik für Neurodegenerative Erkrankungen und Gerontopsychiatrie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs	7
1.2 Epidermale und Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren beim Nicht- kleinzelligen Lungenkrebs	9
1.3 Epigenetik und DNA-Methylierung des Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs	14
1.4 Biomarker	15
1.5 Therapie des Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs mittels Rezeptor-Tyrosinkinase- Inhibitoren	16
1.6 Resistenzmechanismen gegenüber Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren	22
1.7 Ziel der Arbeit	23
2. Materialien und Methoden	25
2.1 Patienten und Tumorproben / TCGA LUSC-Kohorte	25
2.2 Zelllinien	25
2.3 Analyse der DNA-Methylierung	25
2.4 Analyse der mRNA-Expression	27
2.5 Analyse der Genkopienzahl / Kopienzahl-Variation	28
2.6 Sensitivitätstest	28
2.7 Statistik	28
3. Ergebnisse	29
3.1 FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 weisen in Plattenepithelkarzinomen der Lunge eine differenzielle DNA-Methylierung im Vergleich zu angrenzendem Normalgewebe auf	29
3.2 Die DNA-Methylierung von FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 korreliert mit der korrespondierenden mRNA-Expression	37

3.3 Die DNA-Methylierung von FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 korreliert mit der Kopienzahl des jeweiligen Gens	38
3.4 Die DNA-Methylierung von FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 korreliert mit der Sensitivität von Zelllinien gegenüber FGFR-Inhibitoren.....	39
4. Diskussion	44
5. Zusammenfassung.....	49
6. Abbildungsverzeichnis	51
7. Tabellenverzeichnis	53
8. Literaturverzeichnis	54
9. Danksagung.....	67

Abkürzungsverzeichnis

CNV	Copy Number Variation (Kopienzahl-Variation)
CpG	Cytosine-phosphate-guanine (Cytosin-Phosphat-Guanosin)
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor)
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1)
FGFR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 2)
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3)
FGFR4	Fibroblast Growth Factor Receptor 4 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 4)
GDSC	Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (Genomik der Wirkstoffsensitivität von Krebs)
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom)
IC ₅₀	Half-maximal inhibitory concentration (halbmaximale inhibitorische Konzentration)
LUSC	Lung squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom der Lunge)
n.c.	normalized counts (normalisierte Zähler)
NSCLC	Non-small cell lung cancer (Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs)

PSA	Prostate Specific Antigen (Prostata-spezifisches Antigen)
RNA-Seq	RNA-Sequencing (RNA-Sequenzierung)
RSEM	RNA-Seq by Expectation-Maximization (RNA-Seq durch Erwartungsmaximierung)
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCLC	Small cell lung cancer (Kleinzelliger Lungenkrebs)
TCGA	The Cancer Genome Atlas (Der Krebsgenom-Atlas)
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs

Lungenkrebs stellt mit etwa 2,2 Millionen neuen Fällen 2020 die zweithäufigste diagnostizierte Tumorart dar (siehe Tabelle 1). Lungenkrebs ist bei Männern mit 15,4% aller Malignome der häufigste bösartige Tumor.

Es existieren viele verschiedene ätiologische Faktoren, die zur Entstehung von Lungenkrebs führen. Tabakkonsum ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs. Mehr als 300 Schadstoffe und 40 potenziell karzinogene Stoffe konnten in Tabak nachgewiesen werden (Sabbula et al., 2022). Auch bereits bestehende Lungenvorerkrankungen, Arsen, Asbest, eine Radonexposition und Luftverschmutzung sind klare Risikofaktoren für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms (WCRF, 2023, de Groot et al., 2018).

Lungenkarzinome stellen eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren dar. Allgemein werden klinisch-histologisch kleinzellige von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen unterschieden, die ebenfalls aus therapeutischer Sicht verschieden behandelt werden müssen. Circa 80 bis 85 % aller Lungenkrebsfälle sind dem nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (Non-small Cell Lung Cancer [NSCLC]) zuzuordnen (American Cancer Society, 2023). Die folgenden Unterformen des NSCLCs werden unterschieden: Adenokarzinome (40 %), Plattenepithelkarzinome (30 %; Lung Squamous Cell Carcinoma [LUSC]), großzellige Karzinome (10 – 15 %) und sonstige nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (Adenosquamoses Karzinom, Sarkomatoides Karzinom) (Cancer Center, 2023). 10 – 15 % aller Lungenkarzinome sind sogenannte kleinzellige Lungenkarzinome (American Cancer Society, 2023).

Das Plattenepithelkarzinom kann aus Plattenepithelzellen an verschiedenen anatomischen Stellen und von verschiedenen Organen des menschlichen Körpers hervorgehen (Yan et al., 2011). Plattenepithelzellen kommen an diversen inneren und äußeren Oberflächen im Körper vor. So kleidet Plattenepithel beispielsweise einschichtig das Endothel, die Alveolen der Lunge, das Endokard, Mesothel und die Schleimhäute aus. Plattenepithelkarzinome entstehen oftmals in chronisch sonnenexponierten Hautarealen (kutane Plattenepithelkarzinome), in der Lunge (squamoses NSCLC, LUSC), in der Speiseröhre (Ösophaguskarzinome) oder in der Kopf- und Halsregion (Head and Neck

Squamous Cell Carcinoma [HNSCC]). Das LUSC entsteht häufig im zentralen Lungengewebe bzw. in den rechten und linken Hauptbronchien, wo die natürliche nicht-plattenepitheliale Schleimhaut zur Plattenepithelmetaplasie fähig ist und ein Wachstum dieses Gewebes zulässt, welches dann entartet. Die zweite Hauptform des NSCLCs bildet das Adenokarzinom, welches eine Drüsendifferenzierung oder Schleimbildung aufweist und aus den Pneumozyten der Alveolen in der Lunge hervorgeht.

Tab.1: Liste der weltweit häufigsten Malignome (WCRF, 2023). Die Statistik beinhaltet keine nicht-melanozytären Hautkrebs.

Rang	Krebsart	Neue Fälle im Jahr 2020	% Anteil von allen Krebsarten
	Alle Malignome*	18094716	100
1	Brust	2261419	12,5
2	Lunge	2206771	12,2
3	Darm	1931590	10,7
4	Prostata	1414259	7,8
5	Magen	1089103	6,0
6	Leber	905677	5,0
7	Zervix	604127	3,3

Meist treten Symptome sehr spät auf, wodurch Patienten erst zu einem Zeitpunkt diagnostiziert werden, zu dem das Karzinom bereits metastasiert ist und dann nicht mehr kurativ behandelbar ist (Bernhardt und Jalal, 2016). Symptome, die im Zusammenhang mit Lungenkarzinomen auftreten können, sind oftmals persistierender Husten, Brustschmerzen, Kurzatmigkeit, Blut im Auswurf, Heiserkeit, Gewichtsverlust, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und wiederkehrende Bronchialinfektionen (wie Bronchitis und Pneumonie) (Sabbula et al., 2022).

1.2 Epidermale und Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren beim Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs

Allgemein wird die Tumorgenese als ein Prozess definiert, in dem eine normale Zelle durch multifaktorielle Einflüsse eine progressive Transformation hin zu einer malignen Zelle durchläuft. Eine Transformation hin zum Karzinom wird als Karzinogenese bezeichnet. Es ist bekannt, dass genetische Veränderungen in menschlichen Zellen zur Karzinogenese führen können, beispielsweise durch Onkogene. Onkogene sind mutierte Gene aus den sogenannten Proto-Onkogenen. Diese sind Gene, die das Zellwachstum und Zellteilungsaktivitäten beeinflussen und steuern. Sobald diese Proto-Onkogene zu Onkogenen mutiert sind, können diese zu einem unkontrollierten Zellwachstum und einer unkontrollierten Zellteilung beitragen und damit zur Entstehung verschiedener maligner Tumore führen (National Human Genome Research Institution, 2023). Maligne Zellen können sich dann, auch unabhängig von Wachstumsfaktoren, durch schnelles Zellwachstum und erhöhte Mutationsraten unkontrolliert ausbreiten (Cao, 2017). An der Progression und Entwicklung von NSCLC sind unter anderem wichtige Rezeptoren, wie der EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor; Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) und FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor; Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor), beteiligt. EGFR und FGFR sind transmembranöse Rezeptoren mit konsekutiven Signalkaskaden, die in Zellen unter anderem Überleben, Wachstum, Proliferation und Differenzierung der Zellen und der Gewebe auslösen. Die Aktivität von Epidermalen- und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren werden durch die Epidermalen- und Fibroblasten Wachstumsfaktor-rezeptor-Tyrosinkinasen vermittelt. Der schematische Aufbau dieser Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) an der Zellmembran ist zusammen mit drei gängigen Veränderungen in Abbildung 1 illustriert.

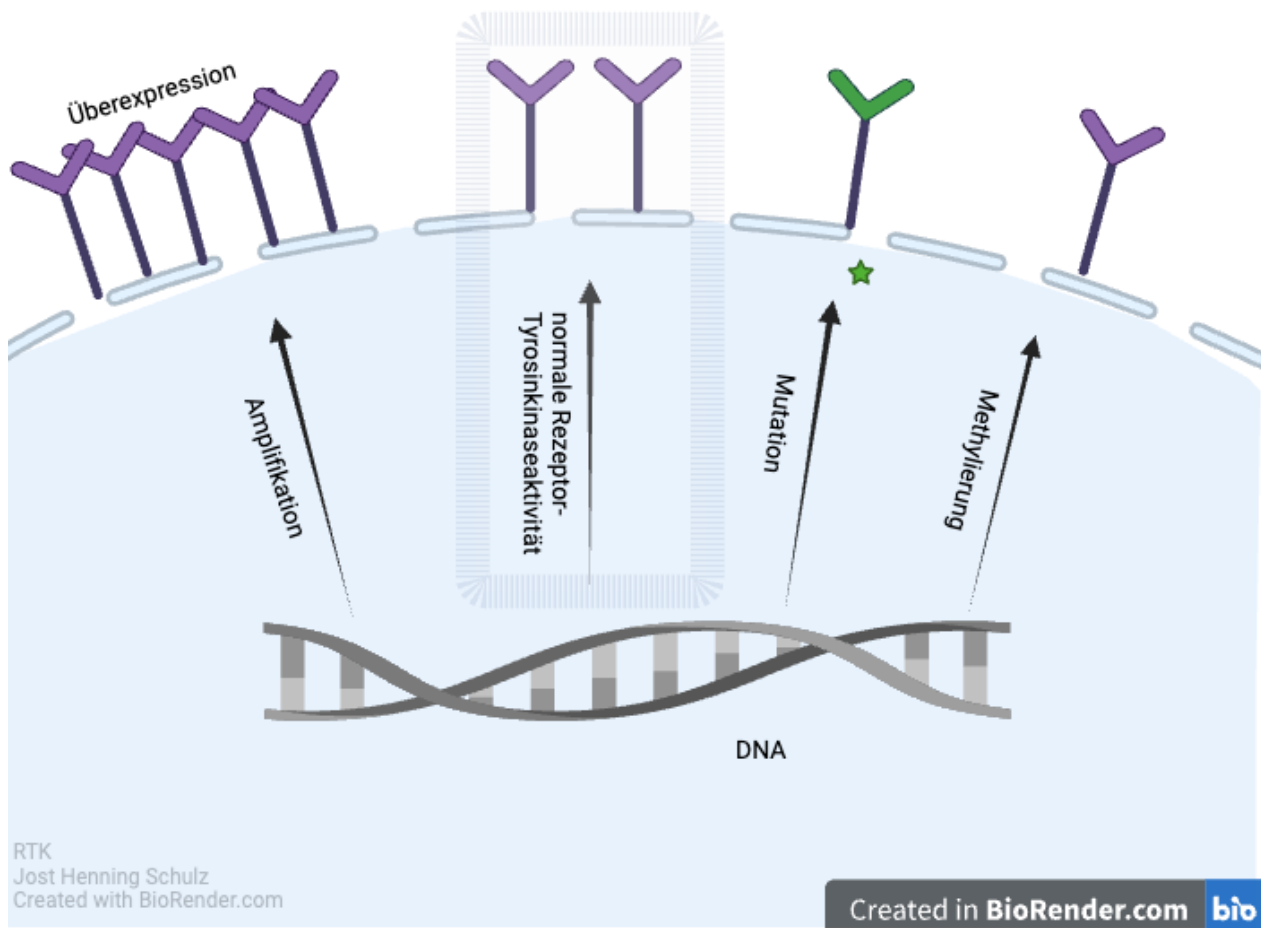


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung einer Expression einer Rezeptor-Tyrosinkinase im Normalzustand (umrandet) und bei gängigen Veränderungen: Genetische, genomische und epigenetische Veränderung (von links nach rechts.: Amplifikation führt zu einer Überexpression, Normalzustand, Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung, DNA-Methylierung führt zur Herunterregulation).

In einer umfassenden Studie über das LUSC, ein Projekt durchgeführt vom The Cancer Genome Atlas (TCGA), konnten spezifisch für LUSC häufig auftretende genetische Veränderungen, wie Mutationen in den Genen PIK3CA, PTEN, TP53, CDKN2A und NOTCH1, festgestellt werden. Dabei vorwiegend signifikant konnte in ungefähr 90 % der untersuchten Tumorproben eine genetische Alteration des Tumorsuppressorgens TP53 nachgewiesen werden. Das Tumorsuppressorgen CDKN2A wurde in 72 % der untersuchten Proben inaktiviert. Das Gen HLA, dessen physiologische Funktion das Screening

und die Präsentation körpereigener und fremder Antigene ist, wurde ebenfalls oftmals durch Mutationen inaktiviert (American Cancer Society, NCI, 2023).

Der EGF-Rezeptor ist einer von vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen der ERbB-Familie: EGFR1/ERbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 und HER4/ErbB4. Der EGFR ist ein Glykoprotein, das aus einer extrazellulären Domäne (Ektodomäne), einer transmembranen Domäne und einer katalytischen Region im Zytoplasma – Juxtamembranregion und C-terminaler regulatorischer Region besteht (Wieduwilt und Moasser, 2008). Der EGFR wird durch Bindung eines Liganden an der extrazellulären Ektodomäne aktiviert, woraufhin verschiedene konsekutive Signalkaskaden intrazellulär initiiert werden. EGFR kann beispielsweise die MAPK-Kaskaden aktivieren. Die Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade ist eine Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kaskade (MAPK-Kaskaden), die aus Signalproteinen bzw. Proteinkinasen besteht: Ras (GTPase), Raf, MEK (MAPK/ERK Kinase) und ERK (extrazelluläre Kinase). Sobald die Signalkaskade initiiert wurde und konsekutiv ERK aktiviert ist, aktiviert ERK im Nukleus der Zelle diverse Gene und Transkriptionsfaktoren (z. B. c-Myc, C-Jun und C-Fos). Diese Targets sind essenziell, da diese einen direkten Einfluss auf Zellproliferation, Survival und anderen Zellfunktionen haben. Die Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade führt ebenfalls zu einer Transkription und Produktion von mehr TGF-Alpha, das wiederum EGFR aktiviert und die Signalkaskade nachgelagert erneut initialisiert. Da durch diese Signalkaskade wichtige Zellfunktionen gesteuert und initialisiert werden, können Mutationen in dieser Signalkaskade zur Karzinogenese und Proliferation von verschiedenen Tumoren führen. Mutationen in dieser Signalkaskade führen am häufigsten zu EGFR-Überexpressionen, Ras- und Raf-Veränderungen (Degirmenci et al., 2020). So sind beispielsweise erhöhte H-Ras-Mutationen im Blasenkarzinom vorzufinden. K-Ras-Mutation sind oft in Darm- und Pankreaskarzinomen zu verzeichnen. K-Ras-Mutationen (KRAS) spielen eine kritische Rolle in der Initiierung und Entwicklung des Pankreaskarzinoms. Die Signalkaskade des Onkogens KRAS (K-Ras) ist daher eines der Ziele in der zielgerichteten Therapie von Pankreaskarzinomen (Luo, 2021). Eine weitere durch EGFR aktivierte intrazelluläre Signalkaskade ist der PI3K-AKT-Pathway, der einen Einfluss in verschiedenen Erkrankungen im menschlichen Körper hat, darunter Typ-2 Diabetes, verschiedenen Autoimmunerkrankungen und auch in der Karzinogenese (Huang et al., 2018; Kitz et al., 2016). Nach Aktivierung des EGFR wird PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) aktiviert, das durch einen Anstieg an PiP3-Level PDK1 und konsekutiv AKT

aktiviert. Durch die AKT-Aktivierung wird im weiteren Verlauf der Kaskade ein Anstieg des intrazellulären Glukosespiegels veranlasst, Proteinsynthese und Zellproliferation initiiert.

Die FGFR-Familie besteht aus den FGF-Rezeptoren FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4. Diese gehören ebenfalls zu den RTKs. FGFR1-4 sind an der Zellmembran exprimiert und können durch extrazelluläre Signale aktiviert werden (Dai et al., 2019). Der FGFR besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, die drei Immunglobulin-Untereinheiten (D1, D2, D3) umfasst. Daran strukturell angebunden befindet sich eine einsträngige transmembranöse Helix und eine intrazelluläre Tyrosinkinase Domäne. In der Region zwischen D1 und D2 befindet sich eine sogenannte Säurebox, reich an Asparaginsäure (Dai et al., 2019). Diese FGFR1-4 regulieren essenzielle Funktionen im menschlichen Körper, wie die Zellproliferation und -differenzierung, Gewebereparatur und Stoffwechsel. FGFRs aktivieren ebenfalls die oben genannten Signalkaskaden, Ras-Raf-MEK-ERK und PI3K-AKT und führen somit konsekutiv zu den genannten Zellveränderungen. Des Weiteren gehören die Phospholipase C-gamma (PLC-gamma) - und JAK-STAT-Signalwege (Januskinase-Signal Transducers and Activators of Transcription Signalweg) zu den von FGFR-induzierten intrazellulären Signalkaskaden (Ornitz und Itoh, 2015). Die intrazelluläre Aktivierung von PLCγ induziert durch weitere Zwischenschritte das Enzym PKC. Dieses besitzt eine zentrale Bedeutung bei der intrazellulären Signaltransduktion und der Regulierung des zellulären Wachstums. Die STAT-Signalkaskade ist eine weitere wichtige intrazelluläre Signalkaskade, die Einfluss auf die Genexpression im Nukleus hat (Ornitz und Itoh, 2015). Vereinfachte Darstellungen der durch EGFR- und FGFR-aktivierten Signalkaskaden RAS-RAF-MEK-ERK und PI3K-AKT sind in Abbildung 2 dargestellt.

FGFR-Genveränderungen treten in LUSC häufig auf und könnten deshalb ein potenzielles Ziel für die zielgerichtete Tumorthherapie mittels FGFR-Inhibierung sein (Hibi et al., 2016). So treten nach einer Studie von Zhou et al. (2021) Genveränderungen des FGFR in 6,8 % aller untersuchten Patienten mit LUSC auf (Zhou et al., 2021).

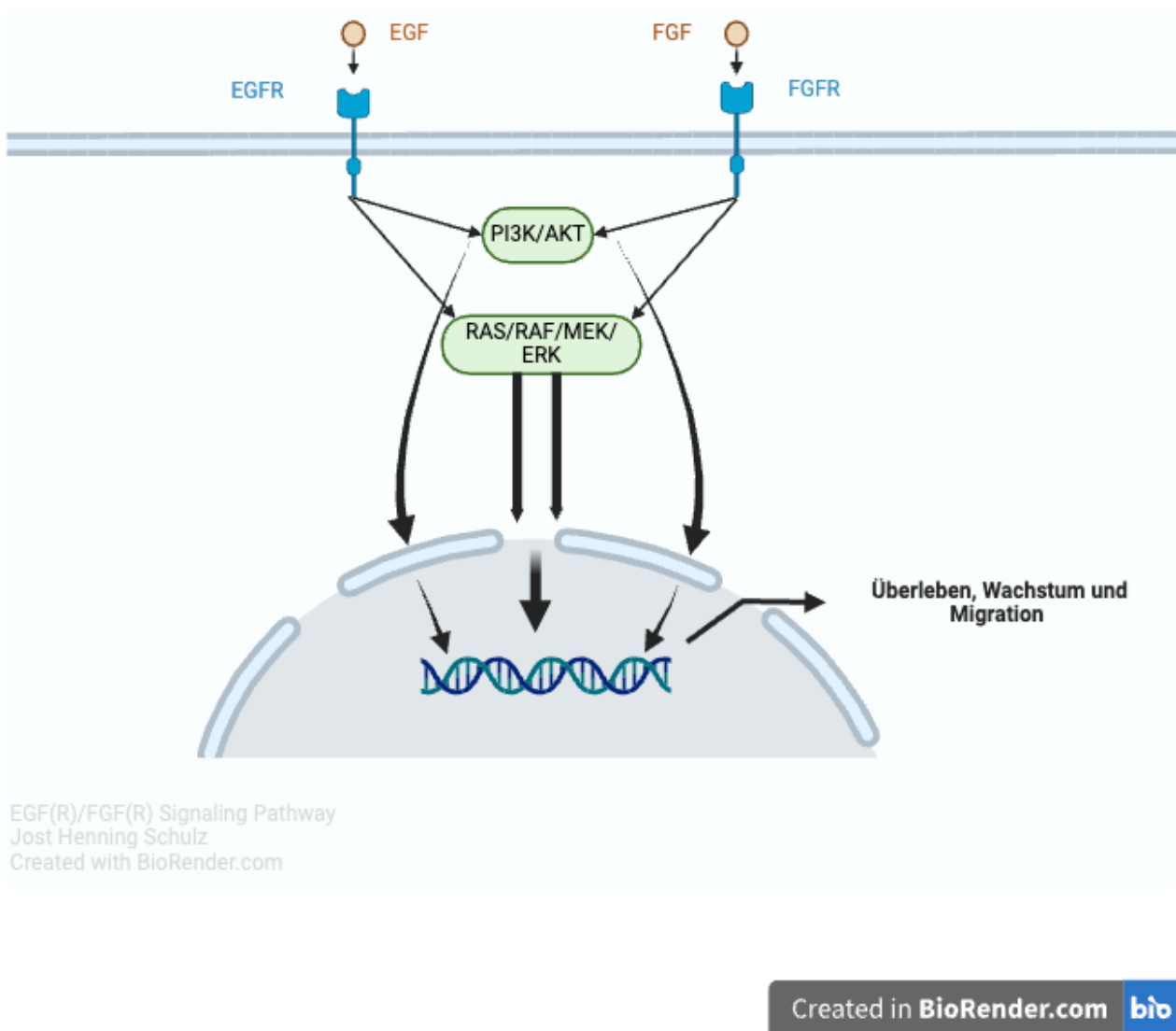


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung von EGF- und FGF-Rezeptoren und deren Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (PI3K-AKT, RAS-RAF-MEK-ERK), die wiederum Signale zur Steuerung von Zellüberleben und -wachstum in den Nukleus weiterleiten.

In verschiedenen Plattenepithelkarzinomen, wie beispielsweise dem HNSCC werden häufig Überexpressionen des EGFR (> 90 %) und EGFR-Amplifikationen (Copy Number Variationen, CNV) nachgewiesen (Rehmani und Issaeva, 2020). Im Lungenkarzinom konnten hohe Mutationsraten des FGFR und des EGFR nachgewiesen werden (Rehmani und Issaeva, 2020). In einer Studie von Bethune et al. (2010) ließen sich bereits in über 43 % der Fälle von NSCLC eine Überexpression des EGF-Rezeptors oder intrazelluläre EGFR-Mutationen nachweisen. Andere Studien belegten, dass etwa ein Viertel der

NSCLC Mutationen in der EGFR-Tyrosinkinase aufwiesen und diese mit einer Rezeptor-Überexpression in etwa 75 % der Fälle verbunden waren.

Die übergeordnete Relevanz von EGFR und FGFR in verschiedenen Tumoren, inklusive des NSCLCs, prädestiniert diese Rezeptoren als Ziel molekularer Therapien, insbesondere mittels niedermolekularer Tyrosin-Kinaseinhibitoren (TKIs).

1.3 Epigenetik und DNA-Methylierung des Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs

Die Epigenetik umfasst das Fachgebiet über vererbare Eigenschaften, die nicht in der Primärsequenz der DNA kodiert sind. Typische epigenetische Faktoren sind DNA-Methylierung, Histonmodifikationen, aberrante Expression von microRNAs und langen nicht-kodierenden RNAs. Diese Faktoren spielen bei einer Reihe physiologischer Prozesse, wie etwa Zelldifferenzierung, Entwicklung, genetischer Prägung und Inaktivierung des X-Chromosoms eine signifikante Rolle (Baylin und Jones, 2016). Dazu wirken epigenetische Faktoren auch vielseitig bei Prozessen der Karzinogenese und Tumorprogression. Nach Jones et al. (2011) ist die Stilllegung von Genen, induziert durch DNA-Promotor-Hypermethylierung, sogar einer der Hauptmerkmale in der Entwicklung von Karzinomen. Dies trifft insbesondere auch auf NSCLC zu (Rogers, 2014 und 2012).

Unter den epigenetischen Mechanismen stellt die DNA-Methylierung den bisher am besten untersuchten dar. Unter der DNA-Methylierung versteht man die kovalente Bindung einer Methylgruppe an ein Cytosin, welches sich im Cytosin-Phosphat-Guanosin (CpG)-Dinukleotidkontext befindet. Eine Methylierung des Promotorbereichs eines Gens ist oftmals mit einer reduzierten Genexpression verbunden, während eine Methylierung im Genkörper ein Indikator für transkriptionell aktive Gene sein kann (Baylin und Jones, 2016). In Vorarbeiten konnten die Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass individuelle CpGs, auch wenn sie nahe beieinanderliegen, oftmals einen sehr unterschiedlichen Informationsgehalt hinsichtlich der transkriptionellen Aktivität des Gens tragen (Bao et al., 2021). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass eine DNA-Methylierung auch mit der Amplifikation des betreffenden Gens assoziiert sein kann (Schneider et al., 2011).

Epigenetische Veränderungen sind vielversprechende Anhaltspunkte für die Entwicklung von spezifischen Biomarkern zur Tumorerkennung, Diagnosestellung, Prognosestellung

und Prädiktion des Therapieansprechens. Im Vergleich zu genetischen Veränderungen sind epigenetische Veränderungen oftmals reversibel und dynamisch und können daher eine ideale Ergänzung zu genetischen Veränderungen bei der Klassifizierung und Typisierung von Tumoren bilden.

1.4 Biomarker

Die molekulare Charakterisierung ist ein integraler Punkt in der histopathologischen Diagnostik und Therapieplanung bei verschiedenen Tumorarten geworden. Der wissenschaftliche Fortschritt der Genotypisierung hilft dabei, gezielte Therapieansätze über histologisch unterschiedliche Tumore hinaus in Richtung molekularpathologisch zu differenzierenden Malignomen zu etablieren. Diese legt damit den Grundstein für die Bestimmung von Biomarkern, die ein Ansprechen und die Indikationsstellung zielgerichteter Therapien ermöglichen könnten. So richten sich sogenannte zielgerichtete Krebsmedikamente spezifisch gegen bestimmte molekulare Veränderungen, um mutierte/dysplastische Zellen, aber nicht die gesunden körpereigenen Zellen zu zerstören. Das National Cancer Institute (2023) definiert einen Biomarker als ein biologisches Molekül, das im Blut, anderen Körperflüssigkeiten oder im Gewebe eines Menschen zu finden ist und Anzeichen auf einen normalen und/oder abnormalen Prozess im Körper und bei Krankheit gibt. Biomarker können ebenfalls dazu verwendet werden, klinisch gesunde Patienten auf potenzielle Malignome zu screenen. Beispielsweise ist das Prostataspezifische Antigen (PSA) ein bekannter Biomarker. Das Ziel des Screenings ist es, durch eine einfach Blutuntersuchung Prostatakarzinome in einem frühen Stadium zu entdecken (Henry und Hayes, 2012). Ein Biomarker kann ebenfalls verwendet werden, um das Ansprechverhalten einer Therapie auf eine bestimmte Erkrankung zu untersuchen und vorherzusagen. Dies ist heutzutage von übergeordnetem Interesse, da zum einen die Zahl der medikamentösen Therapieoptionen stetig steigt, gleichzeitig der Wirkmechanismus oftmals so spezifisch ist, dass nur ein geringer Anteil der Patienten von der Therapie profitiert, diese jedoch auch im fortgeschrittenen Stadium noch langanhaltende Wirksamkeit zeigen kann. Bekannte Beispiele, die im Kontext dieser Arbeit relevant sind, sind Veränderungen von EGFR und FGFR. Der gegen FGFRs gerichtete TKI Erdafitinib wirkt beispielsweise dann besonders, wenn aktivierende Veränderungen in den FGFR-Genen vorliegen (Loriot et al., 2019) und ist für die

Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinomen zugelassen, welche genetische Veränderungen in FGFR2 oder FGFR3 tragen. Der gegen EGFR gerichtete TKI Gefitinib wirkt vor allem, wenn aktivierende Mutationen im EGFR-Gen vorliegen (Mitsudomi et al., 2010) und ist für die Behandlung von NSCLC zugelassen, wenn diese eine aktivierende Mutation im EGFR-Gen tragen.

Genetische Veränderungen von EGFR und den FGFRs stellen damit leistungsstarke prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit dem entsprechenden TKI dar. Epigenetische Mechanismen, wie beispielsweise die Aktivierung über ein Promotor-Hypermethylierung, sind als zu dem Mutationsstatus komplementärer Biomarker bisher nur unzureichend untersucht.

1.5 Therapie des Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs mittels Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren

Allgemein angewendete therapeutische Maßnahmen in der Behandlung von Lungenkrebs sind die chirurgische Resektion, die regionale Strahlentherapie und/oder die systemische Chemo-, zielgerichtete und Immuntherapie. Die chirurgische Resektion des Tumors ist die Haupttherapieform des NSCLCs in den Stadien I und II und eine wichtige adjuvante Therapieform in einem multimodalen Therapieansatz in weiter fortgeschrittenen Formen des Karzinoms (Stadium IIIA) (Lackey und Donington, 2013). Tumore der Größe < 7 cm und Tumore der Größe > 7 cm ohne Lymphbefall sind entsprechend als Stadium I und Stadium II klassifiziert. Chirurgische Formen der Tumoresektion sind unter anderem die offene Lobektomie, die videoassistierte thorakoskopische Lobektomie, roboterassistierte Lobektomie, die Segmentektomie und die sogenannte Keilresektion (Lackey und Donington, 2013). In fortgeschrittenen Erkrankungen (Stadium IIIB, Stadium IV) stehen Strahlen-, Chemo-, zielgerichtete und Immuntherapien im Vordergrund (Balibrea et al., 2001).

Therapiemöglichkeiten des fortgeschrittenen NSCLCs haben sich in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt und verändert. Initial als Sekundärtherapie angesehene Behandlungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die Immuntherapie mittels immuntherapeutischer Wirkstoffe, wie Pembrolizumab, haben sich nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen als Primärtherapie durchgesetzt, da sie bei guter Verträglichkeit und Nebenwirkungsprofil eine nachweisbare ausgezeichnete Wirksamkeit zeigen. Eine Studie von Reck

et al. (2016) untersuchte die Therapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Pembrolizumab vs. Chemotherapie für Patienten mit NSCLC (PD-L1-positiv). Pembrolizumab erwies sich mit einem progressionsfreien Überleben von 10,3 Monaten vs. einem progressionsfreien Überleben von 6,0 Monaten der Gruppe der mit Chemotherapeutika behandelten Patienten als die effektivere Therapieform. Patienten mit einem fortgeschrittenen NSCLC und PD-L1 Expression an mindestens 50 % der Tumorzellen profitieren demnach von einer Therapie mit Pembrolizumab. Pembrolizumab wird nun sowohl als Monotherapie-Option als auch in Kombination mit bewährten Behandlungsmöglichkeiten wie der platinhaltigen Chemotherapie (z. B. Cisplatin) als Primärtherapieform in fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom der Lunge angewendet. Die KEYNOTE-024 Studie belegte letztlich, dass sich die Monotherapie mit Pembrolizumab von Patienten mit 50 % oder höherer Tumor-PD-L1-Expression, als die neu etablierte Standardtherapie zu empfehlen ist und sich somit als solche durchgesetzt hat. Patienten mit PD-L1 Expression geringer als 50 % allerdings profitieren laut Daten der Keynote-042 Studie nicht von einer Pembrolizumab Monotherapie gegenüber der Platin-Doubletten-Chemotherapie (Lopes et al., 2018). Seit dem Fortschritt der genannten immuntherapeutischen Wirkstoffe wird eine Chemotherapie (mit Medikamenten wie Docetaxel) folglich als Sekundärtherapieform angesehen. Als Rückgrat einer medikamentösen Therapie findet der Wirkstoff Docetaxel Anwendung.

Zielgerichtete anti-EGFR-Therapie hat sich derzeit als eine sehr erfolgreiche Therapieform für Patienten mit NSCLC etabliert (Tiefenbacher und Pirker, 2017). So werden bereits verschiedene EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (EGFR-TKI) eingesetzt, um Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zu behandeln. Das Ansprechverhalten auf niedermolekulare EGFR-TKI bei Patienten mit EGFR-Kinase-Mutationen liegt bei 70 – 80 %. Diese EGFR-Mutationen liegen hingegen meistens bei Adenokarzinomen und selten bis gar nicht bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge vor (Liao et al., 2012, B).

Gefitinib und Erlotinib waren die ersten eingesetzten EGFR-TKIs (Chan und Hughes, 2015). Gefitinib inhibiert die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR, in dem es die Autophosphorylierung und die daraus entstehende konsekutive intrazelluläre Signalkaskade blockiert (Armour und Watkins, 2010). Erlotinib, Gefitinib und Afatinib gelten derzeit als

Erstlinien-Behandlungsansatz für Patienten mit einem EGFR-Mutation-positiven NSCLC (Park et al., 2016). So untersuchte eine Studie von Park et al. (2016) die Effizienz von Erlotinib als Erstlinien-Therapie in NSCLC-Patienten (N = 208) mit EGFR-Mutationen. Das Ergebnis der Studie ergab eine Gesamtüberlebensrate von 66,2 % und eine medianes Gesamtüberleben von 31 Monaten und unterstützte daher den Einsatz von Erlotinib als Erstlinien-Therapie in Patienten mit EGFR-Mutation-positiven NSCLC. Da EGFR- und KRAS-Mutationen die häufigsten auftretenden Mutationen des Adenokarzinoms sind, ist eine gezielte EGFR-Therapie, insbesondere bei Patienten mit einem Adenokarzinom von Bedeutung (TCGA, 2012). Beim LUSC konnten EGFR-Mutationen hingegen deutlich seltener nachgewiesen werden (TCGA, 2012). Der EGFR kann auf zwei Wegen inhibiert werden: Mithilfe von monoklonalen Antikörpern (z. B. Cetuximab, Necitumumab) gegen die Rezeptoroberfläche oder mithilfe von niedermolekularen Kinase-Inhibitoren. Diese Kinase-Inhibitoren führen zu einer EGFR-Inhibition, welche eine konsekutive Signalweiterleitung zur Zellteilung verhindert (Tiefenbacher und Pirker, 2017). Abbildung 3 zeigt im Folgenden eine solche schematische (EGFR-)Inhibierung.

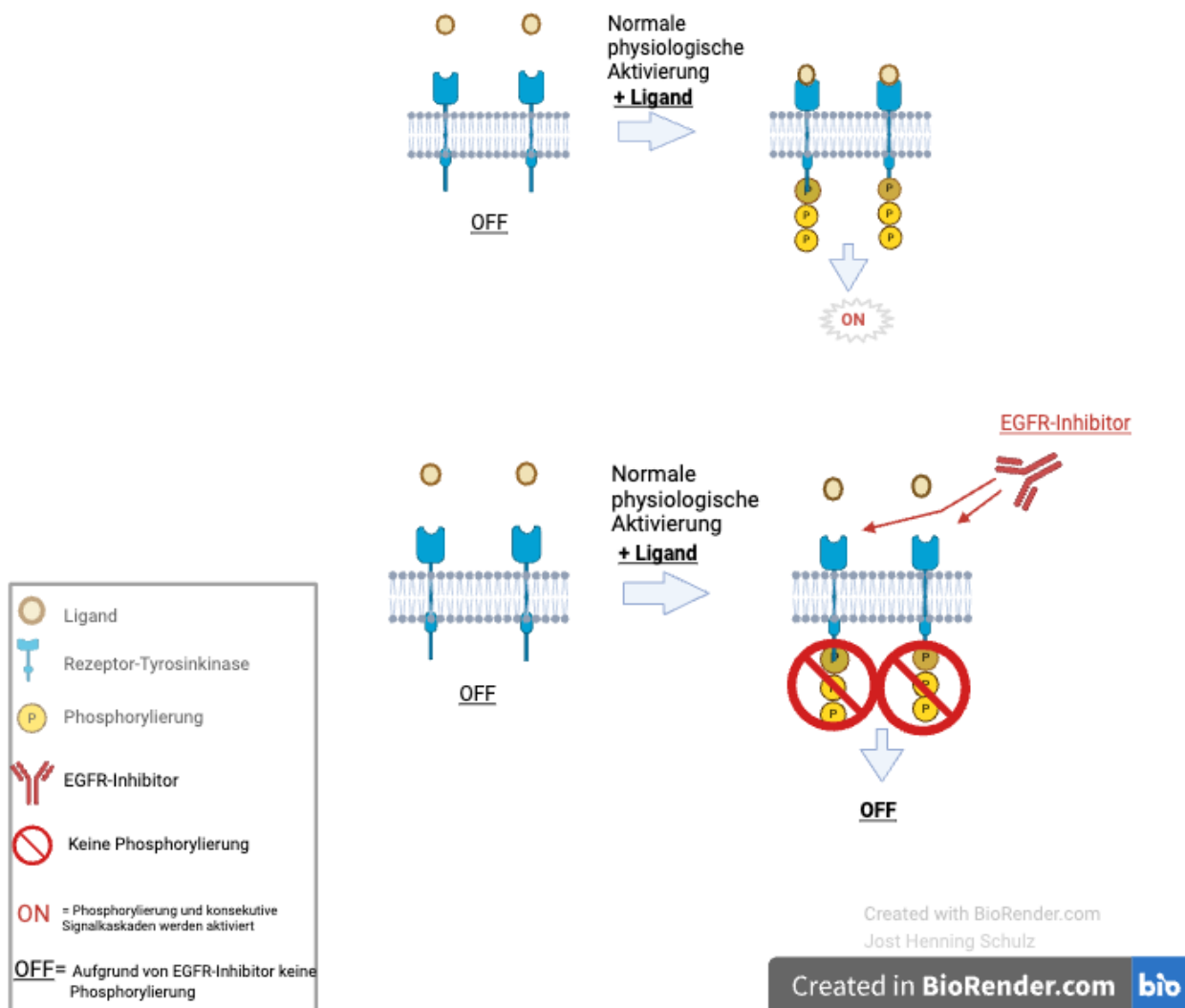


Abb. 3: Schematische Darstellung einer physiologischen Bindung von Liganden an RTK und anschließender Phosphorylierung mit Aktivierung konsekutiver Signalkaskaden (oben) und Inhibierung dieses physiologischen Vorgangs durch einen EGFR-Inhibitor, der die RTK-Bindungsstelle blockiert, wodurch eine Phosphorylierung und Aktivierung konsekutiver Signalkaskaden inhibiert werden (unten).

FGFR-Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren finden bereits Anwendung in der Behandlung diverser Tumore, wie beispielsweise in Gallengang- und Urothelkarzinomen (Kommalapati et al., 2021). Dem Urothelkarzinom liegt oftmals eine FGFR-Dysregulierung zugrunde, wodurch sich eine klare Indikation einer FGFR-inhibierenden Therapieform stellt. Die US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (U.S. Food and Drug Administration, FDA) ließ als erstes den TKI Erdafitinib zur Behandlung von FGFR-Genveränderungen im

fortgeschrittenen Urothelkarzinom zu (Garje et al., 2020). Im intrahepatischen Cholangiokarzinom konnte in 15 –20 % der Fälle FGFR2 Genveränderungen und -fusionen nachgewiesen werden. Durch die Inhibierung des FGFR konnte in diesen Fällen ein positiver Effekt auf die Entwicklung der Cholangiokarzinome dieser Patienten verzeichnet werden (Gile et al., 2021). So liegt laut dieser Studie das progressionsfreie Überleben nach Behandlung mit FGFR-Inhibitoren bei allen untersuchten Patienten bei durchschnittlich 5,8 Monaten. Dabei hatten Frauen mit durchschnittlich 6,9 Monaten ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben als Männer mit 4,9 Monaten. Pemigatinib war der erste von der FDA zugelassene FGFR-Inhibitor für Patienten mit fortgeschrittenem Cholangiokarzinom. In einer Phase 2-Studie in China, Korea und Taiwan (Studienidentifikationsnummer NCT02699606) bekamen Patienten mit fortgeschrittenem Cholangiokarzinom und FGFR-Veränderungen Erdafitinib 8mg täglich. Von den 17 involvierten Patienten zeigten 15 ein positives Ansprechverhalten auf die Therapie. (Chmiel et al.) Infigratinib (BGJ398) ist ein oraler kompetitiver ATP-FGFR1-3 selektiver Inhibitor. Eine Phase 2-Studie von 108 vorbehandelten Patienten mit Cholangiokarzinom mit FGFR2-Fusionen und/oder -Neuordnungen kam nach Behandlung der Patienten mit täglich 125mg Infigratinib und nach finaler Auswertung und Durchführung der Studie durch Javle et al. (2021) zu einer objektiven Ansprechrare von 23,1 % auf den FGFR-Inhibitor mit einer medianen Ansprechdauer von 5 Monaten und einem medianen progressionsfreien Überleben von 7,3 Monaten. Da sich diese Medikamente in der Behandlung verschiedener oben genannten Tumore als effektiv erwiesen, könnte eine zielgerichtete Behandlung mittels FGFR-Inhibierung auch für Patienten mit Lungenkarzinom erfolgreich sein.

TKIs wie Gefitinib und Erlotinib blockieren die EGFR-vermittelte Signaltransduktion, indem diese an die Tyrosinkinase-Domäne des EGFR binden und dadurch die Bindung von ATP an den EGFR unterbinden. Im NSCLC korrelieren daher EGFR-Amplifikationen mit einem besseren Ansprechverhalten auf Gefitinib (Matsui et al., 2013). Eine Studie von Lortot et al. (2019) untersuchte Patienten (n=99) mit fortgeschrittenem Urothelkarzinom und nachgewiesenen FGFR-Genveränderungen. Während der Therapie mit dem FGFR-TKI Erdafitinib, konnte ein Ansprechverhalten bei 40% der Patienten erreicht werden. Chmiel et al. (2022) kamen in Ihren Untersuchungen zu der Erkenntnis, dass 14% der Patienten mit Cholangiokarzinom FGFR2-Fusionen aufwiesen und weitere FGFR1- und FGFR3-Mutationen sowie FGFR4-Überexpressionen nachzuweisen waren, die zur

Entwicklung des Karzinoms beigetragen haben. In Ihren Untersuchungen mit verschiedenen TKIs konnten sie positive Ergebnisse verzeichnen.

In einer randomisierten kontrollierten Studie Garassino et al. (2013) wurde die Effektivität von Docetaxal vs. Erlotinib als Sekundärtherapieform für Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC untersucht. Erlotinib ist ein für alle Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC zugelassener TKI. Die Studienergebnisse wiesen eine eindeutig überlegene Wirksamkeit der Chemotherapie mit Docetaxal gegenüber dem TKI Erlotinib als Sekundärtherapieform nach: medianes Gesamtüberleben 8,2 Monate mit Docetaxel vs. 5,4 Monate mit Erlotinib (Garassino et al., 2013). Die progressionsfreie Überlebensrate war mit 2,9 Monaten mit Docetaxel ebenfalls der Erlotinib-Therapie mit einer Überlebensrate von 2,4 Monaten überlegen (Garassino et al., 2013). Im Gegensatz zu Patienten mit einem Adenokarzinom, die durch gezieltes Genotypisierung oftmals eine gezielte Therapie gegen EGFR- oder EML4-ALK Mutationen erhalten können, gibt es für Patienten mit einem LUSC bislang aufgrund der nicht übereinstimmenden genomischen Veränderungen keine solche zielgerichtete gentypspezifische Therapie. Patienten mit LUSC erhalten zurzeit immer noch eine unspezifische, konventionelle (Chemo-)Therapie (Liao et al., 2012, A). Eine Studie vom TCGA Forschungsnetzwerk (Cancer Genome Atlas Research Network, 2012) untersuchte eine große Gruppe Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom, um neue zielgerichtete Therapieansätze zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zum Adenokarzinom nur selten EGFR- und KRAS Mutationen vorlagen, allerdings im LUSC häufig Veränderungen in der FGFR-Kinase-Familie vorliegen. Dabei waren FGFR-Kinasen die am häufigsten veränderten Tyrosinkinasen (12 % der untersuchten Fälle). FGFR-Amplifikationen sind daher vielversprechende Ziele einer zielgerichteten Therapie im LUSC (Schildhaus HU et al., 2012). Eine Phase 1-Studie untersuchte das Ansprechverhalten vom Plattenepithelkarzinom auf den FGFR1-3 Inhibitor BGJ398. Das Ergebnis wies eine Ansprechrates von 11 % bei FGFR1-amplifizierten LUSC auf (Nogovio et al., 2017). Ein weiterer FGFR-TKI, Dovitinib (TKI258), ein FGFR1-3, KIT und VEGFR Inhibitor wies in einer Phase 2-Studie am LUSC mit FGFR1 Amplifikationen eine objektive Ansprechrates von 11,5 % auf (NCT01861197) (Yue et al., 2021). Neben den bereits zugelassenen FGFR-TKIs Erdafitinib (JNJ-42756493) und Pemigatinib (INCB054828) sind weitere FGFR-TKI-Kandidaten, wie unter anderem Futibatinib (TAS-120) und der FGFR1-3-Inhibitor CH5183284 (Debio-1347) in Entwicklung bzw. in Phase 1- und 2-

Untersuchungen. Einer Resistenz gegen EGFR-TKIs sollte durch therapeutische Strategien, wie beispielsweise die Entwicklung von kovalent bindenden Inhibitoren, vorgebeugt werden (Yue et al., 2021). Genomische Variationen der FGF-Signalweg-Gene wurden in verschiedenen Karzinomen, unter anderem Brust, Endometrium-, Blasen-, Lungen- und dem intrahepatischem Cholangiokarzinom identifiziert (Wang et al., 2016; Facchinetti et al., 2020). Diese Untersuchungen führten letztendlich zur erfolgreichen klinischen Zulassung von FGFR TKIs für Patienten mit Cholangiokarzinomen und FGFR2-Genfusionen oder -neuordnungen (Patel et al., 2022) und für Patienten mit Urothelkarzinomen und FGFR-Veränderungen (Loriot et al., 2019; Siefker-Radtke et al., 2022). Weiss et al. (2010) zeigten, dass 22% von LUSC-Patienten FGFR1-Amplifikationen aufwiesen. Die Überlebensrate und Proliferation von FGFR1-amplifizierten LUSC-Zelllinien wurden durch die Behandlung mit dem FGFR-TKI PD173074 in vitro signifikant reduziert. Leider zeigten klinische Studien von FGFR-TKIs bislang kein vielversprechendes Ansprechverhalten bei LUSC mit FGFR1-Amplifikation, wodurch sich die Fragestellung ergibt, wie sich das Ansprechverhalten auf FGFR-TKIs für LUSC-Patienten vorhersagen lässt (Aggarwal et al., 2019; Chae et al., 2020; Paik et al., 2017).

1.6 Resistenzmechanismen gegenüber Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren

Resistenzmechanismen gegenüber EGFR- und FGFR-TKIs sind vielseitig. Unter EGFR-TKI-Therapiedruck können sich so etwa Mutationen bilden und durchsetzen, welche zu einer Resistenz führen. Beispiele dafür sind die Mutationen EGFR^{T790M} und EGFR^{C797S} (einen Überblick liefert Lu et al. (2018)).

Die Amplifikation von Onkogenen und Proto-Onkogenen ist auch eine in Tumoren oft vorzufindende Genveränderung, die durch die Vermehrung der malignen Zellen zur Karzinogenese und Tumorprogression führt. MYC war das erste Onkogen, bei welchem man Amplifikationen in verschiedenen Tumoren nachweisen konnte, unter anderem im NSCLC (Matsui et al., 2013). Amplifikationen der RTK bilden einen weiteren Resistenzmechanismus. Yang H. et al. (2022) untersuchten in einer Studie NSCLC-Patienten (N = 53) mit EGFR-Mutationen. In der Patientenkohorte waren TP53-Amplifikationen (72 %) und EGFR-Amplifikationen (40 %) die häufigsten Veränderungen. Die Amplifikation des EGFR beschreibt den Anstieg der Kopienzahl des EGFR-Gens und ist daher in bestimmten

Tumoren ein ‚Bypass‘-Weg zur Resistenzbildung gegen die EGFR-TKIs. Yang et al. (2022) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass EGFR-Genamplifikationen ein potenzieller Resistenzmechanismus zu der EGFR-TKI-Therapie sind und daher mit einem schlechteren Behandlungsergebnis assoziiert sind.

Mehrere unabhängige Studien zeigten Amplifikationen am Chromosom 8p12, wo FGFR1 lokalisiert ist. FGFR1-Amplifikationen konnten in ungefähr 20 % der LUSC nachgewiesen werden aber nicht im Adenokarzinom (Heist et al., 2012).

Auch wenn eine Rolle der DNA-Methylierung bei der Resistenz gegenüber von EGFR- und FGFR-TKIs naheliegend ist, sind bisher nur wenige Studien zu diesem Thema publiziert, welche diese These stützen (Xu et al., 2021 und Li et al., 2013). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide innerhalb der FGFR-Gene potenziell mit der Sensitivität gegenüber FGFR-TKIs beim HNSCC ist (Bao et al., 2021).

Mutationen, DNA-Methylierung und Genamplifikation stellen daher besonders vielversprechende prädiktive Biomarkerkandidaten für das Nicht-Ansprechen auf eine Therapie mit EGFR- und FGFR-TKIs dar.

1.7 Ziel der Arbeit

Während zielgerichtete Therapien beim Adenokarzinom der Lunge inzwischen erfolgreich routinemäßig angewendet werden, sind die klinischen Ergebnisse beim LUSC ernüchternd. Ein Grund hierfür könnte eine ungenügende Biomarker-gesteuerte Selektion der Patienten sein (eine Überblick liefert Lau et al. (A), (2022)). Während beim Adenokarzinom der Lunge oftmals schon der Mutationsstatus des Zielgens ausreichend prädiktiv für das Ansprechen der entsprechenden zielgerichteten Therapie ist, scheint dieser Zusammenhang beim LUSC deutlich komplexer (Lau et al. (B), 2022). Die vorliegende Studie zielte auf eine detaillierte Korrelationsanalyse der DNA-Methylierung der CpG-Dinukleotide in den FGFR-Genen und deren regulatorischen Elementen hinsichtlich der Korrelationen mit der mRNA-Expression, der CNV und der Sensitivität gegenüber FGFR-TKIs in LUSC. Diese Arbeit sollte Machbarkeit zeigen und eine Grundlage für die Weiterentwicklung von DNA-Methylierungsbiomarkern zur Prädiktion des Ansprechens auf FGFR-

TKIs in LUSC bilden. In Zukunft könnte so die kleine LUSC-Patientengruppe vorab identifiziert werden, bei denen FGFR-TKIs doch eine Wirksamkeit aufweisen.

2. Materialien und Methoden

1.8 Patienten und Tumorproben / TCGA LUSC-Kohorte

Daten über klinisch-pathologische und molekulare Eigenschaften des LUSC wurden aus dem Krebsgenom-Atlas TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>) bezogen. Insgesamt wurden 412 Lungengewebsproben, darunter 370 Tumorgewebeproben und 42 Proben von normalem adjazenten Gewebe einbezogen.

1.9 Zelllinien

Es wurden 15 LUSC-Zelllinien verwendet (EBC-1, EPLC-272H, HARA, HCC-15, KNS-62, LC-1-sq, LK-2, LOU-NH91, NCI-H1869, NCI-H2170, NCI-H226, NCI-H520, RERF-LC-Sq1, SK-MES-1, SW900), um die DNA-Methylierung von FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 zu untersuchen. Für diese Untersuchung wurde ein bereits publiziertes Datenset des „Gene Expression Omnibus“ (GEO) verwendet (GEO-Zugang: GSE68379), welches die Grundlage des „Genomics of Drug Sensitivity in Cancer“ (GDSC) Atlas (<https://www.cancerrxgene.org/>) bildet.

1.10 Analyse der DNA-Methylierung

Es wurde eine Analyse der DNA-Methylierung von 169 CpG-Stellen der FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 Gene durchgeführt. Die Daten der DNA-Methylierung (β -Werte) wurden mithilfe der Infinium HumanMethylation450 BeadChip-Technologie (Illumina, Inc., Diego, CA, USA) generiert und von dem UCSC Xena Browser (TCGA Kohorte, www.xena.ucsc.edu) und der GEO Internet-Datenbank (GEO-Zugang: GSE68379, LUSC Zelllinien) bezogen. Für die Interpretation der Daten wurden die β -Werte näherungsweise mit prozentualer Methylierung gleichgesetzt.

Zur Vereinfachung der Darstellungen und Beschreibungen wurden die 169 analysierten CpGs bzw. die Sonden, die auf diese CpGs zielen, wie folgt konsekutiv durchnummeriert: CpG 1 (cg05177519), CpG 2 (cg15791248), CpG 3 (cg10823844), CpG 4 (cg08722122), CpG 5 (cg27646230), CpG 6 (cg15321288), CpG 7 (cg26385256), CpG 8 (cg20148210),

CpG 9 (cg05810369), CpG 10 (cg27063138), CpG 11 (cg09324698), CpG 12 (cg08117032), CpG 13 (cg07498778), CpG 14 (cg10300229), CpG 15 (cg12614213), CpG 16 (cg20913106), CpG 17 (cg02639993), CpG 18 (cg14489594), CpG 19 (cg21128610), CpG 20 (cg00400221), CpG 21 (cg13123964), CpG 22 (cg13278539), CpG 23 (cg02043791), CpG 24 (cg04685186), CpG 25 (cg14733725), CpG 26 (cg11547613), CpG 27 (cg00676030), CpG 28 (cg01866148), CpG 29 (cg16625770), CpG 30 (cg18106968), CpG 31 (cg07343607), CpG 32 (cg20336472), CpG 33 (cg27653103), CpG 34 (cg03089725), CpG 35 (cg07862977), CpG 36 (cg24828864), CpG 37 (cg07250222), CpG 38 (cg09772154), CpG 39 (cg02179499), CpG 40 (cg22762615), CpG 41 (cg17794169), CpG 42 (cg06657142), CpG 43 (cg17028039), CpG 44 (cg12835048), CpG 45 (cg05368033), CpG 46 (cg03471571), CpG 47 (cg17710779), CpG 48 (cg01385327), CpG 49 (cg18566515), CpG 50 (cg17681491), CpG 51 (cg02210151), CpG 52 (cg11430259), CpG 53 (cg22633036), CpG 54 (cg25052156), CpG 55 (cg06791446), CpG 56 (cg02412684), CpG 57 (cg17337672), CpG 58 (cg13175830), CpG 59 (cg15049101), CpG 60 (cg11836372), CpG 61 (cg20277356), CpG 62 (cg14834653), CpG 63 (cg10314760), CpG 64 (cg10362842), CpG 65 (cg14856220), CpG 66 (cg00730832), CpG 67 (cg10788901), CpG 68 (cg23444251), CpG 69 (cg17997363), CpG 70 (cg12226006), CpG 71 (cg16595750), CpG 72 (cg16499947), CpG 73 (cg13707729), CpG 74 (cg23936294), CpG 75 (cg03708012), CpG 76 (cg10280007), CpG 77 (cg07062338), CpG 78 (cg01240724), CpG 79 ch.10.2610459F), CpG 80 (cg17235897), CpG 81 (cg12763813), CpG 82 (cg07344086), CpG 83 (cg06082804), CpG 84 (cg01049916), CpG 85 ch.10.2609808F), CpG 86 (cg23248910), CpG 87 (cg25294906), CpG 88 (cg00250743), CpG 89 (cg13734061), CpG 90 (cg15598650), CpG 91 (cg09820865), CpG 92 (cg08899523), CpG 93 (cg16653991), CpG 94 (cg03552039), CpG 95 (cg15986555), CpG 96 (cg26370911), CpG 97 (cg21608500), CpG 98 (cg02790486), CpG 99 (cg04902458), CpG 100 (cg07360076), CpG 101 (cg06883949), CpG 102 (cg03919554), CpG 103 (cg17269277), CpG 104 (cg23835677), CpG 105 (cg19870628), CpG 106 (cg08145949), CpG 107 (cg03860252), CpG 108 (cg04742135), CpG 109 (cg02350535), CpG 110 (cg24979233), CpG 111 (cg03874978), CpG 112 (cg21339581), CpG 113 (cg12997579), CpG 114 (cg13131329), CpG 115 (cg05203875), CpG 116 (cg00077738), CpG 117 (cg00907756), CpG 118 (cg19625524), CpG 119 (cg00525145), CpG 120 (cg03629948),

CpG 121 (cg25301756), CpG 122 (cg14988083), CpG 123 (cg11777917), CpG 124 (cg05311119), CpG 125 (cg02137691), CpG 126 (cg11545838), CpG 127 (cg14399850), CpG 128 (cg23286903), CpG 129 (cg22519233), CpG 130 (cg13572539), CpG 131 (cg09576124), CpG 132 (cg09711356), CpG 133 (cg04784842), CpG 134 (cg04168185), CpG 135 (cg19207803), CpG 136 (cg03262295), CpG 137 (cg07680129), CpG 138 (cg21782511), CpG 139 (cg01903185), CpG 140 (cg01795199), CpG 141 (cg15697036), CpG 142 (cg21311834), CpG 143 (cg17475304), CpG 144 (cg27294629), CpG 145 (cg11408622), CpG 146 (cg23197992), CpG 147 (cg21042539), CpG 148 (cg15442702), CpG 149 (cg26480626), CpG 150 (cg12033014), CpG 151 (cg00618323), CpG 152 (cg18229134), CpG 153 (cg04849878), CpG 154 (cg15676371), CpG 155 (cg06460652), CpG 156 (cg27320658), CpG 157 (cg20725716), CpG 158 (cg27002826), CpG 159 (cg06376277), CpG 160 (cg11112931), CpG 161 (cg02044145), CpG 162 (cg00538695), CpG 163 (cg05476287), CpG 164 (cg16326743), CpG 165 (cg18998860), CpG 166 (cg17386911), CpG 167 (cg11849703), CpG 168 (cg12982374) und CpG 169 (cg08802358).

1.11 Analyse der mRNA-Expression

mRNA-Genexpressionsdaten waren von N = 370 Tumorproben und N = 9 normalen Gewebeproben über das TCGA Forschungsnetzwerk (<http://cancergenome.nih.gov/>) verfügbar. Die Illumina HiSeq 2000 RNA-Sequenzierung Version 2 Analyse (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) wurde zur Datengenerierung durch das TCGA Forschungsnetzwerk verwendet. Normalisierte Zahlen („normalized counts“ [n.c.]) pro Gen wurde mithilfe von der SeqWare Rahmenarbeit über den RNA-Seq durch Erwartungsmaximierung (RNA-Seq by Expectation-Maximization, RSEM)-Algorithmus berechnet. mRNA-Genexpressionsdaten von LUSC-Zelllinien wurden von der ArrayExpress-Datenbank (Human Genome U219 Array, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) bezogen.

1.12 Analyse der Genkopienzahl / Kopienzahl-Variation

FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 CNV in den LUSC-Zelllinien wurden mit dem PICNIC Algorithmus von der GDSC-Datenbank einbezogen ([https:// www.cancerrx-gene.org/](https://www.cancerrx-gene.org/)).

1.13 Sensitivitätstest

Die Daten über die Sensitivität (ln-transformierte halbe maximale inhibitorische Konzentration [$\ln(IC_{50})$]) von LUSC-Zelllinien gegenüber der gegen FGFR-gerichteten Wirkstoffe PD173074 und AZD4547 wurden von der der GDSC-Datenbank (<https://www.cancerrx-gene.org/>) zugrundeliegende Originalarbeit von Iorio et al (2016) bezogen.

1.14 Statistik

SPSS (Version 24.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und die GraphPad Prism 8 Software wurden für die statistische Auswertung und die Kurvenzeichnungen der Daten verwendet. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Mann-Whitney *U*-Test) wurden für den Vergleich von zwei Gruppen verwendet. Die Spearmansche Rangkorrelation wurde für die bivariate Korrelationsanalyse verwendet. Alle Tests waren zweiseitig, P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant eingestuft. Eine Korrektur der P-Werte für multiples Testen wurde nach Bonferroni durchgeführt.

3. Ergebnisse

CpG-Dinukleotide in Promotoren von transkriptionell aktiven Genen sind tendenziell gering methyliert, während die Methylierung im Genkörper oftmals hoch ist. In malignen Zellen ist die Promotormethylierung oftmals höher als in benignen Zellen und im Genkörper dagegen niedriger (Berman et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit zunächst geprüft, ob die Gene der FGFR-Familie in LUSC ebenfalls ein solches typisches Methylierungsmuster aufweisen. Dazu wurde die Methylierung von insgesamt 169 CpG-Dinukleotiden untersucht, welche durch den verwendeten Infinium HumanMethylation450 BeadChip abgedeckt sind und innerhalb bzw. nahe an den Genen FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 liegen.

1.15 FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 weisen in Plattenepithelkarzinomen der Lunge eine differenzielle DNA-Methylierung im Vergleich zu angrenzendem Normalgewebe auf

Insgesamt wurden 36 CpG-Positionen innerhalb des FGFR1-Gens untersucht (Abbildung 4a). Die CpGs 1-24 liegen im Promotor und in der Promotorflanke, während die CpGs 25-36 über den Genkörper verteilt sind. Tendenziell niedrige Methylierungsgrade zeigten sich im zentralen Promotor (CpGs 5-22), während die Methylierung in Richtung der beiden Promotorflanken anstieg. Im Genkörper zeigte sich ein eher heterogenes Bild mit teilweise hohen aber auch niedrigen Methylierungsgraden (Abbildung 4b). Zwischen Tumor- und Normalgewebe konnten signifikant unterschiedliche Methylierungsgrade an 33 der 36 untersuchten CpGs gefunden. Tendenziell zeigten die im zentralen Promotor gelegenen CpGs eine höhere Methylierung im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Dagegen kehrte sich dieses Verhältnis in Richtung der beiden Promotorflanken um. Innerhalb des Genkörpers war wieder kein einheitliches Bild zu erkennen. Hier waren die Tumoren teilweise hyper- bzw. hypomethyliert. Die FGFR1-mRNA-Expression unterschied sich nicht signifikant zwischen Normal- und Tumorgewebe (Abbildung 4b).

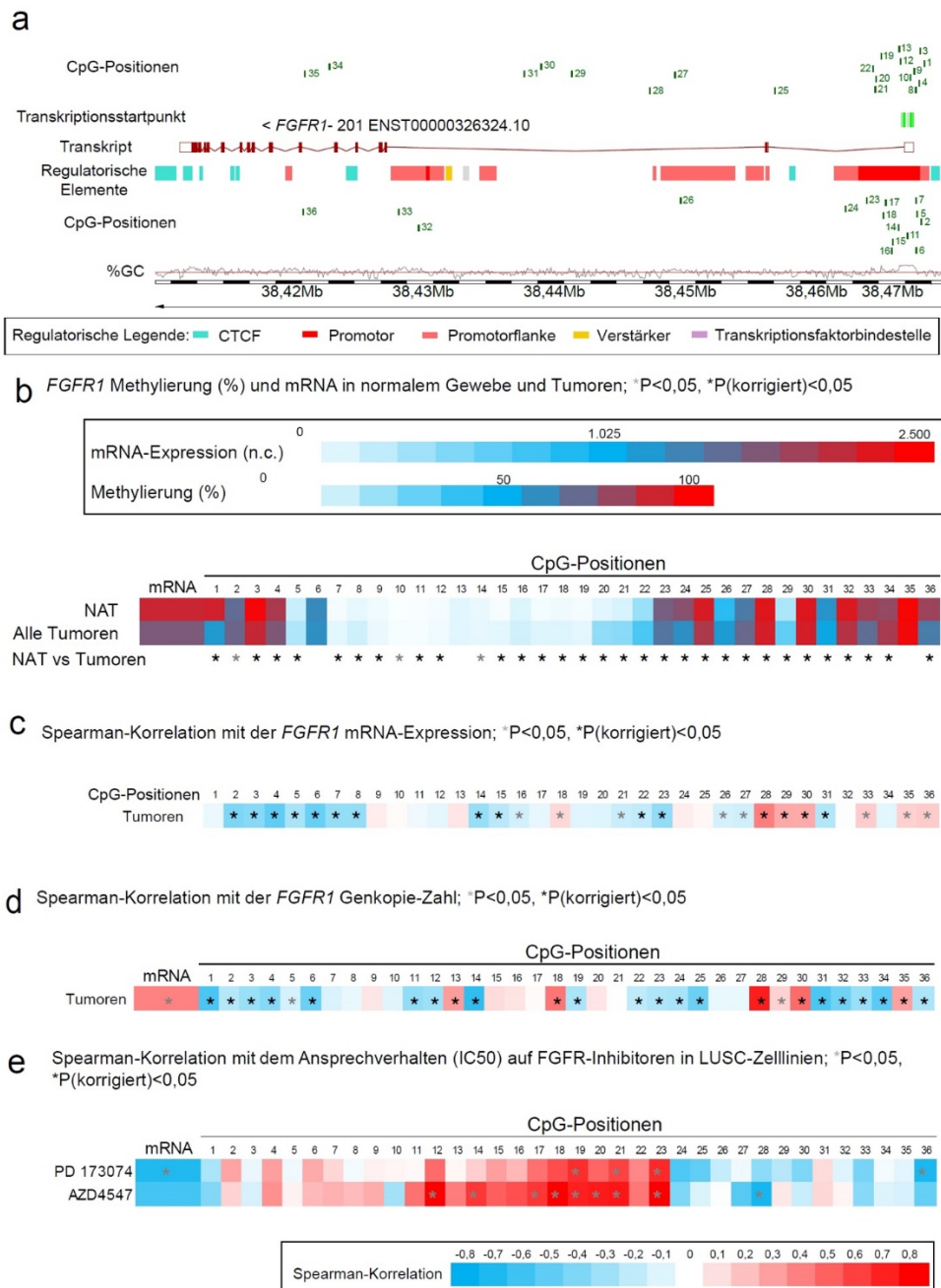


Abb. 4: Organisation des *FGFR1*-Gens (Konsensustranskript, regulatorische Elemente, GC-Gehalt und analysierte CpG-Positionen) (a), Methylierung der CpG-Positionen sowie *FGFR1*-mRNA-Expression in LUSC Tumorgewebe und Normalgewebe (b), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung mit der *FGFR1*-mRNA-Expression im Tumorgewebe (c), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der *FGFR1*-mRNA-Expression mit der *FGFR1*-Genkopienzahl (d) sowie Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der *FGFR1*-mRNA-Expression mit der Sensitivität (IC_{50}) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 (e).

Innerhalb des FGFR2-Gens und der nachgelagerten Sequenz wurden insgesamt 60 CpG-Dinukleotide durch den Infinium HumanMethylation450 BeadChip abgedeckt und im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die CpGs 37-70 liegen im zentralen Promotor und in den anliegenden Promotorflanken, CpGs 71-95 liegen über den Genkörper verteilt und das CpG 96 lag dem Gen nachgelagert (Abbildung 5a). Wie bereits für FGFR1 gefunden, waren auch im FGFR2-Gen generell niedrige Methylierungsgrade im Promotor zu finden, welche in Richtung der inneren Promotorflanke anstiegen. Im Genkörper lagen dagegen eher hohe Methylierungsgrade vor, allerdings zeigten einige CpG-Positionen auch innerhalb des Genkörpers eine niedrige Methylierung (Abbildung 5b). Von den untersuchten 60 CpGs waren 45 zwischen Normalgeweben und Tumoren signifikant unterschiedlich methyliert. Im Bereich des Promotors und dessen Flanken war die Methylierung im Tumor verglichen mit den Normalgeweben generell erhöht. Im Genkörper bzw. dem Gen nachgelagert lag wie bereits für FGFR1 beschrieben kein einheitliches Bild vor jedoch zeigten die meisten CpGs eine Hypermethylierung im Tumor verglichen mit den normalen angrenzenden Lungengeweben. Eine signifikant unterschiedliche mRNA-Expression konnte auch für FGFR2 nicht gefunden werden (Abbildung 5b).

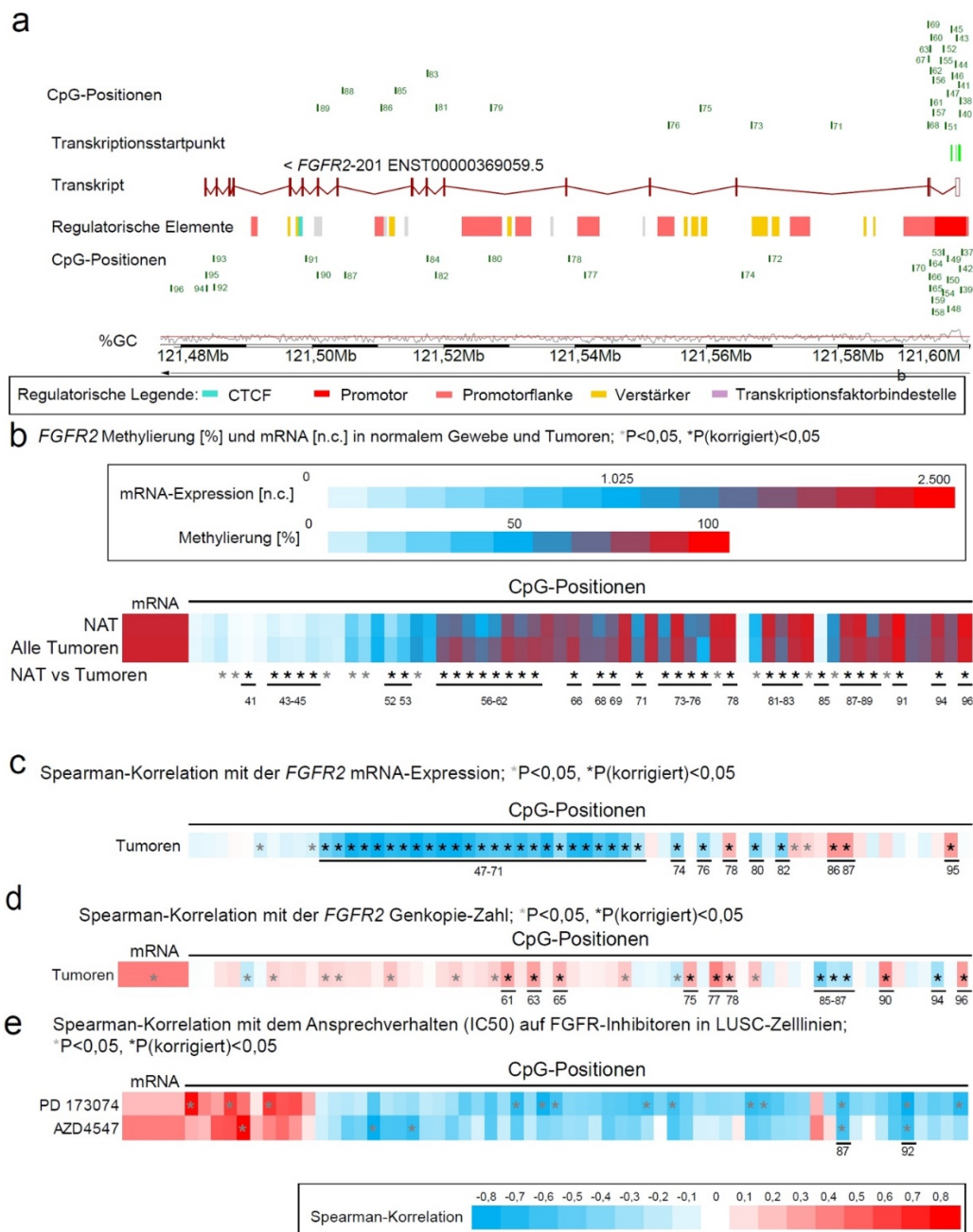


Abb. 5: Organisation des *FGFR2*-Gens (Konsensustranskript, regulatorische Elemente, GC-Gehalt und analysierte CpG-Positionen) (a), Methylierung der CpG-Positionen sowie *FGFR2*-mRNA-Expression in LUSC Tumorgewebe und Normalgewebe (b), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung mit der *FGFR2*-mRNA-Expression im Tumorgewebe (c), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der *FGFR2*-mRNA-Expression mit der *FGFR2*-Genkopienzahl (d) sowie Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der *FGFR2*-mRNA-Expression mit der Sensitivität (InIC₅₀) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 (e).

Die 46 untersuchten CpGs 97-142 befinden sich in den Promotorflanken bzw. im zentralen Promotor (CpGs 97-107) sowie im Genkörper und der nachgelagerten Sequenz des FGFR3-Gens (CpGs 108-142; Abbildung 6a). Signifikante Methylierungsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe zeigten 44 der 46 analysierten CpGs (Abbildung 6b). Auch für FGFR3 zeigte sich dabei wieder das für FGFR1 und FGFR2 bereits beschriebene Bild: Die Methylierung im zentralen Promotor war tendenziell niedrig und im Tumor vergleichsweise höher als im nicht-tumorösen Lungengewebe. In Richtung der beiden Promotorflanken stiegen die Methylierungsgrade an und waren dort teilweise im Normalgewebe signifikant erhöht. Der gesamte Genkörper und die nachgelagerte Sequenz zeigte, von einzelnen Ausnahmen abgesehen, eine sehr hohe Methylierung nahe 100%, welche im Normalgewebe oftmals im Vergleich zum Tumorgewebe nochmals signifikant stärker methyliert war. Die mRNA-Expression von FGFR3 war in den Plattenepithelkarzinomen der Lungen zwar vergleichsweise hoch, allerdings war dieser Unterschied bezogen auf das Normalgewebe statistisch nicht signifikant (Abbildung 6b).

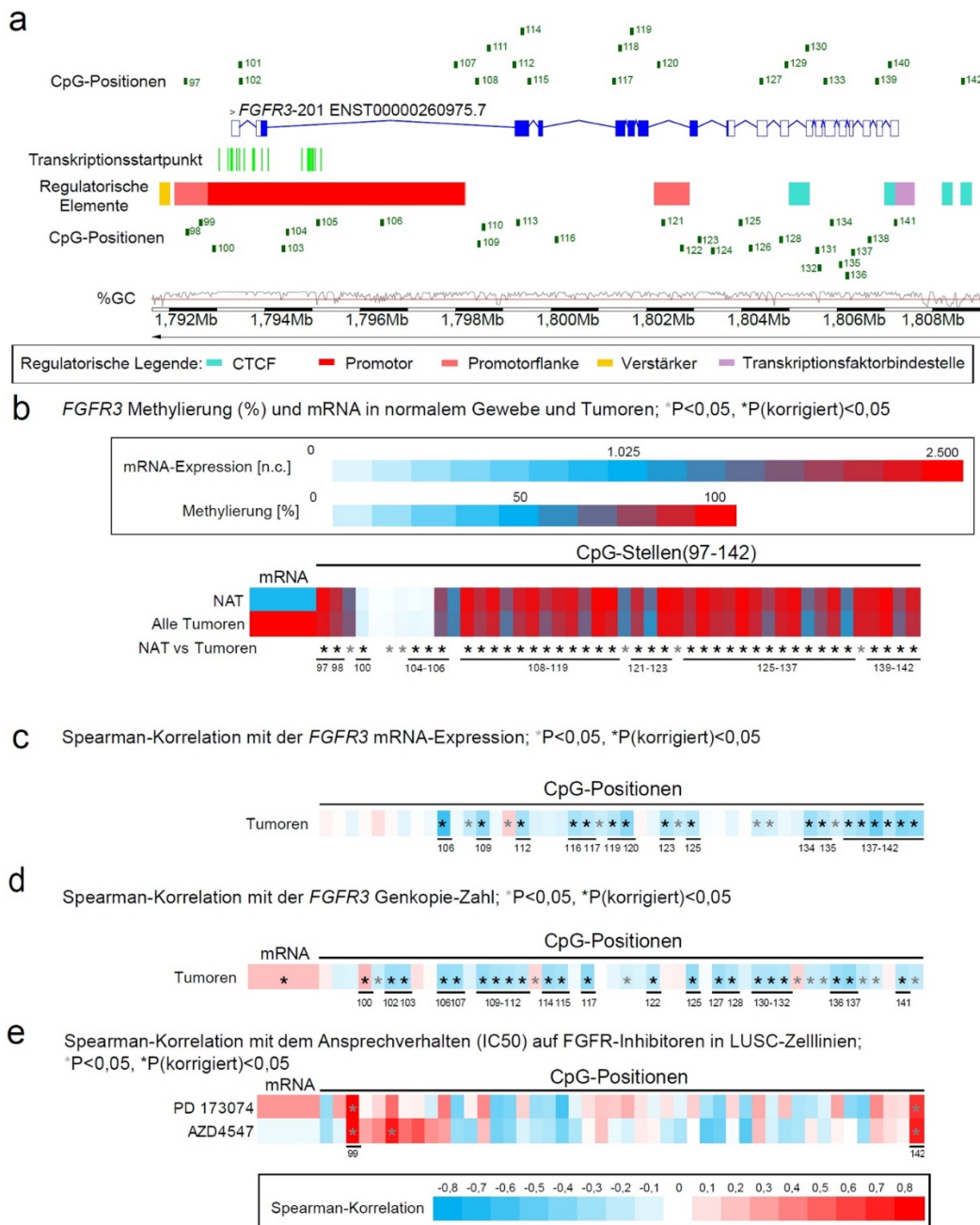


Abb. 6: Organisation des *FGFR3*-Gens (Konsensustranskript, regulatorische Elemente, GC-Gehalt und analysierte CpG-Positionen) (a), Methylierung der CpG-Positionen sowie *FGFR3*-mRNA-Expression in LUSC Tumorgewebe und Normalgewebe (b), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung mit der *FGFR3*-mRNA-Expression im Tumorgewebe (c), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der *FGFR3*-mRNA-Expression mit der *FGFR3*-Genkopienzahl (d) sowie Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der *FGFR3*-mRNA-Expression mit der Sensitivität (InIC₅₀) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 (e).

Als letzter Vertreter der FGFR-Genfamilie wurde die DNA-Methylierung von FGFR4 näher untersucht. Der Infinium BeadChip enthält insgesamt 27 Sonden, welche gegen CpGs (CpGs 143-169) innerhalb und nahe des FGFR4-Gens gerichtet sind. Die CpGs 143-153 liegen im Promotor und dessen Flanken, die CpGs 154-161 liegen im Genkörper und die CpGs 162-169 befinden sich in einem putativen alternativen Promotor und dessen Flanken (Abbildung 7a). Von diesen CpGs waren 20 signifikant differenziell methyliert. Das bereits für FGFR1-3 beschriebene Methylierungsmuster konnte auch für FGFR4 bestätigt werden. Niedrige Methylierungswerte, welche im Tumorgewebe signifikant erhöht waren, lagen im zentralen Promotor vor. Die Methylierung stieg dann in Richtung der Promotorflanken an und war dort teilweise im Normalgewebe signifikant höher verglichen mit dem Tumorgewebe (Abbildung 7b). Im Genkörper waren wieder Methylierungswerte nahe 100% erkennbar, welche im Normalgewebe signifikant höher als im Tumorgewebe war. Der putative alternative Promotor und dessen Flanken zeigten im Tumorgewebe zwar wieder etwas niedrigere Methylierungswerte im Vergleich zum Genkörper, allerdings lagen diese mit um die 50% vergleichsweise hoch im Vergleich zum eigentlichen Promotor und war verglichen mit dem Normalgewebe niedriger methyliert. Das für die Hauptpromotoren gefunden Methylierungsmuster konnte daher für den putativen alternativen Promotor nicht gefunden werden. Bezogen auf die FGFR4-mRNA-Expression könnte der für FGFR1, FGFR2 und FGFR3 beschriebene Befund bestätigt werden, indem keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Karzinomgewebe und nicht-malignem Gewebe gefunden werden konnte (Abbildung 7b).

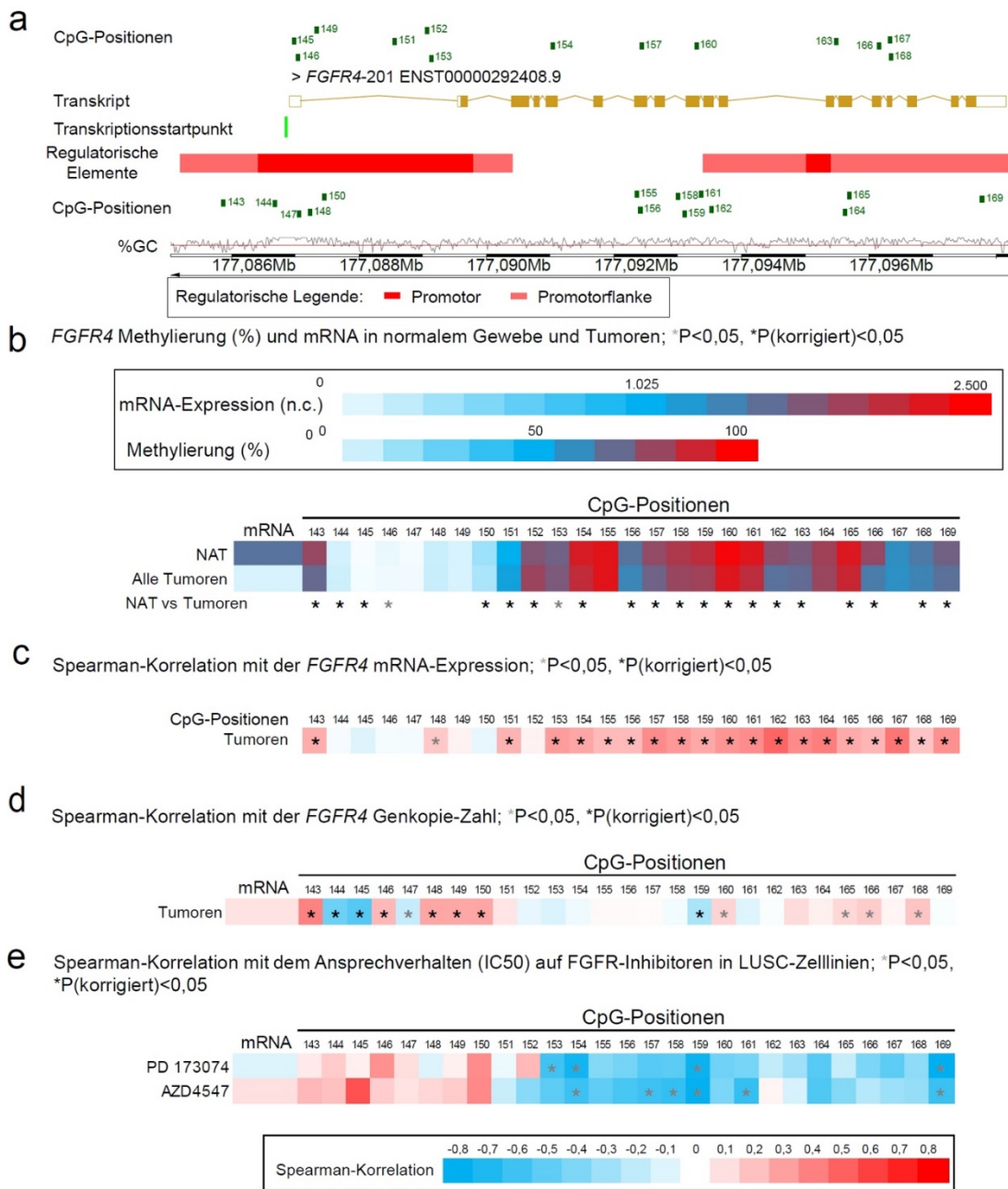


Abb. 7: Organisation des *FGFR4*-Gens (Konsensustranskript, regulatorische Elemente, GC-Gehalt und analysierte CpG-Positionen) (a), Methylierung der CpG-Positionen sowie *FGFR4*-mRNA-Expression in LUSC Tumorgewebe und Normalgewebe (b), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung mit der *FGFR4*-mRNA-Expression im Tumorgewebe (c), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der *FGFR4*-mRNA-Expression mit der *FGFR4*-Genkopienzahl (d) sowie Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der *FGFR4*-mRNA-Expression mit der Sensitivität (InIC₅₀) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 (e).

1.16 Die DNA-Methylierung von FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 korreliert mit der korrespondierenden mRNA-Expression

Bei über DNA-Methylierung epigenetisch regulierten Genen ist häufig eine inverse Korrelation der mRNA-Expression mit der DNA-Methylierung im Promotorbereich zu finden, während sich diese Korrelation für CpGs im Genkörper umdreht (Bao et al., 2021). Im zweiten Aspekt dieser Arbeit wurde diese Korrelation für jedes einzelne in die Studie eingeschlossene CpG-Dinukleotid im Tumorgewebe näher untersucht.

Von den 36 untersuchten CpGs im Bereich von FGFR1 und dessen regulatorischen Elementen zeigten 23 eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von FGFR1 und der DNA-Methylierung (Abbildung 4c). Von diesen signifikanten Korrelationen waren 16 invers während sieben positiv gerichtet waren. Mit Ausnahme der CpGs 28 und 31 waren die inversen Korrelationen wie zu erwarten im zentralen Bereich des Promotors und dessen Flanken zu finden, wohingegen im Genkörper positive Korrelationen zwischen der CpG-Methylierung und der mRNA-Expression sichtbar war.

Die 60 CpG-Positionen, welche im und um das FGFR2-Gen analysiert wurden, zeigten ein im Vergleich zu FGFR1 ein sehr ähnliches Muster (Abbildung 5c). Die Methylierung von 38 CpGs korrelierte signifikant mit der FGFR2-mRNA-Expression. Starke und ausschließlich inverse Korrelationen waren im zentralen Promotor und dessen Flanken im Bereich der Transkriptionsstartpunkte (CpGs 47-70) zu finden. Dagegen waren im Genkörper neben vereinzelter negativer auch positive Korrelationen zu finden.

Für FGFR3 zeigte sich ein etwas anderes Muster als es für FGFR1 und FGFR2 zu finden war (Abbildung 6c). Zwar wies wieder über die Hälfte der untersuchten CpGs (24 von 46) eine signifikante Korrelation der Methylierung mit der FGFR3-mRNA-Expression aus, allerdings war lediglich die Korrelation eines CpGs im Genkörper (CpG 111) positiv gerichtet, die übrigen signifikanten Korrelationen waren invers. Ebenfalls unterschiedlich verglichen mit den beiden zuvor untersuchten FGFR-Familienmitgliedern war für FGFR3 im zentralen Promotorbereich, um die Transkriptionsstartpunkte eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression zu finden. Dagegen waren solche inversen Korrelationen ebenfalls im Unterschied zu FGFR2 und FGFR3 weit und homogen über den Genkörper verteilt und sogar hinter dem Gen liegend zu finden.

Ebenfalls anders als FGFR1 und FGFR2, jedoch auch konträr zu FGFR3, zeigte sich das Bild für FGFR4 (Abbildung 7c). Für FGFR4 konnten für 20 der 27 untersuchten CpG-Positionen signifikante Korrelationen zwischen der DNA-Methylierung und der FGFR4-mRNA-Expression gefunden werden, welche jedoch ausnahmslos gleichgerichtet waren. Bemerkenswerter Weise waren diese signifikanten Korrelationen über den gesamten Genkörper verteilt zu finden und lediglich im zentralen Promotorbereich um die Transkriptionsstartpunkte nicht zu beobachten.

1.17 Die DNA-Methylierung von FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 korreliert mit der Kopienzahl des jeweiligen Gens

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte eine Korrelation der DNA-Methylierung mit der Amplifikation des Locus für das SHOX2-Gen gezeigt werden (Schneider et al., 2011). Eine entsprechende Analyse für die FGFR-Gene war Bestandteil des dritten Teilaspekts dieser Studie.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die FGFR1-mRNA-Expression signifikant positiv mit der Kopienzahl des FGFR1-Genlokus korreliert (Abbildung 4d). Von den 36 im Bereich des FGFR1-Lokus untersuchten CpG-Positionen korrelierten 25 signifikant mit der FGFR1-mRNA-Expression. Die Richtung dieser Korrelationen (Abbildung 4d) zeigte ein im Vergleich zur Korrelation der DNA-Methylierung mit der mRNA-Expression (Abbildung 4c), wie es aufgrund der starken Korrelation von FGFR1-mRNA-Expression und Genkopienzahl bereits zu erwarten war.

Für FGFR2 konnte ebenfalls eine signifikante stark positive Korrelation zwischen mRNA-Expression und FGFR2-Kopienzahl gefunden werden (Abbildung 5d). Von den 60 untersuchten CpG-Dinukleotiden in und um den FGFR2-Genlokus zeigten 22 eine signifikante Korrelation mit der Kopienzahl, wovon sechs negativ und 16 positiv gerichtet waren. Anders als für FGFR1 konnte für FGFR2 trotz der signifikanten Korrelation von Methylierung und Expression sowie Expression und Genkopienzahl unterschiedliche Muster der Korrelationen von Methylierung und mRNA-Expression (Abbildung 5c) sowie Methylierung und Kopienzahl (Abbildung 5d) gefunden werden. Signifikante positive Korrelation fanden sich im zentralen Promotor und für die innere Promotorflanke, während ein uneinheitliches

Muster negativer und positiver Korrelationen für den Genkörper und die dem Gen nachgelagerten Sequenzen zu finden war.

Die mRNA-Expression des FGFR3-Gens korreliert zwar nur schwach aber signifikant positiv mit der Genkopienzahl (Abbildung 6d). 31 der 46 analysierten CpG-Positionen zeigten signifikante Korrelationen der Genkopienzahl mit der DNA-Methylierung (Abbildung 6d), welche von drei Ausnahmen abgesehen negativ gerichtet war und damit das Muster widerspiegelte, wie es bereits für die Korrelationen von mRNA-Expression und Methylierung zu finden war (Abbildung 6c).

FGFR4 als letzter untersuchter Vertreter der Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptoren zeigte keine signifikante Korrelation von FGFR4-mRNA-Expression und der Zahl der FGFR4 Genkopien (Abbildung 7d). Entsprechend fand sich auch für das Muster der Korrelationen von CpG-Methylierung und Kopienzahl (Abbildung 7d) ein im Vergleich zu dem Muster der Korrelationen CpG-Methylierung und mRNA-Expression (Abbildung 7c) anderes Bild. Insgesamt konnten statistisch signifikante Korrelationen mit der FGFR4-Genkopienzahl für 13 der 27 untersuchten CpGs gefunden werden, welchen in vier Fällen negativ und in neun Fällen positiv gerichtet war. Die stärksten negativen und positiven Korrelationen fanden sich im zentralen Promotor und in der äußeren Promotorflanke. Eine Systematik war hier nicht zu erkennen (Abbildung 7d).

1.18 Die DNA-Methylierung von FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 korreliert mit der Sensitivität von Zelllinien gegenüber FGFR-Inhibitoren

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wiesen bereits auf Korrelationen der DNA-Methylierung der FGFR-Gene mit der Sensitivität gegenüber einer Behandlung von HNSCC-Zelllinien mit FGFR-Inhibitoren hin (Bao et al., 2021). Im letzten Teilaspekt dieser Studie wurde die Sensitivität (In-transformierte halbmaximale inhibitorische Konzentration [$\ln(IC_{50})$]) von 15 humanen Zelllinien von LUSC gegenüber der beiden FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZD4547 in Abhängigkeit der Methylierung der insgesamt 169 CpG-Dinukleotide innerhalb und angrenzend der Gene FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 untersucht. Des Weiteren wurde die Korrelation der mRNA der vier FGF-Rezeptoren mit der Sensitivität korreliert.

Eine hohe FGFR1-mRNA-Expression korrelierte signifikant mit einer niedrigen $\ln(IC_{50})$ gegenüber einer Behandlung mit PD173074, d.h. eine hohe Expression korrelierte mit einer hohen Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff. Für das kleine Molekül AZD4547 konnte dies tendenziell bestätigt werden, jedoch wurde hier die statistische Signifikanz nicht erreicht (Abbildung 4e). Von den 36 analysierten CpG-Positionen korrelierte die Methylierung in drei (PD173074) bzw. acht (AZD4547) Fällen signifikant positiv mit der entsprechenden $\ln(IC_{50})$, also einer geringen Sensitivität gegenüber der Wirkstoffe. Diese CpGs befinden sich im zentralen Promotor des FGFR1-Gens. Für jeweils ein CpG im Genkörper wurde eine signifikante negative Korrelation gefunden (CpG 36 / PD173074 und CpG 28 / AZD4547). Die Methylierung von drei CpGs korrelierte sowohl mit der $\ln(IC_{50})$ von PD173074 als auch von AZD4547 signifikant positiv (Abbildung 4e).

Die mRNA-Expression von FGFR2 korrelierte weder mit der Sensitivität gegenüber PD173074 noch gegenüber AZD4547 (Abbildung 5e). Im Bereich der CpGs 37 – 46 fanden sich positive Korrelationen mit der $\ln(IC_{50})$ der beiden FGFR-Inhibitoren, von denen drei (CpG 37, 40 und 43 / PD173074) bzw. eine (CpG 41) statistische Signifikanz erreichte. Die Methylierung der restlichen CpGs zeigte mit einer Ausnahme durchweg keine oder negative Korrelationen mit den beiden $\ln(IC_{50})$ -Werten. Zehn CpGs (PD173074) bzw. vier CpGs (AZD4547) wiesen dabei statistische Signifikanz auf. Die Methylierung der CpGs 87 und 92 korrelierte signifikant negativ mit der $\ln(IC_{50})$ beider Wirkstoffe, also mit einer hohen Sensitivität gegenüber der FGFR-Inhibition (Abbildung 5e).

Wie schon für FGFR2 beobachtet, war die mRNA-Expression von FGFR3 ebenfalls nicht mit der Sensitivität gegenüber den FGFR-Inhibitoren korreliert (Abbildung 6e). Die Korrelationsanalysen der Methylierung der 46 CpG-Dinukleotide in und um FGFR3 mit der Sensitivität gegenüber einer FGFR-Inhibition zeigte ein heterogenes Muster. Die Methylierung von zwei CpGs (CpG 99 und CpG 142) korrelierte signifikant positiv mit der $\ln(IC_{50})$ von PD173074. Für diese beiden CpGs sowie das CpG 102 wurden ebenfalls signifikant positive Korrelationen mit der $\ln(IC_{50})$ von AZD4547 gefunden. Damit korrelierte die DNA-Methylierung von CpG 99 und CpG 142 signifikant positiv mit der $\ln(IC_{50})$ beider Wirkstoffe, also einer niedrigen Sensitivität (Abbildung 6e).

FGFR4 zeigte ebenfalls keine signifikante Korrelation mit den $\ln(IC_{50})$ von PD173074 oder AZD4547 (Abbildung 7e). Im Promotorbereich korrelierte die DNA-Methylierung

tendenziell positiv mit der $\ln(\text{IC}_{50})$ beider Wirkstoffe, allerdings wurde hier keine statistische Signifikanz erreicht. Die Methylierung des Genkörpers bzw. des putativen alternativen Promotors korrelierte dagegen tendenziell negativ mit der $\ln(\text{IC}_{50})$ beider Wirkstoffe. Für vier CpGs (CpG 153, 154, 159 und 169 / PD173074) bzw. sechs CpGs (CpG 154, 157 – 159, 161 und 169 / AZD4547) konnte statistische Signifikanz erreicht werden. Damit korrelierte die Methylierung der drei CpGs 154, 159 und 169 signifikant negativ mit der $\ln(\text{IC}_{50})$ beider Wirkstoffe, also mit einer hohen Sensitivität gegenüber der FGFR-Inhibition (Abbildung 7e).

Insgesamt korrelierte die DNA-Methylierung von zehn CpGs (CpG 19, 21, 23, 87, 92, 99, 142, 154, 159 und 169) signifikant mit den $\ln(\text{IC}_{50})$ beider Wirkstoffe. Die Methylierung dieser CpGs wurde im Weiteren genauer hinsichtlich der Assoziation mit der Sensitivität gegenüber den FGFR-Inhibitoren untersucht. Die Methylierungsgrade der Zelllinien wurden anhand der jeweiligen medianen Methylierung dichotomisiert, um so eine hyper- (Methylierung über dem Median) bzw. hypomethylierte (Methylierung unterhalb des Medians) zu bilden. Anschließend wurden die Mittelwerte der $\ln(\text{IC}_{50})$ beider Wirkstoffe zwischen den Gruppen verglichen. Sechs CpGs zeigten nach Dichotomisierung eine signifikante Assoziation der hyper- und hypomethylierten Gruppe von Zelllinien mit der Sensitivität gegenüber beider Wirkstoffe (Abbildung 8).

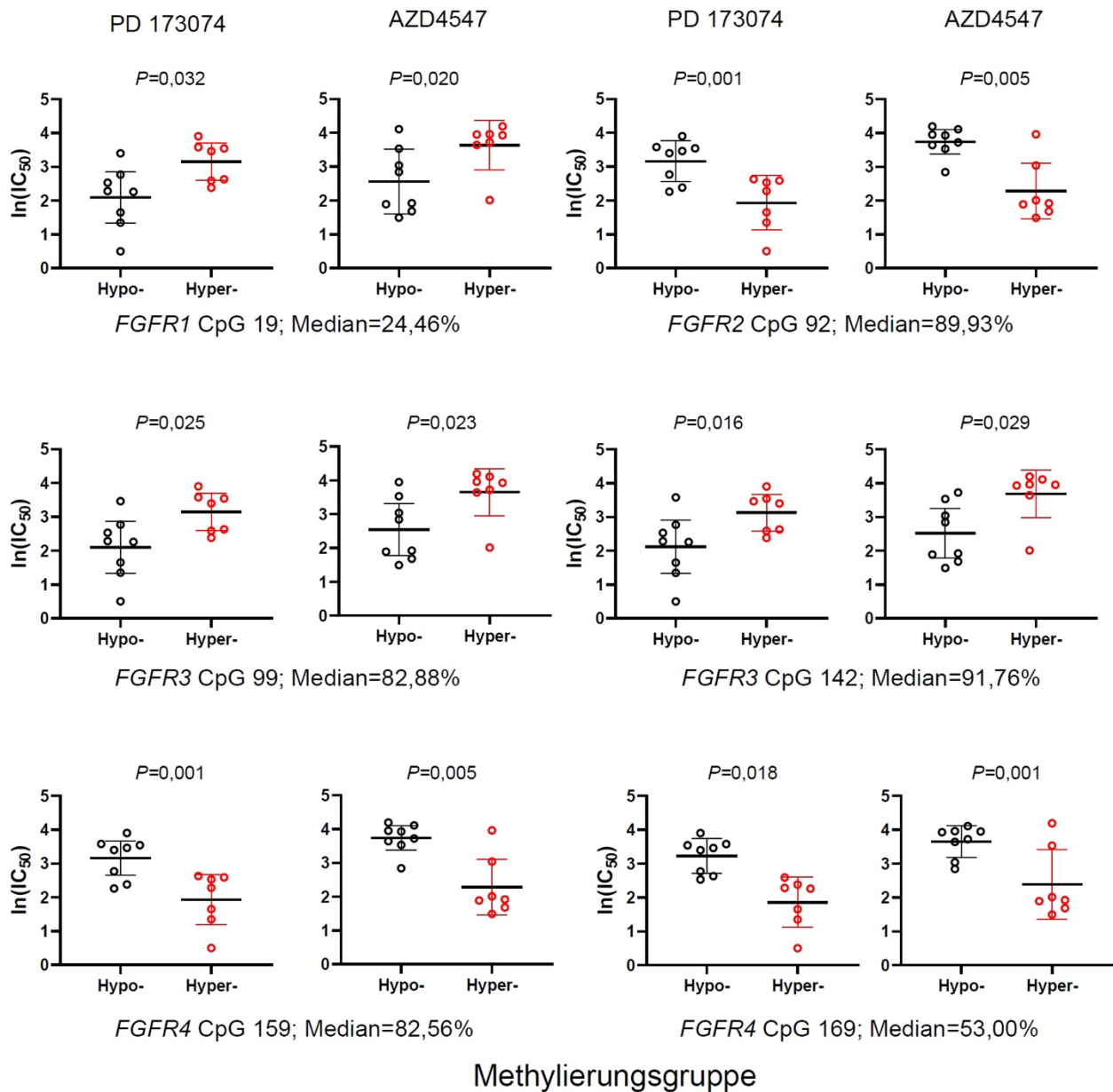


Abb. 8: Sensitivität (ln[IC₅₀]) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547. Die LUSC-Zelllinien wurden anhand der medianen Methylierung sechs ausgewählter CpG-Positionen innerhalb der FGFR-Genfamilie (FGFR1: CpG 19; FGFR2: CpG 92; FGFR3: CpG 99, CpG 142; FGFR4: CpG 162, CpG 169) ausgewählt.

Für die CpGs 19 (FGFR1), 99 (FGFR3) und 142 (FGFR3) war eine Hypomethylierung mit einer niedrigeren $\ln(IC_{50})$, also einer hohen Sensitivität gegenüber einer FGFR-Inhibition assoziiert. Für die CpGs 92 (FGFR2), 159 (FGFR4) und 169 (FGFR4) war der umgekehrte Fall zu erkennen. Dies steht im Einklang mit den bereits beschriebenen und den Abbildungen 4e – 7e gezeigten Korrelationsanalysen.

4. Diskussion

NSCLC, darunter LUSC, stellen weltweit einer der Hauptursachen krebserkrankter Todesfälle dar (WCRF, 2023). Die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren für eine zielgerichtete Therapie hat die Behandlung insbesondere von Adenokarzinomen der Lunge in den letzten Jahren deutlich verbessert (eine Überblick liefert Grodzka et al., 2023). Niedermolekulare Inhibitoren, die gegen RTKs (wie EGFR und FGFR), Komponenten der Signaltransduktion und Zellzyklus-Checkpoints gerichtet sind, stellen inzwischen ein Standard bei der medikamentösen Therapie von Adenokarzinomen der Lunge dar (Grodzka et al., 2023). Obwohl auch LUSC rekurrente molekulare Veränderungen aufweist, beispielsweise in der FGFR-vermittelten Signalkaskade, konnte bisher für keinen niedermolekularen Inhibitor eine ausreichende klinische Wirksamkeit gezeigt werden, was zumindest teilweise auf eine ungenügende Leistungsfähigkeit von entsprechenden Biomarkern zurückzuführen sein könnte (eine Überblick liefert Lau et al., 2022). Hier geraten epigenetische Modifikation zunehmend in den Fokus klinischer Forschung, sowohl als therapeutisches Target als auch als Quelle für Biomarker (Lau et al., 2022 und Cai et al., 2023). Die rekurrente Veränderung der FGFR-Signalkaskade in LUSC eignet diese besonders als Ziel gerichteter Therapien, welche bisher in klinischen Studien keine ausreichende Wirksamkeit gezeigt haben, vermutlich auch wegen einer schlechten Biomarker-gesteuerten Patienten-Selektion (Lau et al., 2022 und Addeo et al., 2022). Insbesondere FGFR-CNV und -mRNA-Überexpression eigneten sich als alleinstehende Biomarker nicht (Lau et al., 2022 und Addeo et al., 2022 und Aggarwal et al., 2019). Nichtsdestotrotz ist bei einzelnen Patienten eine klinische Wirksamkeit von FGFR-Inhibitoren zu beobachten (Aggarwal et al., 2019), wodurch eine Rationale für die Entwicklung akkuraterer Biomarker oder Biomarker-Kombinationen gebildet wird. Ein genaueres Verständnis der Regulation der FGFR-Genfamilie in LUSC, insbesondere auf epigenetischer Ebene über DNA-Methylierung von CpG-Dinukleotiden, könnte dazu beitragen, geeignete zu FGFR-CNV und -mRNA komplementäre prädiktive Biomarker zu entwickeln. Ein Biomarker-gesteuerter Einsatz von FGFR-Inhibitoren hat bereits bei der Behandlung FGFR-mutierter Urothelkarzinome zu einem Durchbruch führen können (Siefker-Radtke et al., 2022).

Während Mutationen der FGFR-Genfamilie in LUSC selten ist, kann die Aktivierung der FGFR-Kaskade aufgrund von FGFR-Genamplifikationen erfolgen. Ein weiterer

Mechanismus könnte auf der Aktivierung bzw. Deaktivierung der FGFR-Signalkaskade über aberrante DNA-Methylierung beruhen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte dies bereits für das HNSCC erfolgreich gezeigt werden (Bao et al., 2021). Ziel der vorliegenden Arbeit war daher eine detaillierte Analyse der DNA-Methylierung der FGFR-Genfamilie hinsichtlich der Korrelationen mit der mRNA-Expression und der Genkopienzahl der entsprechenden FGFRs sowie der Sensitivität gegenüber selektiver niedermolekularer FGFR-Inhibitoren. Die DNA-Methylierungsanalyse wurde auf Ebene der Einzel-CpG-Dinukleotide durchgeführt, da die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits die hohe individuelle Signifikanz distinkter CpG-Dinukleotide zeigen konnte (Bao et al., 2021).

Es wurde bereits gezeigt, dass beim HNSCC das CpG-Methylierungsmuster der FGFR-Gene mit dem von epigenetisch-regulierten Genen im Einklang ist (Bao et al., 2021). Hohe Methylierungsgrade wurden bei den analysierten CpG-Stellen primär in der Promotorflankenregion und in der Genkörperregion nachgewiesen, während niedrige Methylierungsgrade hauptsächlich in der zentralen Promotorregion nachgewiesen wurden (Bao et al., 2021). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für LUSC bestätigt werden und weist auf eine epigenetische Regulation der FGFRs in LUSC hin, wie im Weiteren detailliert beschrieben.

Die Überexpression des FGFR1-Proteins als rationaler Biomarker mit hoher Spezifität und Sensibilität hat sich bei der Analyse von Tumorproben von NSCLC-Patienten zur Identifizierung von Patienten, welche potenziell von gegen den FGFR1-Signalweg gerichteten Wirkstoffen profitieren, als besonders leistungsfähig herausgestellt (Göke et al., 2015). Es wird angenommen, dass bei diversen Tumorarten, unter anderem dem NSCLC, die Hypomethylierung von spezifischen FGFR1-Promotorstellen als einen gemeinsamer Mechanismus vorliegt, um FGFR1-Überexpression zu erreichen. Im Einklang damit konnten in der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede der Methylierungsgrade in Tumoren und den normalen benachbarten Geweben festgestellt werden sowie ebenfalls einen starken Zusammenhang mit der mRNA-Expression und der CNV nachgewiesen werden. Präziser beschrieben korrelierte eine geringere Promotor-DNA-Methylierung oft mit einem erhöhten mRNA-Expressionslevel bei FGFR1, FGFR2 und FGFR3. Es konnte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen FGFR4-mRNA-Expression und Genkörpermethylierung gezeigt werden. Genstilllegung, vermittelt durch Promotor-DNA-Hypermethylierung

ist bekannt als eines der Hauptmerkmale von Karzinomen (Baylin et al., 2011). Auf Basis von Analysen der Genmethylierung konnte die DNA-Methylierung in verschiedenen genomischen Kontexten bewertet werden, wie etwa dem Transkriptionsstartpunkt sowie der Genkörper- und Promotorregion. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung und die Gentranskriptionsaktivität je nach Kontext signifikant unterschiedlich sind. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Hypermethylierung der Promotorregion mit einer geringen mRNA-Expression der Gene FGFR1, FGFR2 und FGFR3 korreliert (Weiss et al., 2010). FGFR1-Amplifikationen treten oft in LUSC auf. Signifikante Korrelation zwischen CNV der FGFRs und der Methylierung der korrespondierenden genspezifischen CpG-Stellen konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Diese Korrelation war konstant mit der mRNA-Genexpression von FGFR1, FGFR2 und FGFR3, jedoch nicht von FGFR4. Diese Ergebnisse untermauern noch einmal die Relevanz der epigenetischen Regulierung auf die Genexpression und die daraus resultierende genetische Variation. Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen der CpG-Methylierung und dem Ansprechverhalten auf zwei selektive niedermolekulare FGFR-Inhibitoren (PD173074 und AZD4547) in LUSC-Zelllinien in dieser Arbeit untersucht, um einen direkten Zusammenhang zwischen CpG-Methylierung und der Sensitivität gegenüber FGFR-TKIs nachweisen zu können. AZD4547, welcher ein selektiver Tyrosinkinaseinhibitor von FGFR1, FGFR2 und FGFR3 ist, inhibiert die FGFR-Signalübertragung und das Wachstum von Tumorzelllinien mit dysregulierter FGFR-Expression. Kürzlich veröffentlichte klinische Studien weisen nach, dass Patienten mit FGFR-Fusionen und/oder FGFR-Neuordnungen das höchste Ansprechverhalten auf AZD4547 zeigen, gefolgt von denen mit FGFR-Mutationen (Abou-Alfa et al., 2020). Eine weitere kürzlich veröffentlichte Studie von Ma et. al. (2023) beschreibt, dass AZD4547 kombiniert mit Nanopartikel-Albumin-gebundenem Paclitaxel die Phosphorylierung des MAPK-Signalwegs supprimiert, wodurch die Kombination die Apoptose auslöst und die Proliferation von NSCLC unterdrückt. PD173074 ist ein selektiver niedermolekularer FGFR1/3-Inhibitor, der die von FGF-Rezeptoren ausgehenden Signaltransduktionen unterbricht (Mohammadi et al., 1998). Studien haben gezeigt, dass Tumorzelllinien mit höherer FGFR1/3-Expression sensibler auf den FGFR1/3-Inhibitor PD173074 ansprechen (Li et al., 2020). In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass die DNA-Methylierung von acht CpG-Positionen innerhalb FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 mit der Sensitivität

von LUSC-Zelllinien gegenüber einer Behandlung mit PD173074 und AZD4547 assoziiert ist. Dabei wurden in der Promotorregion positive Korrelationen und in der Genkörperregion negative Korrelationen festgestellt. Dies zeigt weiterhin, dass sich die Beziehung zwischen DNA-Methylierung und Transkription je nach Region und Kontext signifikant unterscheidet. Aus früheren Studien lässt sich entnehmen, dass FGFR1-Amplifikationen automatisch in höherer mRNA-Expression resultieren und daher nicht unbedingt als ideale Biomarker für die Selektion von Patienten für eine zielgerichteten TKI-Therapie fungieren (Göke et al., 2015). Aufgrund mangelnder Alternativen, werden nichtsdestotrotz weiterhin Patienten anhand von FGFR1-Amplifikationen, FGFR3-Mutationen, oder FGFR2/3-Fusionen für FGFR-Inhibitor-Behandlungen selektiert (Lim et al., 2016; Cheng et al., 2017). Laut einer kürzlich veröffentlichten Studie kann keine klare Korrelation zwischen FGFR1-Amplifikationen und -Veränderungen und hoher FGFR1-Expression festgestellt werden (Moes-Sosnowska J et al., 2022).

Die vorliegende Studie weist einige Schwächen auf. Insgesamt wurden nur diejenigen 169 CpG-Dinukleotide untersucht, die durch den Infinium HumanMethylation450 Bead-Chip abgedeckt wurden. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen auf die hohe Variabilität der spezifischen Eigenschaften der einzelnen CpGs hin, sodass in weiteren Studien mittels geeigneter Techniken, beispielsweise der Bisulfit-Sequenzierung, die Gesamtheit aller in den FGFR-Genen enthaltenen CpGs untersucht werden sollte. Auf der anderen Seite beherbergen die untersuchten 169 CpGs aber auch das potenzielle Problem des multiplen Testens. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse zwar für multiples Testen korrigiert, dennoch ist eine Validierung der Ergebnisse in einer unabhängigen Patientenkohorte vonnöten. Die Verwendung der TCGA-Kohorte, die Patienten umfasst, welche keine gegen FGFR-gerichtete Therapie erhielten sowie die Untersuchung von Zelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren stellt eine weitere Limitierung dar. Idealerweise würde für diese Untersuchung eine Kohorte von Patienten untersucht, deren Tumormaterial vor Beginn einer gegen FGFR-gerichteten Therapie gewonnen wurde. Eine solche Kohorte ist zurzeit leider nicht verfügbar. Letztendlich umfasst die vorliegende Studie lediglich korrelative Analysen, sodass über Kausalitäten hinsichtlich der DNA-Methylierung keine definite Aussage getroffen werden kann. Hierfür sind umfassende funktionale Analysen notwendig.

Konkludierend liefert die vorliegende Arbeit eine Rationale für die weitere klinische Testung der FGFR-DNA-Methylierung, insbesondere zusammen mit FGFR-mRNA-Expression, -CNV und -Neuordnung, als prädiktiver Biomarkerkandidat bei LUSC-Patienten, die einen selektiven niedermolekularen FGFR-Inhibitor erhalten. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte hohe Relevanz der DNA-Methylierung im Kontext der FGFR-Signalkaskade unterstützt zudem Ansätze, die auf einer kombinierten epigenetischen und anti-FGFR-Therapie beruhen.

5. Zusammenfassung

Nichtkleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC), darunter Karzinome mit squamöser Histologie (Plattenepithelkarzinome, LUSC), stellen weltweit einer der Hauptursachen krebserkrankter Todesfälle dar. Die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren für eine zielgerichtete Therapie hat die Behandlung insbesondere von Adenokarzinomen der Lunge in den letzten Jahren deutlich verbessert. Niedermolekulare Inhibitoren, die gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR gerichtet sind, stellen inzwischen ein Standard bei der medikamentösen Therapie von Adenokarzinomen der Lunge dar. Für LUSC konnten jedoch bisher für keinen niedermolekularen Inhibitor eine ausreichende klinische Wirksamkeit gezeigt werden. Die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR)-Signalkaskade ist in LUSC häufig dysreguliert und verändert und könnte ein Ziel gerichteter Therapien darstellen. Allerdings konnte bisher ebenfalls keine Wirksamkeit von selektiven FGFR-Inhibitoren in dieser Tumorentität gezeigt werden. Ein genaueres Verständnis der Regulation der FGFR-Genfamilie in LUSC, insbesondere auf epigenetischer Ebene über DNA-Methylierung von CpG-Dinukleotiden, könnte dazu beitragen, eine kleine Subgruppe von LUSC vorab zu identifizieren, die auf eine zielgerichtete Therapie mit selektiven FGFR-Inhibitoren ansprechen und davon profitieren könnten. Ein Biomarker-gesteuerter Einsatz von FGFR-Inhibitoren hat bereits bei der Behandlung FGFR-mutierter Urothelkarzinome zu einem Durchbruch führen können. Während Mutationen der FGFR-Genfamilie in LUSC selten ist, kann die Aktivierung der FGFR-Kaskade aufgrund von FGFR-Genamplifikationen erfolgen. Ein weiterer Mechanismus könnte auf der Aktivierung bzw. Deaktivierung der FGFR-Signalkaskade über aberrante DNA-Methylierung beruhen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Analyse der DNA-Methylierung der FGFR-Genfamilie (FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4) mit Einzel-CpG-Dinukleotid-Auflösung. Hierfür wurde die DNA-Methylierung von 169 CpG-Dinukleotiden in 370 LUSC-Tumoren und 42 Normalgeweben des „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) hinsichtlich der Korrelationen mit der mRNA-Expression und der Genkopienzahl der entsprechenden FGFRs sowie anhand von 15 LUSC-Zelllinien, die mit den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 behandelt wurden, untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der spezifischen CpG-Position eine aberrante Methylierung von LUSC-Tumoren gegenüber von Normalgeweben vorlag und

diese mit der mRNA-Expression und Genamplifikation der jeweiligen FGFRs sowie der Sensitivität gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 korrelierte.

Die vorliegende Arbeit bildet eine Rationale für das Testen der DNA-Methylierung spezifischer CpG-Positionen innerhalb der FGFR-Genfamilie in Patientenproben von LUSC, welche mit FGFR-Inhibitoren behandelt werden, um den prädiktiven Wert für das Therapieansprechen zu bestimmen. Dadurch könnte zukünftig eine Biomarker-gesteuerte Behandlung von einer Subgruppe von LUSC-Patienten ermöglicht werden.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Vereinfachte Darstellung einer Expression einer Rezeptor-Tyrosinkinase im Normalzustand (umrandet) und bei gängigen Veränderungen genetischen, genomischen und epigenetischen Veränderungen (von links nach rechts.: Amplifikation führt zu einer Überexpression, Normalzustand, Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung, DNA-Methylierung führt zur Herunterregulation). 10
- Abb. 2:** Vereinfachte Darstellung von EGF- und FGF-Rezeptoren und deren Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (PI3K-AKT, RAS-RAF-MEK-ERK), die wiederum Signale zur Steuerung von Zellüberleben und -wachstum in den Nukleus weiterleiten. 13
- Abb. 3:** Schematische Darstellung einer physiologischen Bindung von Liganden an RTK und anschließender Phosphorylierung mit Aktivierung konsekutiver Signalkaskaden (oben) und Inhibierung dieses physiologischen Vorgangs durch einen EGFR-Inhibitor, der die RTK-Bindungsstelle blockiert, wodurch eine Phosphorylierung und Aktivierung konsekutiver Signalkaskaden inhibiert werden (unten). 19
- Abbildung 4:** Organisation des FGFR1-Gens (Konsensustranskript, regulatorische Elemente, GC-Gehalt und analysierte CpG-Positionen) (a), Methylierung der CpG-Positionen sowie FGFR1-mRNA-Expression in LUSC Tumorgewebe und Normalgewebe (b), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung mit der FGFR1-mRNA-Expression im Tumorgewebe (c), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der FGFR1-mRNA-Expression mit der FGFR1-Genkopienzahl (d) sowie Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der FGFR1-mRNA-Expression mit der Sensitivität (InIC₅₀) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 (e). 30
- Abbildung 5:** Organisation des FGFR2-Gens (Konsensustranskript, regulatorische Elemente, GC-Gehalt und analysierte CpG-Positionen) (a), Methylierung der CpG-Positionen sowie FGFR2-mRNA-Expression in LUSC Tumorgewebe und Normalgewebe (b), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung mit der FGFR2-mRNA-Expression im Tumorgewebe (c), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der FGFR2-mRNA-Expression mit der FGFR2-Genkopienzahl (d) sowie Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der FGFR2-mRNA-Expression mit der Sensitivität (InIC₅₀) von LUSC-

Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547
(e). 32

Abbildung 6: Organisation des FGFR3-Gens (Konsensustranskript, regulatorische Elemente, GC-Gehalt und analysierte CpG-Positionen) (a), Methylierung der CpG-Positionen sowie FGFR3-mRNA-Expression in LUSC Tumorgewebe und Normalgewebe (b), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung mit der FGFR3-mRNA-Expression im Tumorgewebe (c), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der FGFR3-mRNA-Expression mit der FGFR3-Genkopienzahl (d) sowie Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der FGFR3-mRNA-Expression mit der Sensitivität ($\ln IC_{50}$) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 (e). 34

Abbildung 7: Organisation des FGFR4-Gens (Konsensustranskript, regulatorische Elemente, GC-Gehalt und analysierte CpG-Positionen) (a), Methylierung der CpG-Positionen sowie FGFR4-mRNA-Expression in LUSC Tumorgewebe und Normalgewebe (b), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung mit der FGFR4-mRNA-Expression im Tumorgewebe (c), Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der FGFR4-mRNA-Expression mit der FGFR4-Genkopienzahl (d) sowie Spearman-Korrelation der CpG-Methylierung und der FGFR4-mRNA-Expression mit der Sensitivität ($\ln IC_{50}$) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547 (e). 36

Abbildung 8: Sensitivität ($\ln IC_{50}$) von LUSC-Zelllinien gegenüber den niedermolekularen FGFR-Inhibitoren PD173074 und AZ4547. Die LUSC-Zelllinien wurden anhand der medianen Methylierung sechs ausgewählter CpG-Positionen innerhalb der FGFR-Genfamilie (FGFR1: CpG 19; FGFR2: CpG 92; FGFR3: CpG 99, CpG 142; FGFR4: CpG 162, CpG 169) ausgewählt. 42

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der weltweit häufigsten Malignome (WCRF, 2023).	8
---	---

8. Literaturverzeichnis

Abou-Alfa GK, Sahai V, Hollebecque A, et al. Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 2020; 21: 671-684. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30109-1

Addeo A, Rothschild SI, Holer L, Schneider M, Waibel C, Haeffliger S, Mark M, Fernandez E, Mach N, Mauti L, Jermann PM, Alborelli I, Calgua B, Savic-Prince S, Joerger M, Früh M. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor rogaratinib in patients with advanced pretreated squamous-cell non-small cell lung cancer over-expressing FGFR mRNA: The SAKK 19/18 phase II study. *Lung Cancer* 2022; 172: 154-159. doi: 10.1016/j.lungcan.2022.08.016

Aggarwal C, Redman MW, Lara PN Jr, Borghaei H, Hoffman P, Bradley JD, Newman AJ 3rd, Feldman MJ, Minichiello K, Miao J, Mack PC, Papadimitrakopoulou VA, Herbst RS, Kelly K, Gandara DR. SWOG S1400D (NCT02965378), a Phase II Study of the Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor AZD4547 in Previously Treated Patients With Fibroblast Growth Factor Pathway-Activated Stage IV Squamous Cell Lung Cancer (Lung-MAP Substudy). *J Thorac Oncol* 2019; 14: 1847-1852. doi: 10.1016/j.jtho.2019.05.041

Aggarwal C, Redman MW, Lara PN, Jr., et al. SWOG S1400D (NCT02965378), a Phase II Study of the Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor AZD4547 in Previously Treated Patients With Fibroblast Growth Factor Pathway-Activated Stage IV Squamous Cell Lung Cancer (Lung-MAP Substudy). *J Thorac Oncol* 2019; 14: 1847-1852. doi: 10.1016/j.jtho.2019.05.041

American Cancer Society, 2023: What is Lung Cancer? <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Amjad MT, Chidharla A, Kas A. Cancer Chemotherapy. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC., 2022

Armour AA, Watkins CL. The challenge of targeting EGFR: experience with gefitinib in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev* 2010; 19: 186-196. doi: 10.1183/09059180.00005110

Balibrea JL, Torres J, Arias-Diaz J. Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem Oriented. München: Zuckschwerdt, 2001

Bao Y, Gabrielpillai J, Dietrich J, et al. Fibroblast growth factor (FGF), FGF receptor (FGFR), and cyclin D1 (CCND1) DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas is associated with transcriptional activity, gene amplification, human papillomavirus (HPV) status, and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. Clin Epigenetics 2021; 13 1:228. 10.1186/s13148-021-01212-4

Bao Y, Gabrielpillai J, Dietrich J, Zarbl R, Strieth S, Schröck F, Dietrich D. Fibroblast growth factor (FGF), FGF receptor (FGFR), and cyclin D1 (CCND1) DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas is associated with transcriptional activity, gene amplification, human papillomavirus (HPV) status, and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. Clin Epigenetics 2021 Dec 21; 13: 228. doi: 10.1186/s13148-021-01212-4

Bao Y, Gabrielpillai J, Dietrich J, Zarbl R, Strieth S, Schröck F, Dietrich D. Fibroblast growth factor (FGF), FGF receptor (FGFR), and cyclin D1 (CCND1) DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas is associated with transcriptional activity, gene amplification, human papillomavirus (HPV) status, and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. Clin Epigenetics 2021; 13: 228. doi: 10.1186/s13148-021-01212-4

Bao Y, Gabrielpillai J, Dietrich J, Zarbl R, Strieth S, Schröck F, Dietrich D. Fibroblast growth factor (FGF), FGF receptor (FGFR), and cyclin D1 (CCND1) DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas is associated with transcriptional activity, gene amplification, human papillomavirus (HPV) status, and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. Clin Epigenetics 2021; 13: 228. doi: 10.1186/s13148-021-01212-4

Bao Y, Gabrielpillai J, Dietrich J, Zarbl R, Strieth S, Schröck F, Dietrich D. Fibroblast growth factor (FGF), FGF receptor (FGFR), and cyclin D1 (CCND1) DNA methylation in head and neck squamous cell carcinomas is associated with transcriptional activity, gene amplification, human papillomavirus (HPV) status, and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. Clin Epigenetics 2021; 13: 228. doi: 10.1186/s13148-021-01212-4

Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. Nat Rev Cancer 2011; 11: 726-734. 10.1038/nrc3130

Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 8: a019505. doi: 10.1101/cshperspect.a019505

Bender CM, Gonzalgo ML, Gonzales FA, et al. Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6690-6698. doi: 10.1128/MCB.19.10.6690

Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, Hinoue T, Ramjan Z, Liu Y, Noushmehr H, Lange CP, van Dijk CM, Tollenaar RA, Van Den Berg D, Laird PW. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet* 2011 Nov 27; 44: 40-46. doi: 10.1038/ng.969

Bernhardt EB, Jalal SI. Small Cell Lung Cancer. *Cancer Treat Res*. 2016; 170: 301-322. doi: 10.1007/978-3-319-40389-2_14

Bethune G, Bethune D, Ridgway N, Xu Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *J Thorac Dis* 2010; 2: 48-51. PMID: 22263017

Cai Q, He B, Tu G, Peng W, Shi S, Qian B, Liang Q, Peng S, Tao Y, Wang X. Whole-genome DNA methylation and DNA methylation-based biomarkers in lung squamous cell carcinoma. *iScience* 2023; 26: 107013. doi: 10.1016/j.isci.2023.107013

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; 489: 519-525. doi: 10.1038/nature11404

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; 489: 519-525. doi: 10.1038/nature11404

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014; 511: 543-550. doi: 10.1038/nature13385

Cao Y. Tumorigenesis as a process of gradual loss of original cell identity and gain of properties of neural precursor/progenitor cells. *Cell Biosci* 2017; 7: 61. doi: 10.1186/s13578-017-0188-9

Center for Disease Control and Prevention, 2023: What is Epigenetics? <https://www.cdc.gov/genomics/disease/epigenetics.htm> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Chae YK, Hong F, Vaklavas C, et al. Phase II Study of AZD4547 in Patients With Tumors Harboring Aberrations in the FGFR Pathway: Results From the NCI-MATCH Trial (EAY131) Subprotocol W. *J Clin Oncol* 2020; 38 21: 2407-2417. doi: 10.1200/JCO.19.02630

Chen L, Zhang Y, Yin L, Cai B, Huang P, Li X, Linag G. Fibroblast growth factor receptor fusions in cancer: opportunities and challenges. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2021; 40, 345. doi.org/10.1186/s13046-021-02156-6

Cheng FT, Ou-Yang F, Lapke N, et al. Pazopanib Sensitivity in a Patient With Breast Cancer and FGFR1 Amplification. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15 12: 1456-1459. doi: 10.6004/jnccn.2017.7030

Chmiel P, Gęca K, Rawicz-Pruszyński K, Wojciech P, Skórzewska, M. 2022. "FGFR Inhibitors in Cholangiocarcinoma—A Novel Yet Primary Approach: Where Do We Stand Now and Where to Head Next in Targeting This Axis?" *Cells* 2022; 11 23: 3929. doi: 10.3390/cells11233929

City of Hope, 2023: Lung cancer types. <https://www.cancercenter.com/cancer-types/lung-cancer/types> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Dai S, Zhou Z, Chen Z, Xu G, Chen Y. Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs): Structures and Small Molecule Inhibitors. *Cells* 2019; 8 6: 614. doi: 10.3390/cells8060614

de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2018 Jun; 7 3: 220-233. doi: 10.21037/tlcr.2018.05.06

Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, Kitui SK, Man-yazewal T. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* 2021; 9: 20503121211034366. doi: 10.1177/20503121211034366

Debiopharm International SA. Basket Trial in Solid Tumors Harboring a Fusion of FGFR1, FGFR2 or FGFR3- (FUZE Clinical Trial). *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT03834220. Updated 04.04.2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03834220> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells* 2020; 9 1: 198. doi: 10.3390/cells9010198

Facchinetti F, Hollebecque A, Bahleda R, et al. Facts and New Hopes on Selective FGFR Inhibitors in Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 2020, 26 4: 764-774. 10.1158/1078-0432.CCR-19-2035

Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol.* 2018; 9:1300. doi: 10.3389/fphar.2018.01300

Garassino MC, Martelli O, Broggin M, Farina G, Veronese S, Rulli E, Bianchi F, Bettini A, Longo F, Moscetti L, Tomirotti M, Marabese M, Ganzinelli M, Lauricella C, Labianca R, Floriani I, Giaccone G, Torri V, Scanni A, Marsoni S; TAILOR trialists. Erlotinib versus docetaxel as second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer and wild-type EGFR tumours (TAILOR): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 981-988. doi: 10.1016/S1470-2045 70310-3

Garje R, An J, Obeidat M, Kumar K, Yasin HA, Zakharia Y. Fibroblast Growth factor Receptor (FGFR) Inhibitors in Urothelial Cancer. *Oncologist* 2020; 25: e1711-e1719. doi: 10.1634/theoncologist.2020-0334

Goke F, Franzen A, Hinz TK, et al. FGFR1 Expression Levels Predict BGJ398 Sensitivity of FGFR1-Dependent Head and Neck Squamous Cell Cancers. *Clin Cancer Res*, 2015, 21:4356-64. 10.1158/1078-0432.CCR-14-3357

Grodzka A, Knopik-Skrocka A, Kowalska K, Kurzawa P, Krzyzaniak M, Stencel K, Bryl M. Molecular alterations of driver genes in non-small cell lung cancer: from diagnostics to targeted therapy. *EXCLI J* 2023; 22: 415-432. doi: 10.17179/excli2023-6122

Heist RS, Mino-Kenudson M, Sequist LV, Tammireddy S, Morrissey L, Christiani DC, Engelman JA, Iafrate AJ. FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 1775-1780. doi: 10.1097/JTO.0b013e31826aed28

Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol* 2012; 6: 140-146. doi: 10.1016/j.molonc.2012.01.010

Hibi M, Kaneda H, Tanizaki J, Sakai K, Togashi Y, Terashima M, De Velasco MA, Fujita Y, Banno E, Nakamura Y, Takeda M, Ito A, Mitsudomi T, Nakagawa K, Okamoto I, Nishio K. FGFR gene alterations in lung squamous cell carcinoma are potential targets for the

multikinase inhibitor nintedanib. *Cancer Sci* 2016; 107: 1667-1676. doi: 10.1111/cas.13071

Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci* 2018; 14: 1483-1496. doi: 10.7150/ijbs.27173

Incyte Corporation. Efficacy and Safety of Pemigatinib in Subjects with Advanced/Metastatic or Surgically unresectable Cholangiocarcinoma who failed previous therapy – (FIGHT-202). *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT02924376. Updated 05.04.2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02924376> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Iorio F, Knijnenburg TA, Vis DJ, Bignell GR, Menden MP, Schubert M, Aben N, Gonçalves E, Barthorpe S, Lightfoot H, Cokelaer T, Greninger P, van Dyk E, Chang H, de Silva H, Heyn H, Deng X, Egan RK, Liu Q, Mironenko T, Mitropoulos X, Richardson L, Wang J, Zhang T, Moran S, Sayols S, Soleimani M, Tamborero D, Lopez-Bigas N, Ross-Macdonald P, Esteller M, Gray NS, Haber DA, Stratton MR, Benes CH, Wessels LFA, Saez-Rodriguez J, McDermott U, Garnett MJ. A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Epub* 2016 Jul 7; 166:740-754. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.017

Iorio F, Knijnenburg TA, Vis DJ, Bignell GR, Menden MP, Schubert M, Aben N, Gonçalves E, Barthorpe S, Lightfoot H, Cokelaer T, Greninger P, van Dyk E, Chang H, de Silva H, Heyn H, Deng X, Egan RK, Liu Q, Mironenko T, Mitropoulos X, Richardson L, Wang J, Zhang T, Moran S, Sayols S, Soleimani M, Tamborero D, Lopez-Bigas N, Ross-Macdonald P, Esteller M, Gray NS, Haber DA, Stratton MR, Benes CH, Wessels LFA, Saez-Rodriguez J, McDermott U, Garnett MJ. A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell* 2016;166: 740-754. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.017

Janssen Research & Development, LLC. An Efficacy and Safety Study of Erdafitinib (JNJ-42756493) in Participants With Urothelial Cancer. *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT02365597. Updated 31.01.2023. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02365597> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Javle M, Roychowdhury S, Kelley RK, Sadeghi S, Macarulla T, Weiss KH, Waldschmidt DT, Goyal L, Borbath I, El-Khoueiry A, Borad MJ, Yong WP, Philip PA, Bitzer M, Tanasavimon S, Li A, Pande A, Soifer HS, Shepherd SP, Moran S, Zhu AX, Bekaii-Saab TS, Abou-Alfa GK. Infigratinib (BGJ398) in previously treated patients with advanced or

metastatic cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions or rearrangements: mature results from a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2021; 6: 803-815. doi: 10.1016/S2468-1253 00196-5

Khan BA, Hughes BG. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res* 2015; 4: 36-54. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2014.05.01

Kitz A, de Marcken M, Gautron AS, Mitrovic M, Hafler DA, Dominguez-Villa M. AKT isoforms modulate Th1-like Treg generation and function in human autoimmune disease. *EMBO Reports* 2016; 17: 1169-1183. doi.org/10.15252/embr.201541905

Kommalapati A, Tella SH, Borad M, Javle M, Mahipal A. FGFR Inhibitors in Oncology: Insight on the Management of Toxicities in Clinical Practice. *Cancers (Basel)* 2021; 13(12): 2968. doi: 10.3390/cancers13122968

Lackey A, Donington JS. Surgical management of lung cancer. *Semin Intervent Radiol* 2013; 30: 133-40. doi: 10.1055/s-0033-1342954

Lau SCM, Pan Y, Velcheti V, Wong KK. Squamous cell lung cancer: Current landscape and future therapeutic options. *Cancer Cell* 2022; 40: 1279-1293. doi: 10.1016/j.ccell.2022.09.018

Lau SCM, Pan Y, Velcheti V, Wong KK. Squamous cell lung cancer: Current landscape and future therapeutic options. *Cancer Cell* 2022; 40: 1279-1293. doi: 10.1016/j.ccell.2022.09.018

Lau SCM, Pan Y, Velcheti V, Wong KK. Squamous cell lung cancer: Current landscape and future therapeutic options. *Cancer Cell* 2022; 40: 1279-1293. doi: 10.1016/j.ccell.2022.09.01

Li XY, Wu JZ, Cao HX, Ma R, Wu JQ, Zhong YJ, Feng JF. Blockade of DNA methylation enhances the therapeutic effect of gefitinib in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29: 1975-1982. doi: 10.3892/or.2013.2298

Li Y, Wu L, Tao W, et al. Expression Atlas of FGF and FGFR Genes in Pancancer Uncovered Predictive Biomarkers for Clinical Trials of Selective FGFR Inhibitors. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:5658904. 10.1155/2020/5658904

Liao RG, Watanabe H, Meyerson M, Hammerman PS. Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Manag* 2012; 1: 293-300. doi: 10.2217/lmt.12.40

Lim SH, Sun JM, Choi YL, et al. Efficacy and safety of dovitinib in pretreated patients with advanced squamous non-small cell lung cancer with FGFR1 amplification: A single-arm, phase 2 study. *Cancer* 2016; 122: 3024-3031. 10.1002/cncr.30135

Lopes G, Wu YL, Kudaba I, Kowalski D, Cho BC, Castro G, Srimuninnimit V, Bondarenko I, Kubota K, Lubiniecki GM, Zhang J, Kush DA, Mok T. Pembrolizumab (pembro) versus platinum-based chemotherapy (chemo) as first-line therapy for advanced/metastatic NSCLC with a PD-L1 tumor proportion score (TPS) $\geq 1\%$: Open-label, phase 3 KEY-NOTE-042 study. *Journal of Clinical Oncology* 2018; 36: 18. doi: 10.1200/JCO.2018.36.18

Loriot Y, Necchi A, Park SH, et al. Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 2019; 381: 338-348. 10.1056/NEJMoa1817323

Loriot Y, Necchi A, Park SH, Garcia-Donas J, Huddart R, Burgess E, Fleming M, Rezazadeh A, Mellado B, Varlamov S, Joshi M, Duran I, Tagawa ST, Zakharia Y, Zhong B, Stuyckens K, Santiago-Walker A, De Porre P, O'Hagan A, Avadhani A, Siefker-Radtke AO; BLC2001 Study Group. Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 2019; 25; 381: 338-348. doi: 10.1056/NEJMoa1817323

Lu X, Yu L, Zhang Z, Ren X, Smaill JB, Ding K. Targeting EGFR^{L858R/T790M} and EGFR^{L858R/T790M/C797S} resistance mutations in NSCLC: Current developments in medicinal chemistry. *Med Res Rev* 2018; 38: 1550-1581. doi: 10.1002/med.21488

Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2021; 48: 10-18. doi: 10.1053/j.seminoncol.2021.02.003

Ma F, Zhu X, Niu Y, et al. FGFR inhibitors combined with nab-paclitaxel – A promising strategy to treat non-small cell lung cancer and overcome resistance. *Front Oncol* 2023; 13: 1088444. 10.3389/fonc.2023.1088444

Maani EV, Maani CV. Radiation Therapy. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC., 2022

Matsui A, Ihara T, Suda H, Mikami H, Semba K. Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer. *BioMolecular Concepts* 2013; 4: 567-582. doi.org/10.1515/bmc-2013-0026

Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M; West Japan Oncology Group. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 121-128. doi: 10.1016/S1470-2045 70364-X

Moes-Sosnowska J, Skupinska M, Lechowicz U, Szczepulska-Wojcik E, Skronska P, Rozy A, Stepniewska A, Langfort R, Rudzinski P, Orlowski T, Popiel D, Stanczak A, Wieczorek M, Chorostowska-Wynimko J. FGFR1-4 RNA-Based Gene Alteration and Expression Analysis in Squamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 10506. doi: 10.3390/ijms231810506

Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, et al. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J* 1998; 17: 5896-5904. 10.1093/emboj/17.20.5896

Mukherjee K, Storici F. A mechanism of gene amplification driven by small DNA fragments. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1003119. doi: 10.1371/journal.pgen.1003119

National Cancer Institute, 2023: TCGAs Study of Lung Squamous Cell Carcinoma. <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga/studied-cancers/lung-squamous> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

National Human Genome Research Institute, 2023: Oncogene. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Oncogene> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Nogova L, Malchers F, Bitter E, Michels SYF, Fischer RN, Scheffler M, Gardizi M, Brandes V, Scheel AH, Kambartel KO, Krüger S, Serke MH, Isaacs R, Porter D, Buettner R, Thomas RK, Wolf J. Fibroblast kinase 1-3 inhibitor BGJ398 in patients with FGFR1 amplified squamous non-small cell lung cancer treated in a phase 1 study: Evaluation of

tumor tissue and response at a single center. *Journal of Clinical Oncology* 2017; 35: 15_suppl, e20664-e20664. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e20664

Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2015; 4: 215-266. doi: 10.1002/wdev.176

Pacini L, Jenks AD, Lima NC, Huang PH. Targeting the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Family in Lung Cancer. *Cells*. 2021 May 10; 10:1154. doi: 10.3390/cells10051154. PMID: 34068816; PMCID: PMC8151052

Paik PK, Pillai RN, Lathan CS, Velasco SA, Papadimitrakopoulou V. New Treatment Options in Advanced Squamous Cell Lung Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational* 2019; Book 39: e198-e206 doi: 10.1200/EDBK_2378

Paik PK, Shen R, Berger MF, et al. A Phase Ib Open-Label Multicenter Study of AZD4547 in Patients with Advanced Squamous Cell Lung Cancers. *Clin Cancer Res*, 2017; 23: 5366-5373. 10.1158/1078-0432.CCR-17-0645

Park K, Yu CJ, Kim SW, Lin MC, Sriuranpong V, Tsai CM, Lee JS, Kang JH, Chan KC, Perez-Moreno P, Button P, Ahn MJ, Mok T. First-Line Erlotinib Therapy Until and Beyond Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Progression in Asian Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: The ASPIRATION Study. *JAMA Oncol* 2016; 2: 305-312. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.4921

Patel TH, Marcus L, Horiba MN, et al. FDA Approval Summary: Pemigatinib for Previously Treated, Unresectable Locally Advanced or Metastatic Cholangiocarcinoma with FGFR2 fusion or other rearrangement. *Clin Cancer Res*, 2022; 29: 838-842. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2036

Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leiby MA, Lubiniecki GM, Shentu Y, Rangwala R, Brahmer JR; KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375: 1823-1833. doi: 10.1056/NEJMoa1606774

Rehmani HS, Issaeva N. EGFR in head and neck squamous cell carcinoma: exploring possibilities of novel drug combinations. *Ann Transl Med* 2020; 8: 813. doi: 10.21037/atm.2020.04.07

Schildhaus HU, Heukamp LC, Merkelbach-Bruse S, Riesner K, Schmitz K, Binot E, Paggen E, Albus K, Schulte W, Ko YD, Schlesinger A, Ansén S, Engel-Riedel W, Brockmann M, Serke M, Gerigk U, Huss S, Göke F, Perner S, Hekmat K, Frank KF, Reiser M, Schnell R, Bos M, Mattonet C, Sos M, Stoelben E, Wolf J, Zander T, Buettner R. Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high- and low-level FGFR1 amplification types in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* 2012; 25: 1473-80. doi: 10.1038/modpathol.2012.102

Schneider KU, Dietrich D, Fleischhacker M, Leschber G, Merk J, Schäper F, Stapert HR, Vossenaar ER, Weickmann S, Liebenberg V, Kneip C, Seegebarth A, Erdogan F, Rappold G, Schmidt B. Correlation of SHOX2 gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors. *BMC Cancer* 2011; 11: 102. doi: 10.1186/1471-2407-11-102

Semaan A, van Ellen A, Meller S, Bergheim D, Branchi V, Lingohr P, Goltz D, Kalff JC, Kristiansen G, Matthaei H, Pantelis D, Dietrich D. *SEPT9* and *SHOX2* DNA methylation status and its utility in the diagnosis of colonic adenomas and colorectal adenocarcinomas. *Clin Epigenetics* 2016 Sep 20; 8:100. doi: 10.1186/s13148-016-0267-5

Semaan A, van Ellen A, Meller S, Bergheim D, Branchi V, Lingohr P, Goltz D, Kalff JC, Kristiansen G, Matthaei H, Pantelis D, Dietrich D. *SEPT9* and *SHOX2* DNA methylation status and its utility in the diagnosis of colonic adenomas and colorectal adenocarcinomas. *Clin Epigenetics* 2016; 8: 100. doi: 10.1186/s13148-016-0267-5

Siefker-Radtke AO, Loriot Y. Erdafitinib for locally advanced or metastatic urothelial carcinoma. *Am J Health Syst Pharm* 2022, 79: 824-825. 10.1093/ajhp/zxac030

Sun Z, Sun X, Chen Z, Du J, Wu Y. Head und Neck Squamous Cell Carcinoma: Risk Factors, Molecular Alterations, Immunology and Peptide Vaccines. *Int J Pept Res Ther* 2022; 28: 19. doi: 10.1007/s10989-021-10334-5

Taiho Oncology, Inc. A Study of TAS-120 in patients with advanced solid tumors. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02052778. Updated 10.01.2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02052778> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; 489: 519-525. <https://doi.org/10.1038/nature11404>

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489 2012; 519-525. doi.org/10.1038/nature11404

Universitätsklinikum Heidelberg, 2023: Z033 Plattenepithelkarzinom. <https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/zahn/171/verhornendes-plattenepithelkarzinom> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Wang Y, Ding X, Wang S, et al. Antitumor effect of FGFR inhibitors on a novel cholangiocarcinoma patient derived xenograft mouse model endogenously expressing an FGFR2-CCDC6 fusion protein. *Cancer Lett* 2016; 380:163-173. 10.1016/j.canlet.2016.05.017

Weiss J, Sos ML, Seidel D, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2010; 2: 62ra93. Doi: 10.1126/scitranslmed.3001451

Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 1566-1584. doi: 10.1007/s00018-008-7440-8

World Cancer Research Fund International, 2023: Lung cancer statistics. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/lung-cancer-statistics/> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

World Cancer Research Fund International, 2023: Worldwide Cancer data. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/> (Zugriffsdatum: 20.02.2023)

Xiao Y, Liu P, Wei J, Zhang X, Guo J, Lin Y. Recent progress in targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Front Pharmacol.* 2023 Feb 21;14:1125547. doi: 10.3389/fphar.2023.1125547

Xu Z, Qin F, Yuan L, Wei J, Sun Y, Qin J, Deng K, Zheng T, Li S. EGFR DNA Methylation Correlates With EGFR Expression, Immune Cell Infiltration, and Overall Survival in Lung Adenocarcinoma. *Front Oncol* 2021; 11: 691915. doi: 10.3389/fonc.2021.691915

Yan W, Wistuba II, Emmert-Buck MR, Erickson HS. Squamous Cell Carcinoma – Similarities and Differences among Anatomical Sites. *Am J Cancer Res* 2011 Jan 1; 1: 275-300. PMID: PMC3175764

Yue S, Li Y, Chen X, Wang J, Li M, Chen Y, Wu D. FGFR-TKI resistance in cancer: current status and perspectives. *J Hematol Oncol* 2021; 14: 23. doi: 10.1186/s13045-021-01040-2

Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, Yang W, Tian C, Miao Z, Wang T, Yang S. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Sig Transduct Target Ther* 2021; 6: 201. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>

Zhou Z, Liu Z, Ou Q, Wu X, Wang X, Shao Y, Liu H, Yang Y. Targeting FGFR in non-small cell lung cancer: implications from the landscape of clinically actionable aberrations of FGFR kinases. *Cancer Biol Med* 2021; 18: 490-501. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0120

9. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle besonders bei Frau PD Dr. Friederike Schröck und Herrn PD Dr. Dimo Dietrich für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und deren ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und deren ständige Erreichbarkeit auch außerhalb normaler Arbeitszeiten möchte ich mich recht herzlich bedanken. Ohne die Hilfe von Frau PD Dr. Schröck und Herrn PD Dr. Dietrich wäre die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. med. Anja Schneider, Direktorin der Klinik für Neurodegenerative Erkrankungen und Gerontopsychiatrie für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken für die uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und dieser Arbeit, ohne die diese Arbeit so ebenfalls nicht möglich gewesen wäre.