

Aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

Direktor: Prof. Dr. R. M. Bohle

**Analyse primärer Plattenepithelkarzinome der Lunge auf Mutationen und  
Amplifikationen der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gene 1, 2 und 3  
im Hinblick auf ihre prognostische Relevanz**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin*

der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2016

vorgelegt von: Fidelis Andrea Vitus Flockerzi

geb. am 09.02.1992 in 66424 Homburg

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung .....	4
2.1	Lungentumore .....	6
2.1.1	Inzidenz und Ätiologie .....	6
2.1.2	Tumorklassifikation.....	7
2.1.3	Plattenepithelkarzinom der Lunge.....	8
2.2	Physiologie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren und Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptoren.....	15
2.2.1	Familie der humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren.....	15
2.2.2	Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptoren.....	16
2.3	Pathophysiologie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren und Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptoren .....	21
2.3.1	Bedeutung der FGFR in der Karzinogenese.....	21
2.4	Fragestellung und Zielsetzung.....	29
3	Material und Methodik.....	31
3.1	Material .....	31
3.1.1	Kollektivstruktur.....	31
3.1.2	Probenmaterial.....	31
3.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	32
3.1.4	Reagenzien .....	33
3.1.5	Verwendete Programme .....	35
3.1.6	Verwendete Primer .....	35
3.2	Methoden.....	36
3.2.1	Asservierung.....	36
3.2.2	Molekulargenetische Analysen .....	36
3.2.3	Statistische Auswertung .....	48
4	Ergebnisse .....	49
4.1	Ergebnisse der klinisch-histopathologischen Standardparameter .....	49
4.1.1	Häufigkeitsverteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter .....	49
4.1.2	Überlebenszeitanalyse nach klinisch-histopathologischen Standardparametern.....	53
4.2	Ergebnisse der Immunhistochemie zum Nachweis von $\Delta$ Np63.....	58
4.2.1	Auswertung der Immunhistochemie von $\Delta$ Np63 .....	58
4.2.2	Zusammenhang zwischen p40-IHC und klinisch-histopathologischen Parametern.....	61
4.2.3	Bedeutung der p40 Immunreaktivität für das Gesamtüberleben .....	63
4.3	Ergebnisse der FGFR2 / FGFR3 Mutationsanalyse .....	64

4.3.1	Auswertung der Mutationsanalyse .....	64
4.3.2	Prognostische Bedeutung der Punktmutation S249C für das Gesamtüberleben .....	67
4.4	Ergebnisse der FGFR1-Genamplifikationsanalyse .....	69
4.4.1	Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....	69
4.4.2	Frequenz der diagnostizierten FGFR1-Genamplifikation .....	74
4.4.3	Zusammenhang zwischen FGFR1-Genamplifikationsstatus und klinisch-histopathologischen Standardparametern .....	75
4.4.4	Bedeutung der FGFR1-Genamplifikation für das Gesamtüberleben .....	79
4.4.5	Zusammenhang zwischen Lebensalter zum Operationszeitpunkt und FGFR1-Genamplifikation.....	87
4.4.6	Zusammenhang zwischen einer nachgewiesenen FGFR1-Genamplifikation und den klinisch-histopathologischen Parametern bei Frauen .....	88
4.4.7	Zusammenhang zwischen einer nachgewiesenen FGFR1-Genamplifikation und den klinisch-histopathologischen Parametern bei Patienten der Stadiengruppe IIIA-IV .....	89
5	Diskussion .....	91
5.1	Patientenkollektiv .....	91
5.2	Überlebensanalyse und prognostische Bedeutung von klinisch-histopathologischen Standardparametern beim PEC der Lunge .....	92
5.3	Immunhistochemische Anfärbung von $\Delta$ Np63 mit dem Antikörper p40.....	96
5.3.1	Methode zur immunhistochemischen Anfärbung des $\Delta$ Np63 .....	96
5.3.2	Vergleichs- und Überlebensanalyse im Rahmen der immunhistochemischen Färbung von $\Delta$ Np63.....	96
5.4	Punktmutationsanalyse in den Genen von FGFR2 und FGFR3 .....	98
5.4.1	Methode zur Punktmutationsanalyse in den Genen von FGFR2 und FGFR3.....	98
5.4.2	Überlebensanalyse der FGFR3 Mutation S249C sowie Rolle der FGFR2 Spleißvarianten .....	99
5.5	Amplifikationsanalyse im Gen des FGFR1 .....	101
5.5.1	Methode zur Amplifikationsanalyse des FGFR1-Gens .....	101
5.5.2	Vergleichs- und Überlebensanalyse im Rahmen der Amplifikationsanalyse des FGFR1-Gens .....	102
5.6	Zusammenfassung und Ausblick: Prognosefaktoren beim PEC der Lunge .....	108
5.6.1	Klinisch-histologische Prognosefaktoren .....	108
5.6.2	Molekularbiologische Prognosefaktoren .....	108
6	Literaturverzeichnis .....	111
7	Publikationen .....	117
8	Dank .....	118
9	Anhang .....	119

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Entwicklung eines bösartigen Lungentumors.....	9
Abbildung 2: Plattenepithelkarzinom der Lunge .....	10
Abbildung 3: Aufbau und Eigenschaften von TAp63 und ΔNp63 .....	11
Abbildung 4: Aufbau eines aktivierten FGFR-Monomers.....	18
Abbildung 5: Der FGF/FGFR Signalweg.....	20
Abbildung 6: Genetische Alterationen der FGFR1-3 beim PEC der Lunge .....	21
Abbildung 7: Mutationsbedingte Folgen für die Signalweiterleitung über FGFR.....	25
Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese.....	39
Abbildung 9: FGFR1 Sonde.....	43
Abbildung 10: UICC-Stadiengruppierung .....	50
Abbildung 11: Altersverteilung zum Zeitpunkt der Tumorresektion .....	51
Abbildung 12: Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberlebenszeit Patientenkollektiv .....	53
Abbildung 13: Kaplan-Meier Kurve: Histologie.....	55
Abbildung 14: Nachweis von ΔNp63 in verschiedenen Stadien der Karzinogenese .....	59
Abbildung 15: p40 Immunreaktivität .....	60
Abbildung 16: p40-IHC: Häufigkeitsverteilung der Immunreaktivität der Tumorzellen .....	61
Abbildung 17: Mutation S249C im 7.Exon des FGFR3-Gens.....	65
Abbildung 18: Kaplan-Meier Kurve: FGFR3 S249C .....	68
Abbildung 19: Amplifikation des FGFR1-Gens .....	70
Abbildung 20: FGFR1 FISH: Beispielsbefunde.....	72
Abbildung 21: FGFR1 FISH: Amplifikationsstatus bei Polyploidie .....	73
Abbildung 22: FGFR1-Genamplifikationsfrequenz.....	74
Abbildung 23: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, Gesamtkollektiv .....	80
Abbildung 24: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, Frauen .....	80
Abbildung 25: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, pT1a-pT2b.....	82
Abbildung 26: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, pT3-pT4.....	82
Abbildung 27: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, cM0.....	84
Abbildung 28: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, cM1.....	84
Abbildung 29: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, Stadiengruppe IA-IIB .....	85
Abbildung 30: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, Stadiengruppe III-IV .....	85

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Histologische Subtypen des Lungenkarzinoms .....</i>	<i>7</i>
<i>Tabelle 2: IHC-Markerprofil von PEC und ADC der Lunge .....</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 3: Gene der FGFR 1-4 .....</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 4: Punktmutationen im Gen von FGFR2 .....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 5: Punktmutationen im Gen von FGFR3 .....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterialien .....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 7: Reagenzien .....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 8: Software zur Datenerhebung, Dokumentation und Auswertung .....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 9: Primertabelle .....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 10: Auswertungskriterien der <math>\Delta</math>Np63 /p40-IHC .....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 11: Klinisch-histopathologische Parameter gesamtes Patientenkollektiv .....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 12: Überlebensanalyse nach Standardparametern, gesamtes Patientenkollektiv .....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 13: Überlebensanalyse nach Standardparametern, Trennung nach Geschlecht .....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 14: Vergleichsanalyse p40 Immunreaktivität / klinisch-histologische Parameter .....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 15: Klinisch-histopathologische Merkmale Tumorprobe Nr. 50 .....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 16: Ergebnisse der Mutationsanalyse FGFR2 und FGFR3 .....</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 17: FGFR1-Genamplifikationsgrad .....</i>	<i>74</i>
<i>Tabelle 18: Vergleichsanalyse FGFR1-Gen nicht amplifiziert / FGFR1-Gen amplifiziert .....</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 19: Überlebensanalyse nach Standardparametern in Bezug zum FGFR1-Genamplifikationsstatus .....</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 20: Durchschnittsalter bei Operation .....</i>	<i>87</i>
<i>Tabelle 21: Vergleichsanalyse FGFR1-Genamplifikation / Standardparameter, Frauen .....</i>	<i>88</i>
<i>Tabelle 22: Vergleichsanalyse FGFR1-Genamplifikation / Standardparameter, Stadiengruppe IIIA-IV .....</i>	<i>90</i>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AP-Stelle	apurinische oder apyrimidinische Stelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
CCD	charge coupled device
CEN	Centromer
CENP	Centromerproteine
Cis	Carcinoma in situ
CK 5/6	Cytokeratin 5/6
Konz.	Konzentration
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
d.h.	das heißt
DM	double minute
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (EGF Rezeptor)
ERK	Extracellular signal regulated kinase
et al.	et alii
EZD	extrazelluläre Domäne
FFPE	formalinfixiert, paraffineingebettet
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FGFR	Fibroblast growth factor receptor (FGF Rezeptor)
FGFR2-IIIb	Fibroblast growth factor receptor 2 isoform 3b
FGFR2-IIIc	Fibroblast growth factor receptor 2 isoform 3c
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GRB2 Protein	Growth factor-receptor-bound 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	Heparin-Binding Site
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hi-Di Formamide	highly deionized formamide
HPLC	High-pressure liquid chromatography
HPV	Humanes Papillomavirus
HSR	Homogenous staining region
IARC	International Agency for Research on Cancer
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
IHC	Immunhistochemie
IHC-	Immunhistochemische-
Ig	Immunglobulin
Ig(+römische Ziffer)	Immunglobulinähnliche Domäne
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IQR	Interquartile range (Interquartilsabstand)

JMD	juxtamembranäre Domäne
JPEG-F	Joint Photographic Experts Group-Format
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
m	Meter
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mbp	Megabasenpaare
ME	Median
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
Myc	Transkriptionsfaktor Myc
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
NSCLC	non small cell lung cancer
o.g.	oben genannt
OS	Overall Survival
p	kurzer Arm des Chromosoms
p40	Wachstumsprotein $\Delta$ Np63
p53	Tumorsuppressor Protein 53
p63	Transkriptionsfaktor Protein 63
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbones
PBS	„phosphate buffered saline“ Domäne
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor (Plättchen Wachstumsfaktor)
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor (PDGF Rezeptor)
PE	Plattenepithel
PEC	Plattenepithelkarzinom
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB, AKT	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pmol	picomol
PTB-	phosphotyrosine binding -
p-Wert	probability-/Signifikanzwert
q	langer Arm des Chromosoms
RAF	Rat sarcoma
RAS	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur (21°C)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SA	Standardabweichung
SCLC	small cell lung cancer
SH2-D	Src homology 2-Domäne
shRNA	small hairpin RNA
Sig.	Signifikanz
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sog.	so genannte

SOS	Son of Sevenless
S-Phase	Synthese-Phase
S-S	Disulfidbrücke
SSC	Standard Saline Citrate
STAT	signal transducer and activator of transcription
Taq	Thermus aquaticus
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TIF-F	Tagged Image File-Format
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
Tris	Trismethylamin
tRNA	Transfer-RNA
TTF-1	Thyroid Transcription Factor-1
U	Units (Aktivitätseinheit)
u.a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	ultraviolett
V	Valin
V	Volt
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
z. B.	zum Beispiel

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Cystein	Cys	C*
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G*
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Tryptophan	Trp	W
Valin	Val	V

Nukleinbase	Abkürzung	Nukleosid
Adenin	A	Adenosin
Cytosin	C*	Cytidin
Guanin	G*	Guanosin
Thymin	T	Thymidin

\* Wenn aus dem Kontext nicht eindeutig hervorgeht, ob das jeweilige Nukleosid gemeint ist, wird die ausgeschriebene Bezeichnung verwendet.

# **1 Zusammenfassung**

## **I) Zielsetzung**

Das Plattenepithelkarzinom gehört zu den häufigsten malignen Tumoren der Lunge. Bisher sind jedoch nur wenige klinisch-histopathologische bzw. molekulare Parameter bekannt, die als Prognosefaktoren für das Überleben der betroffenen Patienten verwendet werden können. Ziel dieser Arbeit ist es, festzustellen, ob die Amplifikation des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor 1 Gens sowie die in der Fachliteratur als „Driver“-Mutationen beschriebenen Punktmutationen K660E und K660N im Gen des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptors 2 und die Mutationen R248C und S249C im Gen des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptors 3 beim Plattenepithelkarzinom der Lunge eine prognostische Bedeutung haben.

## **II) Material und Methodik**

Die Untersuchungen wurden an p40-positiven Plattenepithelkarzinomresektaten der Lunge von n=101 Patienten durchgeführt. Das mediane Alter der Patienten bei Operationszeitpunkt betrug 68,66 Jahre (IQR:12,48 Jahre), die mediane Nachbeobachtungszeit war 33,85 Monate (2-96 Monate). Die Überlebensdaten der Patienten wurden retrospektiv erhoben; für die mithilfe der Kaplan-Meier Kurve sowie des Log-Rank Tests durchgeführte Überlebensanalyse wurde ausschließlich die Gesamtüberlebenszeit zur Auswertung verwendet. Der immunhistochemische Nachweis des  $\Delta$ Np63 Proteins mit einem p40 Antikörper wurde etabliert und mit Standardmethoden durchgeführt, die Bestimmung des Genamplifikationsstatus des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptors 1 der Tumorproben erfolgte mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), die molekulargenetischen Untersuchungen der Punktmutationen wurden nach Isolierung der DNA aus Gewebeschnitten mit der Sequenzierungsmethode nach Sanger durchgeführt.

## **III) Ergebnisse**

Bei allen 101 Tumorproben wurde das Protein  $\Delta$ Np63 in typischer Lokalisation nachgewiesen, bei 21,78% (22/101) der Tumorproben wurde eine Amplifikation des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor 1 Gens festgestellt; die Mutationsfrequenz der Mutationen K660N, K660E und R249C betrug 0% (0/101), die Mutationsfrequenz der Mutation S249C betrug 1% (1/101). Von den einzelnen Ausprägungen der klinisch-

pathologischen Parameter (Geschlecht, Tumorhistologie, Tumorgrading, pT-pN-cM-Stadium, Stadiengruppen und Tumorlokalisation) konnte für das Vorliegen eines verhornenden Plattenepithelkarzinoms der Lunge ein für das Gesamtüberleben prognostisch günstiger Einfluss gefunden werden. Im Rahmen der Überlebensanalyse hinsichtlich der übrigen molekulargenetischen Parameter wurden folgende Ergebnisse erzielt: Es gibt keinen Hinweis dafür, dass die Mutation S249C, die als „Driver“-Mutation des PEC der Lunge angesehen wird, einen prognostisch ungünstigen Prognosemarker darstellt. Die Amplifikation des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor 1 Gens ist für alle in das Kollektiv eingeschlossenen Patienten kein ungünstiger, sondern eher ein prognostisch günstiger Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben. Speziell bei Frauen und bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumor des T-Stadiums pT3-T4, des cM1-Stadiums sowie der Stadiengruppe III-IV ist die Amplifikation des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor 1 Gens ein prognostisch günstiger Faktor für das Gesamtüberleben.

#### **IV) Schlussfolgerung**

Bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge besitzt die Amplifikation des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor 1 Gens bei Männern keine prognostische Bedeutung. Die Amplifikation des Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptors 1 Gens bei Frauen stellt keinen ungünstigen, sondern vielmehr einen eher günstigen Prognosefaktor dar und ein amplifiziertes Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor 1 Gen ist für Patienten mit fortgeschrittenem Tumor des T-Stadiums pT3-T4, des cM1-Stadiums sowie generell der Stadiengruppe III-IV ein für die Prognose der Gesamtüberlebenszeit günstiger Faktor.

#### **Summary**

##### **I) Purpose:**

Worldwide, squamous cell carcinoma (SCC) is one of the most common histological subtype of non small cell lung cancer, but reliable molecular parameters are mostly missing. Mutations of the Fibroblast Growth Factor Receptor genes such as FGFR1 gene amplification and driver mutations in genes of FGFR2 and FGFR3 are found to be frequent among patients suffering from SCC of the lung. They seem to be of prognostic relevance in other types of solid cancer like breast cancer or urothelial carcinoma. In SCC of the lung their prognostic

value is not definitely clear. Therefore, our aim was to analyze resected  $\Delta$ Np63/p40-positive squamous cell carcinomas of the lung from 101 patients for FGFR1 gene amplification and driver mutations in genes of FGFR2 and FGFR3 in order to investigate their prognostic value.

## **II) Methods and Material:**

Primary resected squamous cell lung carcinomas (n=101) were analyzed for mutations and amplification in FGFR1-3 genes. FISH-analysis was performed on formalin-fixed paraffin embedded tissues. For the detection of K660N/K660E (FGFR2) and R248C/S249C (FGFR3) mutations, tumor DNA was sequenced by the Sanger method. Epidemiological information were retrospectively collected, for survival analysis overall survival of the patients was used. The median age at time of tumor resection was 68,66 years (IQR:12,48 years), the median follow up time was 33,85 months (2-96 months).

## **III) Results**

Twenty-two of 101 (21,78%) samples were shown to be FGFR1-gene amplification positive based on a FGFR1/CEN8 ratio of  $>2.0$  or higher. In advanced stages (III-IV), patients carrying the amplification showed significantly longer overall survival ( $p=0,006$ ). Among women, amplification was significantly associated with longer overall survival ( $p=0,023$ ). The FGFR1 gene amplification status was associated with patient age (65 versus 69 years,  $p=0,046$ ), there was no association with gender, tumor stage, histologic subtype, tumor grade or  $\Delta$ Np63/p40-immunoreactivity.

In one out of 101 cases (1%) a mutation within the FGFR2 and 3 genes was identified, the S249C mutation in FGFR3. There was no indication that it influences overall survival; the K600N, K660E or R248C mutations were not identified.

## **IV) Conclusion**

In SCC of the lung, FGFR1 gene amplification is a frequent genetic alteration whereas the K660N/K660E (FGFR2) and R249C/S249C (FGFR3) mutations are rare events. In SCC of the lung, FGFR1 gene amplification appears not to be a negative but rather a favourable prognostic factor for women and particularly for patients with advanced cancer.

## **2 Einleitung**

Im Jahr 2012 waren von Tumorerkrankungen im Bereich der Lunge weltweit 1,8 Millionen Patienten betroffen. Mit 13% aller Tumorerkrankungen sind die Karzinome der Lunge der häufigste Tumor beim Menschen (Stewart and Wild, 2014). In Deutschland erkrankten im Jahr 2012 34.490 Männer und 18.030 Frauen an einem Karzinom der Lunge. Während bei den Männern in den vergangenen Jahren ein leichter Rückgang der Neuerkrankungen beobachtet wurde, nahm bei den Frauen die Inzidenz von Lungenkarzinomen kontinuierlich zu. In naher Zukunft ist eine Fortsetzung dieser Entwicklung zu erwarten, für das Jahr 2016 bei Frauen eine weitere Zunahme um etwa 2000 neu diagnostizierter Lungenkarzinome. Deutschlandweit gehören bösartige Neoplasien der Lunge geschlechterunabhängig zu den drei häufigsten Krebserkrankungen (Kaatsch et al., 2013). Karzinome der Lunge sind die häufigste Krebstodesursache in der deutschen männlichen Bevölkerung (Husmann et al., 2010; Kaatsch et al., 2013). Für das Bundesland Saarland haben die Karzinomerkrankungen der Lunge eine besondere epidemiologische und sozialökonomische Bedeutung: Im bundesweiten Vergleich liegt die Inzidenz von bösartigen Lungentumoren in der saarländischen Bevölkerung geschlechterunabhängig etwa 25% über dem Bundesdurchschnitt (Ziegler et al., 2009).

Die histologische Untergliederung der Lungenkarzinome erlaubt die Einteilung in vier Hauptgruppen, aus denen sich drei Entitäten quantitativ hervorheben: Kleinzellige Karzinome machen etwa 13% aller Lungenkarzinome aus, Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome sind mit einem Anteil von je 30-40% die beiden am häufigsten vorkommenden Entitäten der Lungenkarzinome (Böcker et al., 2001, p. 590). Da niedrig differenzierte Adenokarzinome und nicht-verhornende Plattenepithelkarzinome konventionell histologisch nicht immer leicht voneinander zu unterscheiden sind, kommt der Immunhistochemie in der Diagnostik eine wichtige Rolle zu. Aktuell als spezifischster Marker für den Nachweis von plattenepithelialer Differenzierung bei Lungenkarzinomen gilt das p40-Epitop, das eine zuverlässige Abgrenzung gegenüber Adenokarzinomen erlaubt (Bishop et al., 2011).

Hinsichtlich der Ätiologie gilt für Plattenepithelkarzinome der Lunge in mehr als 90% der Fälle inhalatives Zigarettenrauchen als auslösendes Agens; in bis zu 18% der Fälle können auch DNA-Sequenzen des karzinogenen Humanen Papillomavirus in den Tumorzellen nachgewiesen werden (Böcker et al., 2001; Fan et al., 2015; Husmann et al., 2010).

Um Aussagen über die Prognose bestimmter Lungenkarzinome treffen zu können und eine effizientere Therapie zu erreichen, wurde die histologische Diagnostik um molekular-

biologische Diagnoseverfahren erweitert. Erste Erfolge ergaben sich bei den pulmonalen Adenokarzinomen, die Mutationen in codierenden Abschnitten des EGF-Rezeptors (Epidermal-Wachstums-Faktor-Rezeptor) zeigten (Paez et al., 2004).

Dagegen konnten bis vor wenigen Jahren noch keine typischen molekularen Veränderungen als mögliche prognostische Biomarker oder Ansatzpunkte für spezifische Medikamente beim Plattenepithelkarzinom der Lunge ausgemacht werden (Dutt et al., 2011; Travis et al., 2015, p. 55). Mittlerweile wurde nachgewiesen, dass Plattenepithelkarzinome der Lunge neben Urothel- und Mammakarzinomen gehäuft Amplifikationen des Gens, das für den FGFR1 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1) kodiert, sowie Punktmutationen im codierenden Bereich der Gene für FGFR2 und FGFR3 aufweisen können (Hammerman et al., 2012; Knights and Cook, 2010). Mutationen der FGF-Rezeptoren wurden schon seit längerem vor allem eine Beteiligung am Pathomechanismus von Chondrodysplasien zugewiesen (Ehrenfels, 2000). Unklar ist jedoch der Einfluss dieser molekularen Veränderungen auf die Karzinogenese und auf die Prognose für die Patienten mit der entsprechenden Tumorerkrankung (Ahmad et al., 2012).

Es war daher das Ziel der vorliegenden Arbeit, die prognostische Bedeutung der molekularen Veränderungen in den Genen der FGFR an Gewebeproben von resezierten Plattenepithelkarzinomen der Lunge zu untersuchen.

Im Folgenden wird zunächst auf die Ätiologie, Klassifikation und Entstehung von Lungenkarzinomen, insbesondere von Plattenepithelkarzinomen, eingegangen. Weiterhin werden mögliche Ursachen von Punktmutationen und Genamplifikationen sowie die physiologische und pathologische Bedeutung des FGFR-Signalwegs vorgestellt.

## 2.1 Lungentumore

### 2.1.1 Inzidenz und Ätiologie

Die Hauptursache für die Entstehung von malignen Lungentumoren ist das Inhalationsrauchen. Diese Tatsache spiegelt sich in den nach Nichtrauchern und Rauchern unterteilten Lungentumorinzidenzen wider: Im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht sich die Erkrankungshäufigkeit durch den Konsum von zehn Zigaretten pro Tag um das 16-Fache, durch den Konsum von 40 Zigaretten pro Tag um mehr als das 70-Fache (Böcker et al., 2001, p. 590). Bei männlichen Patienten sind Lungenkarzinome europaweit in 85% der Fälle auf inhalatives Zigarettenrauchen zurückzuführen, die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms (PEC) der Lunge ist in über 90% der Fälle mit Rauchen assoziiert (Kleihues et al., 2000, pp. 14, 26).

In Zigarettenrauch sind bis zu 7000 verschiedene potenziell mutagene chemische Substanzen enthalten, u.a. Schwermetalle (Cadmium, Nickel), Alkylantien (Nitroverbindungen) und als Hauptbestandteil polyzyklische Kohlenwasserstoffe (Böcker et al., 2001, p. 589). Metabolisch umgewandelte polyzyklische Kohlenwasserstoffe können durch die Einwirkung auf die NH-Gruppe der Purinbase Guanin die Entstehung eines sperrigen Adduktes (bulky adduct) bewirken und dadurch die Formation der DNA-Helix stark verändern. Dies führt einerseits zur gestörten Replikation, andererseits können fehlerhafte Reparaturvorgänge zu Deletion, Substitution oder Insertion führen und damit eine Änderung der DNA-Sequenz induzieren (Seyffert, 2003, pp. 549–555).

Weitere Risikofaktoren für die Entstehung von Bronchialkarzinomen sind die berufliche Exposition zu Karzinogenen wie Asbest, Quarzstaub oder Radon sowie die Belastung mit dem Schwermetall Arsen (Böcker et al., 2001, p. 590; Kleihues et al., 2000, p. 15). Asbest begünstigt das Entstehen von „reactive oxygen species“ (ROS) und kann dadurch DNA-Schäden hervorrufen (Heintz et al., 2010).

Die genaue Rolle von onkogenen Viren wie dem Humanen Papillomavirus in der Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms der Lunge ist zurzeit noch nicht geklärt (Böhm et al., 2009; Chang et al., 2015).

## 2.1.2 Tumorklassifikation

### 2.1.2.1 Tumorvarianten

Maligne Neoplasien der Lunge können in die quantitativ bedeutendste Hauptgruppe der Karzinome und in die selteneren Hauptgruppen der neuroendokrinen Tumore sowie Lymphome und Sarkome unterteilt werden (Rössner et al., 2008, p. 364).

Die Gliederung der Lungenkarzinome erfolgt gemäß ihres klinisch-histologischen Bildes und ihrer Prognose bei Erstdiagnose in die Gruppe der aggressiven kleinzelligen Karzinome (SCLC = small cell lung cancer; etwa 13% aller Lungenkarzinome) und der nicht kleinzelligen Karzinome (NSCLC = non small cell lung cancer), die sich wiederum in vier Untergruppen gliedern lassen (Tab. 1). Dies sind in erster Linie die Plattenepithel- und die Adenokarzinome (Böcker et al., 2001). Daneben gibt es die Gruppe der großzelligen Karzinome sowie eine sehr kleine vierte Gruppe von seltenen Varianten. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Subgruppen sind in Tabelle 1 aufgeführt: Im Zeitraum von 1977-1981 war der am häufigsten auftretende Subtyp das Plattenepithelkarzinom mit einem Anteil von 32%, gefolgt von Adenokarzinomen mit 29%. In den Jahren 2006-2010 hat der Anteil der Adenokarzinome um 14% auf 43% zugenommen, der Anteil der Plattenepithelkarzinome sank hingegen um 12% und liegt derzeit bei 20%. Der Anteil der kleinzelligen Karzinome liegt zurzeit bei 13% (Travis et al., 2015, p. 28):

Gruppen-zuteilung	Histologischer Subtyp der Lungenkarzinome	Abkürzung	1977-1981 (prozentualer Anteil an allen Lungenkarzinomen )	2006-2010 (prozentualer Anteil an allen Lungenkarzinomen )
NSCLC	Plattenepithelkarzinom	PEC	32%	20%
	Adenokarzinom	ADC	29%	43%
	Großzelliges Karzinom	GZCA	8%	2%
	Andere, spezifizierte Karzinome	/	2%	4%
SCLC	Kleinzelliges Karzinom	SCLC	17%	13%
-	Sonstige	/	12%	18%

**Tabelle 1: Histologische Subtypen des Lungenkarzinoms**

*Prozentuale Anteile der histologischen Subtypen der Lungenkarzinome weltweit und Verteilung der Anteile von 1977-1981/2006-2010 (Travis et al., 2015, p27)*

### 2.1.3 Plattenepithelkarzinom der Lunge

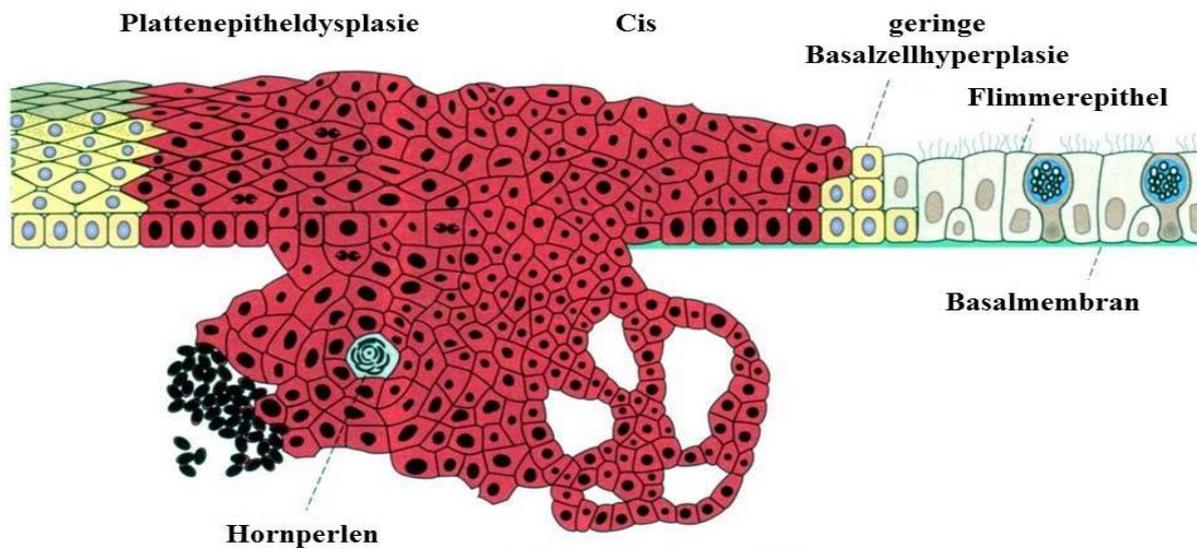
#### 2.1.3.1 Pathogenese des Plattenepithelkarzinoms der Lunge

Wenngleich jede Zelle eines Individuums die gesamte Erbinformation besitzt, ist die Expression einzelner Gene während der Entwicklung eingeschränkt, sodass es zur zellspezifischen Differenzierung kommt. Dennoch bleibt bei einzelnen Zellpopulationen ein Differenzierungsspielraum bestehen, der unter pathologischen Einflüssen eine Um-differenzierung des Ausgangsgewebes bedingen kann. Die Um-differenzierung erfolgt dabei im Bereich der Stammzellen des Ursprungssystems und wird als Metaplasie bezeichnet. So sind Plattenepitheldysplasien typische Vorläufer von Plattenepithelkarzinomen (PEC). Diese Vorläufer entwickeln sich u.a. durch Einwirkung von Noxen: Als Reaktion auf Zigarettenrauch als Noxe degeneriert das respiratorische Epithel und es kommt zu einer Hyperplasie der Basalzellen, die sich nicht länger in die typischen respiratorischen Epithelzellen, sondern in Plattenepithelzellen differenzieren.

Die einer Hyperplasie folgende Metaplasie beschreibt ein regelhaft ausdifferenziertes Plattenepithel und gilt grundsätzlich als nicht neoplastisch. Kommt es dabei aber im weiteren Verlauf zu Zell- und Zellkernatypien, so spricht man von einer Dysplasie (Rössner et al., 2008, pp. 199–201). Im Stadium der Dysplasie besteht noch die physiologische Differenzierung der einzelnen Zellschichten.

Ist eine Ausreifung der Zellen nicht mehr gegeben, d.h. wenn proliferierende atypische Zellen bis in oberste Epithelschichten auftauchen, spricht man von einem Carcinoma in situ (Cis). Ein Cis ist definitionsgemäß ein Karzinom, das durch die lokale Ansammlung von proliferierenden atypisch neoplastischen Zellen mit intakter Basalmembran gekennzeichnet ist (Böcker et al., 2001, p. 195). Als obligate Präkanzerose entwickelt sich das Cis häufig (50–60%) zu einem invasiven Karzinom, welches zusätzlich zu den bereits genannten Kriterien invasiv über die Basalmembran hinauswächst. Weitere Merkmale für das Vorliegen eines invasiven Karzinoms sind der Nachweis von zahlreichen Mitosen sowie das Fehlen einer Tumorkapsel im Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitt (Rössner et al., 2008, pp. 206–209).

Die einzelnen Stadien der Karzinogenese am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt:



**Abbildung 1: Entwicklung eines bösartigen Lungentumors**

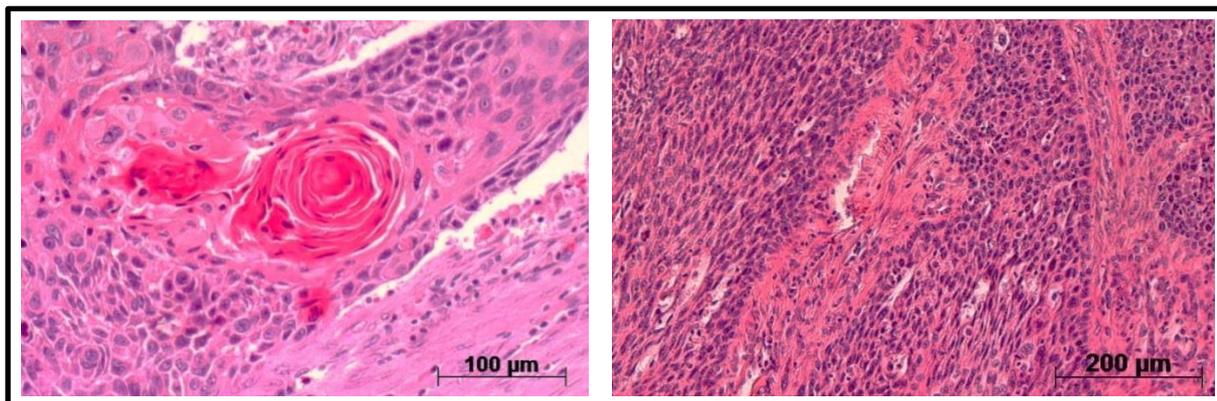
*Schematische Darstellung der Entwicklung eines PEC der Lunge: Rechts physiologisches respiratorisches Epithel mit intakter Basalmembran (türkis); Gelb: rechts Basalzellhyperplasie und links Plattenepitheldysplasie als Vorstufe eines PEC. Rot: Cis (Carcinoma in situ) mit intakter Basalmembran sowie -links davon- Übergang in ein PEC mit Hornperlenausbildung nach Durchbruch der Basalmembran (modifiziert nach Böcker et al., 2001, p.592).*

### 2.1.3.2 Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms der Lunge

Die histopathologische Typisierung eines Lungentumors erfolgt mikroskopisch nach den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO).

Hierbei gilt das Auftreten von Hornperlen und Interzellularbrücken sowie unauffälligen Zellkernen in der HE-Färbung als spezifischer Hinweis auf das Vorliegen eines gut differenzierten, verhornenden PEC. Fehlen diese Merkmale und treten dafür zusätzlich Kernatypien wie beispielsweise prominente Nucleoli auf, so bedarf es der immunhistochemischen Färbung (IHC-Färbung), um ein undifferenziertes, nicht verhornendes PEC von einem Adenokarzinom zu unterscheiden.

Die WHO-Klassifikation unterteilt die Plattenepithelkarzinome der Lunge in verhornende und nicht verhornende Tumore (Travis et al., 2015, pp. 51–55). Beide Subentitäten wurden an unserem Kollektiv gefärbt und fotografisch dokumentiert:



**Abbildung 2: Plattenepithelkarzinom der Lunge**

*Die histologischen Subtypen des Plattenepithelkarzinoms: Links: verhornendes PEC der Lunge mit rötlicher Hornperle (HE-Färbung, 20-fache Originalvergrößerung); Rechts: nicht verhornendes PEC der Lunge (HE-Färbung, 10-fache Originalvergrößerung)*

In der IHC-Färbung ergeben bei den meisten PEC des Respirationstrakts Antikörper gegen Cytokeratin 5 und 6 und gegen das Protein p63 eine positive Reaktion, daneben gilt als spezifischstes Reaktionsmuster derzeit eine positive Färbung mit dem Antikörper p40 gegen  $\Delta$ Np63. Der Nachweis von TTF-1 ist als Marker für ADC etabliert und sollte daher bei Tumormaterial eines PEC in der IHC-Färbung negativ ausfallen:

	CK 5/6	TTF-1	p63	p40/ $\Delta$ Np63
PEC	+	-	+	+
ADC	-	+	-	-

**Tabelle 2: IHC-Markerprofil von PEC und ADC der Lunge**

Markerprofil mit Antikörper gegen Cytokeratin 5 und 6 (CK5/6); gegen den Thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1); gegen p63, ein dem Tumorsuppressor p53 verwandtes Protein, und gegen  $\Delta$ Np63 (synonym p40), eine verkürzte Version von p63.

### 2.1.3.2.1 Diagnostische Bedeutung des $\Delta$ Np63/p40 Proteins

Für das Protein p63 codiert das Gen TP63 (tumor protein 63), das beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert ist (Nobre et al., 2013). Es hat bezüglich Struktur und Gensequenz eine große Ähnlichkeit mit dem bekannten Tumorsuppressorgen TP53 und wird deshalb zur p53 Familie der nukleären Transkriptionsfaktoren gezählt (Pelosi et al., 2002). Im Gegensatz zu TP53 können aus dem TP63 Gen durch alternatives Spleißen verschiedene Proteinvarianten entstehen, die sich den mittels Antikörper p63 nachweisbaren TAp63 Varianten oder den mittels Antikörper p40 nachweisbaren  $\Delta$ Np63 Varianten zuordnen lassen (Bishop et al., 2011; Nobre et al., 2013). Strukturell unterscheiden sich diese beiden Varianten in dem Vorhandensein (TAp63) bzw. dem Fehlen ( $\Delta$ Np63) einer Transaktivierungsdomäne (Bishop et al., 2011). Ein Vergleich der beiden Isoformen des p63 Proteins ist in Abbildung 3 gezeigt:

p63 Isoform	alternative Bezeichnung	Funktionelle Bedeutung	Proteinaufbau mit Antikörperbindung	Antikörper Reaktivität	
				p63	p40
TAp63	p63	Tumor-suppressor		+	-
$\Delta$ Np63	p40	Proto-onkogen		+	+

**Abbildung 3: Aufbau und Eigenschaften von TAp63 und  $\Delta$ Np63**

Vergleich der beiden p63 Isoformen TAp63 und  $\Delta$ Np63 hinsichtlich der Bezeichnung, der funktionellen Bedeutung, des Proteinaufbaus sowie des immunhistochemischen Reaktionsmusters (modifiziert nach Bishop et al., 2011).

Bisher wurde bei der Diagnostik des PEC der Lunge der Antikörper p63 verwendet, der sowohl die TAp63 Variante des p63 Proteins als auch die  $\Delta$ Np63 Variante des p63 Proteins identifiziert, wodurch eine hohe Sensitivität (93,5-100 % (Ao et al., 2014; Bishop et al., 2011)), jedoch eine geringere Spezifität für PEC der Lunge erreicht wurde (60-80% (Ao et al., 2014; Bishop et al., 2011)). Grund dafür ist die Tatsache, dass sich die TAp63 Proteinvariante bei etwa einem Drittel aller Adenokarzinome der Lunge und der Hälfte der großzelligen Lymphome des Mediastinums nachweisen lässt (Bishop et al., 2011; Pelosi et al., 2013).

Bei der TAp63 Variante handelt es sich funktionell wie bei p53 um ein Tumorsuppressorprotein, das vermehrt in differenzierten Zellen vorkommt und nach Zellschädigung die Apoptose initiieren kann. Im Gegensatz zu TAp63 wird das  $\Delta$ Np63 Protein eher in Vorläuferzellen exprimiert und hemmt die Zelldifferenzierung sowie die Einleitung der Apoptose. Es kann so als Stammzellfaktor die Ausdifferenzierung von Zellen verhindern und besitzt die Fähigkeit, die Aktivität von p53 oder TAp63 zu antagonisieren (Bishop et al., 2011). Im Gegensatz zu p53 und TAp63 wird die Expression von  $\Delta$ Np63 aus diesem Grund nach Zellschädigung unter physiologischen Bedingungen herabreguliert. Insgesamt kann die  $\Delta$ Np63 Variante der Gruppe der Protoonkogene zugeordnet werden, d.h. das Protein reguliert in der gesunden Zelle das Wachstum bzw. die Proliferation der Zelle (Jain et al., 2013; Nobre et al., 2013).

Der Antikörper p40, der immunhistochemisch nur die in Plattenepithelien verstärkt exprimierte Isoform  $\Delta$ Np63 nachweist, scheint bei anderen Tumoren der Lunge wie z.B. Adenokarzinomen deutlich seltener positiv zu sein, sodass dadurch zuverlässiger zwischen Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen differenziert werden kann (Bishop et al., 2011; Koh et al., 2014; Pelosi et al., 2013).

P40 gilt daher mit einer Spezifität von 92,5%-98% (Ao et al., 2014; Bishop et al., 2011; Koh et al., 2014) als höher spezifischer Marker für den Nachweis von PE-Zelldifferenzierung (Bishop et al., 2011; Pelosi et al., 2013). Mit einer Sensitivität von 93,2-100% (Ao et al., 2014; Bishop et al., 2011) weist p40 gegenüber p63 ein vergleichbares Niveau auf, weshalb p40 bei PEC der Lunge aktuell als präzisester Marker angesehen wird (Bishop et al., 2011; Koh et al., 2014; Pelosi et al., 2013).

### 2.1.3.3 Grading und TNM-Einteilung der NSCLC

Anhand verschiedener histologischer Merkmale wie Beurteilung der Zellkerne und der Mitosenzahl lässt sich der Differenzierungsgrad und damit der Malignitätsgrad, das so genannte Grading der Lungenkarzinome, bestimmen (Böcker et al., 2001, p. 208; Damjanov and Fan, 2013, pp. 31–35). Die Einteilung erfolgt von hochdifferenzierten Karzinomen (G1) bis zu undifferenzierten Tumoren (G4). Die PEC werden gemäß ihres Differenzierungsgrads am häufigsten in die Kategorien G1-G3 eingeteilt (Wittekind and Meyer, 2010). Kriterien für ein hochdifferenziertes PEC (G1-2) sind im Aufbau gleichartige Epithelkomplexe, verbunden mit der Ausbildung von Interzellularbrücken. Daneben ist eine bestehende Verhornungstendenz ein mögliches Charakteristikum für ein hoch differenziertes PEC und zeigt sich im histologischen Präparat durch das Auftreten von wirbelartigen Hornperlen. Bei niedrigdifferenzierten PEC (G3) ist die Schichtung des Epithels komplett aufgehoben, wodurch die Ähnlichkeit zum Muttergewebe im Aufbau meist nicht mehr gegeben ist (Böcker et al., 2001, p. 590; Damjanov and Fan, 2013, pp. 31–35). Da mit abnehmendem Differenzierungsgrad die Wachstumsintensität (Malignität) eines Tumors zunimmt, ist für viele Neoplasien die Bestimmung der Ausreifung (Differenzierung) eines Tumors wichtig für dessen prognostische Einordnung (Böcker et al., 2001, pp. 208, 590).

Die Klassifizierung von Tumoren gemäß ihrer Größe und Ausbreitung spiegelt sich im Staging wider - einer Stadieneinteilung, die verschiedene Merkmale des Tumors umfasst und besonders für die Therapie und die Prognose wichtig ist. Eine für viele Tumorarten verwandte Klassifikation ist das TNM-System. Daten hinsichtlich des Primärtumors (T), des Befalls regionärer Lymphknoten (N) und evtl. vorliegender Fernmetastasen (M) führen zu einem Gesamtstaging des betreffenden Tumors. Basiert die Kenntnis dieser Merkmale auf klinischen Untersuchungen, so bezeichnet man die Klassifikation als cTNM, sind die Daten das Ergebnis von postoperativen histologischen oder autoptischen Untersuchungen in einem Institut der Pathologie, so handelt es sich um die pTNM-Klassifikation (Böcker et al., 2001, p. 208).

Für die TNM-Klassifikation des Plattenepithelkarzinoms der Lunge gilt seit dem 01.01.2010 die von der IASLC und UICC verfasste 7. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Lungentumore. Mithilfe der TNM-Klassifikation kann eine Stadieneinteilung des Tumors in die Stadien 0-IV erfolgen; dies ist für die Therapieplanung und zur Einschätzung der Prognose des Krankheitsverlaufs wichtig (Goeckenjan et al., 2010). Die siebte TNM-Klassifikation und die Stadieneinteilung für PEC der Lunge sind im Anhang beigefügt.

#### **2.1.3.4 Therapie der NSCLC**

In der Therapie des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms steht bei einem operablen Tumor in erster Linie die Operation, postoperativ kann sich eine adjuvante Therapie anschließen. Die Bestrahlung des Tumorbetts ist nach der Entfernung des Tumors erforderlich, wenn ein R1-Stadium vorliegt, d.h. wenn der Tumor bis in den chirurgischen Schnittrand des Resektates reicht und eine Nachresektion nicht möglich ist. Die Therapie der Wahl im UICC-Stadium I ist die mit einer systematischen Lymphknotendisektion verbundene Tumorresektion. Eine adjuvante Chemotherapie ist bei diesem Tumorstadium nicht empfohlen. In Stadium II und III sollte nach Resektion des Tumors eine adjuvante, cisplatinhaltige Chemotherapie durchgeführt werden. Bei Vorliegen eines Stadiums IIIA bzw. ab einem Lymphknotenstadium  $>pN1$  ist zusätzlich zur bereits aufgeführten Therapie eine postoperative Radiotherapie indiziert. Sind bereits präoperativ Lymphknotenmetastasen der Kategorie N2 bekannt, sollte eine neoadjuvante Radiotherapie mit nachfolgender Operation sowie adjuvanter Therapie erfolgen. Therapie der ersten Wahl ab Stadium IIIB ist eine alleinige Kombination aus Radiotherapie und Chemotherapie. Im Stadium IV ist eine Chemotherapie durchzuführen, es kann in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand des Patienten gegebenenfalls eine Operation zur Reduktion der Tumormasse erfolgen (Goeckenjan et al., 2010).

#### **2.1.3.5 Prognose des Plattenepithelkarzinoms der Lunge**

Prognostisch relevant ist neben der körperlichen Verfassung des Patienten und des Tumorsubtyps der Differenzierungsgrad des Karzinoms. Generell gilt die Prognose des PEC hinsichtlich der stadienabhängigen Überlebensrate als signifikant günstiger als bei der Gruppe der ADC der Lunge (Lipp et al., 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei aktuellen Rauchern etwa 50%, diese Rate kann bei Ex-Nikotinabusus in Abhängigkeit von der vergangenen rauchfreien Zeit steigen (Kadota et al., 2014). Ein Rauchverzicht kann sich auch noch bei oder nach Diagnosestellung positiv auf die Prognose auswirken. Als Prognoseparameter konnte bisher nur der beispielsweise mithilfe des Karnofsky-Index gemessene Allgemeinzustand des Patienten verwandt werden (Goeckenjan et al., 2010). Im Gegensatz zu den ADC der Lunge konnten bei den PEC bisher noch keine sicheren Biomarker mit prognostischer Relevanz ausgemacht werden (Travis et al., 2015, p. 55).

## **2.2 Physiologie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren und Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptoren**

### **2.2.1 Familie der humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren**

Mit zurzeit 22 bekannten Mitgliedern bilden die FGF eine der größten Familien der Wachstumsfaktoren im menschlichen Körper (Turner and Grose, 2010). Ihre Zielpunkte umfassen sowohl Zellen mesodermalen als auch neuroektodermalen Ursprungs. Man kann diese heterogene Gruppe verschiedener Faktoren gemäß ihrer zeitlichen Wirkung auf mesodermale und neuroektodermale Zellen in verschiedene Subgruppen gliedern. So nehmen die FGF 4, 8, 15, 17, 19 einen besonderen Stellenwert in der Embryonalentwicklung ein, während FGF 1, 2, 5-7, 9-14, 16, 18, 20-23 zur Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen in der späteren Entwicklung einen wichtigen Beitrag leisten (Ornitz and Itoh, 2001). Generell übernehmen FG-Faktoren eine wichtige Rolle in der Gastrulation sowie in der Bildung von Zellmembranen und beeinflussen durch die Regulation von Zelldifferenzierung und Zellproliferation die Entwicklung des Nervensystems und der Lunge (Grose and Dickson, 2005; Powers et al., 2000). Auch besitzen sie die Fähigkeit, bei Organschäden die Produktion von IL-2 und Megakaryozyten (Mitogenic) zu stimulieren und ermöglichen eine erleichterte Migration von Zellen durch Endothelschichten in Verletzungsbereichen (Chemotaxis). Eine weitere wichtige Eigenschaft einzelner FGFs ist ihre Fähigkeit, Angiogenese zu induzieren und aufrechtzuerhalten (Powers et al., 2000).

Chemisch handelt es sich bei den einzelnen Faktoren um Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 17000 bis 34000. Ihre Aminosäuresequenz stimmt zu 13-65% überein (Eswarakumar et al., 2005). Als definierend und somit Voraussetzung für die einzelnen Faktoren dieser vielfältigen Familie gilt nicht die Fähigkeit zur Stimulierung von Fibroblasten (Powers et al., 2000), sondern die hohe Affinität, mit der sie Heparin binden. Aus diesem Grund werden sie auch als „Heparin Binding Proteins“ (HBP) bezeichnet. Gleichzeitig haben alle FGF einen ähnlichen Aufbau: Sie besitzen einen identischen 140 Aminosäurereste langen Abschnitt, der Heparin bindet und für den Kontakt mit den jeweiligen Rezeptoren verantwortlich ist (Ornitz and Itoh, 2001; Powers et al., 2000).

In der Regel verläuft die durch FGF ausgelöste Signalkaskade über die Bindung des Faktors an seinen Rezeptor (FGFR1-4), wodurch es zur Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase (RTK) kommt und als Folge verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden stimuliert werden. Auf diese Weise wird ein regulatorisches Signal in den Zellkern weitergegeben (Eswarakumar et al., 2005) (Abb. 5).

## 2.2.2 Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptoren

Die Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptoren (FGFR) sind integrale Membranproteine mit einer extrazellulär gelegenen Rezeptordomäne für die einzelnen Wachstumsfaktoren sowie einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne (TKD), die nach Bindung des Liganden (FGF) durch seinen Rezeptor (FGFR) aktiviert wird (Abb. 4). Diese Aktivierung löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus (Abb. 5).

Beim Menschen sind fünf verschiedene FGFRs bekannt (FGFR1-5), allerdings besitzt FGFR5 (FGFRL1) keine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne, er fängt möglicherweise überschüssige Liganden (FGF) ab und moduliert auf diese Weise die Signalweiterleitung (Turner and Grose, 2010).

### 2.2.2.1 Die Gene für FGFR 1-4 des Menschen

Die Mitglieder der FGFR Familie (1-4) werden von vier Genen codiert. Die Gene für FGFR1, 2, 3 und 4 sind auf Chromosom 8, 10, 4 bzw. 5 gelegen und weisen Unterschiede in ihrer Größe auf. In Tabelle 3 sind die Merkmale der jeweiligen Rezeptoren aufgeführt.

	Chromosom	Genlokus	Größe (in kb)	Anzahl der Exone	NCBI Referenz Sequenz
<b>FGFR1</b>	8	8p11	64.697	17	NG_007729.1
<b>FGFR2</b>	10	10q26	127.129	17	NG_012449.1
<b>FGFR3</b>	4	4p16.3	22.561	17	NG_012632.1
<b>FGFR4</b>	5	5q35.2	18.207	17	NG_012067.1

**Tabelle 3: Gene der FGFR 1-4**

Die Informationen über die Genstruktur der einzelnen Rezeptoren entstammen der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (Pruitt et al., 2012; Zhang et al., 1999). Das Gen des FGFR2 ist mit etwa 127 kb das größte der FGFR Familie. Die FGF-Rezeptoren 1-4 stimmen in ihren Aminosäuresequenzen zu 55-72% überein. Die Proteinsequenzen der beiden FGFR2 und FGFR3 sind zu mindestens 65% identisch; mit knapp 90% identischer Aminosäuren findet sich die größte strukturelle Übereinstimmung zwischen diesen beiden Rezeptoren in den TKD (Powers et al., 2000).

### 2.2.2.2 Aufbau und Funktion des FGFR Proteins

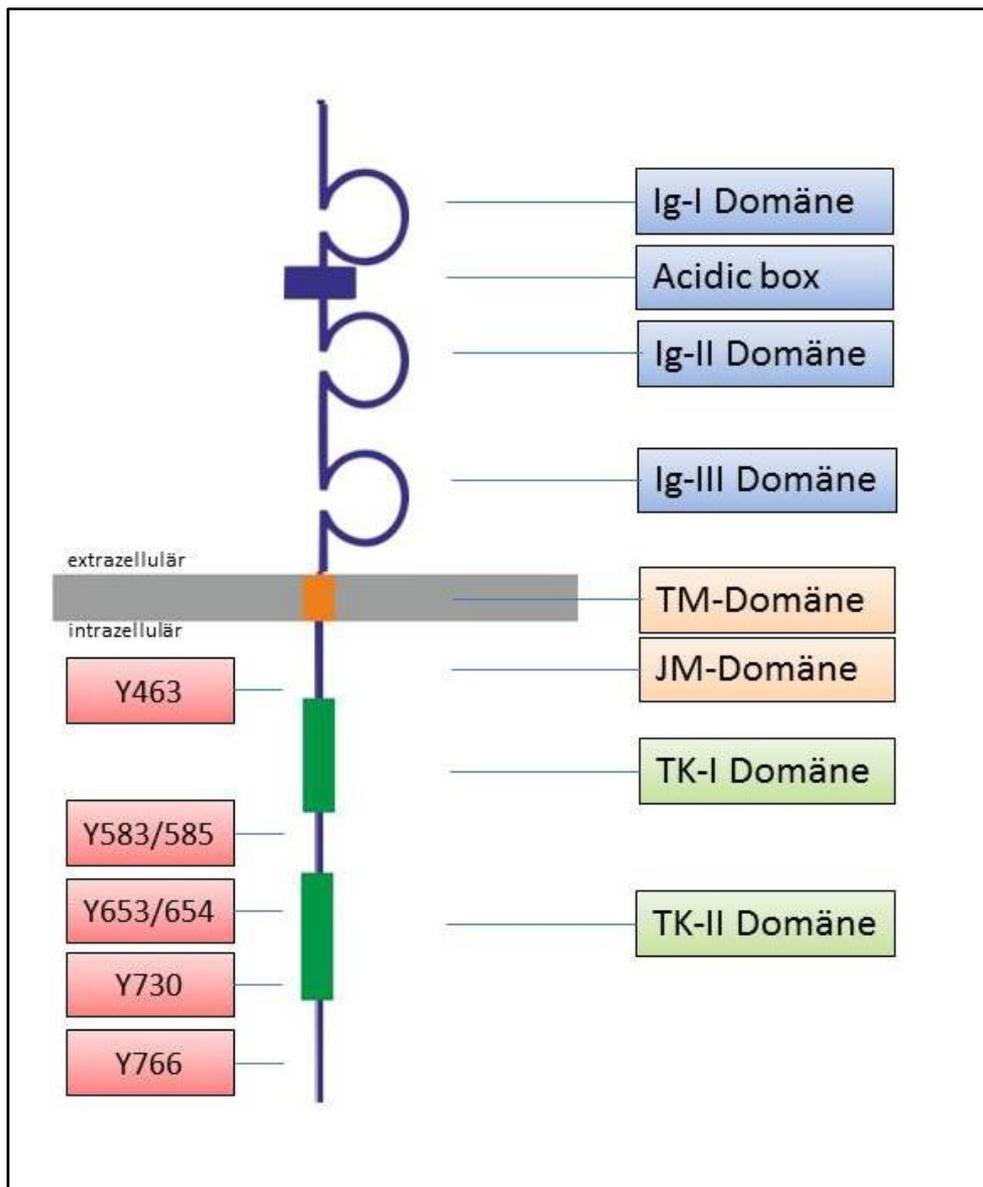
Jedes der FGFR Proteine 1 bis 4 setzt sich aus einer extrazellulären Domäne (ED), einer helikalen Transmembrandomäne (TMD), einer juxtamembranär gelegenen Domäne (JMD) sowie der intrazellulär gelegenen Proteintyrosinkinasedomäne (TKD) zusammen (Abb. 4).

Die ED umfasst den Carboxyterminus des Proteins und besteht aus drei Immunglobulin-ähnlichen Schleifen, die als IgI, IgII und IgIII bezeichnet werden (Abb. 4), sowie einer Acidic Box, die aus acht sauren Aminosäureresten besteht (Powers et al., 2000). Während IgI in Verbindung mit der Acidic Box nicht für die Ligandenbindung (Mohammadi et al., 2005), sondern für einen negativen Rückkopplungsmechanismus, eine so genannte Autoinhibition (Eswarakumar et al., 2005) von Bedeutung ist, dienen IgII und IgIII (Mohammadi et al., 2005) der Bindung von FGFs durch nichtkovalente Wechselwirkungen.

Im Bereich der IgII findet sich ein Abschnitt mit vorwiegend positiv geladenen Aminosäuren, der aufgrund seiner Bindungsaffinität zu zellmembranständigen Heparinmolekülen den Namen „Heparin Binding Site“ (HBS) trägt (Eswarakumar et al., 2005). Durch alternatives Spleißen der Gene im Bereich von IgIII entstehen die weiteren Varianten IIIa, IIIb, IIIc. Dabei ist die IIIa Form Bestandteil jeder IgIII Domäne von FGFR1-3. Der zweite Teil der IgIII Domäne enthält entweder den IIIb- oder den IIIc-Abschnitt. Für den FGFR2 kodieren Exon 7 IgIIIa und die Exone 8 und 9 IgIIIb bzw. IIIc, wodurch Exon 7 entweder mit Exon 8 oder mit Exon 9 für die IgIII Region codiert (Eswarakumar et al., 2005). Diese Spleißvarianten werden zell- und gewebespezifisch exprimiert: Man findet die IIIc Variante vorwiegend in mesenchymalen Zellen und die IIIb Variante in Epithelzellen (Mohammadi et al., 2005). Auch beeinflussen die Isoformen die Bindung der einzelnen FGFs. So bindet die Isoform FGFR2b, welche die IgIIIb Variante enthält, die FGFs 7 und 10 und FGF2 nicht, während FGFR2c FGF2 bindet und keine Affinität für FGF7 und 10 zeigt (Eswarakumar et al., 2005).

Auf die Transmembranhelix des Rezeptors folgen die im Zytoplasma gelegenen juxtamembranären Domänen (JMD), die Tyrosinkinasedomäne (TKD) sowie der Carboxyterminus (Knights and Cook, 2010) (Abb. 4).

Die Bindung des Liganden FGF induziert eine Dimerisierung von zwei Rezeptormolekülen. Dabei binden die korrespondierenden Ligandenbindungsdomänen beider Moleküle je ein FGF-Molekül und ein damit assoziiertes Heparansulfat-Proteoglycan Molekül. Die durch die Dimerisierung hervorgerufene Konformationsänderung führt zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomänen mit der Folge, dass Substratproteine, welche an der JMD bzw. der TKD angelagert sind, an Tyrosinresten phosphoryliert werden (Turner and Grose, 2010).



**Abbildung 4: Aufbau eines aktivierten FGFR-Monomers**

*Aufbau eines FGFR-Monomers mit schematischer Darstellung der IG-Schleifen I-III und der für die Autoinhibition wichtigen Acidic box, der transmembranären (TM) und juxtamembranären (JM) Domäne sowie der zweigeteilten intrazellulären Tyrosinkinase- (TK) Domäne.*

*Exemplarisch links dargestellt sind rot hinterlegt mögliche phosphorylierbare Tyrosinreste mit Angabe ihrer Positionen im Bereich der Tyrosinkinasedomänen (modifiziert nach Knights and Cook, 2010)*

### 2.2.2.3 Aktivierung und Signalweiterleitung

#### 2.2.2.3.1 Phosphorylierung

Infolge der Dimerisierung zweier Rezeptormonomere kommt es zu einer Konformationsänderung in der Rezeptorstruktur und dadurch zur Aktivierung der TKD1 und 2. Dies hat die Phosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosinreste des Rezeptors zur Folge, wodurch Anlagerungspunkte für weitere in die Signaltransduktion involvierte Proteine entstehen (Löffler et al., 2007, p. 786). Die überwiegende Zahl der phosphorylierbaren Tyrosinreste ist in den FGFR1-3 nahezu identisch; die einzelnen Unterschiede, z.B. das Fehlen der phosphorylierbaren Tyrosinreste in der JMD des FGFR3, erklären zum Teil die spezifische Signalgebung durch jeden einzelnen FGF-Rezeptor (Ahmad et al. 2012).

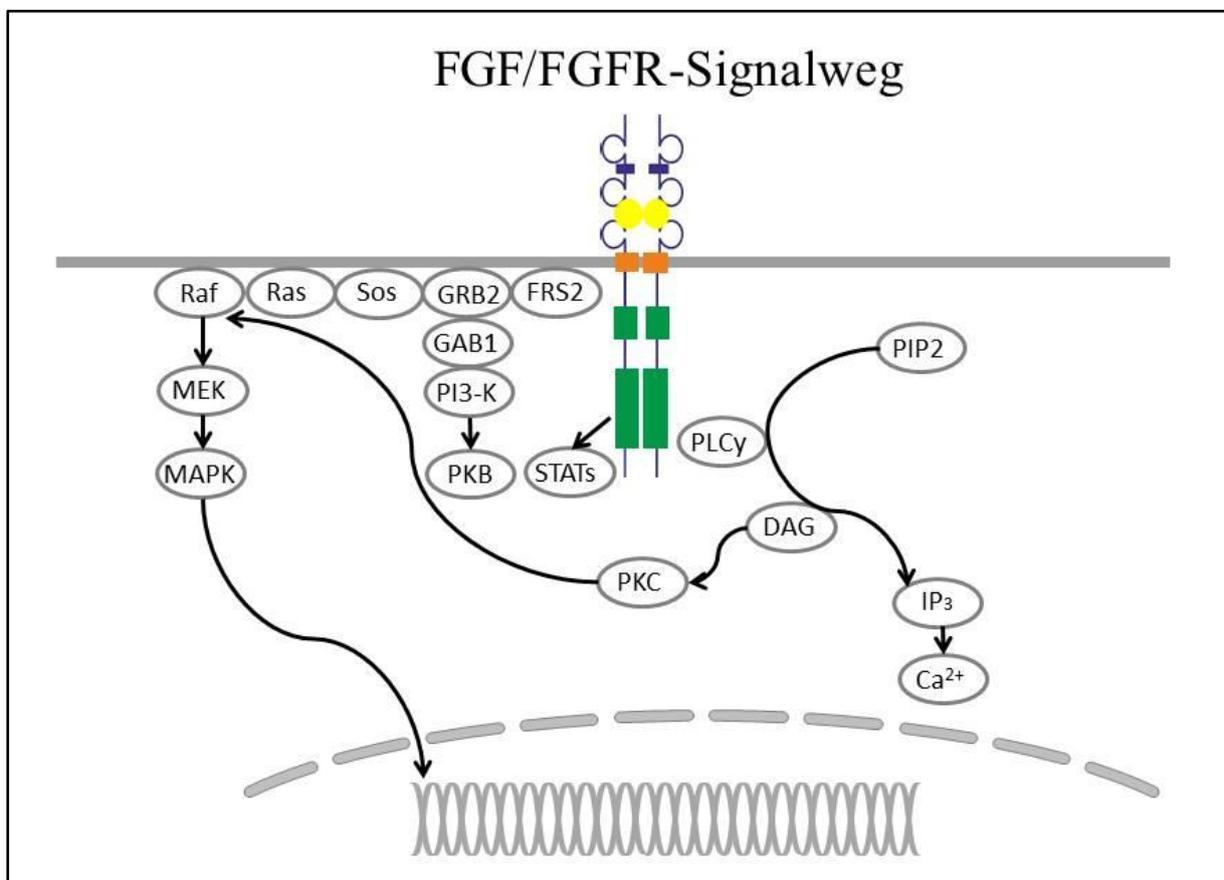
Die Bindung des für die Signalweiterleitung wichtigen FGFR-Substrat-Moleküls 2 (FRS2) erfolgt an der JMD bereits im inaktiven Zustand unabhängig von der Phosphorylierung der Tyrosinreste. Allerdings ist zur Aktivierung von FRS2 der phosphorylierte Tyrosinrest an der Position 766 unabdingbar (Knights and Cook, 2010) (Abb. 4).

#### 2.2.2.3.2 Das FGFR Substratmolekül 2 (FRS2)

Das FRS2 ist ein an der Innenseite der Zellmembran vom FGFR gebundenes Protein mit großer Bedeutung für die Signalweiterleitung. Durch seine PTB-Domäne bindet es zunächst an die JMD der FGFRs und wird in Folge durch den aktivierten Rezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert (Knights and Cook, 2010; Webster and Donoghue, 1997) (Abb. 5).

An das phosphorylierte FRS2 lagern sich SOS (son of sevenless) und GRB2 (growth factor receptor bound 2) an, es kommt zur Aktivierung des RAS/RAF/MAPK Signalwegs (Abb. 5). GRB2 geht eine Bindung mit Gab1 (GRB2 associated binding protein 1) ein, einem Molekül, das den PI3Kinase Signalweg auslöst und im Weiteren für die Aktivierung des anti-apoptotischen PKB-abhängigen Signalwegs verantwortlich ist (Ahmad et al., 2012; Turner and Grose, 2010). Am C-terminal gelegenen phosphorylierten Tyrosinrest (Position 766) erfolgt beim FGFR1 die Bindung der PLC von FRS2 unabhängig über deren „Src homology 2“- (SH2) Domäne. Das nach Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> durch die PLC freigesetzte Diacylglycerol (DAG) erlaubt die Aktivierung der PKC, die durch die Phosphorylierung von RAF die Signalweiterleitung über den MAPK Signalweg auslöst (Ahmad et al., 2012). Neben diesen Hauptsignalwegen können FGFR weitere zelluläre Signalwege induzieren, beispielsweise den STAT-Signalweg (signal transducer and activator of transcription) (Turner and Grose, 2010).

Die Signalwege sind durch mehrere Mechanismen rückgekoppelt: Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, die Zahl der Rezeptoren durch Endozytose und Abbau in Lysosomen zu kontrollieren. Bei der Hemmung einzelner Signalwege kommt dem Regulatorprotein MAPK Phosphatase 2 (MKP3), den Sprouty (SPRY) Proteinen und der SEF Familie (similiar expression to FGF) eine bedeutende Rolle zu. Die MAPK Phosphatase 2 drosselt durch Dephosphorylierung von ERK 1 und 2 den MAPK Signalweg; die SPRY Proteine können mit dem GRB2 um dessen Bindungsstelle am Rezeptor konkurrieren und verhindern auf diese Weise eine Aktivierung des RAS-Weges. Bei der SEF Familie kann die transmembranäre Form (SEF) direkt hemmend auf den FGFR wirken, während die zyttoplasmatische Form (SEFb) wahrscheinlich die Phosphorylierung von ERK verhindert (Turner and Grose, 2010).



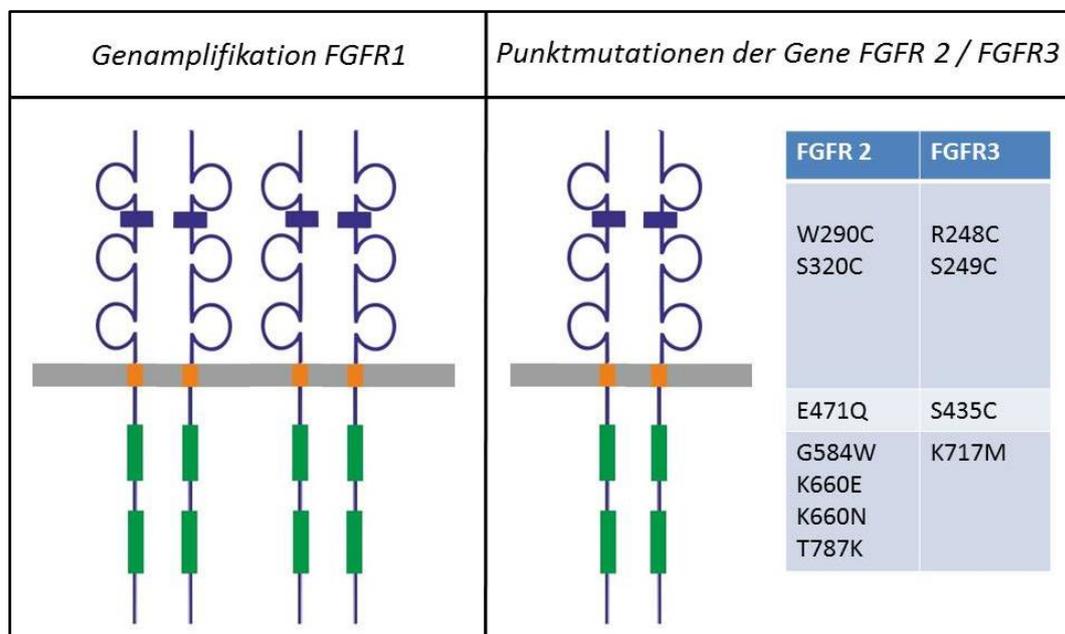
**Abbildung 5: Der FGF/FGFR Signalweg**

*Die Dimerisierung des FGFR führt über Autophosphorylierung der intrazellulären Kinasedomäne (grün) direkt oder indirekt (über Adapterproteine wie FRS2a (FGFR substrate 2), GRB2 (growth factor receptor bound 2) oder SOS (son of sevenless)) zur Aktivierung von vier wichtigen Hauptsignalwegen: PLCγ/PKC, STAT (signal transducer and activator of transcription), PI3K-PKB und RAS/RAF/MAPK. (modifiziert nach Turner and Grose, 2010)*

## 2.3 Pathophysiologie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren und Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptoren

### 2.3.1 Bedeutung der FGFR in der Karzinogenese

FGF-Rezeptoren leiten Wachstumssignale des Interzellulärraums in die Zelle mit dem Ergebnis, dass die Zelle differenziert und proliferiert. Diese Eigenschaft macht die Gene, welche die Gruppe der FGFR kodieren, zu Protoonkogenen (Knights and Cook, 2010). Um ein kontrolliertes Wachstum zu gewährleisten, unterliegt der FGFR-Signalweg normalerweise mehreren Kontrollen (Mohammadi et al., 2005) (siehe. 2.2.2.3). Mutationen in den Genen der Rezeptoren können die Eigenschaft der Rezeptorproteine verändern, sodass diese rückkoppelnden Kontrollmechanismen nicht mehr greifen und es zu unkontrollierter Aktivierung des FGFR-Signalwegs kommt. So wurden Punktmutationen in den Genen von FGFR2 und 3 sowie die Amplifikation der Genregion vom FGFR1 bei PEC der Lunge beobachtet (Abb. 6), daneben treten diese auch in Gewebeproben von Patienten mit Skelettmalformationen und bei anderen Neoplasien auf (Heist et al., 2012; Turner and Grose, 2010; Webster and Donoghue, 1997).



**Abbildung 6: Genetische Alterationen der FGFR1-3 beim PEC der Lunge**

Beim PEC der Lunge können eine durch Genamplifikation bedingte Überexpression von FGFR1 oder durch Punktmutationen hervorgerufene Aminosäureänderungen in der Struktur der FGFR 2 und 3 auftreten. Rechts sind die derzeit bekannten Punktmutationen der FGFR 2 und 3 aufgeführt, farblich unterteilt nach Lage im Bereich der EZD, JMD, und TKD. (modifiziert nach Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013; Sasaki, 2011)

### 2.3.1.1 Amplifikation des Gens für FGFR1

Als Genamplifikation bezeichnet man die Vervielfachung eines bestimmten Gens. Diese Vermehrung der Kopienzahl erfolgt im Zuge der DNA Replikation (Albertson, 2006). Eine Genamplifikation kommt beim Plattenepithelkarzinom der Lunge gehäuft vor, betroffen ist dabei das FGFR1-Gen (Schildhaus et al., 2012).

Das Gen des FGFR1 befindet sich in der menschlichen Zelle auf dem kleinen Arm des Chromosoms 8 im Bereich der Bande 11 (8p11) (Dutt et al., 2011; Mendez and Ramirez, 2013). Die Amplifikation dieser Genregion wird bei verschiedenen humanen Tumoren beobachtet (Dutt et al., 2011). Die Häufigkeit, mit der die Amplifikation des Gens von FGFR1 bei PEC der Lunge auftritt, beträgt etwa 9,7-32% und unterscheidet sich nach aktuellen Daten nicht zwischen westlichen und asiatischen Ländern (Jiang et al., 2015; Schildhaus et al., 2012; Sos and Thomas, 2012). Derzeit gilt die FGFR1-Genamplifikation in dieser pulmonalen Tumorsubgruppe als die am häufigsten vorkommende Veränderung in den Genen der FGF-Rezeptoren (Schildhaus et al., 2012, Dutt et al., 2011; Weiss et al., 2010). Bei anderen Tumoren der Lunge tritt sie nur bei 0-1% der Patienten auf (Schildhaus et al., 2012; Weiss et al., 2010). Krankheitsassoziierte Punktmutationen des Gens für FGFR1 scheinen bei PEC der Lunge im Vergleich zu einer Genamplifikation nicht oder nur selten vorzukommen (Heist et al., 2012; Weiss et al., 2010). Zum Nachweis einer FGFR1-Genamplifikation kann eine Dual Color FISH Sonde verwendet werden; es werden hierbei Centromer und Genlokus von FGFR1 mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben markiert (Schildhaus et al., 2012).

Die FGFR1-Genamplifikation bewirkt eine vermehrte Transkription mit Zunahme der Menge des Rezeptorproteins, nicht jedoch der Anzahl der entsprechenden Liganden, der FGF-Faktoren. Die erhöhte Menge an FGFR1-Protein könnte eine ligandenunabhängige Aktivierung der Rezeptoren mit Signalweiterleitung ermöglichen (Weiss et al., 2010). In Anwesenheit von FGFR-Inhibitoren wird in Zellen mit amplifiziertem FGFR1-Gen der MAPK Signalweg gehemmt, die durch den PI3K Weg aktivierte PKB jedoch nicht. Dies legt den Schluss nahe, dass der MAPK Signalweg eine wichtige Bedeutung in der FGFR1-abhängigen Signalweiterleitung einnimmt (Weiss et al., 2010).

Die FGFR1-Genamplifikation selbst kommt in Plattenepithelkarzinomen der Lunge nicht in allen Tumorzellen vor; sie tritt in mehr als 50% der Fälle herdförmig auf (Heist et al., 2012; Schildhaus et al., 2012; Weiss et al., 2010).

Bisher wurden bei PEC der Lunge keine Zusammenhänge zwischen der FGFR1 Genamplifikation und dem Geschlecht der Patienten, dem Stadium und Differenzierungsgrad des Tumors oder der Raucheranamnese gefunden (Jiang et al., 2015).

### 2.3.1.1.1 Genamplifikationsvarianten

Die amplifizierten Gensequenzen, die auch als Amplicon bezeichnet werden, können in der Zelle in zwei verschiedenen Formen vorliegen: Ist das Amplicon in die Chromosomen integriert und zeigt es kein typisches chromosomales Bandenmuster, so wird es als „homogenous staining region“ (HSR) bezeichnet. Die amplifizierten Sequenzen liegen somit intrachromosomal und sind an die normale Zellreplikation gebunden. Amplicons können aber auch isoliert von den eigentlichen Chromosomen als „double minutes“ (DM) vorliegen (Matsui et al., 2013). Diese zeichnen sich durch autonome Replikation aus und besitzen kein Centromer, gelten als instabiler als HSR und können durch Zytostatika vernichtet werden (Storlazzi et al., 2010). Da „double minutes“ kein Centromer besitzen, verteilen sie sich zufällig auf Tochterzellen (Bizari et al., 2006). HSR und DM können sowohl alleine als auch gleichzeitig in den betroffenen Zellen vorkommen; es besteht auch die Möglichkeit, dass sich DM wieder in das Chromosom integrieren und dadurch HSR bilden.

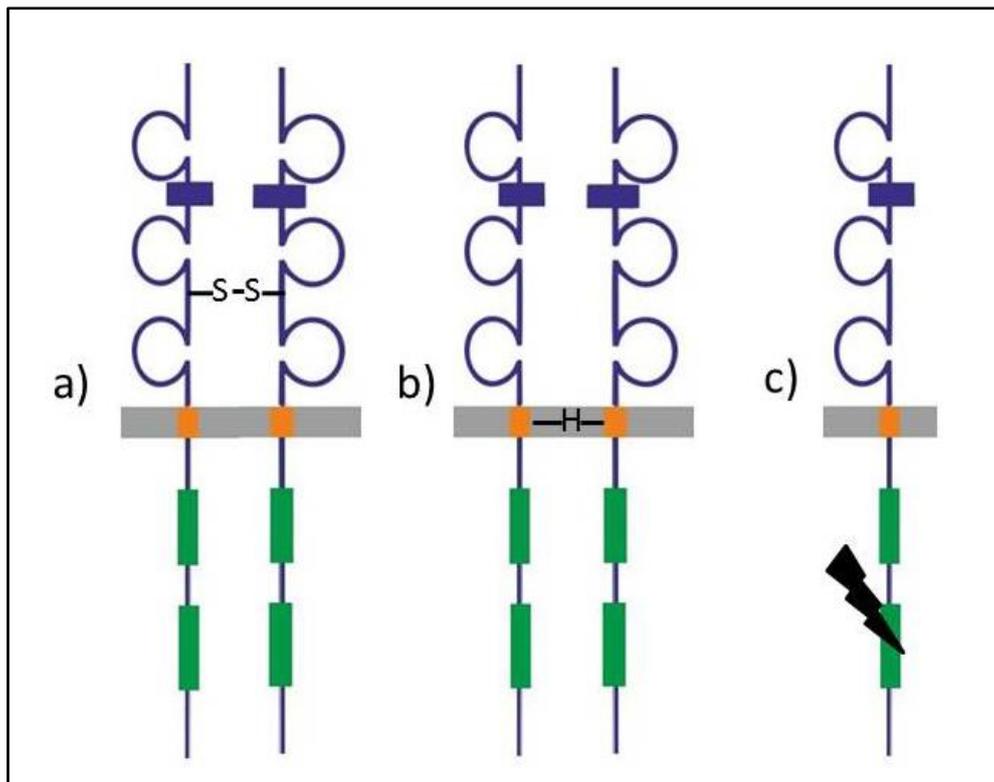
Im Rahmen einer FGFR1-Genamplifikation kann das Amplicon nach derzeitigem Kenntnisstand sowohl als HSR oder als DM vorliegen, generell beweist aber das isolierte oder gemeinsame Vorhandensein von HSR oder DM das Vorliegen einer Genamplifikation in der betreffenden Zelle (Storlazzi et al., 2010).

### 2.3.1.2 Punktmutationen in den Genen von FGFR2 und FGFR3

#### 2.3.1.2.1 „Gain of Function“ Mutationen

Aktivierende Punktmutationen der Gene der FGF Rezeptoren, so genannte "Gain of Function" Mutationen, wurden zunächst vornehmlich im Genom von Patienten mit Wachstumsstörungen infolge von Skelettdysplasien gefunden (Webster and Donoghue, 1997). Heute ist bekannt, dass somatische Mutationen der FGFR-Gene auch bei Tumorerkrankungen vermehrt auftreten (Turner and Grose, 2010). Gain of Function Mutationen führen zu konstitutiv aktiven, d.h. permanent aktiven Proteinen, die nicht mehr der physiologischen Kontrolle unterliegen, eine Tumorentwicklung vorantreiben können und deshalb auch als „Driver“-Mutationen bezeichnet werden (Stratton et al., 2009). Solche Mutationen bei FGFR2 und FGFR3 lassen sich in zwei Untergruppen unterteilen, in Mutationen, die zu Proteinen führen, die immer noch ligandenabhängig aktiviert werden, und in Mutationen, bei denen die resultierenden Proteine ligandenunabhängig aktiv sind. Besonders letztere können eine wichtige Rolle in der Karzinogenese von menschlichen Tumoren spielen (Mohammadi et al., 2005). Mutationen können auf drei verschiedenen Wegen zur ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors und des nachfolgenden Signalweges führen (Abb. 7):

1. Die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen den extrazellulären Domänen zweier Rezeptormoleküle erfolgt im Rahmen der Dimerisierung und beeinflusst damit die Aktivierung der Tyrosinkinase. Das mutationsbedingte Auftreten eines zusätzlichen oder der Wegfall eines Cysteinrestes kann ebenso wie der mutationsbedingte Einbau anderer Aminosäuren zur Destabilisierung von intramolekularen S-S - Brücken führen (Burke et al., 1998; Mohammadi et al., 2005).
2. Auch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Transmembrandomänen spielt bei der Dimerisierung der Rezeptormoleküle und der Aktivierung der Tyrosinkinase eine wichtige Rolle. Durch einen mutationsbedingten Ersatz einer neutralen Aminosäure durch eine geladene Aminosäure kann die Ausbildung von solchen Wasserstoffbrücken beeinflusst werden (Webster and Donoghue, 1997).
3. Das Auftreten von Mutationen im Bereich von Genabschnitten, welche die intrazellulär gelegenen TK kodieren, kann zu einer konstitutiven Enzymaktivität führen und damit den Signalweg ohne Dimerisierung des Rezeptors starten (Webster and Donoghue, 1997).



**Abbildung 7: Mutationsbedingte Folgen für die Signalweiterleitung über FGFR**

*Ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung (a) durch Ausbildung einer S-S-Brückenbindung, b) durch Ausbildung zusätzlicher mutationsbedingter Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen in der TMD und (c) durch ligandenunabhängige Aktivierung oder Funktionssteigerung der TKD infolge einer in der Kinasedomäne auftretenden Mutation (schwarzer Pfeil) (modifiziert nach Webster and Donoghue, 1997)*

### 2.3.1.2.2 Punktmutationen in den Genen für FGFR2 und FGFR3 beim PEC der Lunge

Somatische Mutationen im Gen von FGFR3 sind bei Neoplasien mit einer Inzidenz von 30% am häufigsten bei Urothelkarzinomen nachweisbar (Liao et al., 2013). Bei Untersuchungen an 178 Tumorproben aus PEC der Lunge im Rahmen des „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) Projektes zeigten 3% (5/178) der Proben im Gen des FGFR2 und 2% (4/178) der Proben im Gen des FGFR3 Mutationen (Hammerman et al., 2012). Eine weitere Arbeitsgruppe übernahm zur Auswertung die Sequenzierungsergebnisse der 178 Proben von TCGA und erweiterte die Studienzahl um 18 Proben auf 196 Tumorproben. Die Mutationshäufigkeit im Gen von FGFR2 und FGFR3 betrug bei dieser Untersuchung bei beiden Genen 3% (jeweils 6/196 Mutationen pro Gen) (Liao et al., 2013). Die Ergebnisse einer Untersuchung an Tumormaterial von asiatischen Patienten zeigten Mutationsfrequenzen von 2% (2/102) für FGFR2 und 1% (1/102) für FGFR3 (Kim et al., 2014).

Mutationen des FGFR2-Gens fanden sich im Rahmen des TCGA-Projektes in den Genabschnitten, welche die EZD (W290C) und die JMD (E471Q) des Rezeptors kodieren sowie in dem die TKD kodierenden Bereich (G584W, K660E oder K660N; T787K) (Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013) (Abb. 6). Diese Veränderungen wurden sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene nachgewiesen (Hammerman et al., 2012). Die Punktmutation der EZD, die zum Austausch der Aminosäure Serin an Position 320 im Bereich von IgIIIc der extrazellulären Domäne des Rezeptors durch ein Cystein führt (S320C), wurde nur von einer Arbeitsgruppe gefunden (Liao et al., 2013). Bereits im Jahr 2005 wurde die Mutation im Codon 290 (W290C) von FGFR2 bei Sequenzierung einer PEC Gewebeprobe detektiert (Davies et al., 2005; Katoh, 2008).

Im Gen des FGFR3 wurden von beiden Arbeitsgruppen zwei Mutationen, R248C und S249C, innerhalb benachbarter Codons im codierenden Bereich der EZD sowie die Mutation K717M im codierenden Bereich für die intrazelluläre TKD festgestellt (Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013). Zusätzlich wurde die Mutation S435C innerhalb der JMD gefunden (Liao et al., 2013) (Abb. 6). Die Mutation S249C machte bei beiden Arbeitsgruppen 50% (2/4 bzw. 3/6) der Mutationen im FGFR3-Gen aus (Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013). Sie gilt beim Blasenkarzinom als häufigste aktivierende Mutation im Gen des FGFR3 (Majewski et al., 2013). Auch die benachbarte Mutation R248C ist als somatische Veränderung bei Urothelkarzinomen detektiert worden, zusätzlich tritt sie bei benignen Hauttumoren oder als Keimbahnmutation bei der Thanatophoren Dysplasie auf (Hafner and Hartmann, 2010).

Im Rahmen des TCGA-Projektes wurden die im Gen des FGFR2 nachgewiesenen Mutationen K660E und K660N sowie die im Gen des FGFR3 nachgewiesenen Mutationen R248C und S249C als „Driver“-Mutationen des PEC der Lunge beschrieben, weshalb in dieser Arbeit die Tumorproben in erster Linie auf diese vier Mutationen hin untersucht wurden.

Die bisher gefundenen Punktmutationen in den Genen von FGFR2 und FGFR3 beim PEC der Lunge sind in Abbildung 6 dargestellt, die im Rahmen der Arbeit untersuchten Punktmutationen sind getrennt nach Rezeptor in den Tabellen 4-5 aufgeführt.

	<b>W290C</b>	<b>E471Q</b>	<b>G584W</b>	<b>K660E/N</b>
Exon	Exon 7	Exon 10	Exon 13	Exon 14
Basen- mutation	c.870 G>C	c.1411 G>C	c.1749 G>T	c.1977 A>G c.1980 A>C/T
Aminosäure- austausch	Tryptophan (W) > Cystein (C)	Glutamat (E) > Glutamin (Q)	Glycin (G) > Tryptophan (W)	Lysin (K) > Glutamat (E)/ Asparagin (N)
Referenz für PEC der Lunge	Davies et al., 2005; Hammerman et al., 2012; Kato, 2008; Liao et al., 2013	Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013	Hammerman et al., 2012	Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013
Identifizierung der Mutation bei anderen Krebs- erkrankungen	Ösophagus, lymphatisches Gewebe	-	-	Urogenitaltrakt, Brustgewebe, ZNS

**Tabelle 4: Punktmutationen im Gen von FGFR2**

	<b>R248C</b>	<b>S249C</b>	<b>S435C</b>	<b>K717M</b>
Exon	Exon 7	Exon 7	Exon 10	Exon 15
Basen- mutation	c.742 A>T	c.746 C>G	c.1304 C>G	c.2150 A>T
Aminosäure- austausch	Arginin (R) > Cystein (C)	Serin (S) > Cystein (C)	Serin (S) > Cystein (C)	Lysin (K) > Methionin (M)
Referenz für PEC der Lunge	Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013	Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013	Liao et al., 2013	Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013
Identifizierung der Mutation bei anderen Krebs- erkrankungen	Urogenitaltrakt, Haut, obere Atemwege, lymphatisches Gewebe	Urogenitaltrakt, Haut, obere Atemwege	-	-

**Tabelle 5: Punktmutationen im Gen von FGFR3**

**Mutationen in der extrazellulären Domäne der FGFR2 und FGFR3:**

Voraussetzung für eine physiologische Aktivierung des FGFR Signalweges ist in den meisten Fällen zunächst die Dimerisierung von zwei Rezeptormolekülen nach Bindung des Liganden (Webster and Donoghue, 1997). Sowohl bei Rezeptor 2 (W290C, S320C) als auch bei Rezeptor 3 (R248C, S249C) führen vier der insgesamt neun Punktmutationen im Bereich der für die EZD kodierenden Exone zum Austausch einer Aminosäure durch jeweils ein Cystein (Hammerman et al., 2012; Liao et al., 2013).

Im normalen Wildtyp-Molekül finden sich mindestens sechs Cysteinreste, die über Disulfidbrücken die drei Immunglobulinschleifen der Tertiärstruktur bedingen. Ein im mutierten Protein auftretendes zusätzliches Cystein kann die regelrechte Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten stören oder mit dem mutierten Cystein des zweiten Rezeptormoleküls ein intermolekulares Disulfid ausbilden (Abb. 7a). In beiden Fällen kann es zu einer ligandenunabhängigen Rezeptordimerisierung kommen (Eswarakumar et al., 2005; Mohammadi et al., 2005; Robertson et al., 1998; Webster and Donoghue, 1997).

**Mutationen im Bereich der intrazellulären Domäne der FGFR2 und FGFR3:**

Im Bereich der JMD des FGFR findet neben der Phosphorylierung die Anlagerung des FRS2 Proteins an den aktivierten Rezeptor statt. In beiden Rezeptoren ist bei Lungenkarzinomen in diesem Bereich jeweils eine Mutation auffällig geworden (E471Q in FGFR2 und S435C in FGFR3). Zu möglichen Auswirkungen der Mutationen auf den FGFR Signalweg liegen nach unseren Informationen derzeit keine Ergebnisse vor.

Bekannte Mutationen, die eine Änderung der Aminosäureabfolge im Bereich der TKD hervorrufen, führen im Gegensatz zu Mutationen der EZD nicht zu einer ligandenunabhängigen Rezeptordimerisierung, allerdings können sie die Kinaseaktivität beeinflussen, z.B. durch eine Hemmung des Rückkopplungsmechanismus oder durch Autophosphorylierung (Di Martino et al., 2009) (Abb. 7c).

Bei Lungenkarzinomen betrifft dies in FGFR2 die Aminosäuren der Positionen 584 (G584W) und 660 (K660E oder K660N), in FGFR3 der Position 717 (K717M) (Hammerman et al., 2012).

## 2.4 Fragestellung und Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Faktenlage wird in der vorliegenden Arbeit, ausgehend von einem Kollektiv von 101 Patientinnen und Patienten, die im Zeitraum von 2006 bis 2013 am Universitätsklinikum des Saarlandes wegen eines Plattenepithelkarzinoms der Lunge operiert wurden, gezielt den folgenden Fragen nachgegangen:

1. Durch welche klinisch-histopathologischen Standardparameter wie Geschlecht, Tumorhistologie, Tumorgrading, pT-pN-cM-Stadium, Stadiengruppe, Tumorlokalisation und Überlebensstatus zum 01.01.2014 ist das oben genannte Kollektiv gekennzeichnet?
2. Ergeben sich aus den in Frage 1 genannten klinisch-histopathologischen Standardparametern relevante prognostische Hinweise für das Gesamtüberleben der Patienten?

Für die weiteren Fragestellungen wurden die vorhandenen Tumorresektate dieser Patientinnen und Patienten untersucht.

3. Lässt sich die  $\Delta$ Np63 Variante des Proteins p63 in Tumorresektaten immunhistochemisch nachweisen, und wie hoch ist der Anteil der  $\Delta$ Np63-positiven Plattenepithelkarzinome an den Karzinomen des Kollektivs?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Immunreaktivität der Tumorzellen als Maß für die Expression von  $\Delta$ Np63 und den klinisch-histopathologischen Standardparametern?
5. Korreliert die Immunreaktivität der Tumorzellen als Maß für die Expression von  $\Delta$ Np63 mit dem Gesamtüberleben der Patienten?
6. Lässt sich die DNA aus Gewebeschnitten der Tumorresektate effektiv für eine anschließende Sequenzierung isolieren, und wie hoch beläuft sich die Frequenz der beschriebenen Punktmutationen in den Genen von FGFR2 und FGFR3 am vorliegenden Patientenkollektiv?
7. Existiert ein Zusammenhang von einzelnen Mutationen mit dem  $\Delta$ Np63 Nachweis und den klinisch-histopathologischen Standardparametern?
8. Haben einzelne Mutationen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten?

9. Kann eine Amplifikation des FGFR1-Gens in den Tumorresektaten identifiziert werden, und wie hoch ist deren Frequenz im vorliegenden Patientenkollektiv?
10. Korreliert die Amplifikation des FGFR1-Gens mit den klinisch-histopathologischen Standardparametern, dem  $\Delta$ Np63 Nachweis (Frage 3) und/oder der Frequenz der beschriebenen Punktmutationen in den Genen von FGFR2 und FGFR3 (Frage 6)?
11. Eignen sich die bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge identifizierten molekularen Veränderungen der FGFR1-3 Gene allein oder zusammen mit den klinisch-pathologischen Standardparametern als mögliche prognostische Marker für Patientensubgruppen oder für das Gesamtkollektiv?

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Kollektivstruktur**

Das Gesamtkollektiv, das der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt, setzt sich aus 23 Frauen und 78 Männern mit einer Altersspanne von 42 bis 82 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zusammen. Die klinischen Daten wurden retrospektiv in Zusammenarbeit mit der Klinik für Innere Medizin (Schwerpunkte Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin) und der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie, dem Tumorregister des UKS sowie dem Krebsregister Saarland erhoben. Als Stichtag für die Überlebensdaten wurde der 01.01.2014 festgesetzt, wodurch sich ein Follow-up der einzelnen Patienten von 2 bis 96 Monaten ergab. Insgesamt waren zum Stichtag 50 der 101 Patienten verstorben; aufgrund der retrospektiven Datenerhebung wurde bei den Verstorbenen die Gesamtüberlebenszeit unabhängig von individuellen Todesursachen für die Auswertung herangezogen. Die TNM-Klassifikation der Tumore erfolgte bei Diagnosestellung nach den vorgegebenen Richtlinien und wurde im Jahr 2014 gemäß der siebten Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren aktualisiert (Wittekind and Meyer, 2010) und ein einheitliches Tumorgrading durchgeführt (Damjanov and Fan, 2013, pp. 31–35).

##### **3.1.2 Probenmaterial**

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die molekulargenetischen und immunhistochemischen Untersuchungen an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben von 101 Patienten. Es handelt sich bei dem Untersuchungsmaterial ausschließlich um DNA-Proben, die aus Resektaten von primären PEC der Lunge gewonnen wurden. Die Resektate wurden im Rahmen einer Operation am Universitätsklinikum des Saarlandes (UKS) entnommen und nach leitliniengerechter Diagnostik am Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des UKS (Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Bohle) archiviert. Die Diagnose erfolgte durch Fachärzte der Pathologie am o.g. Institut des UKS im Zeitraum von 2005-2013 an Hämatoxylin-Eosin und immunhistochemisch gefärbten Schnitten der Tumorresektate. Den Richtlinien der Ethikkommission bei der Ärztekammer des Saarlandes entsprechend wurden die vorliegenden Untersuchungen an pseudonymisierten Gewebeproben durchgeführt.

### 3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Produktname	Firma, Ort
96 Well Platte	Thermo Fast 96 PCR Detection Plate	ThermoFisher, Waltham
Automat zur PCR Aufreinigung	QIAcube	Qiagen, Hilden
Deckglas	Deckgläser 24x32mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
DNA- Sequenzierautomat	3500 Genetic-Analyzer	Applied Biosystems, Foster City
Elektrophoresekammer	Power Source 300V	VWR, Radnor
Eppendorfer Reaktionsgefäß 2,0ml	Biosphere Safe Seal Tube 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfer Reaktionsgefäß 0,5ml	Biosphere Safe Seal Tube 0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfer Reaktionsgefäß 0,2ml	Multiply-Pro 0,2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Färbeautomat	Tissue Stainer COT 20	Medite GmbH, Burgdorf
Färbeautomat	BenchMark XT	Ventana Medical Systems, Oro Valley
Färbeautomat IHC	Bench Mark Ultra ICH Färbemodul	Ventana Medical Systems, Oro Valley
Fluoreszenzkamera	DFC 340 FX	Leica Microsystems, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop	DM 6000B	Leica Microsystems, Wetzlar
Heizplatte	PZ 28-2 T	Präzitherm, Düsseldorf
Hybridisierer	S2451	DakoCytomation, Hamburg
Immersionsöl	Immersol 518 F	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kältebank	Tissue-Tek Cryo Console	Miles Scientific, Newark
Kanülen	Microlance 1,2mm x 40mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Kapillare 3500	8-Capillary	Applied Biosystems, Foster City
Klebstoff	Fixogum	Marabu, Tamm
Kühlschrank	Premium NotFrost	Liebherr, Kirchdorf
Magnetrührer	RET Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop	Axioskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop-Kamera	AxioCam MRc 5	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop-Kamera	DFC340 FX	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotom	Rotary 3003	pfm medical, Nonnweiler
Mikrowelle	M708	Miele, Gütersloh
Objektträger	Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger	SuperFrost Ultra plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipette	Eppendorf Research 10y, 100y, 200y, 1000y	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Filter Tips Clearline	Biosigma, Cona
Programmierbarer Heizblock	peqSTAR 96 Universal Thermocycler	peqlab Biotechnologie, Erlangen

Produktbezeichnung	Produktname	Firma, Ort
Spectrophotometer	NanoDrop-1000	peqlab Biotechnologie, Erlangen
UV-Lichtkammer	Syngene	InGenius, Ottawa
Vortex Mixer	peqTWIST	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Waage	BP 110S	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Modell 100	Memmert GmbH, Schwabach
Wasserbad groß	SW 21	Julabo, Seelbach
Wasserbad klein	1052	GFL Gesellschaft für Laborwesen, Burgwedel
Workstation	UV Sterilizing PCR Workstation	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Zentrifuge	Z 326 K	Hermle Labortechnik, Gosheim

**Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterialien**

### 3.1.4 Reagenzien

Produktbezeichnung	Produktname	Firma, Ort
Agarose	peqGOLD Universal Agarose	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Aqua dest.	Aqua	B. Braun AG, Sembach
Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA	Dapi	Linaris, Dossenheim
EDTA	EDTA	AppliChem, Darmstadt
Eindeckmedium	Entellan Neu	Merck, Darmstadt
Eosin	Eosin Y-solution 0,5% aqueous	Merck, Darmstadt
Ethanol	Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, St. Louis
Farbstoff zum Nachweis von Nukleinsäuren	Ethidiumbromid	VWR, Erlangen
FGFR1-Sonde	ZytoLight SPEC FGFR1/CEN 8 Dual Color Probe	ZytoVision GmbH, Bremerhaven
Formalin	Formaldehyd-Lösung 4,0%	Fischar GmbH, Saarbrücken
Formamid	Hi-Di Formamide 5ml	Applied Biosystems, Foster City
Nachfixierungslösung ICH	10ml NaCl 0,9%, 20yl Glutaraldehyd 25%	Ventana Medical Systems, Oro Valley
Oligodesoxynukleotide	Primer	Eurofins Genomics, Ebersberg
Polymer	POP-4	Applied Biosystems, Foster City
Primärantikörper	Anti-p40 (5-17) Rabbit pAb (PC373)	Calbiochem-Merck, Darmstadt

Produktbezeichnung	Produktname	Firma, Ort
Reagenzien DNA Isolierung	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit: ATL buffer, Proteinase K, AL buffer, AW1 buffer, AW2 buffer	Qiagen, Hilden
Reagenzien FGFR1 FISH	SPEC FGFR1/CEN8 Dual Color Probe Kit: Heat Pretreatment Solution Citric, Pepsin Solution, Wash buffer SSC, Wash buffer A (25x)	ZytoVision GmbH, Bremerhaven
Reagenzien PCR Template Aufreinigung	QIAamp MinELute PCR Purification Kit: PB buffer, PE buffer, EB buffer, MinElute Column	Qiagen, Hilden
Reagenzien Sequenzierungs- PCR	BigDye Terminator v1.1: Ready Reaction Mix v1.1 (2,5x); BigDye buffer (5x)	Applied Biosystems, Foster City
Taq Polymerase	peqGold Taq-DNA-Polymerase	peqlab Biotechnologie, Erlangen
TBE Puffer	Tris -Puffer, EDTA, Boric acid Molecular biology grade	AppliChem, Darmstadt
Xylol	Xylol Pharm. Helv VI	Aug. Hedinger GmbH, Stuttgart
Zweitantikörperkomplex IHC (biotinylierter Sekundärantikörper)	ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit: Red Enhancer (<3% MGCL2); Red Multimer (<50yg/ml); Red Naphtol (<1.0%), Red Fast Red A (<1.0%); Red Fast Red B (< 1.0%)	Ventana Medical Systems, Oro Valley
Reagenzien IHC	Protease: Alkaline Protease aus Bacillus Subtilis (1:0,5 U/ml; 2: 0,1U/ml; 3: 0,02U/ml) Bluing Reagent (0.1M Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0.5M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) Reaction Buffer Concentrate (10x) SSC (Salt Sodium Citrat Puffer) (2x) CC1 (Cell Conditioning: TBE ph 8.4 buffer) CC2 (Citrate ph 6 buffer) Reaktionspuffer (Tris-Puffer ph7.6-7.8) (1x) EZ Prep buffer: Entparaffinisierungslösung (1x) LCS (Liquid Coverslip)	Ventana Medical Systems, Oro Valley

Tabelle 7: Reagenzien

### 3.1.5 Verwendete Programme

Name	Firma, Ort	Verwendung
Axiovision	Carl Zeiss AG, Oberkochen	Immunhistochemie
Chromas lite	Technelysium, South Brisbane	DNA-Analyse
Leica Application Suite 4.0	Leica Microsystems, Wetzlar	Fluoreszenzmikroskopie
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/Auswertung
Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/Auswertung
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/Auswertung
SPSS	SPSS/IBM, Armonk	Dokumentation/Auswertung
Zotero	George Mason University, Washington DC	Dokumentation/Auswertung

**Tabelle 8: Software zur Datenerhebung, Dokumentation und Auswertung**

### 3.1.6 Verwendete Primer (jeweils in 5'- 3' Orientierung)

Ziel-DNA	Bezeichnung	Forward	Reverse	„Annealing“-Temperatur	Produktlänge
<i>FGFR2</i> <i>Exon 7</i>	FF1/2	TGGTCGGAGGAG ACGTA	GAACCTTGAGGTAGG GCAGC	60°C	129 bp
<i>FGFR2</i> <i>Exon 10</i>	FF3/4	GTATCCAGGTTTC GGCTGAGT	GTCTCCATCCTGGG ACATGG	60°C	197 bp
<i>FGFR2</i> <i>Exon 13</i>	FF5/6	TCTAAAGGCAAC CTCCGAGA	TCTAAAGGCAACCT CCGAGA	60°C	166 bp
<i>FGFR2</i> <i>Exon 14</i>	FF7/8	AGCAGCCAGAAA TGTTTTGGT	ATCCCACCCAGCTCTC AAC	56°C	198 bp
<i>FGFR3</i> <i>Exon 7</i>	FF9/10	ACGCTGGACGTG CTGGGTGA	CACTGTACACCTTG CAGTGGA	56°C	206 bp
<i>FGFR3</i> <i>Exon 7</i> <i>nested</i>	FF111/10	AGTGGCGGTGGT GGTGAG	CACTGTACACCTTG CAGTGGA	58°C	112 bp
<i>FGFR3</i> <i>Exon 10</i>	FF12/13	AGCAGGTGTCCC TGGAGTC	CCCTCAGCACCCT GACC	58°C	168 bp
<i>FGFR3</i> <i>Exon 15</i>	FF14/15	GCTCTGGGAGAT CTTCACGC	GATGCCACTCACAG GTCGTG	58°C	132 bp

**Tabelle 9: Primertabelle**

(Synthese: Eurofins Genomics, Ebersberg; Quelle FGFR-Gensequenzen: Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (siehe 2.2.2.1))

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Asservierung**

Das zu begutachtende Resektatgewebe wurde nach der Entnahme in der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie des UKS zeitgerecht in Formalinlösung fixiert und an das Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des UKS übersandt, wo es in Paraffin eingebettet und nach der abgeschlossenen Diagnostik archiviert wurde.

### **3.2.2 Molekulargenetische Analysen**

#### **3.2.2.1 DNA Analyse**

##### **3.2.2.1.1 DNA Isolierung und Aufbereitung**

###### **Mikrodissektion der Tumorareale:**

Für die gezielte Isolierung der DNA aus Tumorzellen wurden Hämatoxylin-Eosin (HE)-Schnitte eines repräsentativen Tumorblocks bei 20- bis 40-facher Originalvergrößerung mikroskopiert und die jeweiligen Tumorareale markiert. Nach der Anfertigung von je vier Schnitten mit 5µm Dicke pro Gewebeprobe konnten mithilfe einer sterilen Kanüle die Tumorareale selektiv vom restlichen Lungengewebe getrennt und in einem 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt werden. Zur Kontrolle erfolgten nach Abtragung des Tumormaterials vom Objektträger eine HE-Färbung des verbliebenen Lungengewebes und der Vergleich mit einem neu angefertigten HE-gefärbten Schnitt des Präparates.

###### **Isolierung genomischer DNA aus Gewebeschnitten und Aufarbeitung der DNA zur Sequenzierung:**

Der erste Schritt für die Aufbereitung der DNA aus den Schnitten bestand in der Selektion des Tumorgewebes aus Paraffin; im zweiten Schritt erfolgte die Auftrennung der zellulären Strukturen mit anschließender DNA Isolierung mithilfe einer Reagenzienkombination der Firma Qiagen (Hilden).

Zunächst wurden die Gewebeschnitte zur Entparaffinisierung in 1000µl Xylol für 5min bei 14.000rpm und 21°C in einer Zentrifuge sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgten 2 Waschschrte mit je 1000µl Ethanol (>99,8%). Nach Abpipettieren des Ethanols wurde das Sediment für 15min bei 37°C getrocknet.

Im zweiten Schritt wurden die getrockneten Sedimente in 180µl ATL Puffer aufgeschwemmt

und nach Zugabe von 20µl Proteinase K unter leichtem Schütteln (300rpm) bei 56°C für 16h in einem Thermoblock lysiert. Proteinkinase K ist eine Protease, welche die Proteinanteile in der Probe abbaut. Um artifizielle Quervernetzungen der verbliebenen Nukleinsäuren zurückzubilden, wurde die Probe am Folgetag für 15min auf 90°C erhitzt. Anschließend wurden 200µl AL Puffer zugegeben und die DNA in Gegenwart von Ethanol gefällt. Zum Waschen der Nukleinsäurestränge wurde der gesamte Ansatz auf Qiagen-Säulen pipettiert, nacheinander mit AW1 und AW2 Puffer (jeweils 500µl) gewaschen und anschließend für 3min bei 14.000rpm durch Zentrifugation getrocknet.

Die gereinigte DNA wurde in 30µl H<sub>2</sub>O eluiert, die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration der einzelnen Proben wurde photometrisch mit einem Spectrophotometer gegen einen Leerwert durchgeführt.

### **3.2.2.1.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist eine Standardmethode zur Amplifizierung definierter DNA Abschnitte (Mühlhardt, 2000; Saiki et al., 1985).

Spezifisch für jede PCR sind die synthetisch hergestellten Primer. Es handelt sich dabei um Oligodesoxynukleotide (Länge: 18-30 Nukleotide), welche in ihrer Sequenz komplementär zum Sense- bzw. Antisense-Strang der DNA sind. Die Primerauswahl erfolgte mithilfe des Programms „Primer3“ (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) auf Basis der FGFR-Gensequenzen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (siehe 2.2.2.1). Die Primersequenzen wurden hinsichtlich möglicher weiterer Bindungsstellen an humaner DNA mit dem Programm „Primer-BLAST“ (Ye et al., 2012) überprüft, die Primer selbst wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert.

Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, kann man einen „ingerückten“ Primer einsetzen und eine so genannte „nested PCR“ durchführen. Hierbei wird zunächst eine PCR durchgeführt, deren Produkt als Template für eine zweite PCR dient, deren Primer wiederum im Verhältnis zu den ursprünglichen Primern eingerückt sind (Mühlhardt, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die kodierenden Exone 7, 10, 13 und 14 des FGFR2-Gens und die Exone 7, 10 und 15 des FGFR3-Gens untersucht. Die PCR wurde für jedes Exon getrennt durchgeführt; um die Spezifität zu erhöhen, wurde zur Amplifikation der DNA von Exon 7 des FGFR3 eine „nested PCR“ angewendet.

In der praktischen Durchführung wurde zunächst ein „Master Mix“ angesetzt, der sich aus dem Reaktionspuffer (peq S), den Desoxynukleotiden (peqGold dNTP-Mix), den jeweiligen Primern in einer Konzentration von 10pmol/μl und der Taq-Polymerase (peqGold Taq-DNA-Polymerase) in einer Konzentration von 5U/μl zusammensetzt.

Zu jeweils 47μl des Master Mix wurden 3μl DNA (Konzentration: 30ng/μl) gegeben. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit HPLC-H<sub>2</sub>O anstelle von Tumor-DNA durchgeführt, um eine Verunreinigung mit fremder DNA auszuschließen. Der Reaktionsansatz sowie die genauen PCR-Bedingungen sind als Protokoll aufgeführt:

**Reaktionsansatz PCR:**

38,7μl H <sub>2</sub> O (HPLC)	
1μl Primer forward	(10pmol/μl)
1μl Primer reverse	(10pmol/μl)
5μl Puffer peq S	(100mM Tris-HCL ph=8, 500mM KCL, 15mM MgCl <sub>2</sub> )
1μl dNTPs peqGold dNTP-Mix	(10mM jeweils für A, C, T, G)
0,3μl Taq-DNA Polymerase*	(5U/μl)
3μl DNA	(33ng/μl)

*\*peqGold Taq-DNA-Polymerase*

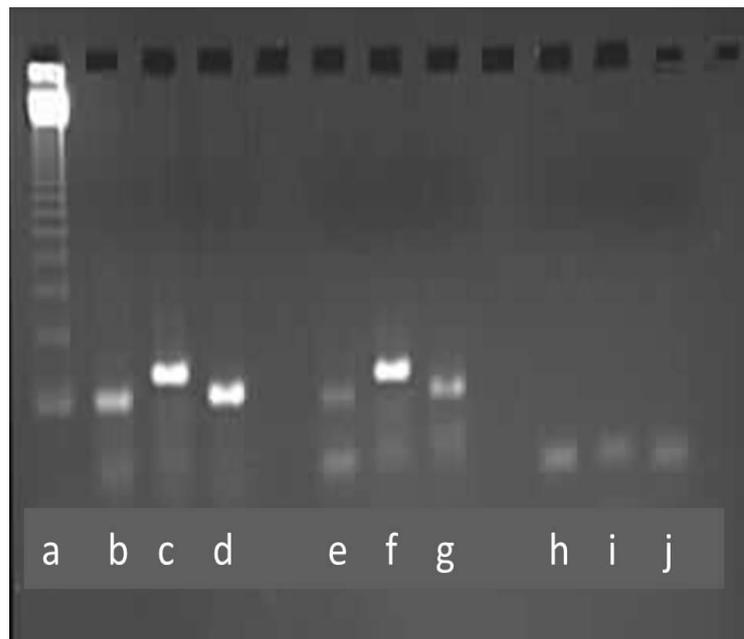
**Reaktionsbedingungen PCR:**

1. initiale Denaturierung: 95°C, 5min
2. 38 Zyklen:
  - Denaturierung: 95°C, 45s
  - Annealing: 56°C/58°C/60°C (siehe 3.1.6), 1min
  - Verlängerung: 72°C, 45s
3. finale Verlängerung: 72°C, 5min
4. Kühlung: 4°C

### 3.2.2.1.3 Gelelektrophorese und DNA Aufreinigung

#### Gelelektrophorese:

Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente wurde mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Herstellung des 2% Agarosegels erfolgte mit in Tris-Borat-EDTA Puffer suspendierter Agarose und Ethidiumbromid zur Färbung der DNA. Dem PCR-Produkt wurde in einem Verhältnis 5:1 ein Ladepuffer zugesetzt und je 5µl des Gemisches in die Taschen des Agarosegels gegeben. Durch Anlegung einer konstanten Spannung von 70V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA im Lauf von 60min; als Größenmarker kam ein Standard-DNA Ansatz der Firma Invitrogen (Carlsbad) zum Einsatz. Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit dem IW Genius UV Bio Imaging System (InGenius, Ottawa) unter UV Licht visualisiert und als TIF/JPEG Datei dokumentiert:



**Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese**

*Agarosegel von amplifizierter FGFR3 DNA aus 2 Tumorproben.*

*a: DNA-Größenmarker zum Vergleich; b, e: Exon 7; c, f: Exon 10; d, g: Exon 15; h-j: Negativkontrolle (HPLC-H<sub>2</sub>O statt DNA)*

### **Aufreinigung des PCR Produkts:**

Das Prinzip der DNA Aufreinigung besteht darin, dass die DNA in Gegenwart des chaotropen Guanidiniumthiocyanats spezifisch an eine Silica-Matrix bindet. Zunächst werden verbliebene Primer, Nukleotide und Salze durch Waschen entfernt. Danach wird die gebundene DNA mit H<sub>2</sub>O oder Puffer, der sehr wenig Salz enthält, eluiert (Mühlhardt, 2000). Praktisch erfolgte die Aufreinigung der PCR Produkte in einem QIAcube (Qiagen, Hilden) mithilfe des MinElute „PCR Purification“ Programms der Firma Qiagen. Zuerst wurde der PB Puffer dem Ansatz zur Bindung der darin befindlichen DNA Fragmente zugegeben. Die Waschung erfolgte durch Zugabe von PE Puffer und zweimaliges Zentrifugieren, das gereinigte PCR Produkt wurde im letzten Schritt in 15µl EB Puffer eluiert.

#### **3.2.2.1.4 DNA-Sequenzierung**

##### **Sequenzierungs-PCR:**

Grundlage für die Bestimmung der Basenfolge des aufgereinigten DNA Fragmentes ist die Sequenzierungsmethode nach Frederick Sanger. Der Vorgang ähnelt der Durchführung der bereits durchgeführten PCR; der Unterschied besteht in der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs), die den Standardnukleosidtriphosphaten beigemischt sind. Den ddNTPs fehlt die 3'Hydroxylgruppe der Desoxyribose, wodurch der Einbau eines ddNTPs zu einem Abbruch der DNA-Synthese führt. Das Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs ist so eingestellt, dass statistisch nach jeder Base des Amplifikats ein Abbruch erfolgt, sodass bei einem zu amplifizierenden DNA-Fragment von 100bp alle Fragmente von 13bp (dem Primer) bis 100bp gebildet werden. Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung können die Basen nach elektrophoretischer Auftrennung im Anschluss von einer Kamera detektiert und ihre lineare Abfolge bestimmt werden (Mühlhardt, 2000).

Bei der praktischen Durchführung der Sequenzierungs-PCR wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City) verwendet. Das Kit besteht aus einem Reaktionspuffer (Sequencing Buffer) sowie einem Polymerase- und ddNTP-haltigen Reaktionsansatz (Ready Reaction Premix). Die exonspezifischen Primer wurden in einer Verdünnung von 1:20 (5pmol/µl) übernommen und zusammen mit dem Master Mix (bestehend aus einem Reaktionspuffer, HPLC-H<sub>2</sub>O und dem Ready Reaction Mix) und dem aufgereinigten PCR Produkt in die Wells einer 96 Wellplatte gegeben. Das Protokoll für die Sequenzierung der DNA Abschnitte ist hier dargestellt:

**Reaktionsansatz Sequenzierungs-PCR:**

14µl H <sub>2</sub> O (HPLC)	
1µl Primer forward bzw. reverse	(5pmol/µl)
3µl Puffer BigDye buffer	(5x)
1µl ddNTPs + DNA Polymerase Ready Reaction Mix v1.1	(2,5x)
1µl DNA	

**Reaktionsbedingungen Sequenzierungs-PCR:**

1. initiale Denaturierung: 96°C, 1min
2. 25 Zyklen:
  - Denaturierung: 96°C, 10s
  - Annealing: 50°C, 5s
  - Verlängerung: 60°C, 2min
3. Kühlung: 8°C

**DNA Fällung und elektrophoretische Sequenzanalyse:**

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion folgte die Präzipitation der verschiedenen DNA Fragmente. Hierzu wurde zum Reaktionsansatz (20µl) zunächst 5µl EDTA gegeben, um die Reaktion zu stoppen. EDTA bindet divalente Kationen wie Mg<sup>2+</sup>; Mg<sup>2+</sup> wiederum wird als Kofaktor von der Taq Polymerase, aber auch von DNA abbauenden Enzymen benötigt. Im nächsten Schritt wurde die Probe mit 60µl Ethanol (100%) für 15min bei Raumtemperatur inkubiert und danach zentrifugiert. Es folgte das Waschen des Sediments mit Ethanol (70%) und die erneute Sedimentierung der DNA mittels Zentrifugation. Das Sediment wurde anschließend in 15µl HiDi Formamide suspendiert und die DNA dabei gleichzeitig denaturiert. Die folgende elektrophoretische Auftrennung der DNA Fragmente mittels Kapillarelektrophorese und die Detektion der Fluoreszenz mittels CCD Kamera erfolgte in einem 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die Registrierung der jeweiligen basenspezifischen Fluoreszenzfarbe im Zeitverlauf wurde computergestützt ausgewertet und zur gesuchten Basensequenz zusammengeführt. Die Dokumentation erfolgte in graphischer Darstellung der Sequenzen unter Verwendung von basenspezifischen Farbpeaks. Zum Öffnen und weiteren Auswerten der Daten wurde das Programm Chromas lite 2.1.1 (Technelysium, South Brisbane (AUS)) verwendet.

### **3.2.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

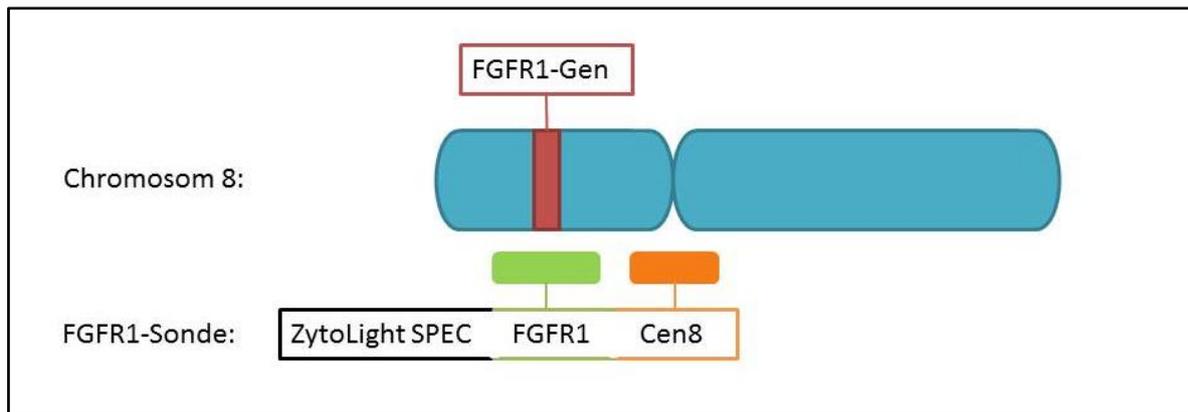
#### **3.2.2.2.1 Grundlagen der FISH**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist eine Methode zum Nachweis von spezifischen Gensequenzen auf den Chromosomen. Es gibt hierbei zwei Arten: die Interphasen-in-situ-Hybridisierung und die Metaphasen-in-situ-Hybridisierung. Der Unterschied liegt im Stadium der zu untersuchenden Zellen gemäß des Zellzyklus. Entspiralisiert liegt das Chromatin der Zellen im Interphasestadium vor; in der Metaphase sind die Chromosomen an den Spindelapparat gebunden und in der zellulären Äquatorialebene ausgerichtet.

Bei der verwendeten Methode handelt es sich um eine Interphase-in-situ-Hybridisierung. Das Prinzip der FISH beruht auf der komplementären Ausbildung von Basenpaaren. Ähnlich der Bindung von Primern bei der PCR möchte man nach Auftrennung der DNA in 2 Einzelstränge die Hybridisierung einer fluoreszenzmarkierten Sonde an einen der Einzelstränge erreichen. Bei der fluoreszenzmarkierten Sonde handelt es sich um eine vorgegebene DNA Sequenz, deren quantitatives Vorkommen man auf Chromosomenebene bestimmt (Lang, 2006, pp. 296–303).

#### **3.2.2.2.2 Sondenmaterial**

Für die FISH in der vorliegenden Arbeit wurde die Sonde „ZytoLight SPEC FGFR1/CEN 8 Dual Color“ (ZytoVision, Bremerhaven) verwendet, die sich aus zwei in Puffer gelösten Bestandteilen zusammensetzt (Abb. 9). Grün fluoreszierende Polynukleotide (ZyGreen: Absorption bei 503nm und Emission bei 528nm) dienen der Bindung und Detektion des Gens von FGFR1. Orange fluoreszierende Polynukleotide (ZyOrange: Absorption bei 547nm und Emission bei 572nm) markieren Alpha-Satelliten-Sequenzen des Centromers von Chromosom 8. Die Markierung der Centromere fungiert bei der „Dual Color“ FISH als Kontrolle des Hybridisierungsvorganges und zum Nachweis einer vorliegenden Poly- oder Aneuploidie. Das quantitative Verhältnis der grün und orange markierten Genloci ist Grundlage für die Auswertung der FISH, die mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (Wetzlar) durchgeführt wurde. Sowohl die Sonde als auch sämtliche Reagenzien sind speziell für Verwendung an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben ausgerichtet. Die Vorbereitung und Aufbereitung der Schnitte zur In-situ-Hybridisierung wurde mit dem „ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit“ durchgeführt und erfolgte nach den Vorgaben des Protokolls der Firma ZytoVision (Kievits et al., 1990; Wilkinson, 1992).



**Abbildung 9: FGFR1 Sonde**

*Schematischer Aufbau des Chromosoms 8 sowie der FGFR1 Sonde der Firma ZytoVision.*

### 3.2.2.2.3 Durchführung der FISH

Die Methode der FISH umfasst die Vorbehandlung des Materials, die Denaturierung und Hybridisierung der Proben mit der Sonde, das stringente Waschen sowie abschließend die Detektion und Analyse der Proben mithilfe des Fluoreszenzmikroskops. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen wurden nach den Vorgaben der Firma ZytoVision übernommen.

#### **Vorbehandlung des Materials:**

Ziel dieses Vorganges ist die Lösung der DNA aus dem Chromatingerüst. Für die In-situ-Hybridisierung musste zunächst ein etwa 3µm dickes Schnittpräparat hergestellt werden, das auf einen Objektträger der Qualität Superfrost Ultra plus aufgezogen wurde. Um zu gewährleisten, dass bei der späteren Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop ausschließlich Tumorzellen zur Auswertung herangezogen wurden, erfolgte die Markierung von repräsentativen Tumorarealen auf dem Objektträger mit Filzstift auf Vorlage der markierten HE Schnitte. Nach Antrocknen der Schnitte wurde das Gewebe außerhalb des markierten Bereiches mit einer sterilen Kanüle entfernt. Zum Abschmelzen des Paraffins und zur Fixierung des Gewebes wurden die Objektträger für 16h bei 60°C in einem Wärmeschrank inkubiert und anschließend nochmals für 10min auf einer Heizplatte bei 70°C fixiert. Das Entfernen sämtlicher Paraffinreste bedurfte des zweimaligen Waschens der Objektträger für 10min in Xylol. Zur Rehydrierung musste eine weitere Waschung mit einer absteigenden Ethanolreihe (100, 90, 70%) durchgeführt werden, gefolgt von der abschließenden Fixierung im Formalinbad für 15min. Der nächste Schritt umfasste die Behandlung des Gewebes für 15min in einem auf 98°C vorgeheizten sauren Citrat Puffer. Ziel dieses Vorgangs ist die Erhöhung der Permeabilität des Gewebes. Anschließend wurde der Objektträger sofort in

Aqua dest. gewaschen. Um die Verknüpfung der DNA mit Histonen zu lösen, wurde das Material auf den Objektträgern mit Pepsinlösung bedeckt und für 10 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Beendet wurde dieser Vorgang mit dem abschließenden Waschen in NaCl/NaCitrat- (SSC) Puffer und Aqua dest. (Kievits et al., 1990; Lang, 2006, pp. 302–303; Wilkinson, 1992).

### **Denaturierung und Hybridisierung:**

Ziel dieses Schritts ist die Ausbildung einer spezifischen Bindung zwischen Sonde und dem korrespondierenden DNA-Strang. Hierfür wurden in einem abgedunkelten Raum zunächst mit einer Pipette 7µl der ZytoLight SPEC FGFR1/CEN 8 Dual Color Sonde auf das vorbehandelte Gewebe gegeben; anschließend wurde das Gewebe mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum Klebstoff luftdicht verschlossen.

Der Denaturierungsvorgang bei 75°C (10min) sowie die anschließende Hybridisierung der DNA mit der Sonde bei 37°C erfolgte für 16h in einem Hybridisierautomat der Firma Dako (Kievits et al., 1990; Lang, 2006, p. 303; Wilkinson, 1992).

### **Stringentes Waschen:**

Unter Stringenz versteht man hier die Ionenbedingungen, die das Ausmaß der spezifischen Hybridisierung zweier komplementärer DNA-Einzelstränge bestimmen. Eine niedrige Stringenz - in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen - bedeutet eine erhöhte Anzahl von nicht spezifisch hybridisierten Doppelsträngen, d.h., dass auch nicht exakt komplementäre DNA-Einzelstränge Doppelstränge ausbilden. Ziel des stringenten Waschens ist die Reduzierung dieser nicht-spezifischen Hybridisierung, sodass auch die Hintergrundfärbung vermindert wird. Dieser Schritt umfasste nach der Entfernung der Deckgläser das Erhitzen der Objektträger auf 37°C in NaCl/NaCitrat Puffer niedriger Ionenstärke sowie die Waschung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70, 90 und 100%) (Kievits et al., 1990; Lang, 2006, p. 303; Wilkinson, 1992).

### **Detektion:**

Bevor eine Untersuchung der Schnitte möglich ist, bedarf es einer Anfärbung der Zellkerne. Dazu wurden die getrockneten Proben mit einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthaltenden Lösung eingedeckt und bei 4°C in lichtgeschützten Mappen gelagert. Als Ergebnis waren die Zellkerne blau angefärbt (Wilson et al. 1990). Die Schnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop DM 6000B (Leica, Wetzlar) untersucht.

### **Auswertung:**

Die FISH-Daten wurden nach den von Schildhaus et al. (2012) aufgestellten Auswertungsbedingungen und Auswertungskriterien ausgewertet:

1. Es wurden für jede Tumorprobe jeweils mindestens 20 Tumorzellen aus drei repräsentativen Tumorarealen auf dem gefärbten Schnitt untersucht.
2. Zur Auswertung kamen ausschließlich Zellkerne, die eindeutig von ihrer Umgebung abgrenzbar waren und spezifische Fluoreszenzmarkierungen aufwiesen.
3. Zur Auswertung kamen nur eindeutig voneinander zu trennende Signale; traten FGFR1 Signale als Duplett oder Triplet auf, so wurden sie als 1 Signal gewertet. Traten Signalcluster auf, so wurden sie je nach Ausprägung als 15, 20 oder 25 Signale gewertet, Mikrocluster entsprachen 5 FGFR1 Signalen.

Nach folgenden Kriterien wurde entschieden, dass es sich um eine Amplifikation oder keine Amplifikation des FGFR1-Gens handelte:

1. Das quantitative Verhältnis von FGFR1 zu CEN 8 Signalen beträgt  $\geq 2.0$ .
2. Die durchschnittliche Anzahl von FGFR1 Signalen pro Tumorzellkern beträgt  $\geq 6$ .
3. Der prozentuale Anteil der Tumorzellkerne mit entweder  $\geq 15$  FGFR1 Signalen oder großen Signalclustern beträgt  $\geq 10\%$ .
4. Der prozentuale Anteil der Tumorzellkerne mit  $\geq 5$  FGFR1 Signalen beträgt  $\geq 50\%$ .

Traf eines dieser vier Bewertungskriterien zu, so wurde die Probe hinsichtlich einer Amplifikation des Gens FGFR1 als positiv gewertet. Handelte es sich dabei um Kriterium 1, 2 oder 3, so lag eine „high-level“ Amplifikation vor; handelte es sich um Kriterium 4, so lag eine „low-level“ Amplifikation vor.

Gemäß dieser Richtlinien wurden bei jedem Schnitt jeweils 20 Zellkerne in drei verschiedenen lokalisierten Tumorarealen begutachtet und somit insgesamt für jede Probe mindestens 60 repräsentative Zellkerne bei einer 40- bis 100-fachen Originalvergrößerung untersucht. Die quantitative Ausprägung von Centromer und Genloci wurde in MS Excel dokumentiert. Mithilfe dieses Programmes wurden für jede Probe die durchschnittliche Kopienanzahl des FGFR1-Gens pro Tumorzellkern, der FGFR1/CEN8 Quotient sowie der prozentuale Anteil der Tumorzellen mit 5-15 bzw. mehr als 15 FGFR1 Genkopien errechnet. Eine Polyploidie des Tumorzellgenoms wurde aus dem quantitativen Verhältnis der FGFR1 und CEN8 Signale geschlossen und hinsichtlich einer FGFR1 Genamplifikation als negativ gewertet.

### **3.2.2.3 Immunhistochemie (IHC)**

#### **3.2.2.3.1 Grundlagen**

Die Grundlage der immunhistochemischen Färbung von Gewebe ist die spezifische Bindung von Antikörpern (Ak) an Antigene (Ag). Bei den Antigenen handelt es sich um Proteine, bei der hier durchgeführten IHC um das  $\Delta$ Np63 Protein. Zur Visualisierung der Ag-Ak-Bindung dient ein gekoppeltes Detektionssystem: Der Erstantikörper geht eine Bindung mit dem gesuchten Antigen ein. Anschließend wird der Zweitantikörper zugegeben. Er erkennt die konstante Region des Erstantikörpers und ist an ein Enzym, hier eine Phosphatase, konjugiert. Die Phosphatase wandelt ein zugegebenes Substrat in einen Farbstoff um. Dadurch wird das Antigen indirekt visualisiert. Durch Bindung von mehreren Zweitantikörpern an den Erstantikörper ist eine Signalverstärkung möglich (Lang, 2006, pp. 259–286).

#### **3.2.2.3.2 Antikörper**

Zur Verwendung kam ein Erstantikörper der Firma Calbiochem/Merck (Darmstadt), der gegen das menschliche Protein  $\Delta$ Np63 gerichtet ist und p40 genannt wird. Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper, der gegen ein Fragment des  $\Delta$ Np63 Proteins gerichtet ist, das die Aminosäurereste 5-17 umfasst. Das beste Färbungsergebnis wurde mit einer Verdünnung von 1:1000 der Ausgangslösung erreicht und diese Verdünnung deshalb als Standard etabliert. Der Nachweis des Erstantikörpers durch den Zweitantikörper sowie die IHC-Färbung erfolgte mithilfe des „ultraview Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit“ (Ventana, Catalog Number 760-501). Um eine für die Auswertung nötige Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurde die IHC-Färbung mit dem Färbeautomat BenchMark XT der Firma Ventana durchgeführt; das Färbeprotokoll ist als Anhang beigefügt.

#### **3.2.2.3.3 Durchführung**

Zunächst wurden 1,5 $\mu$ m dicke Schnitte auf vorgefertigte, beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 60°C im Wärmeschrank für 60min getrocknet. Daran anschließend folgten die Entparaffinisierung mit Xylol und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe.

Um kovalente Vernetzungsreaktionen des Formalins im Gewebe rückgängig zu machen und die Maskierung des gesuchten Antigens zu minimieren, wurden die Gewebeschnitte im sogenannten „Antigen-Retrieval“-Schritt mit einem schwach basischen TRIS Puffer, dem „Tris Buffer Cell Conditionar“, vorbehandelt und für 60min auf 100°C erhitzt. Anschließend erfolgte das Auftragen des Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:1000 manuell auf die Objektträger; inkubiert wurden die Gewebeschnitte dann für 44min bei 37°C. Der verwendete Zeitanantikörperenzymkomplex ist an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, welche das zugegebene Naphtol in Phosphat und Phenol hydrolysiert. Phenol seinerseits geht eine Reaktion mit Diazoniumsalz ein, dessen Produkt ein stabiler roter Azofarbstoff ist und die sichtbare Färbung des Gewebes bedingt. Die Hintergrundfärbung wurde mit Hämatoxylin und „Bluing Reagent“, gepuffertes Lithiumcarbonat zur Blaufärbung, durchgeführt; nach Abschluss der Färbung folgte die Eindeckung der Gewebeschnitte mit Deckgläsern.

#### 3.2.2.3.4 Auswertung

Das mit dieser Färbung nachgewiesene  $\Delta$ Np63/p40 Protein wird im Zellkern exprimiert, weshalb es sich bei der p40-IHC um eine nukleäre Färbung handelt. Die mikroskopische Auswertung der IHC-Färbung besteht in der semiquantitativen Bestimmung des Anteils der angefärbten Zellkerne bei einer 10- bis 20-fachen Originalvergrößerung.

Die diagnostische Beurteilung wurde wie folgt durchgeführt (Bishop et al. (2011)):

<i>Prozentualer Anteil immunpositiver Zellen</i>	<i>Reaktivitätsbeurteilung</i>	<i>Ergebnis der immunhistochemischen Färbung mit p40</i>
0%	keine Reaktivität	negativ
1-5%	minimale Reaktivität	positiv
6-20%	fokale Reaktivität	positiv
21-50%	fokale Reaktivität	positiv
> 50%	diffuse Reaktivität	positiv

**Tabelle 10: Auswertungskriterien der  $\Delta$ Np63 /p40-IHC**

*Einteilungsschema für die p40-IHC mit Bestimmung des prozentualen Anteils immunpositiver Zellen sowie die Beurteilung der Reaktivitätsverteilung (Bishop et al., 2011)*

### **3.2.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics Version 22 (IBM, Armonk (USA)) durchgeführt, die Bereitstellung und Anleitung des Programms sowie die Überprüfung der statistischen Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI) des UKS (Ansprechpartner: M. Sc. J. Schöpe).

Unterschiede zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen wurden für qualitative Merkmale mit dem Chi-Quadrat-Test bzw. dem exakten Test nach Fisher und für quantitative Merkmale mit dem Mann-Whitney U Test, Unterschiede im Rahmen der Kaplan-Meier Überlebensanalyse mit dem Log-Rank Test überprüft. Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde bei 5% ( $p < 0,05$ ) festgelegt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der klinisch-histopathologischen Standardparameter**

Als klinisch-histopathologische Standardparameter wurden das Geschlecht, die Tumorphistologie, das Tumorgrading, das TNM-Stadium, die Stadiengruppe, die Tumorlokalisation sowie der Überlebensstatus zum 01.01.2014 herangezogen. Im Rahmen der Auswertung der klinisch-histopathologischen Standardparameter wurde im ersten Schritt die Häufigkeit der einzelnen Ausprägungen dieser Standardparameter dokumentiert. Im Anschluss daran wurde die prognostische Bedeutung der einzelnen Parameter für die Gesamtüberlebenszeit bewertet.

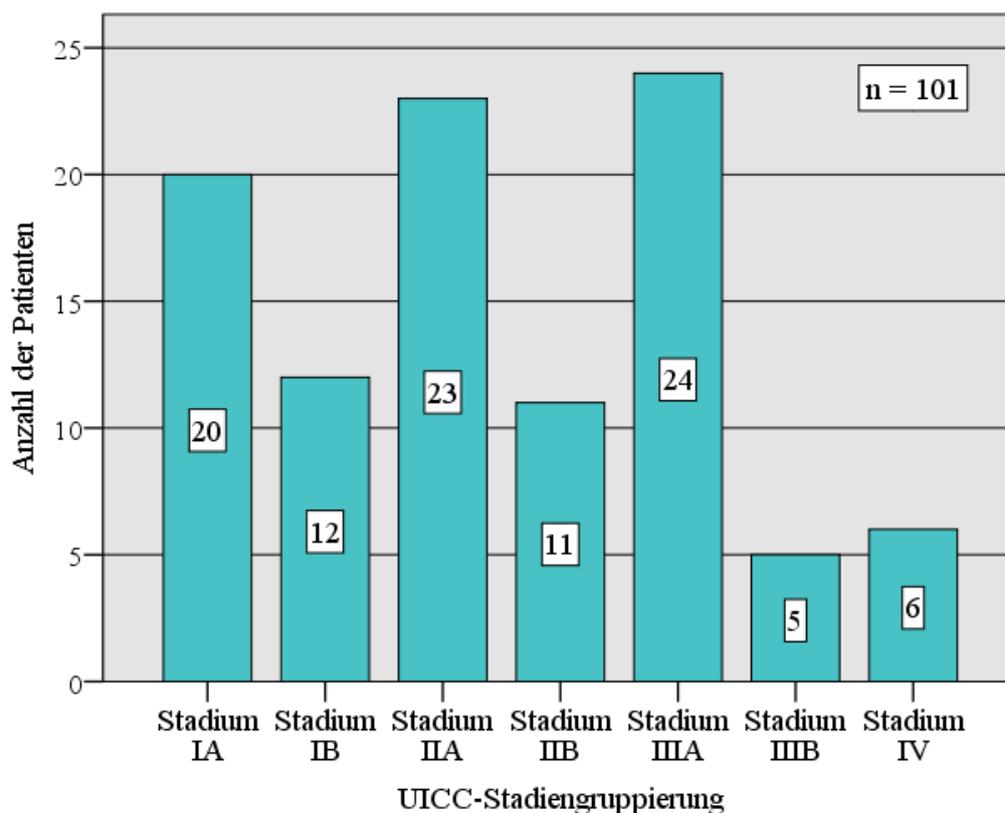
#### **4.1.1 Häufigkeitsverteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter**

In Tabelle 11 sind die Häufigkeiten der einzelnen klinischen Merkmale und histopathologischen Parameter im Hinblick auf das gesamte Patientenkollektiv wiedergegeben.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 22 Frauen und 79 Männern zusammen, deren klinisch-histopathologische Daten dokumentiert und gemäß der siebten TNM-Klassifikation aktualisiert wurden.

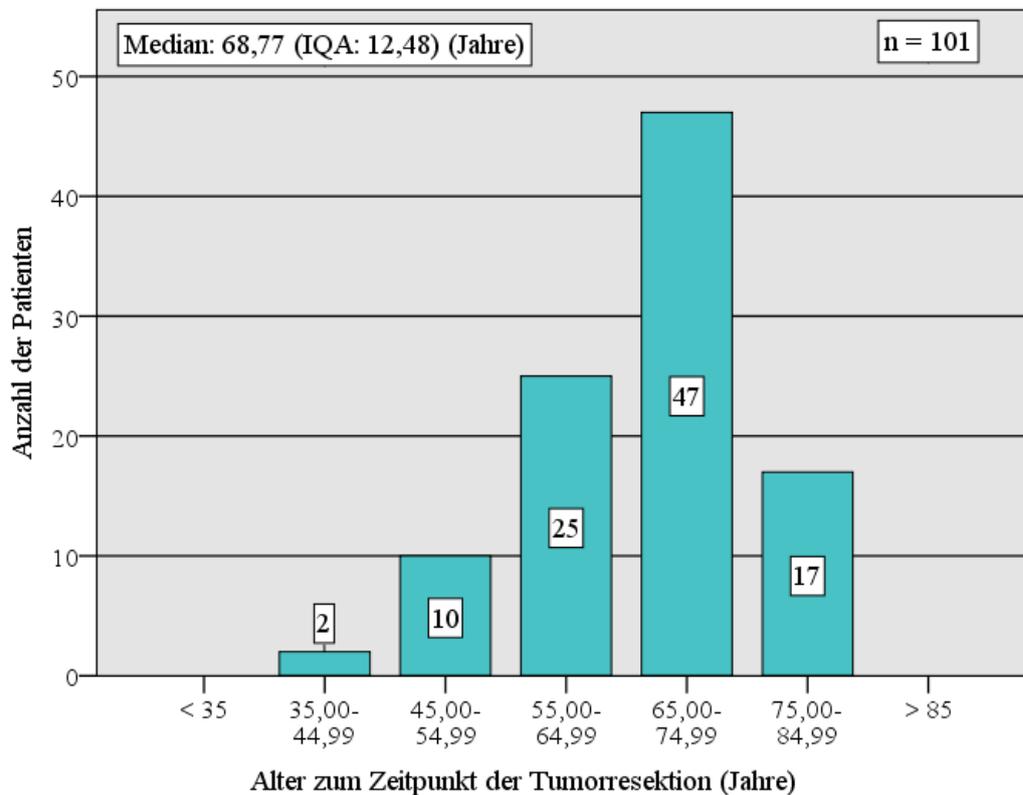
Bei den 101 Patienten wurden 28 verhornende und 73 nicht verhornende PEC der Lunge diagnostiziert. Diese Diagnose beruht auf histologischer Beurteilung von Gewebeproben der resezierten Tumore. Im Einzelnen wurden hierfür jeweils mindestens drei Gewebeschnitte jedes Tumors nach der histologischen WHO-Klassifikation 2015 beurteilt. Etwa die Hälfte der Tumore wurde jeweils der Gradinggruppe 2 (52) und 3 (49) zugeordnet. Bezüglich des pT-Stadiums waren alle Untergruppen pT1a-pT4 mit einer Häufigkeit von 11,9% bis 21,8% vertreten. Zum Operationszeitpunkt hatten 61 Patienten keinen Lymphknotenbefall und bei 93 Patienten wurden keine Fernmetastasen festgestellt. Mit 58,4% war die rechte Lunge etwas häufiger vom Tumorbefall betroffen als die linke Lunge.

Gemäß des jeweiligen TNM-Status, dessen Aufbau in Kapitel 2.1.3.3 erläutert wurde, erfolgte die Einteilung von 66 Patienten in die Stadiengruppen IA-IIB und von 35 Patienten in die Stadiengruppen IIIA-IV; die genaue Häufigkeitsverteilung ist in Abbildung 10 dargestellt: 20 Patienten konnten dem Stadium IA zugeordnet werden, jeweils knapp ein Viertel der Patienten wiesen ein Stadium IIA bzw. IIIA auf. 6 Patienten hatten bereits zum Zeitpunkt der Operation Fernmetastasen, sodass sie Stadium IV zugeteilt wurden. Für die nachfolgende Vergleichsanalyse wurden die einzelnen Stadiengruppen auf zwei große Gruppen aufgeteilt: Die erste Gruppe umfasste mit den Stadien IA-IIB 66 Patienten, die zweite Gruppe mit den Stadien IIIA-IV insgesamt 35 Patienten (Tab. 11). Auch die einzelnen Lymphknoten- und Tumorstadien wurden dichotom aufgeteilt: Die Stadien pN1 und pN2 wurden zusammengefasst und mit dem pN0-Stadium verglichen, die Stadien pT1a-pT2b bildeten eine Gruppe, die den zusammengefassten Stadien pT3 und pT4 gegenübergestellt wurde. Diese Aufteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter wurde neben der Vergleichsanalyse auch für die nachfolgende Überlebensanalyse beibehalten.



**Abbildung 10: UICC-Stadiengruppierung**

Der Median des Patientenalters bei Operation betrug 68,77 Jahre (Interquartilsabstand (IQR):12,48 Jahre). Wie in Abbildung 11 gezeigt, stammte fast die Hälfte der Patienten aus der Altersgruppe der 65- bis 75-Jährigen, ein Viertel der Patienten war bei der Operation zwischen 55 und 65 Jahre alt. Der jüngste Patient hatte ein Alter von 42,5 Jahren, der älteste Patient war 83 Jahre alt. 51 der eingeschlossenen Patienten lebten am Stichtag (01.01.2014), 50 Patienten waren zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben.



**Abbildung 11: Altersverteilung zum Zeitpunkt der Tumorresektion**

<b>Parameter:</b>	<b>n</b>		<b>%</b>		<b>Gesamt</b>
<b>Geschlecht:</b>	-		-		101
weiblich	22		21,8		-
männlich	79		78,2		-
<b>Histologie:</b>	-		-		101
PEC verhornend	28		27,7		-
PEC nicht verhornend	73		72,3		-
<b>Grading:</b>	-		-		101
G1	0		0		-
G2	52		51,5		-
G3	49		48,5		-
<b>pT-Stadium:</b>	-		-		101
pT1a	15	62	14,9	61,4	-
pT1b	12		11,9		-
pT2a	19		18,8		-
pT2b	16		15,8		-
pT3	22	39	21,8	38,6	-
pT4	17		16,8		-
<b>pN-Stadium:</b>	-		-		101
pN0	61		60,4		-
pN1	29	40	28,7	39,6	-
pN2	11		10,9		-
<b>cM-Stadium:</b>					101
cM0	95		94,1		-
cM1	6		5,9		-
<b>Stadiengruppierung:</b>					101
IA	20	66	19,8	65,3	-
IB	12		11,9		-
IIA	23		22,8		-
IIB	11		10,9		-
IIIA	24	35	23,8	34,7	-
IIIB	5		5,0		-
IV	6		5,9		-
<b>Tumorlokalisation:</b>	-		-		101
rechte Lunge	59		58,4		
linke Lunge	42		41,6		
<b>Überlebensstatus 01.01.2014:</b>	-		-		101
lebt	51		50,5		-
verstorben	50		49,5		-

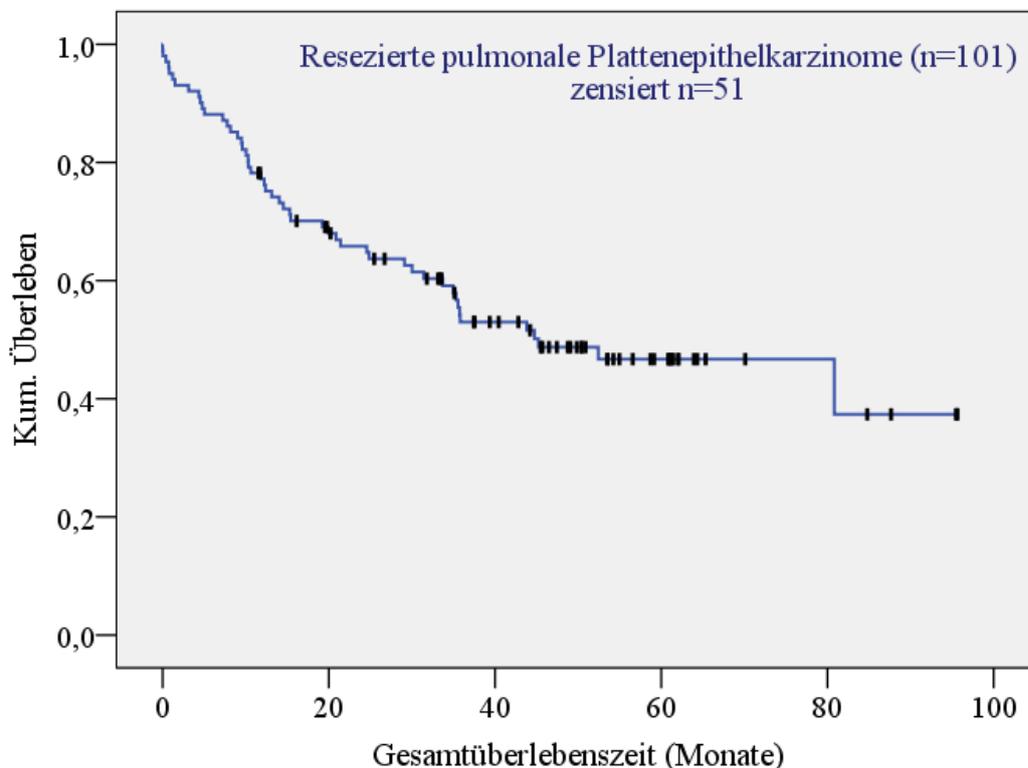
**Tabelle 11: Klinisch-histopathologische Parameter gesamtes Patientenkollektiv**

Häufigkeitsverteilung der Standardparameter bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv (n=101)

## 4.1.2 Überlebenszeitanalyse nach klinisch-histopathologischen Standardparametern

### 4.1.2.1 Gesamtüberlebenszeit

Insgesamt wurden die retrospektiv erhobenen Überlebensdaten von allen 101 Patienten zur Analyse hinzugezogen. Es wurde zur Überlebensanalyse ausschließlich das so genannte „overall survival“ betrachtet, d. h. die Zeit von Tumorresektion bis zum Tod der Patienten oder bis Ende der Nachbeobachtungszeit, wobei sowohl mögliche aufgetretene Rezidive als auch die genaue Todesursache bei Versterben vor dem Stichtag nicht erfasst wurden. In der vorliegenden Arbeit werden die Begriffe „overall survival“ und Gesamtüberlebenszeit synonym verwendet. Falls der Tod während der Nachbeobachtungszeit und damit vor dem 01.01.2014 eintrat, wurde die Gesamtüberlebenszeit definiert als Zeitraum vom Operationsdatum bis zum Sterbedatum. Bei Überleben des Stichtages umfasste die Überlebenszeit den Zeitraum von Operation bis zum Stichtag, die Überlebensdaten gingen in diesen Fällen als zensierte Überlebensdaten in die Kaplan-Meier Kurven ein. 50 Patienten verstarben vor dem 01.01.2014, 51 Patienten waren am Stichtag am Leben.



**Abbildung 12: Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberlebenszeit Patientenkollektiv**

*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberlebenszeit von n=101 Patienten, bei Überleben des Stichtages gehen die Überlebenszeiten als zensierte Daten in die Überlebensanalyse ein.*

Im Durchschnitt wurden die Patienten 33,85 Monate nachbeobachtet, die längste Nachbeobachtungszeit war 8 Jahre, die kürzeste 2 Monate. Die durchschnittliche Überlebenszeit der verstorbenen Patienten mit PEC der Lunge betrug 12,75 Monate, die 5-Jahres-Überlebensrate des gesamten Patientenkollektivs 46,7%.

In Abbildung 12 ist die Gesamtüberlebenszeit aller betrachteten Patienten in Form einer Kaplan-Meier Kurve wiedergegeben.

#### **4.1.2.2 Prognostische Bedeutung der klinisch-histopathologischen Parameter für das gesamte Patientenkollektiv**

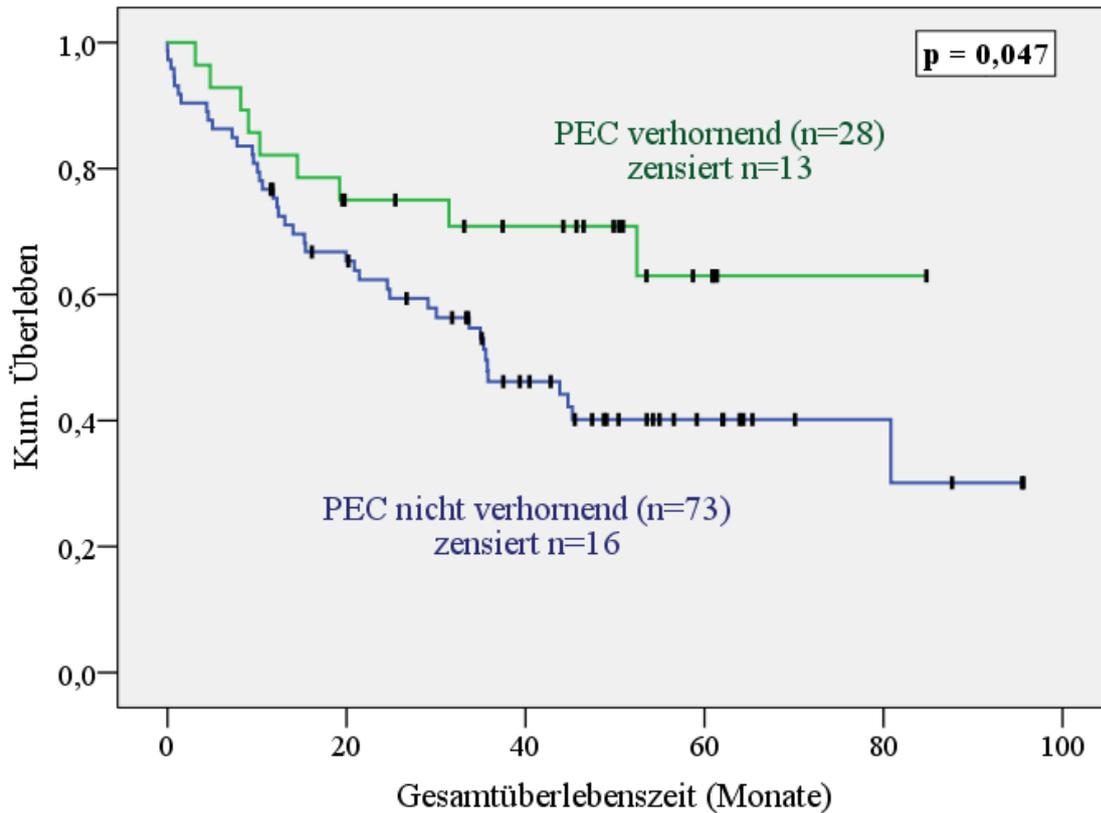
Um im Rahmen der Überlebenszeitanalyse valide Ergebnisse mit ausreichender Fallzahl zu erhalten, wurden die klinisch-histopathologischen Standard-Parameter, wie bereits in Kapitel 4.1.1 angesprochen, dichotom aufgeteilt.

In Form von Kaplan-Meier Kurven wurden die beiden durch die dichotome Aufteilung gebildeten Patientengruppen des jeweiligen klinisch-histopathologischen Parameters hinsichtlich ihrer Gesamtüberlebenszeit graphisch dargestellt und mithilfe des Log-Rank Tests auf einen signifikanten Unterschied bezüglich der Überlebenszeit untersucht. Das Ergebnis des Log-Rank Tests, die Gruppengröße  $n$  und die Zahl der eingetretenen Todesfälle sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs gab es keinen signifikanten Prognoseunterschied hinsichtlich des Geschlechts. Sowohl bei den Männern als auch den Frauen war vor Erreichen des Stichtages etwa die Hälfte der Patienten verstorben, die 5-Jahres-Überlebensrate war bei den Frauen mit 50,2% etwas höher als bei den Männern (45,8%).

Bei Betrachtung der Histologie zeigte sich, dass mit 9 Patienten nur 32% aller Patienten mit einem verhornenden PEC verstorben waren. Im Vergleich dazu war in der Gruppe der nichtverhornenden PEC mehr als die Hälfte der Patienten zum Stichtag bereits verstorben. Auf einem Signifikanzniveau von  $p=0,047$  war dieser Unterschied signifikant und zeigt, dass verhornende PEC im Vergleich zu nicht verhornenden PEC der Lunge mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit verknüpft sind (Abb. 13).

Der Differenzierungsgrad (G2/G3) des Tumors, das Lymphknoten- (pN0/pN1-2) sowie das Metastasenstadium (cM0/cM1) hatten bei dem untersuchten Patientenkollektiv keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit der Patienten.



**Abbildung 13: Kaplan-Meier Kurve: Histologie**

*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit verhornendem und nicht verhornendem PEC der Lunge.*

In der Gruppe der fortgeschrittenen T-Stadien pT3-T4 waren zum Stichtag mit 25 Patienten bereits 64% verstorben, wohingegen bei den frühen Tumorstadien pT1a-2b zum Stichtag mit 40% deutlich weniger als die Hälfte verstorben waren. Bei Betrachtung der Stadiengruppen zeigte sich, dass in der Gruppe IA-IIB 27 von 66 Patienten und damit knapp 41% gestorben waren, während in der Stadiengruppe III-IV 66% der Patienten vor dem Stichtag verstorben waren.

Sowohl bei dem Vergleich der dichotom aufgeteilten T-Stadien als auch bei den Stadiengruppen war der beschriebene Unterschied signifikant. Somit wiesen die T-Stadien 1-2 sowie die Stadiengruppen IA-IIB gegenüber den T-Stadien pT3-T4 bzw. den Stadiengruppen IIIA-IV eine prognostisch günstigere Gesamtüberlebenszeit für die Patienten auf.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Überlebensdaten, dass die Patienten unseres Kollektivs eine 5-Jahres-Überlebensrate von 46,7% aufweisen, Frauen eine um etwa 4% höhere 5-Jahres-Überlebensrate als Männer haben und das fortgeschrittene Stadium IIIA-IV sich prognostisch ungünstig auf die Gesamtüberlebenszeit auswirkt.

Parameter (dichotome Aufspaltung)	n	verstorben <sup>°</sup>	Gesamtüberleben p-Wert (Log-Rank Test)
<b><i>Geschlecht:</i></b>	-	-	0,637
weiblich	22	10	
männlich	79	40	
<b><i>Histologie:</i></b>	-	-	<b>0,047*</b>
verhornendes PEC	28	9	
nicht verhornendes PEC	73	41	
<b><i>Differenzierungsgrad:</i></b>	-	-	0,842
G2	52	27	
G3	49	23	
<b><i>pT-Stadium:</i></b>	-	-	<b>0,016*</b>
pT1-2	62	25	
pT3-4	39	25	
<b><i>pN-Stadium:</i></b>	-	-	0,214
pN0	61	27	
pN1-2	40	23	
<b><i>cM-Stadium:</i></b>	-	-	0,155
cM0	95	46	
cM1	6	4	
<b><i>Stadiengruppen:</i></b>	-	-	<b>0,016*</b>
IA-IIB	66	27	
IIIA-IV	35	23	
<b><i>Tumorlokalisation:</i></b>	-	-	0,095
rechte Lunge	59	26	
linke Lunge	42	24	

**Tabelle 12: Überlebensanalyse nach Standardparametern, gesamtes Patientenkollektiv**

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Log-Rank Tests der Kaplan-Meier-Analysen für die Gesamtüberlebenszeit nach den klinisch-histopathologischen Standardparametern; gesamtes Patientenkollektiv n=101; \*Unterschied bzgl. des Gesamtüberlebens signifikant; ° Stichtag: 01.01.2014

#### 4.1.2.3 Bedeutung der klinisch-histopathologischen Parameter hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit getrennt nach Geschlecht

Im Folgenden wurde die prognostische Bedeutung der dichotom aufgeteilten klinisch-histopathologischen Standardparameter für Männer und Frauen getrennt voneinander untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei den im Kollektiv eingeschlossenen Frauen die Ausprägung keiner Subgruppe der jeweiligen Parameter eine für das Gesamtüberleben der Frauen prognostisch signifikante Bedeutung mit sich brachte.

In der Gruppe der männlichen Patienten hingegen ergab sich wie auch im gesamten Patientenkollektiv für das pT-Stadium (pT1-2/pT3-4) und die Stadiengruppierung (IA-IIB/IIIA-IV) eine signifikant bessere Überlebensprognose für die frühen Tumorstadien pT1-2 und Stadiengruppen IA-IIB. Zusätzlich zeigte sich, dass der Tumorbefall der rechten Lunge im Vergleich zur linken Lunge bei Männern auf einem Signifikanzniveau von  $p=0,044$  für das Gesamtüberleben prognostisch günstiger war.

Parameter	Frauen (p-Wert, Log-Rank)	Männer (p-Wert, Log-Rank)
<b>Histologie:</b> (verhornendes / nicht verhornendes PEC)	0,335	0,081
<b>Differenzierungsgrad:</b> (G2 / G3)	0,794	0,865
<b>pT-Stadium:</b> (pT1-2 / pT3-4)	0,712	<b>0,013*</b>
<b>pN- Stadium:</b> (pN0 / pN1-2)	0,881	0,210
<b>cM- Stadium:</b> (cM0 / cM1)	0,420	0,092
<b>Stadiengruppierung:</b> (IA-IIB / IIIA-IV)	0,132	<b>0,050*</b>
<b>Tumorlokalisation:</b> (rechte / linke Lunge)	0,888	<b>0,044*</b>

**Tabelle 13: Überlebensanalyse nach Standardparametern, Trennung nach Geschlecht**

*Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Log-Rank Tests der Kaplan-Meier-Analysen für die Gesamtüberlebenszeit für die klinisch-histopathologischen Standardparameter; geschlechtergetrennt: Frauen n=22, Männer n=79 ;\*Unterschied signifikant*

## 4.2 Ergebnisse der Immunhistochemie zum Nachweis von $\Delta$ Np63

Die  $\Delta$ Np63 Isoform des Proteins p63 lässt sich mit dem Antikörper p40 immunhistochemisch nachweisen. Dieses Protein befindet sich hauptsächlich im Zellkern, weshalb der Antikörper p40 nur zu einer nukleären Färbung führen sollte.

Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von  $\Delta$ Np63 umfasste zunächst die Bestimmung des Ausmaßes, mit dem Tumorzellkerne mit dem Antikörper p40 angefärbt wurden. Anschließend wurden die Tumore nach dem Ausmaß der Anfärbbarkeit der Gewebeschnitte eingeteilt. Die mittels dieser Immunreaktivität eingeteilten Proben wurden dann dazu verwendet, einen möglichen prognostischen Zusammenhang zwischen Immunreaktivität der Tumorzellen und Gesamtüberlebenszeit zu untersuchen.

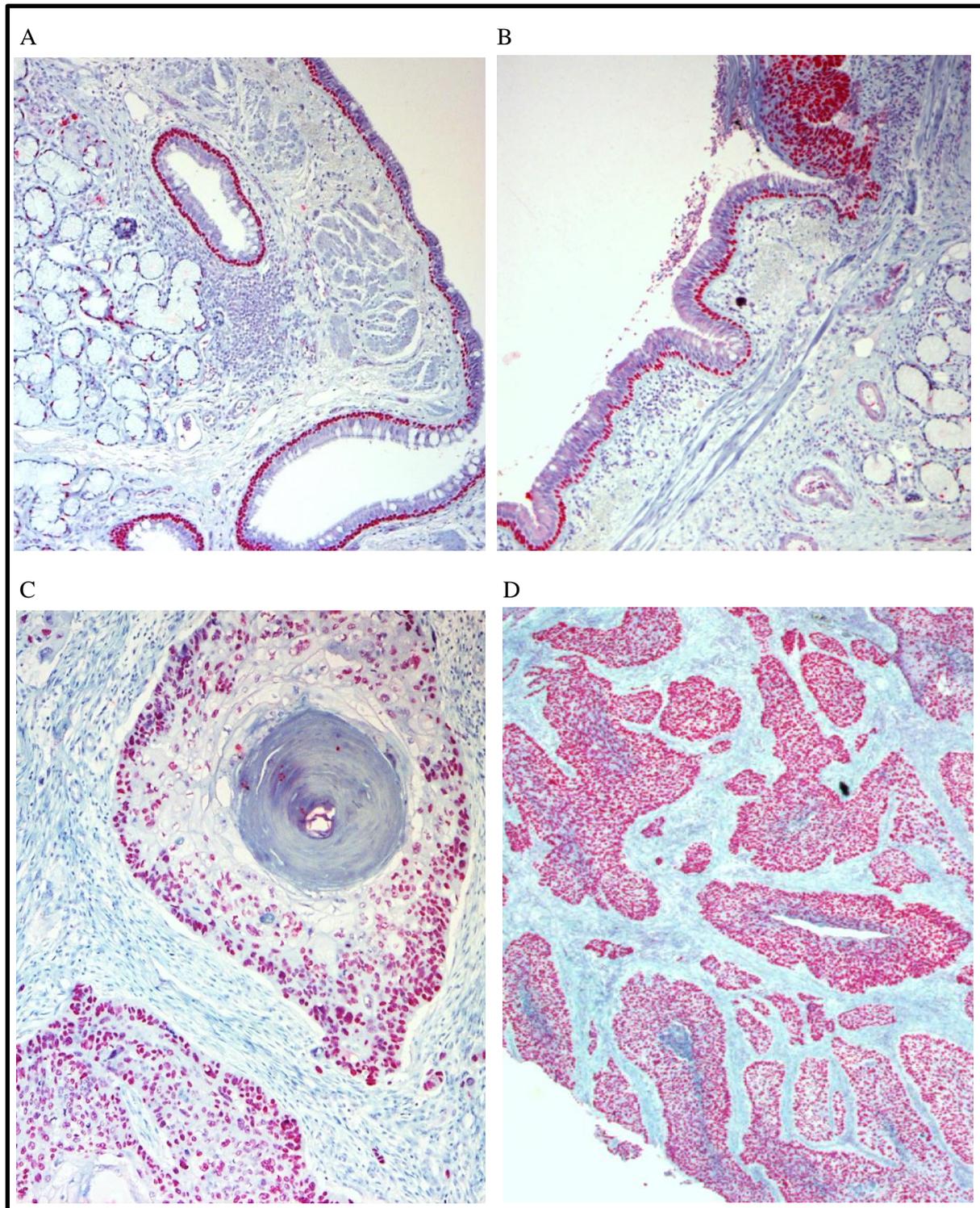
### 4.2.1 Auswertung der Immunhistochemie von $\Delta$ Np63

Im gesunden, d.h. nicht pathologisch veränderten respiratorischen Epithel färben sich ausschließlich Kerne der Basalzellen an (Abb. 14A), während beim Plattenepithelkarzinom der Lunge die Kerne der Tumorzellen unabhängig von deren Lokalisation positiv sind (Abb. 14B-D). Als Positivkontrolle der Färbung fungierten bei den Tumorproben mit geringer Immunreaktivität die einschichtigen Basalzellen der Bronchien (Abb. 14A).

Bei dem untersuchten Kollektiv waren alle entsprechend der Vorgaben von Bishop et al. (2011) und Ao et al. (2014) durchgeführten und ausgewerteten p40 Färbungen der PEC-Gewebeproben positiv für p40, Gewebeschnitte eines Adenokarzinoms waren negativ (Abb. 15D).

Es wurden pro Gewebeschnitt mindestens 500 Tumorzellen ausgezählt, wobei der Anteil der immunpositiven Tumorzellen als Immunreaktivität festgehalten wurde. Gemäß der Immunreaktivität wurden die Schnitte danach wie in Abbildung 15 gezeigt in 4 Untergruppen unterteilt (0%, 1-20%, 21-50%, 51-100%).

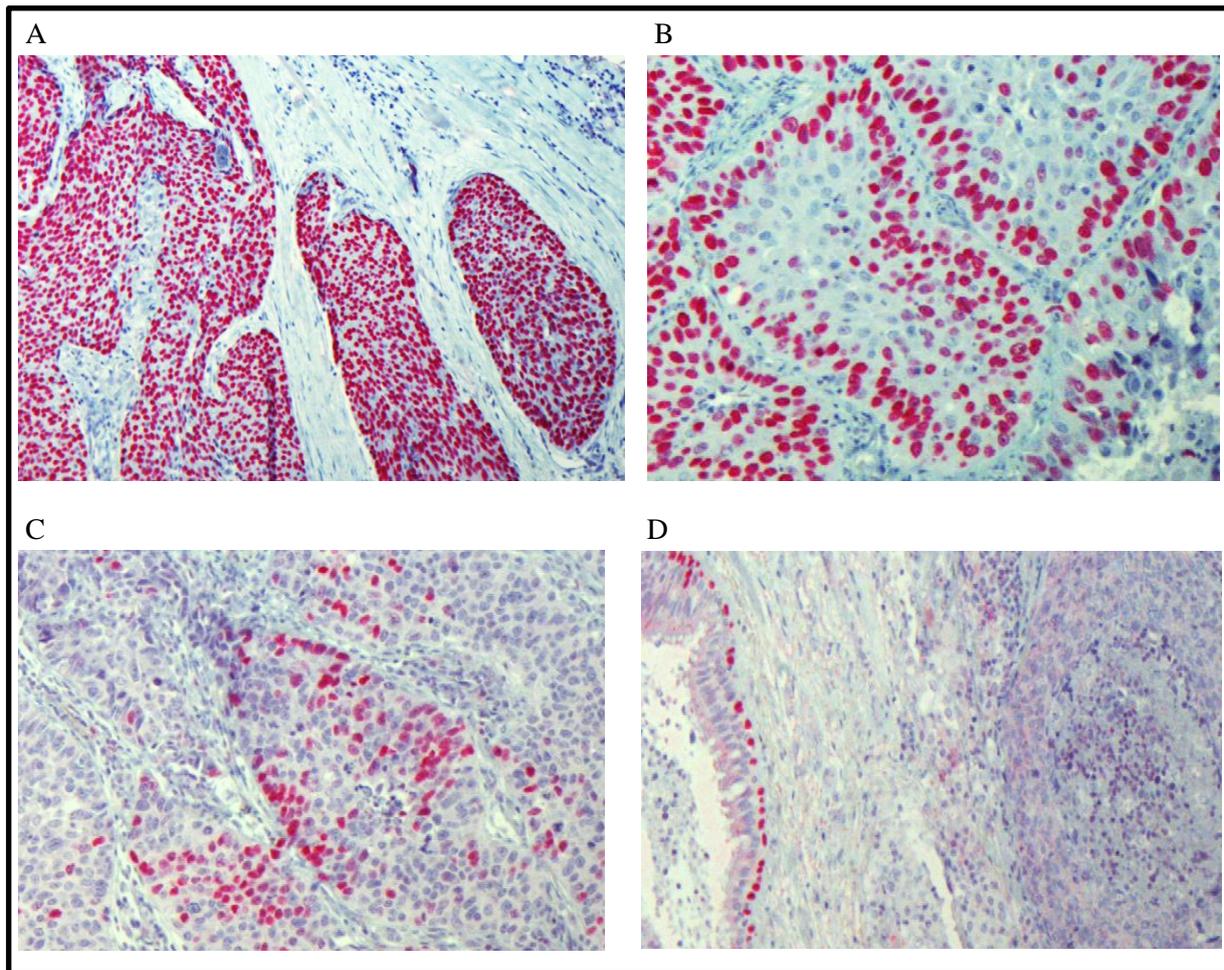
Entsprechend der in Abbildung 16 gezeigten Auswertung der Immunreaktivität waren die Gewebeschnitte von 6 der 101 Tumore  $\leq 50\%$  positiv und 95 Tumore  $> 50\%$  positiv.



**Abbildung 14: Nachweis von  $\Delta$ Np63 in verschiedenen Stadien der Karzinogenese**

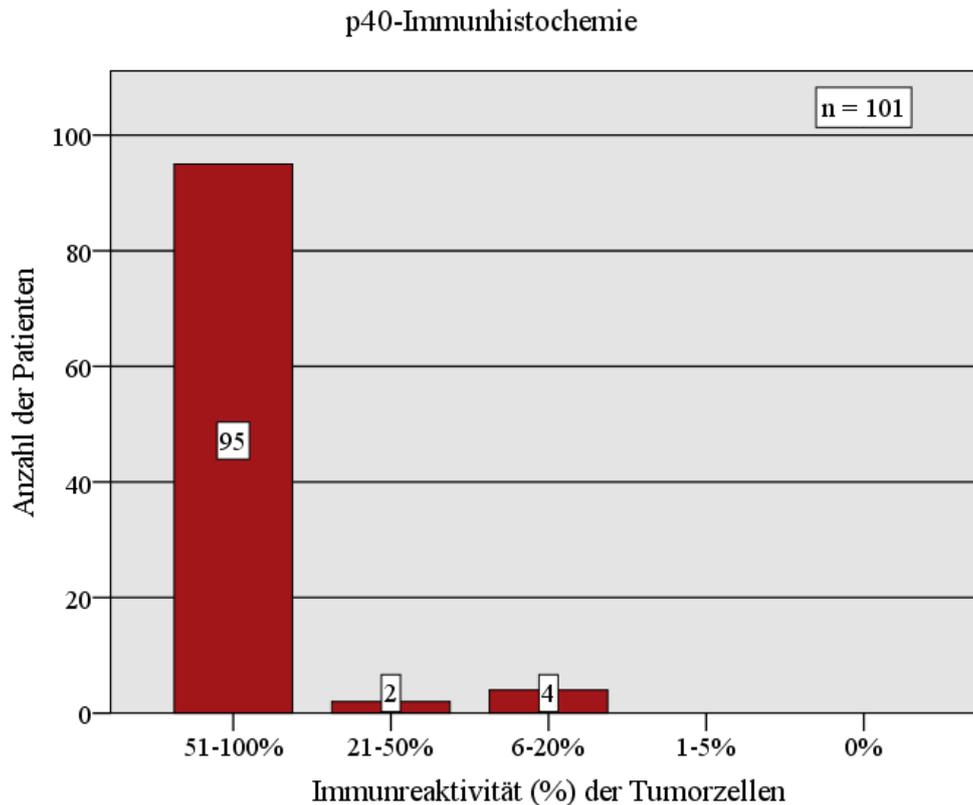
*A: Nicht-neoplastisches Lungengewebe: Nur die Kerne der Basalzellen werden mit dem p40 Antikörper angefärbt, B: Übergang von nicht pathologisch verändertem Lungengewebe mit Anfärbung der Basalzellen (links) in ein Carcinoma in situ (rechts oben), C, D: Verhornendes (C) und nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom (D), jeweils positiv für p40.*

*A-D: 10- bzw. 20-fache Originalvergrößerung, Färbung: Immunhistochemischer Nachweis von  $\Delta$ Np63 mit dem Antikörper p40*



**Abbildung 15: p40 Immunreaktivität**

*p40 Immunreaktivität in Gewebeproben von PEC (A-C) und eines Adenokarzinoms (D).  
 A: p40 Immunreaktivität 98% (PEC); B: p40 Immunreaktivität 50% (PEC); C: p40  
 Immunreaktivität 20% (PEC); D: p40 Immunreaktivität 0% (Adenokarzinom)  
 A: 10-fache Originalvergrößerung, B-D: 20-fache Originalvergrößerung, Färbung:  
 Immunhistochemischer Nachweis von  $\Delta$ Np63 mit dem Antikörper p40*



**Abbildung 16: p40-IHC: Häufigkeitsverteilung der Immunreaktivität der Tumorzellen**

#### 4.2.2 Zusammenhang zwischen p40-IHC und klinisch-histopathologischen Parametern

Die Ausprägung der immunhistologischen Färbung von p40 wurde auf einen möglichen Zusammenhang mit den klinisch-histologischen Standardparametern hin untersucht und ist in Tabelle 14 gezeigt. Zusätzlich ist dort die quantitative Ausprägung der einzelnen Parameter abhängig von der p40 Immunreaktivität dargestellt.

Bei Betrachtung der einzelnen Untergruppen der p40 Immunreaktivität zeigte sich, dass alle 28 verhornende PEC eine Immunreaktivität größer 50% aufwiesen, eine Immunreaktivität bis zu 50% hatte ausschließlich ein kleiner Anteil der nicht verhornenden PEC (n=6). Hinsichtlich des Gradings konnte eine ähnliche Konstellation beobachtet werden: Nur in einer von 52 G2-Tumorproben waren weniger als 50% der Tumorzellen positiv, während 5 G3-Tumore eine Immunreaktivität <50% aufwiesen.

Insgesamt waren alle Gewebeproben der 101 PEC positiv für die Färbung mit dem Antikörper p40. In der Vergleichsanalyse ergab sich für keine der Immunreaktivitätsgruppen der Tumorzellen ein signifikanter Zusammenhang mit den klinisch-histopathologischen Parametern (Tab. 14).

Parameter	p40 Immunreaktivität (absolute Anzahl)			p-Wert (Fisher-Test)
	6-20%	21-50%	51-100%	
<b>Histologie:</b>	-	-	-	0,294
verhornend	0	0	28	
nicht verhornend	4	2	67	
<b>Grading:</b>	-	-	-	0,109
G2	0	1	51	
G3	4	1	44	
<b>T-Stadium:</b>	-	-	-	0,291
T1-2	1	1	60	
T3-4	3	1	35	
<b>N-Stadium:</b>	-	-	-	0,866
N0	2	1	58	
N1-2	2	1	37	
<b>M-Stadium:</b>	-	-	-	0,358
M0	3	2	89	
M1	1	0	6	
<b>Stadiengruppen:</b>	-	-	-	0,655
IA-IIB	2	1	63	
IIIA-IV	2	1	32	
<b>Lokalisation:</b>	-	-	-	0,911
rechte Lunge	2	1	56	
linke Lunge	2	1	39	

**Tabelle 14: Vergleichsanalyse p40 Immunreaktivität / klinisch-histologische Parameter**

Tabellarische Zusammenfassung der mithilfe des exakten Tests nach Fisher ermittelten p-Werte der Vergleichsanalyse zwischen p40 Immunreaktivität und den einzelnen Standardparametern.

### 4.2.3 Bedeutung der p40 Immunreaktivität für das Gesamtüberleben

Zunächst wurden die nach der Immunreaktivität gemäß Bishop et al. (2011) eingeteilten Patientengruppen hinsichtlich ihrer Gesamtüberlebenszeit miteinander verglichen. Hierbei konnte für keine der drei Immunreaktivitätsgruppen eine prognostische Bedeutung festgestellt werden. Allerdings waren die Fallzahlen mit  $n=4$  und  $n=2$  für die Immunreaktivität 6-20% bzw. die Immunreaktivität 21-50% sehr gering.

Auch als die beiden oben genannten Subgruppen mit niedriger Immunreaktivität zu einer Gruppe zusammengefasst und der restlichen Gruppe mit Immunreaktivität  $>50\%$  gegenübergestellt wurden, konnte für keine der beiden Gruppen ein signifikanter Überlebensvorteil festgestellt werden ( $p=0,703$ ).

Bei einer an der Fallzahl orientierten Aufteilung der Patienten gemäß der Immunreaktivität ergab sich folgende Gruppierung: 43 Patienten wurden der Gruppe Immunreaktivität  $>95\%$  zugeteilt, die anderen 58 Patienten wurden in der Gruppe mit Immunreaktivität 0-95% zusammengefasst.

Beim Vergleich dieser beiden Gruppen hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigte sich, dass bei einem Tumor mit mehr als 95% p40 positiven Tumorzellen das 5-Jahres-Überleben mit knapp 60% um 20% höher war als in der Patientengruppe, bei der nur 0-95% der Tumorzellen für p40 positiv waren. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Insgesamt waren alle 101 PEC der Lunge positiv für den immunhistochemischen Nachweis von  $\Delta Np63$ , womit in unserem Kollektiv Plattenepithelkarzinome der Lunge mithilfe des p40-Antikörpers mit einer Sensitivität von 100% nachgewiesen werden konnten.

Kein nachweisbarer Zusammenhang bestand zwischen den klinisch-histopathologischen Parametern und der Immunreaktivität der Tumorzellen. Die Immunreaktivität der Tumorzellen hatte in unserem Kollektiv nach der Einteilung von Bishop et al. (2011) keine prognostische Bedeutung, allerdings scheint bei einer Immunreaktivität der Tumorzellen von 95-100% ein Überlebensvorteil zu bestehen.

In den folgenden Schritten wurden die Tumorproben zunächst auf Punktmutationen in den Genen von FGFR2 und FGFR3 hin untersucht und daran anschließend der FGFR1 Genamplifikationsstatus bestimmt.

### 4.3 Ergebnisse der FGFR2 / FGFR3 Mutationsanalyse

Im ersten Schritt wurden die Gene des FGFR2 und FGFR3 auf beschriebene Punktmutationen hin untersucht, um die Mutationsfrequenz am vorliegenden Patientenkollektiv zu erheben. Der zweite Schritt umfasste die Analyse der prognostischen Bedeutung der gefundenen Mutationen.

#### 4.3.1 Auswertung der Mutationsanalyse

Mithilfe der von Sanger beschriebenen Methode (3.2.2.1.4) wurde die DNA von 101 Tumorproben sequenziert und auf bestimmte Punktmutationen in den Genen der FGFR2 und FGFR3 hin untersucht.

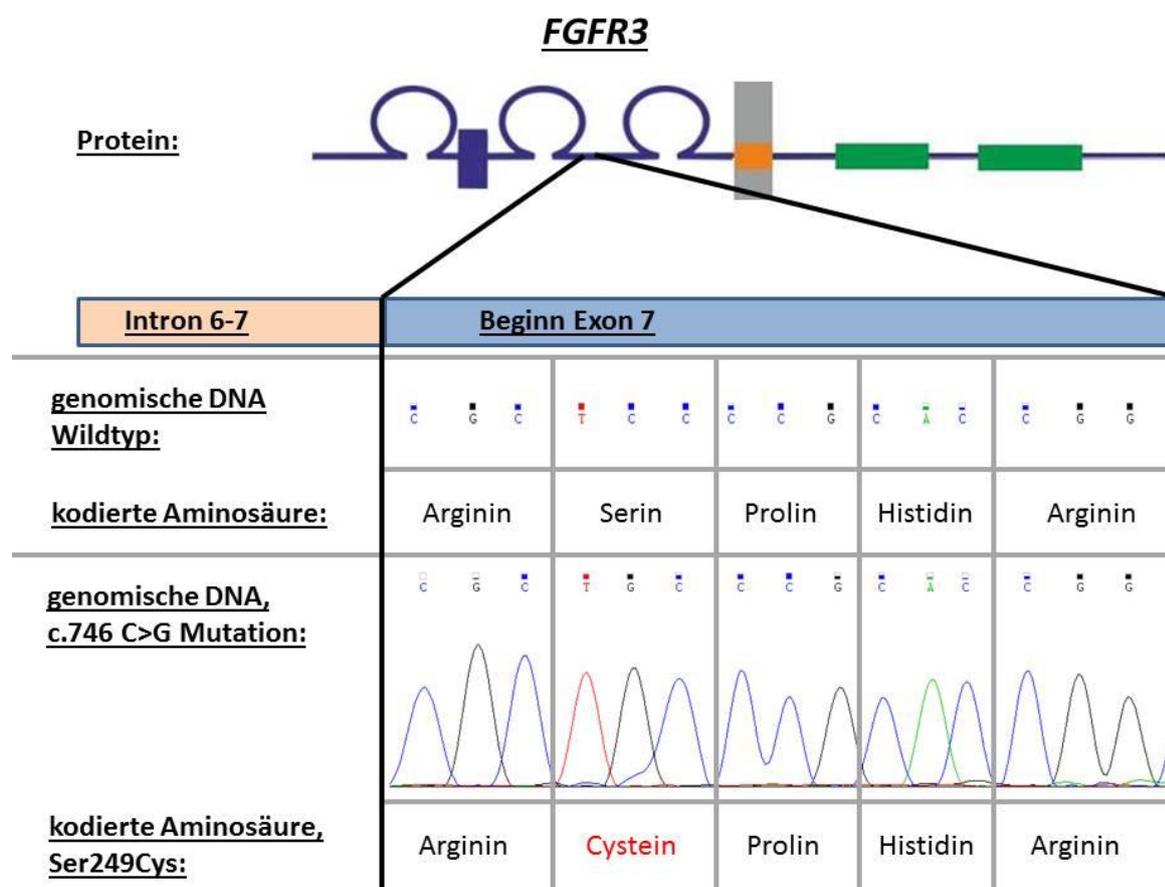
Zunächst wurde jeweils eine PCR für die einzelnen Mutationen etabliert. Im Anschluss wurde die DNA von jeweils 25 Tumorproben im Hinblick auf die Mutationen W290C in Exon 7, E471Q in Exon 10 und G584W in Exon 13 des FGFR2 sowie auf die Mutationen S435C in Exon 10 sowie K717M in Exon 15 des FGFR3 sequenziert. Insbesondere die Mutationen K660N und K660E in Exon 14 des FGFR2 sowie die benachbarten Mutationen R248C und S249C in Exon 7 des FGFR3 gelten als „Driver“-Mutationen des PEC und damit als wichtige Alterationen; es wurden deshalb alle 101 Tumorproben auf diese vier Mutationen hin untersucht.

Insgesamt wurden zur Etablierung der jeweiligen PCRs und Bestimmung der Mutationshäufigkeit etwa 400 Exonabschnitte aus den Gewebeproben der 101 Patienten beidsträngig sequenziert.

Wie in Tabelle 16 dargestellt, konnte durch die Sequenzierung der oben genannten Exone eine Mutation in Exon 7 des FGFR3 gefunden werden. Bei dieser Mutation handelt es sich um den Austausch eines Cytosins durch ein Guanin (c.746 C>G) an zweiter Stelle des Codons 249 des FGFR3-Gens. Das Ergebnis der Sequenzierung der Tumorprobe mit S249C bzw. c.746 C>G Mutation ist in Abbildung 17 dargestellt und zeigt im zweiten Codon die Basenfolge TGC, der Wildtyp lautet TCC. Da es infolge dieser Veränderung der Primärstruktur zu einem Austausch eines Serinrestes durch einen Cysteinrest und damit zu einer veränderten Proteinsequenz kommt, könnte ein FGFR3 mit veränderten Eigenschaften bzw. anderer Funktion resultieren.

In Abbildung 17 ist schematisch die Lokalisation des Bereiches in der Tertiärstruktur gezeigt, für den Exon 7 des FGFR3 codiert. Es handelt sich dabei um einen Anteil des Abschnitts zwischen den beiden Immunglobulin-ähnlichen Schleifen II und III im extrazellulären Anteil des Rezeptors.

Als Kontrolle wurde DNA von nicht-neoplastischem Lungengewebe desselben Patienten untersucht. Hier konnte diese Mutation nicht nachgewiesen werden, weshalb es sich bei der Mutation dieser Tumorprobe um eine Tumorzellen-spezifische Mutation handelt.



**Abbildung 17: Mutation S249C (Basenmutation c.746 C>G) im 7.Exon des FGFR3-Gens**

*Tertiärstruktur des FGFR3 Proteins mit Lokalisation des Proteinbereichs, der von Exon 7 kodiert wird, sowie der kodierenden DNA-Abschnitte von Exon 7. Gezeigt sind die Wildtypsequenz und die davon kodierten Aminosäurereste sowie die mutierten Sequenzen (einschließlich dem Sequenzierungsprofil).*

Die Tumorprobe stammt von einer zum Operationszeitpunkt 64 Jahre alten Frau, die ein verhornendes G2-PEC der Lunge des rechten Oberlappens hatte. Bei der Patientin waren weder Lymphknoten noch andere Fernmetastasen festgestellt worden. Die Nachbeobachtungszeit seit der Resektion des Tumors betrug 44 Monate, zum 01.01.2014 lebte die Patientin. Eine weitere Punktmutation oder eine FGFR1-Genamplifikation wurde bei ihr nicht gefunden, die Immunreaktivität der Tumorzellen im Rahmen der p40 IHC betrug 85%. Alle bekannten Parameter sind zusammenfassend in Tabelle 15 aufgeführt:

<b><i>Standard-Parameter:</i></b>	
Geschlecht:	weiblich
Histologie:	verhornendes PEC
Differenzierungsgrad:	G2
pT-Stadium	pT2a
pN-Stadium	pN0
cM-Stadium	cM0
Stadiengruppierung	IB
Lokalisation des Tumors	rechter Oberlappen
<b><i>Immunhistochemie:</i></b>	
p40 Immunreaktivität	85 %
<b><i>molekulare Parameter:</i></b>	
FGFR1 Amplifikationsstatus	keine Amplifikation
<b><i>Überlebensanalyse:</i></b>	
Alter bei Diagnosezeitpunkt	64 Jahre
Status 01.01.2014	lebt
bisheriges Follow-up	44 Monate

**Tabelle 15: Klinisch-histopathologische Merkmale Tumorprobe Nr. 50**

Die Mutationsfrequenzen am untersuchten Kollektiv sind in Tabelle 16 aufgeführt und betragen für diese Punktmutation 1%, für alle weiteren untersuchten Mutationen 0%:

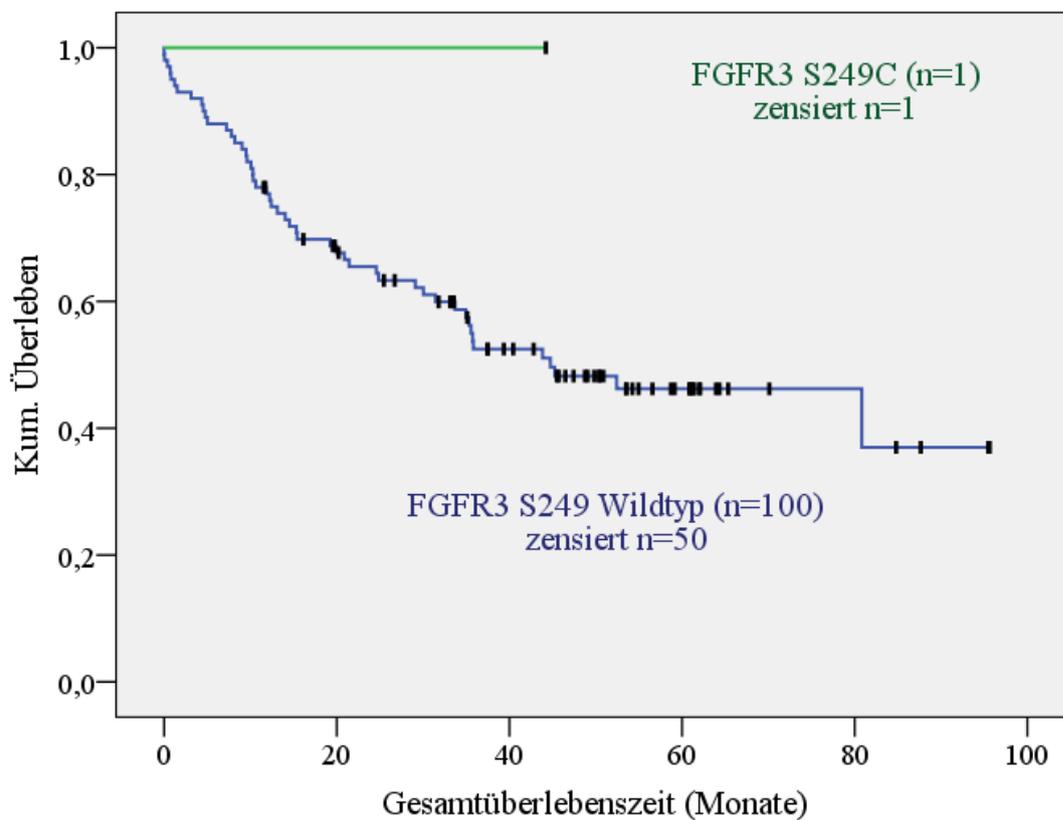
<b>Mutationsstelle:</b>	<b>Wildtyp</b> (absolute Anzahl)	<b>Mutation</b> (absolute Anzahl)	<b>Mutationsfrequenz</b>
<b><i>FGFR2:</i></b>	-	-	-
Exon 7 (W290C)	25	0	0 %
Exon 10 (E471Q)	25	0	0 %
Exon 13 (G584W)	25	0	0 %
Exon 14 (K660E/N)	101	0	0 %
<b><i>FGFR3:</i></b>	-	-	-
Exon 7 (R248C)	101	0	0 %
Exon 7 (S249C)	101	1	1 %
Exon 10 (S435C)	25	0	0 %
Exon 15 (K717M)	25	0	0 %

**Tabelle 16: Ergebnisse der Mutationsanalyse FGFR2 und FGFR3**

*Anzahl der Sequenzierungen der angegebenen Exonabschnitte des FGFR2 und des FGFR3 aus Gewebeschnitten der PEC-Proben der 101 Patienten mit Wildtyp-DNA (Wildtyp) sowie Angabe der gefundenen Mutationen (Mutation) mit errechneter Mutationsfrequenz.*

#### **4.3.2 Prognostische Bedeutung der Punktmutation S249C für das Gesamtüberleben**

Im Rahmen der Überlebensanalyse wurde die Patientin mit der in den Tumorzellen nachgewiesenen Mutation S249C den anderen Patienten mit Wildtyp-DNA gegenübergestellt. Die Überlebensdaten der Patientin mit S249C wurden nach 44 Monaten zensiert, da sie am Stichtag lebte (Abb. 18). Nach 44 Monaten war in der Gruppe der Patienten mit Wildtyp-DNA bereits die Hälfte der Patienten verstorben. Dies zeigt, dass die als „Driver“-Mutation des PEC angesehene Mutation S249C bei der von uns auf die Gesamtüberlebenszeit hin untersuchten Patienten keinen prognostisch ungünstigen Einfluss hatte.



**Abbildung 18: Kaplan-Meier Kurve: FGFR3 S249C**

*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberleben für Patienten mit WT-DNA und S249C Mutation*

Im folgenden Schritt wurde zunächst der FGFR1-Genamplifikationsstatus der 101 Tumorproben bestimmt und auf mögliche Zusammenhänge zwischen einer FGFR1-Genamplifikation und klinisch-histopathologischen Parametern bzw. der Gesamtüberlebenszeit untersucht.

## **4.4 Ergebnisse der FGFR1-Genamplifikationsanalyse**

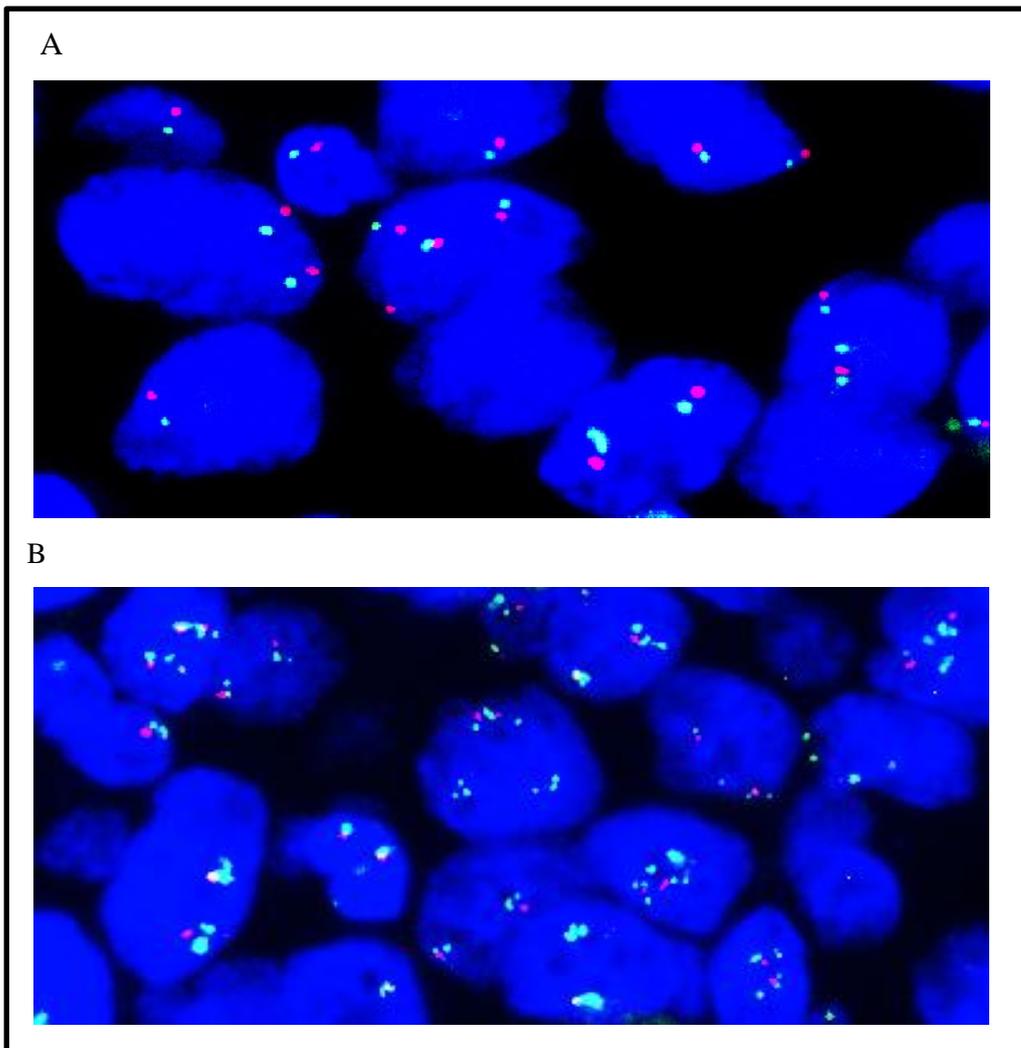
### **4.4.1 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Das FGFR1-Gen ist auf Chromosom 8 lokalisiert, die Amplifikation dieses Gens ist unter den Lungenkarzinomen als Charakteristikum von PEC der Lunge beschrieben.

Mithilfe der FISH Untersuchung (Methode 3.2.2.2) wurde der Amplifikationsstatus des FGFR1-Gens an den Tumorproben der 101 Patienten untersucht. Bei allen Proben war die Färbung erfolgreich und eine für die Auswertung ausreichende Zahl von Tumorzellen erfasst. Gemäß den Auswertungs- und Bewertungsvorgaben von Schildhaus et al. (2012) wurden jeweils mindestens 20 Tumorzellen aus drei Lokalisationen eines Gewebeschnittes ausgezählt.

Waren in einem Zellkern die rote Fluoreszenz nach Anfärben des Centromers sowie die grüne Fluoreszenz zur Visualisierung des FGFR1-Gens je zweimal vorhanden, so lag keine FGFR1-Genamplifikation vor (Abb. 19A).

Waren in einem Zellkern das Fluoreszenzsignal des Centromers zweimal, das Fluoreszenzsignal für das FGFR1-Gen aber mehr als zweimal vorhanden, so handelte es sich um einen Hinweis auf eine FGFR1-Genamplifikation, insbesondere, wenn diese Veränderung in mehreren Zellkernen auftrat (Abb. 19B).



**Abbildung 19: Amplifikation des FGFR1-Gens**

*A: FGFR1-Genamplifikation negativ, B: FGFR1-Genamplifikation positiv*

*Rote Fluoreszenzsignale markieren das Centromer des Chromosoms 8, grüne Fluoreszenzsignale visualisieren das FGFR1-Gen; bei einem Verhältnis von FGFR1-Signalen zu Centromer 8 Signalen  $<2$  liegt keine Amplifikation des FGFR1-Gens vor; beträgt das Verhältnis  $>2$ , so liegt eine FGFR1-Genamplifikation vor.*

*63-fache Originalvergrößerung, Färbung: FISH FGFR1/CEN8 Dual Color*

Zur systematischen Untersuchung der Tumorzellen wurden die Vorgehensweise und das Bewertungsschema von Schildhaus et al. (2012) angewandt. In Abbildung 20 sind beispielhaft die verschiedenen beobachteten Muster aufgeführt:

Abbildung 20A zeigt eine Zelle mit zweifacher Kopienanzahl jeweils für das FGFR1-Gen und das Centromer. Es handelt sich um den diploiden Wildtyp.

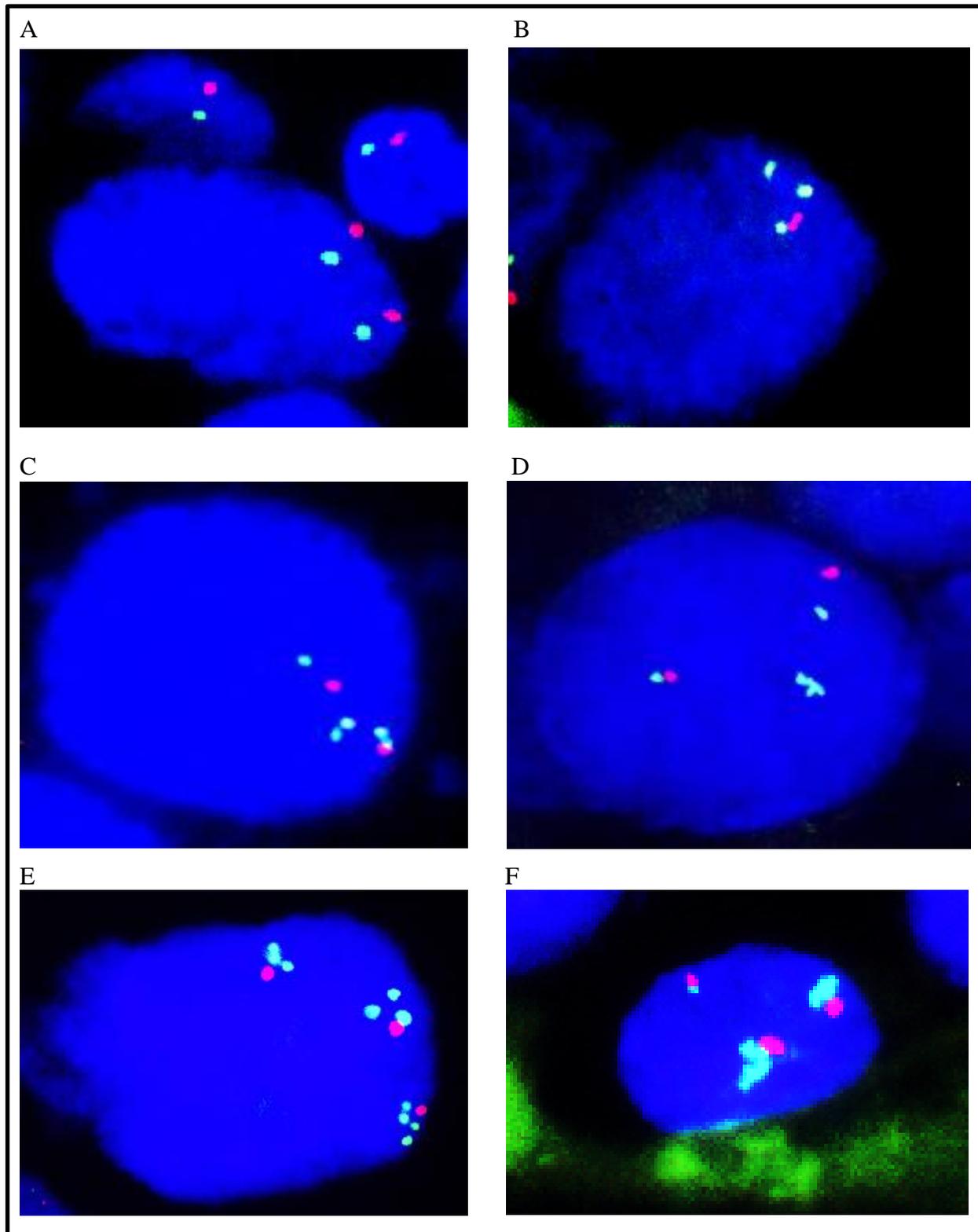
Wurden mehr FGFR1 Signale als Centromersignale in einer Zelle sichtbar, so mussten in allen 60 Zellen durchschnittlich mindestens doppelt so viele FGFR1 Signale wie Centromer Signale vorliegen, um die Diagnose einer FGFR1-Genamplifikation erheben zu können (Abb. 20C-F).

Waren dagegen zwar mehr FGFR1 Signale als Centromer Signale vorhanden, jedoch in einem FGFR1/CEN8 Verhältnis von kleiner 2, so lag keine Amplifikation vor (Abb. 20B).

Bei Ausbildung von FGFR1-Cluster Signalen (Abb. 20F) wurde jeder Cluster mit 5 FGFR1 Signalen bewertet.

Die systematische Durchsicht der mithilfe der FISH angefärbten 101 Gewebeschnitte zeigte, dass es Fälle gab, bei denen die FGFR1 Signale im Umfeld des Centromers auftauchten und es sich bei dem amplifizierten Genmaterial demnach um „homogenous staining regions“ (HSR) handeln könnte (Abb. 20C/E). Als HSR werden Abschnitte des Chromosoms beschrieben, die aus amplifiziertem Genmaterial bestehen (siehe Einleitung 2.3.1.1.1).

Daneben waren FGFR1 Signale bei Amplifikation auch im Zellkern entfernt vom Centromersignal zu finden (Abb. 20D); hierbei könnte das amplifizierte Genmaterial in Form von „double minutes“ (DM) vorliegen. Bei „double minutes“ handelt es sich um amplifiziertes Genmaterial, das sich wie Chromosomen im Zellkern befindet, jedoch strukturell von diesen getrennt ist und autonom repliziert wird (siehe Einleitung 2.3.1.1.1). Bei Genamplifikationen im Rahmen von Tumorerkrankungen können beide beschriebenen Varianten auftreten.



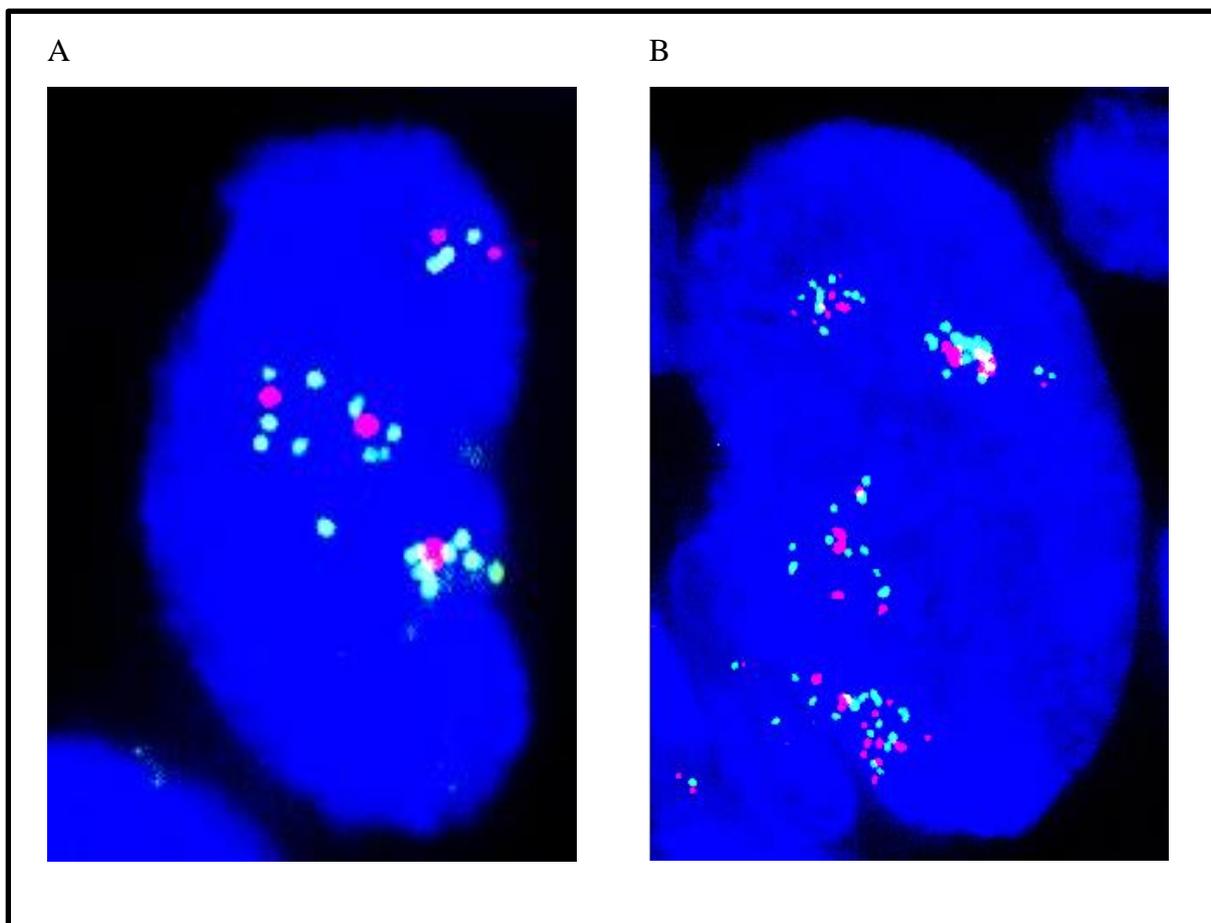
**Abbildung 20: FGFR1 FISH: Beispielsbefunde**

*Typische Befunde, die mit FISH bezüglich des FGFR1-Gens in Gewebeproben von PEC erhoben werden können (FGFR1-Gen: grün, Centromer des Chromosoms 8: rot):*

*A: FGFR1-Genamplifikation negativ, B: FGFR1-Genamplifikation negativ, C: FGFR1 Genamplifikation positiv: HSR („homogenous staining region“), D: FGFR1-Genamplifikation positiv: DM („double minute“), E: Amplifikation bei Polyploidie, F: Amplifikation mit Clusterbildung. 100-fache Originalvergrößerung, Färbung: FISH FGFR1/CEN8 Dual Color*

Im Rahmen von Tumorerkrankungen wie dem PEC der Lunge können Genommutationen auftreten, so auch eine Polyploidie. Hierbei ist der Chromosomensatz in einer Zelle vervielfacht, wodurch es zu einer Amplifikation sämtlicher Gene kommt.

Mithilfe des für die FISH angewendeten Auswertungsschemas lassen sich jedoch Polyploidie mit gleichzeitiger FGFR1-Genamplifikation von Polyploidien ohne Amplifikation unterscheiden. Beide Polyploidievarianten sind in Abbildung 21 dargestellt: A zeigt eine Zelle mit Polyploidie bei gleichzeitiger FGFR1-Genamplifikation, B zeigt eine Zelle mit Polyploidie ohne FGFR1-Genamplifikation.

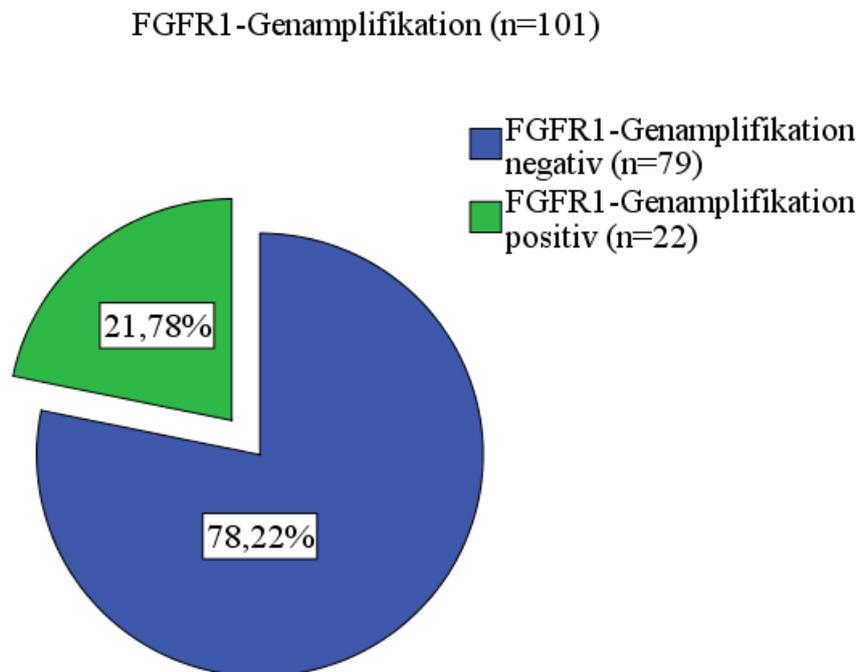


**Abbildung 21: FGFR1 FISH: Amplifikationsstatus bei Polyploidie**

*A: Polyploidie und Amplifikation von FGFR1: innerhalb eines Zellkernes (blau) sind 5 rote Centromersignale vorhanden, das Fluoreszenzsignalverhältnis von FGFR1/CEN8 ist jedoch größer 2; B: Polyploidie ohne Vorliegen einer Amplifikation von FGFR1: das Fluoreszenzsignalverhältnis von FGFR1/CEN8 ist kleiner 2. FGFR1-Gen: grün, Centromer des Chromosoms 8: rot, 100-fache Originalvergrößerung, Färbung: FISH FGFR1/CEN8 Dual Color*

#### 4.4.2 Frequenz der diagnostizierten FGFR1-Genamplifikation

Insgesamt wiesen 22 Schnitte von Gewebeprobe von 101 Tumoren eine Amplifikation des FGFR1-Gens auf. Dies entspricht einer Amplifikationsfrequenz von 21,8%:



**Abbildung 22: FGFR1-Genamplifikationsfrequenz**

Bei Unterteilung der 22 Tumore mit Amplifikation ergab sich nach dem von Schildhaus et al. (2012) definierten Amplifikationsgrad (siehe Methode 3.2.2.2) in „niedrige“ und „hohe“ Amplifikation folgende Aufteilung:

	n	%
<b>FGFR1-Genamplifikation gesamt:</b>	<b>22</b>	<b>21,8%</b>
<b>niedrig</b>	<b>8</b>	<b>7,9%</b>
<b>hoch</b>	<b>14</b>	<b>13,9%</b>

**Tabelle 17: FGFR1-Genamplifikationsgrad**

Für die weitere Auswertung wurde zwischen „Amplifikation des FGFR1-Gens“ und „keine Amplifikation“ unterschieden.

#### **4.4.3 Zusammenhang zwischen FGFR1-Genamplifikationsstatus und klinisch-histopathologischen Standardparametern**

Beim Vergleich der einzelnen klinisch-histopathologischen Parameter mit dem FGFR1-Amplifikationsstatus ergab sich, dass etwa 22% der Patientinnen und Patienten eine FGFR1-Genamplifikation aufwiesen, d.h. dass es in dieser Hinsicht keinen geschlechtsspezifischen Unterschied gab: Bei 5 Frauen (von insgesamt 22 Patientinnen) und 17 Männern (von insgesamt 79 Patienten) wurde die FGFR1 Genamplifikation nachgewiesen.

Auch hinsichtlich der Pathohistologie zeigte sich eine ähnliche Verteilung. So wurde eine FGFR1-Genamplifikation bei 6 von insgesamt 28 Patienten mit verhornendem PEC und bei 16 von insgesamt 73 der Patienten mit nicht verhornendem PEC diagnostiziert (21,4% bzw. 21,9%). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der pathohistologischen Ausprägung bzw. dem Geschlecht und der FGFR1-Genamplifikation gefunden werden. Erwartungsgemäß zeigte sich in der Vergleichsanalyse keine Signifikanz.

Mit einem Anteil von 26,5% trat die FGFR1-Genamplifikation in Gewebeproben von G3 Tumoren, verglichen mit G2 Tumoren, prozentual etwa 10% häufiger auf; dieser Zusammenhang war jedoch nicht signifikant.

Die Aufteilung nach Amplifikationsstatus des FGFR1-Gens der einzelnen klinisch diagnostizierten Untergruppen, die Tumor-, Lymphknoten- und Metastasenstadium berücksichtigen, war bis auf eine Ausnahme relativ ausgeglichen: In den T-Stadien pT1a-T3 traten FGFR1-Genamplifikationen mit einer Häufigkeit von 12,5-26,3% auf, ein signifikanter Zusammenhang zwischen Genamplifikationsstatus und diesen T-Stadien war nicht gegeben. Allerdings wiesen 7 von 10 Tumorproben der Patienten mit PEC im pT4-Stadium eine FGFR1-Genamplifikation auf. Wenn auch mit  $p=0,051$  gerade nicht signifikant, könnte dieser Befund darauf hinweisen, dass eine FGFR1-Genamplifikation gehäuft bei fortgeschrittenem Tumor auftritt.

In den Stadien IA bis IV ist der Anteil der Fälle mit FGFR1-Genamplifikation mit 33,3% am höchsten in der Stadiengruppe IV, allerdings handelt es sich dabei nur um 2 von 4 Tumoren, ein signifikanter Zusammenhang besteht nicht.

Vergleicht man die Ergebnisse der p40 Färbung der Tumorproben mit den FGFR1-Genamplifikationsdaten, ergibt sich, dass Genamplifikationen bei Tumorzellen mit geringer, mittlerer und hoher p40 Immunreaktivität auftreten; die Fallzahl erlaubt keine Aussage hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs.

Der Anteil der Patienten mit FGFR1-Genamplifikation ist mit knapp 30% in der Gruppe der Patienten, die zum Stichtag am Leben waren, doppelt so hoch wie in der Gruppe der Patienten, die vor dem Stichtag verstorben waren. Mit einem p-Wert von 0,061 wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten und der FGFR1-Genamplifikation nur tendenziell erreicht, sodass möglicherweise die FGFR1-Genamplifikation mit einem günstigeren Gesamtüberleben verknüpft ist.

Parameter	FGFR1-Gen, nicht amplifiziert		FGFR1-Gen, amplifiziert		p-Wert
	n	%	n	%	
Patientenkollektiv:	79	78,2	22	21,8	-
<b>Geschlecht:</b>	-	-	-	-	1,000 <sup>1</sup>
weiblich	17	77,3	5	22,7	
männlich	62	78,5	17	21,5	
<b>Histologie:</b>	-	-	-	-	1,000 <sup>2</sup>
PEC verhornend	22	78,6	6	21,4	
PEC nicht verhornend	57	78,1	16	21,9	
<b>Differenzierungsgrad:</b>	-	-	-	-	0,262 <sup>2</sup>
Grading 1	0	0	0	0	
Grading 2	43	82,7	9	17,3	
Grading 3	36	73,5	13	26,5	
<b>T-Stadium:</b>	-	-	-	-	0,218 <sup>1</sup>
T1a	12	80,0	3	20,0	
T1b	10	83,3	2	16,7	
T2a	14	73,7	5	26,3	
T2b	14	87,5	2	12,5	
T3	19	86,4	3	13,6	
T4	10	58,8	7	41,2	

Fortsetzung folgende Seite

Parameter	FGFR1-Gen, nicht amplifiziert		FGFR1-Gen, amplifiziert		p-Wert
	n	%	n	%	
<b><i>N-Stadium:</i></b>	-	-	-	-	0,346 <sup>1</sup>
N0	50	82,0	11	18,0	
N1	20	69,0	9	31,0	
N2	9	81,8	2	18,2	
<b><i>M-Stadium:</i></b>	-	-	-	-	0,644 <sup>1</sup>
M0	74	78,7	20	21,3	
M1	5	71,4	2	28,6	
<b><i>Stadiengruppierung:</i></b>	-	-	-	-	0,809 <sup>1</sup>
IA	18	90,0	2	10,0	
IB	9	75,0	3	25,0	
IIA	18	78,3	5	21,7	
IIB	8	72,7	3	27,3	
IIIA	18	75,0	6	25,0	
IIIB	4	80,0	1	20,0	
IV	4	66,7	2	33,3	
<b><i>Tumorlokalisation:</i></b>	-	-	-	-	0,340 <sup>1</sup>
OL r	26	74,3	9	25,7	
ML r	0	0	0	0	
UL re	21	87,5	4	12,5	
OL li	19	76,0	6	24,0	
UL li	13	81,3	3	18,7	
<b><i>p40 Immunreaktivität:</i></b>	-	-	-	-	0,520 <sup>1</sup>
0-6%	0	0	0	0	
6-20%	3	75,0	1	25,0	
20-50%	1	50,0	1	50,0	
51-100%	75	78,9	20	21,1	
<b><i>Überlebensstatus 01.01.2014:</i></b>	-	-	-	-	0,061 <sup>2</sup>
verstorben	43	86,0	7	14,0	
überlebt	36	70,6	15	29,4	

**Tabelle 18: Vergleichsanalyse FGFR1-Gen nicht amplifiziert / FGFR1-Gen amplifiziert**

Tabellarische Zusammenfassung der p-Werte der Vergleichsanalyse zwischen dem FGFR1-Genamplifikationsstatus und den einzelnen Standardparametern sowie der p40 Immunreaktivität. <sup>1)</sup>exakter Test nach Fisher; <sup>2)</sup> Chi Quadrat Test

Ein weiterer Parameter, der zum Vergleich herangezogen werden kann, ist das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Tumorresektion sowie die Überlebenszeit derjenigen Patienten, die vor dem Stichtag verstorben sind.

Zum Zeitpunkt der Operation waren die Patienten, bei denen keine FGFR1-Genamplifikation in der Gewebeprobe identifiziert wurde, im Median 69,42 Jahre alt. Patienten mit einer FGFR1-Genamplifikation waren hingegen mit 65,21 Jahren im Median 4,2 Jahre jünger; dieser Altersunterschied war signifikant ( $p=0,046$ , Tab. 20). Dagegen war in der Gruppe der vor dem Stichtag verstorbenen Patienten mit oder ohne FGFR1-Genamplifikation kein signifikanter Altersunterschied: Unabhängig vom Amplifikationsstatus hatten die verstorbenen Patienten ein Alter zwischen 71,06 und 72,56 Jahren. Mit knapp 20 Monaten hatten jedoch die Verstorbenen, bei denen eine FGFR1-Genamplifikation nachgewiesen wurde, ein im Median um etwa 8 Monate längeres Gesamtüberleben als Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation. Diese Differenz hinsichtlich der Dauer des Überlebens der verstorbenen Patienten war nicht signifikant.

#### **4.4.4 Bedeutung der FGFR1-Genamplifikation für das Gesamtüberleben**

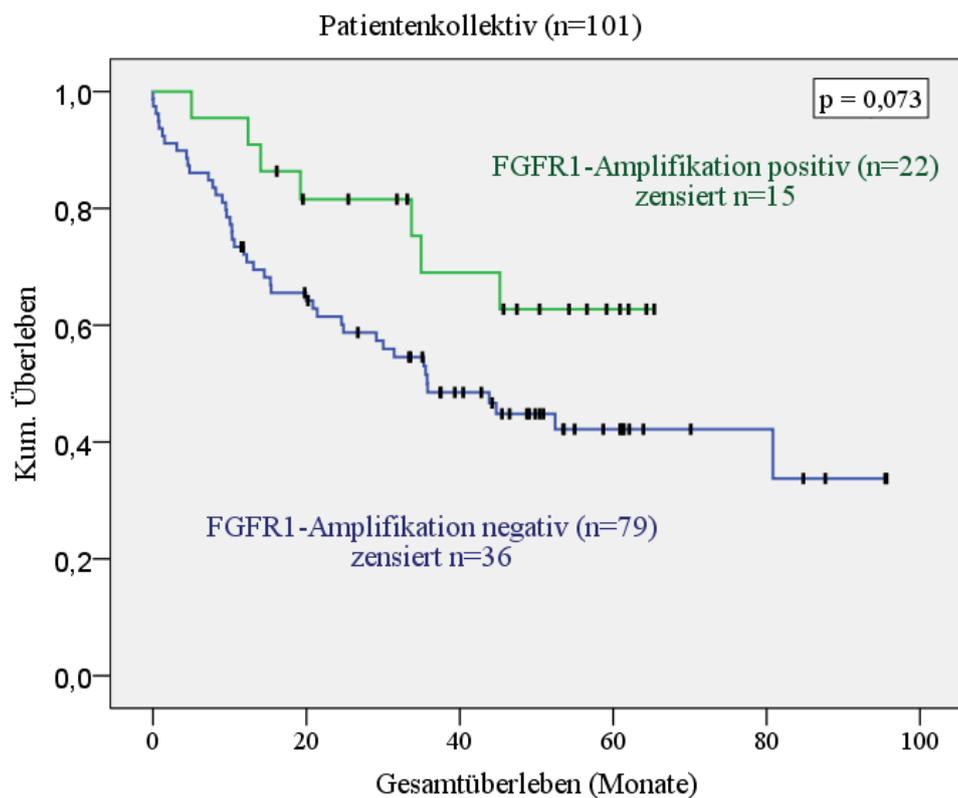
##### **4.4.4.1 Gesamtüberleben**

Wie bereits in Kapitel 4.4.3 beschrieben, könnte die FGFR1-Genamplifikation Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit der Patienten haben. Hierzu ist in Abbildung 23 der jeweilige Verlauf des Gesamtüberlebens der 79 Patienten, bei denen keine FGFR1-Genamplifikation identifiziert wurde, und der 22 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation in Form von Kaplan-Meier Kurven gegenübergestellt. Nach 5 Jahren waren in der Patientengruppe ohne Amplifikation des FGFR1-Gens noch etwa 40% der Patienten am Leben, in der Gruppe mit Genamplifikation waren es zu diesem Zeitpunkt noch über 60%. Dieser Unterschied war bei Berücksichtigung aller verfügbaren Daten nicht signifikant, jedoch spricht der p-Wert von 0,073 zumindest tendenziell für die günstigere Gesamtüberlebenszeit von Patienten, bei denen eine FGFR1-Genamplifikation diagnostiziert wurde.

##### **4.4.4.2 Prognostische Bedeutung der FGFR1-Genamplifikation in Abhängigkeit von den klinisch-histopathologischen Parametern**

Im Folgenden wurden die Patienten nach den jeweiligen klinisch-histopathologischen Parametern in Gruppen aufgeteilt und das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom FGFR-Genamplifikationsstatus untersucht. Eine Zusammenfassung dieser Untersuchung ist in Tabelle 19 dargestellt: Bei einer nach Geschlecht getrennten Betrachtung zeigt sich in der Gruppe der männlichen Patienten kein vom FGFR1-Genamplifikationsstatus abhängiger signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben ( $p=0,423$ ). Sowohl für die 17 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation als auch für die 62 Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation betrug das 5-Jahres-Überleben etwa 45%.

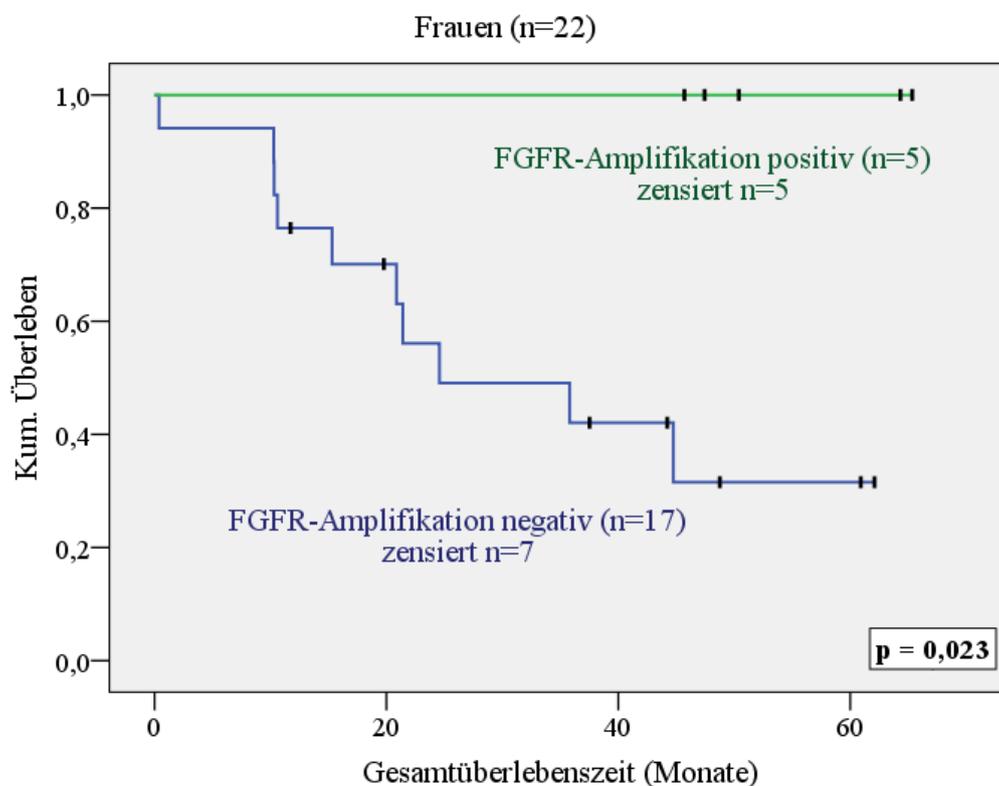
Die Unterteilung der Frauen nach dem Amplifikationsstatus ergab eine Gruppe von 5 Frauen mit FGFR1-Genamplifikation und eine Gruppe von 17 Frauen ohne FGFR1-Genamplifikation. Bei einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 5 Jahren war in der Gruppe ohne Genamplifikation ein dem Gesamtkollektiv ähnlicher Verlauf des Gesamtüberlebens mit einer insgesamt etwas niedrigeren 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 30% zu beobachten. In der Gruppe der Frauen mit Genamplifikation traten in 60 Monaten keine Ereignisse ein, was bedeutet, dass keine dieser Frauen bis zum Stichtag verstorben war. Auch bei dem Vergleich des Gesamtüberlebens der beiden Gruppen wurde dies deutlich: Der Nachweis der Genamplifikation hat eine prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben ( $p=0,023$ ; Abb. 24).



**Abbildung 23: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, Gesamtkollektiv**

Kaplan-Meier Kurve:

Gesamtüberlebenszeit für alle Patienten (n=101) mit und ohne FGFR-Genamplifikation



**Abbildung 24: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, Frauen**

Kaplan-Meier Kurve:

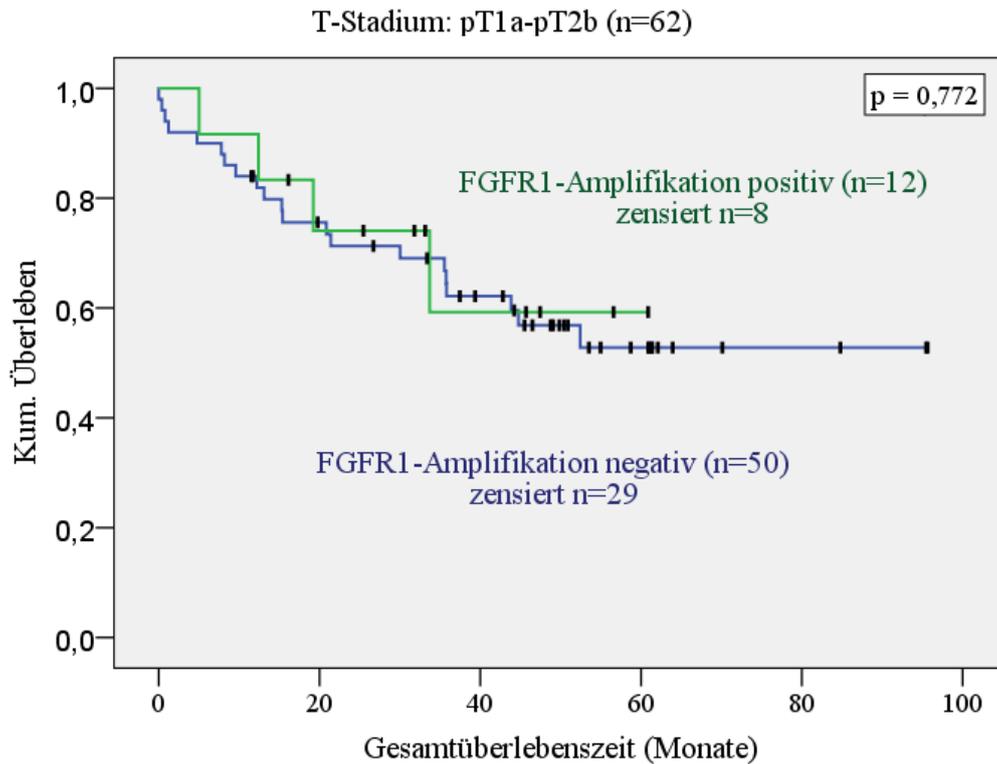
Gesamtüberlebenszeit für Frauen (n=22) mit und ohne FGFR1-Genamplifikation

Bei Trennung des Kollektivs aufgrund der Histologie des Tumors zeigte sich für das Gesamtüberleben der Patienten mit verhornendem PEC der Lunge kein vom FGFR1-Genamplifikationsstatus abhängiger Überlebensvorteil ( $p=0,432$ ). Bei Auftrennung der Patientengruppe mit nicht verhornendem PEC der Lunge gemäß ihres Amplifikationsstatus ergab sich zunächst eine Gruppengröße von 57 Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation sowie 16 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation. Der Vergleich dieser beiden Gruppen hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit zeigte keinen signifikanten Unterschied, jedoch war das Gesamtüberleben der Patienten mit FGFR1-Genamplifikation tendenziell günstiger ( $p=0,069$ ).

Im Hinblick auf die beiden Grading Gruppen G2 und G3 beeinflusste die FGFR1-Genamplifikation die Gesamtüberlebenszeit der Patienten nicht.

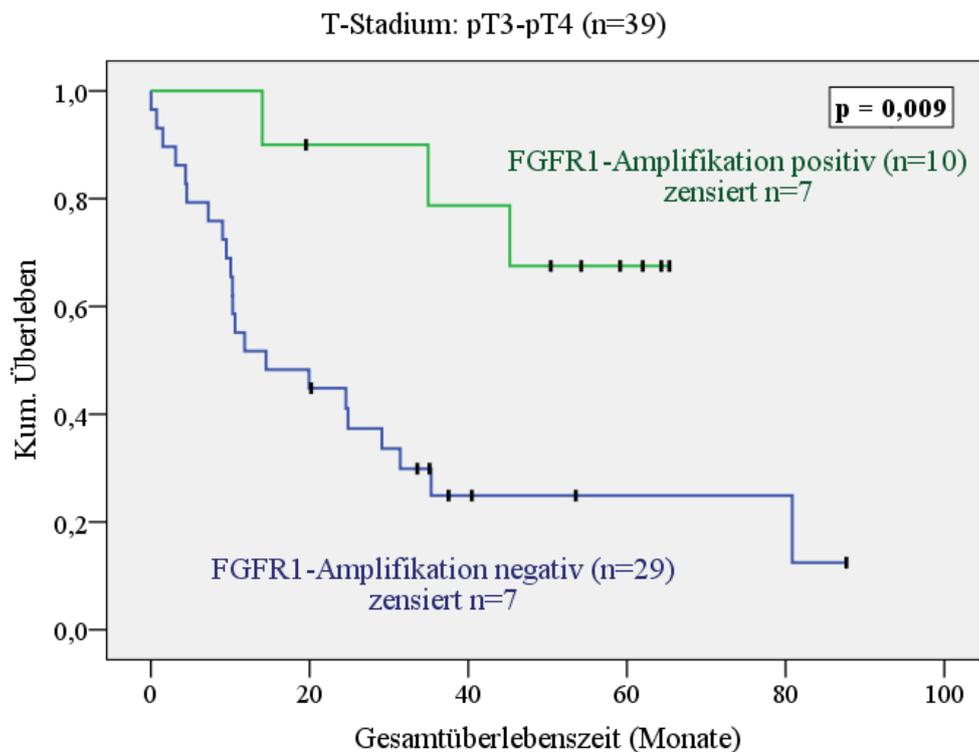
Bezüglich des pT-Stadiums wurden zunächst die zu einer Gruppe zusammengefassten pT-Stadien pT1a-T2b betrachtet: 50 Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation sowie 12 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation. Hinsichtlich des Gesamtüberlebensverlaufs traten hier zwischen beiden Gruppen keine Unterschiede auf ( $p=0,772$ , Abb. 25); der FGFR1-Genamplifikationsstatus beeinflusste demnach in der Gesamtgruppe der Tumorstadien pT1a-T2b das Gesamtüberleben nicht.

In den zu einer weiteren Gruppe zusammengefassten pT-Stadien pT3-T4 wurde das Gesamtüberleben von insgesamt 10 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation und 29 Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation auf Unterschiede hin untersucht: Vergleicht man zunächst nur die Patienten ohne Genamplifikation untereinander, d.h. die Gruppe mit diagnostiziertem pT3-T4 ( $n=29$ ) mit der Gruppe mit diagnostiziertem pT1a-T2b ( $n=50$ ), so ist erwartungsgemäß die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit pT3-T4 mit knapp 20% deutlich geringer als bei der Patientengruppe mit pT1a-T2b Stadium. Im Gegensatz dazu liegt jedoch die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit FGFR1-Genamplifikation des Stadiums pT3-T4 bei knapp 70%. Vergleicht man unter allen Patienten mit pT3-T4 die Gesamtüberlebenszeit, so ergibt sich ein signifikant günstigeres Gesamtüberleben für Patienten mit diagnostizierter FGFR1-Genamplifikation ( $p=0,009$ , Abb. 26). Zudem ist auffällig, dass bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit FGFR1-Genamplifikation es ein nicht signifikantes, aber tendenziell günstigeres Gesamtüberleben für Patienten der Tumorstadien pT3-T4 im Vergleich zu Patienten der Tumorstadien pT1a-T2b gibt.



**Abbildung 25: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, pT1a-pT2b**

*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberleben für Patienten mit einem Tumorstadium pT1a-pT2b in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus*



**Abbildung 26: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, pT3-pT4**

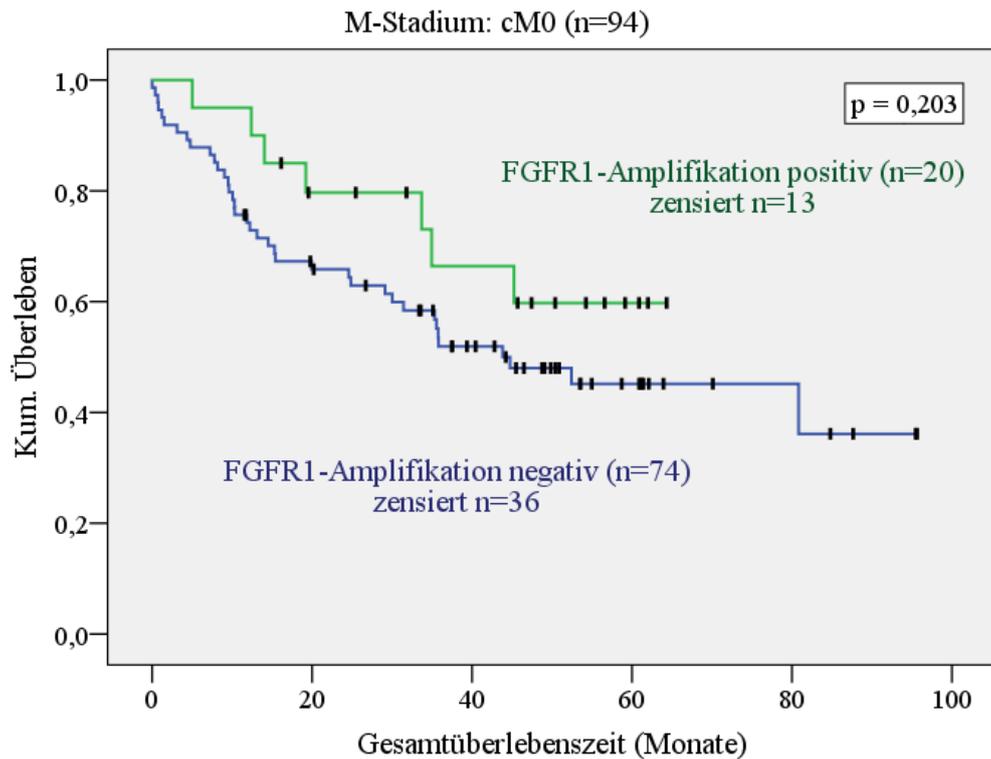
*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberleben für Patienten mit einem Tumorstadium pT3-pT4 in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus*

Im Rahmen der klinischen Untersuchungen hinsichtlich des Vorliegens von Metastasen wurden die Patienten in die Gruppen cM0 und cM1 aufgeteilt. 20 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation sowie 74 Patienten ohne FGFR1-Amplifikation konnten der Gruppe cM0 zugeteilt werden, 2 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation und 5 Patienten ohne Amplifikation hatten bei Operationszeitpunkt bereits Fernmetastasen (cM1).

In der Gruppe cM0 gab es keinen vom Amplifikationsstatus abhängigen signifikanten Überlebensunterschied (Abb. 27). Bei Betrachtung der Gruppe cM1 zeigte sich, dass innerhalb von 20 Monaten bereits alle Patienten ohne FGFR1-Amplifikation verstorben waren, wohingegen die zwei Patienten mit FGFR1-Genamplifikation und Fernmetastasen nach einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 60 Monaten beide zum Stichtag am Leben waren. Dieser Unterschied ist wegen der geringen Fallzahl nicht sicher aussagekräftig ( $p=0,041$ , Abb. 28).

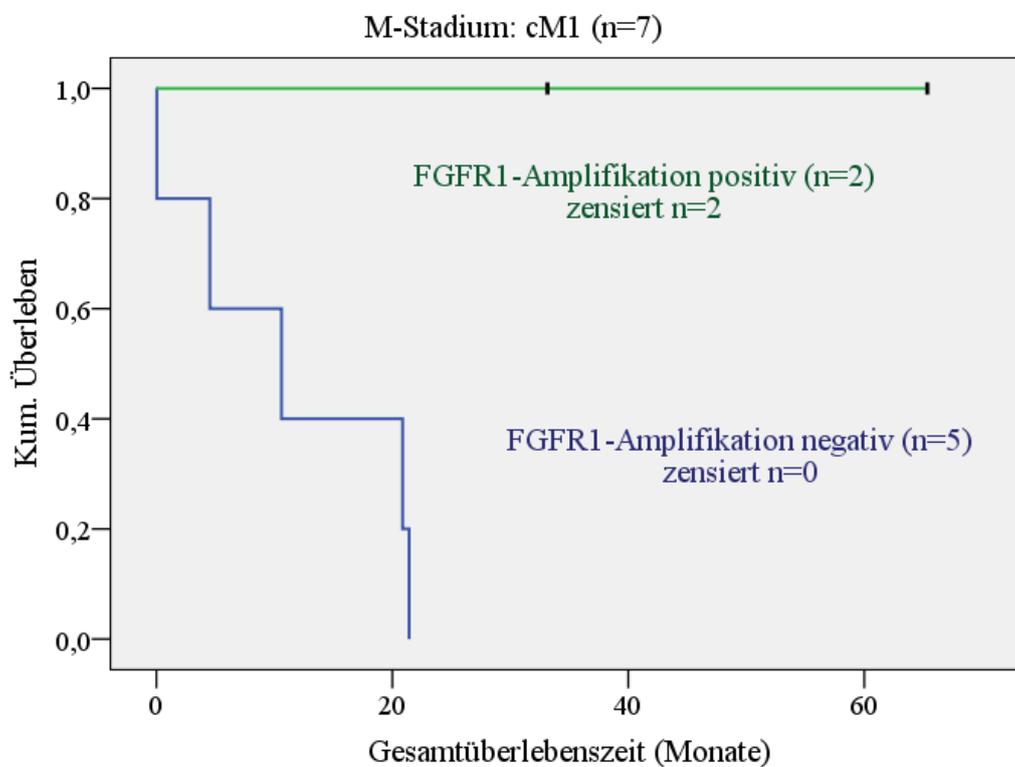
Hinsichtlich der Tumorlokalisation und der p40 Immunreaktivität ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom FGFR1-Genamplifikationsstatus.

Zur Betrachtung der Stadiengruppen wurden die Patienten in die Gruppen IA-IIB sowie III-IV eingeteilt. In Rahmen der Überlebensanalyse der Stadiengruppe IA-IIB ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens zwischen den 13 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation und den 53 Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation (Abb. 29). In der Stadiengruppe III-IV wurden 9 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation und 26 Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation verglichen: Für Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation zeigte sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von  $< 20\%$ , für Patienten mit FGFR1-Genamplifikation ergab sich hingegen eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa  $75\%$ . Dieser Unterschied hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit vom FGFR1-Genamplifikationsstatus war signifikant ( $p=0,006$ ; Abb. 30). Demnach könnte der Nachweis der FGFR1-Genamplifikation ein prognostisch günstiger Marker für Patienten der Stadiengruppe III-IV sein.



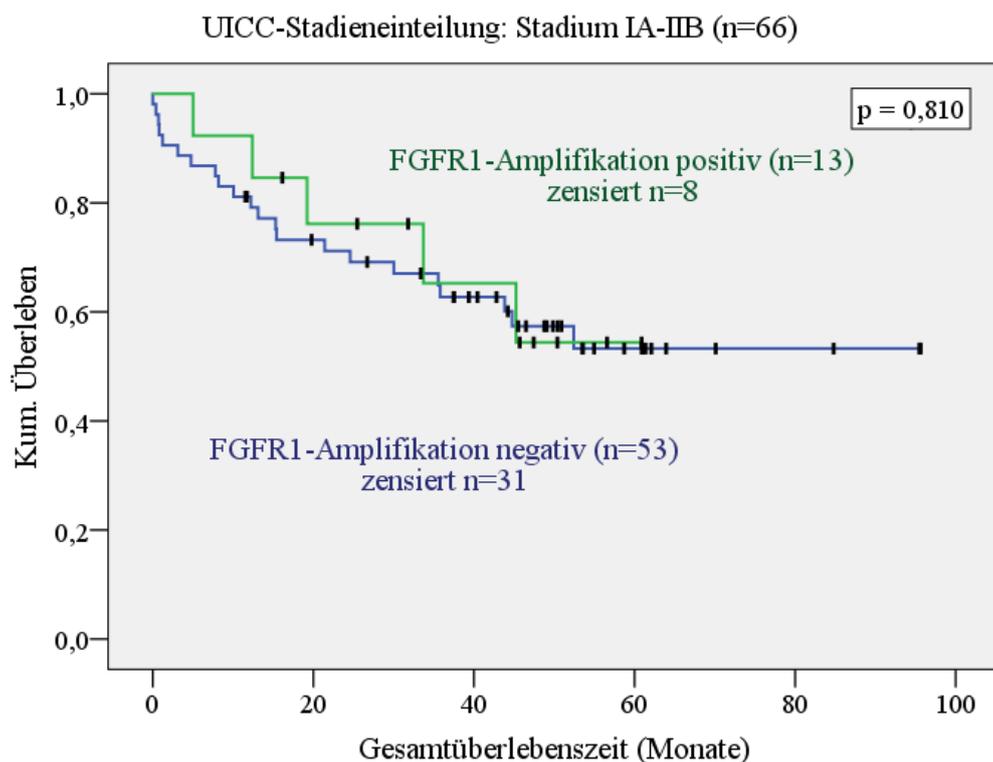
**Abbildung 27: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, cM0**

*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberleben für Patienten mit einem Metastasenstadium cM0 in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus*



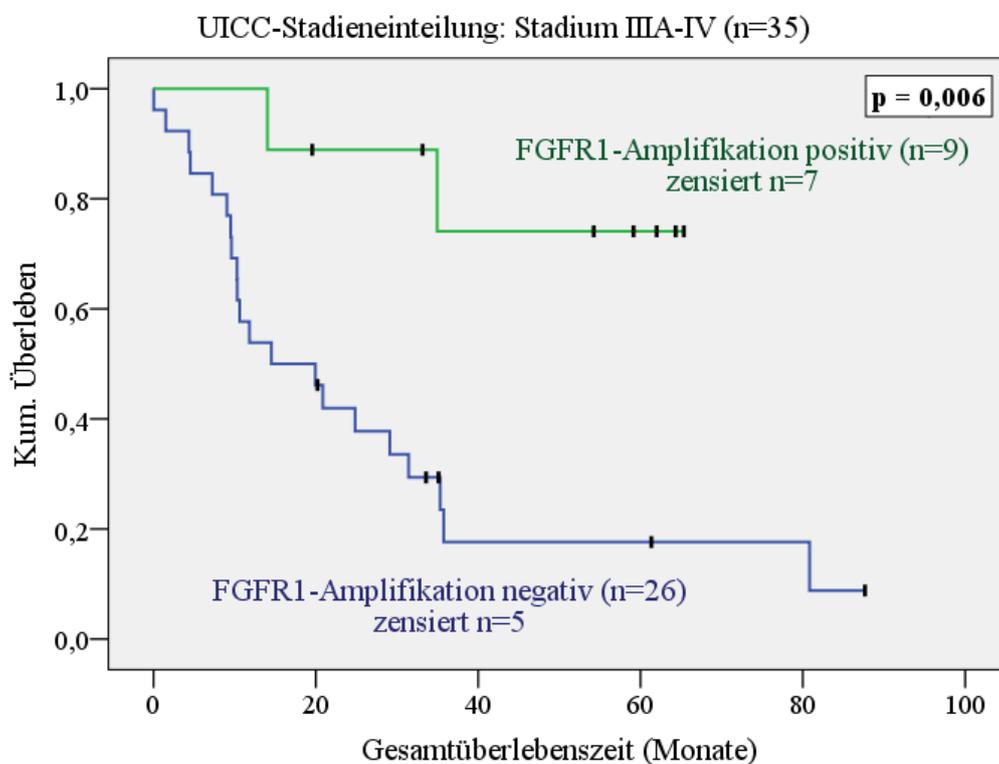
**Abbildung 28: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, cM1**

*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberleben für Patienten mit einem Metastasenstadium cM1 in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus*



**Abb. 29: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, Stadiengruppe IA-IIIB**

*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberleben für Patienten der Stadiengruppe IA-IIIB in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus*



**Abb. 30: Auswirkung FGFR1-Genamplifikation auf Überleben, Stadiengruppe III-IV**

*Kaplan-Meier Kurve: Gesamtüberleben für Patienten der Stadiengruppe IIIA-IV in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus*

Parameter (dichotome Aufspaltung)	<i>FGFR1-Gen, nicht amplifiziert</i>		<i>FGFR1-Gen, amplifiziert</i>		Gesamtüberleben p-Wert (Log-Rank Test)
	n	verstorben <sup>°</sup>	n	verstorben <sup>°</sup>	
<b><i>Geschlecht:</i></b>	-	-	-	-	-
männlich	62	33	17	7	0,423
weiblich	17	10	5	0	<b>0,023*</b>
<b><i>Histologie:</i></b>	-	-	-	-	-
verhornendes PEC	22	8	6	1	0,432
nicht verhornendes PEC	57	35	16	6	0,069
<b><i>Grading:</i></b>	-	-	-	-	-
G2	43	24	9	3	0,182
G3	36	19	13	4	0,266
<b><i>T-Stadium:</i></b>	-	-	-	-	-
T1-2	50	21	12	4	0,772
T3-4	29	22	10	3	<b>0,009*</b>
<b><i>N-Stadium:</i></b>	-	-	-	-	-
N0	50	24	11	3	0,223
N1-2	29	19	11	4	0,134
<b><i>M-Stadium:</i></b>	-	-	-	-	-
M0	74	38	20	7	0,203
M1	5	5	2	0	<b>0,041*</b>
<b><i>Stadiengruppierung:</i></b>	-	-	-	-	-
IA-IIIB	53	22	13	5	0,810
IIIA-IV	26	21	9	2	<b>0,006*</b>
<b><i>Tumorlokalisation:</i></b>	-	-	-	-	-
rechte Lunge	47	22	12	4	0,477
linke Lunge	32	21	10	3	0,520
<b><i>p40 Immunreaktivität:</i></b>	-	-	-	-	-
< 95%	38	17	5	0	0,093
> 95%	41	26	17	7	0,169

**Tabelle 19: Überlebensanalyse nach Standardparametern in Bezug zum FGFR1-Genamplifikationsstatus**

Zusammenfassung der Ergebnisse des Log-Rank Tests der Kaplan-Meier-Analysen für das Gesamtüberleben nach klinisch-histopathologischen Standardparametern in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus; n=101, \*Unterschied signifikant, °Stichtag: 01.01.2014

#### 4.4.5 Zusammenhang zwischen Lebensalter zum Operationszeitpunkt und FGFR1-Genamplifikation

Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt war in der Gruppe der Patienten mit FGFR1-Genamplifikation wie bereits beschrieben signifikant niedriger im Vergleich zur Gruppe der Patienten, bei denen keine Genamplifikation im Tumorgewebe identifiziert wurde (4.4.3). Nun wurde untersucht, ob diese signifikante Beziehung auch für die Gruppe der weiblichen Patienten und die Patientengruppe mit Tumoren der Stadien IIIA-IV galt (Tab. 20):

Zunächst wurde das durchschnittliche Alter zum Operationszeitpunkt der Frauen mit FGFR1-Genamplifikation und der Frauen ohne Genamplifikation verglichen: Das Alter bei Operation war mit einem Median von 58,11 Jahren bei Frauen mit Amplifikation etwa 11 Jahre niedriger als bei Frauen ohne Amplifikation, die beim Operationszeitpunkt im Median 69,58 Jahre alt waren. Statistisch signifikant ist der Zusammenhang zwischen niedrigerem Alter bei Operation und Vorliegen einer FGFR1-Genamplifikation nicht (Tab. 20).

Ein ähnliches Bild ergab sich beim Vergleich der Patienten der Stadiengruppe IIIA-IV mit und ohne FGFR1-Genamplifikation: Das Alter der Patienten der Stadiengruppe IIIA-IV ohne FGFR1-Genamplifikation bei Operation betrug im Median 72,01 Jahre, bei Patienten mit FGFR1-Genamplifikation betrug es im Median 60,14 Jahre. Auch hier war der Zusammenhang zwischen niedrigerem Alter bei Operation und nachgewiesener FGFR1-Genamplifikation nicht signifikant (Tab. 20).

	<i>Median</i>		<i>p-Wert</i> (Mann-Whitney U Test)
	FGFR1-Gen, nicht amplifiziert	FGFR1-Gen, amplifiziert	
<b><i>Gesamt</i></b>	<b>69,42</b> (IQR: 11,45)	<b>65,21</b> (IQR: 12,35)	<b>0,046*</b>
<b><i>Frauen</i></b>	<b>69,58</b> (IQR:9,60)	<b>58,11</b> (IQR:14,15)	0,140
<b><i>Stadium IIIA-IV</i></b>	<b>72,01</b> (IQR:16,01)	<b>60,14</b> (IQR:15,55)	0,197

**Tabelle 20: Durchschnittsalter bei Operation**

*Durchschnittliches Alter der Patienten, angegeben für das gesamte Patientenkollektiv, für die weiblichen Patienten sowie für die Patienten der Stadiengruppe IIIA-IV; \*Unterschied signifikant*

#### 4.4.6 Zusammenhang zwischen einer nachgewiesenen FGFR1-Genamplifikation und den klinisch-histopathologischen Parametern bei Frauen

Wie in Abbildung 24 und Tabelle 19 dargestellt, zeigten Frauen mit FGFR1-Genamplifikation gegenüber Frauen ohne FGFR1-Genamplifikation eine signifikant höhere Gesamtüberlebenszeit. Im Folgenden wurde untersucht, ob es bei den weiblichen Patienten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der FGFR1-Genamplifikation und den klinisch-histopathologischen Standardparametern gibt; die Ergebnisse sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Sowohl für die histologischen Subentitäten des Tumors als auch für die Differenzierungsgrade G2 und G3 konnte für Frauen kein Zusammenhang mit der FGFR1-Genamplifikation gefunden werden. Auch besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten der FGFR1-Genamplifikation und den einzelnen pT-pN-cM-Stadien sowie den Stadiengruppen IA-IIB und III-IV. Gleiches gilt auch für die verschiedenen Tumorlokalisationen sowie die unterschiedliche p40 Immunreaktivität.

Statistisch signifikant ist ein Zusammenhang ausschließlich in Bezug auf den Überlebensstatus der Patientinnen: Die FGFR1-Genamplifikation ist bei Frauen mit dem Überlebensstatus „lebt zum Stichtag 01.01.2014“ verbunden ( $p=0,04$ ) und stützt damit die Aussage, dass die FGFR1-Genamplifikation bei Frauen mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit korreliert und demnach prognostisch günstig sein könnte.

Parameter	p-Wert (Fisher Test)
<i>Histologie</i>	1,000
<i>Differenzierungsgrad</i>	0,609
<i>pT-Stadium</i>	0,231
<i>pN- Stadium</i>	0,249
<i>cM- Stadium</i>	1,000
<i>Stadiengruppierung</i>	1,000
<i>Tumorlokalisation</i>	0,886
<i>p40 Immunreaktivität</i>	0,227
<i>Überlebensstatus 01.01.2014</i>	<b>0,040*</b>

**Tabelle 21: Vergleichsanalyse FGFR1-Genamplifikation / Standardparameter, Frauen**

*Tabellarische Zusammenfassung der p-Werte der Vergleichsanalyse zwischen dem FGFR1-Genamplifikationsstatus und den einzelnen Standardparametern sowie der p40 Immunreaktivität bei Frauen; \* Zusammenhang signifikant*

#### **4.4.7 Zusammenhang zwischen einer nachgewiesenen FGFR1-Genamplifikation und den klinisch-histopathologischen Parametern bei Patienten der Stadiengruppe IIIA-IV**

In der beschriebenen Überlebensanalyse zeigte sich bei nachgewiesener FGFR1-Genamplifikation eine im Vergleich zu Patienten ohne Genamplifikation günstigere Gesamtüberlebenszeit bei fortgeschrittenem T-Stadium pT3-pT4 (Abb. 26) und cM1-Status (Abb. 28). Diese beiden Parameter werden neben dem Lymphknotenstatus in den betreffenden Stadiengruppen zusammengefasst; bei Betrachtung des fortgeschrittenen Stadiums III-IV war die Gesamtüberlebenszeit für Patienten mit FGFR1-Genamplifikation auch hier signifikant höher als bei Patienten ohne nachgewiesene FGFR1-Genamplifikation (Abb. 30).

Im Folgenden wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer FGFR1-Genamplifikation im Stadium IIIA-IV und den klinisch-histopathologischen Standardparametern existiert: Als Ergebnis wurde festgestellt, dass zwischen nachgewiesener FGFR1-Genamplifikation und Geschlecht der Patienten, Histologie und Differenzierungsgrad des Tumors, pT-pN-cM Stadium sowie p40 Immunreaktivität kein signifikanter Zusammenhang bestand (Tab. 22).

Bei Betrachtung der Tumorlokalisation wurde ein Zusammenhang zwischen diagnostizierter FGFR1-Genamplifikation und der Lokalisation des Tumors nachgewiesen: Während bei Patienten der Stadiengruppe IIIA-IV ohne FGFR1-Genamplifikation der Oberlappen und Unterlappen rechts und links gleichermaßen von Tumor betroffen waren, trat der Tumor bei Patienten der Stadiengruppe IIIA-IV mit FGFR1-Genamplifikation ausschließlich in den Oberlappen rechts und links auf. Dieser Zusammenhang war statistisch signifikant ( $p=0,028$ , Tab. 22).

Ein weiterer signifikanter Zusammenhang zeigte sich für die Stadiengruppe III-IV zwischen nachgewiesener FGFR1-Genamplifikation und dem Überlebensstatus: Die FGFR1-Genamplifikation ist statistisch signifikant mit dem Überlebensstatus „lebt zum Stichtag 01.01.2014“ verbunden, d.h. dass von den Patienten der Stadiengruppe III-IV mit diagnostizierter FGFR1-Genamplifikation im Vergleich zu Patienten ohne Genamplifikation signifikant mehr Patienten am 01.01.2014 am Leben waren, was den prognostisch günstigen Einfluss der FGFR1-Genamplifikation besonders für Patienten der Stadiengruppe III-IV verdeutlicht.

Parameter	p-Wert (Fisher-Test)
<i>Geschlecht</i>	0,635
<i>Histologie</i>	1,000
<i>Differenzierungsgrad</i>	1,000
<i>pT-Stadium</i>	0,183
<i>pN- Stadium</i>	0,704
<i>cM- Stadium</i>	0,644
<i>Tumorlokalisation</i>	<b>0,028*</b>
<i>p40 Immunreaktivität</i>	1,000
<i>Überlebensstatus 01.01.2014</i>	<b>0,003*</b>

**Tabelle 22: Vergleichsanalyse FGFR1-Genamplifikation / Standardparameter, Stadiengruppe IIIA-IV**

*Tabellarische Zusammenfassung der p-Werte der Vergleichsanalyse zwischen dem FGFR1-Genamplifikationsstatus und den einzelnen Standardparametern sowie der p40 Immunreaktivität bei Frauen; \*Zusammenhang signifikant.*

## **5 Diskussion**

### **5.1 Patientenkollektiv**

Das unseren Untersuchungen zugrunde liegende Patientenkollektiv setzte sich aus 101 Patienten zusammen, die an einem Plattenepithelkarzinom der Lunge erkrankten und in den Jahren 2006 bis 2013 operiert wurden. Die Fallzahl von 101 Tumorproben ist bei Betrachtung rein epidemiologischer Studien verhältnismäßig gering: Zur Untersuchung von nicht molekularen Prognosefaktoren beim PEC der Lunge wurden meist größere Kollektive zwischen 541 und 4463 Patienten betrachtet (Chansky et al., 2009; Weichert et al., 2015). Umfasste die Zielsetzung der jeweiligen Studie jedoch auch die molekularbiologische Untersuchung der einzelnen Fälle, so bestanden die Kollektive zwischen 100 und 262 Patienten (Kim et al., 2014; Sasaki, 2011). Demnach ist unsere Studie, die molekularbiologische und klinisch-pathologische Aspekte berücksichtigt, hinsichtlich der Fallzahl im internationalen Vergleich als eher klein anzusehen. Speziell bei Aussagen für Untergruppen des Kollektivs sollten unsere Ergebnisse vor diesem Hintergrund betrachtet und bewertet werden. Andererseits ist es die erste derartige Studie, die ein relativ homogenes Kollektiv im Saarland und der Westpfalz im Hinblick auf prognostische Marker des PEC untersuchte und nach Weiss et al. (2010) deutschlandweit die zweite Studie, die sich mit der prognostischen Bedeutung von Mutationen der Gene von FGFR 1, 2 und 3 beschäftigte.

Unser Kollektiv setzte sich aus 22 Frauen und 79 Männern zusammen. Deutschlandweit sind 29% der an Lungentumoren erkrankten Menschen Frauen (Goekenjan et al., 2010), sodass es sich bei unserem Kollektiv hinsichtlich der Geschlechterverteilung um ein repräsentatives Kollektiv handelte. Auch bezüglich der anderen klinisch-histopathologischen Standardparameter war eine ähnliche Verteilung im Vergleich zu anderen Studien gegeben: Der Anteil der verhornenden PEC betrug in unserem Kollektiv 28%, der Anteil der nicht verhornenden 73%, bei Kadota et al. (2014) war mit 25% und bei Weichert et al. (2015) mit 33% der Anteil der verhornenden PEC annähernd vergleichbar (Kadota et al., 2014; Weichert et al., 2015). Angaben zum Tumorgrading sind in den Studien nicht immer vorhanden, bei Kadota et al. (2014) waren 52% der Tumorproben dem Grad 1-2 und 48% dem Tumorgrad 3 zugeteilt; bei unseren Proben wiesen 51,5% einen Tumorgrad G2 und 48,5% einen Tumorgrad G3 auf. Auch bei Betrachtung der Tumorlokalisation ist unser Kollektiv mit anderen vergleichbar: Die rechte Lunge war nach unseren Daten in 58%, bei Whitson et al. (2012) in 59% der Fälle von einem PEC der Lunge befallen (Whitson et al., 2012).

Hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung der einzelnen pT-pN-cM-Stadien ergab sich eine leichte Differenz zwischen unseren Angaben und den bereits bekannten Studien: Mit einer Häufigkeit von 22% und 17% waren die pT-Stadien pT3 und pT4 in unserem Kollektiv häufiger vertreten als bei Kadota et al. (2014) oder Weichert et al. (2015) mit 11% und 25% bzw. 17% und 3,5%. Auch waren bei uns mit 6% im Vergleich zu 1% bei Weichert et al. (2015) deutlich mehr Patienten mit Fernmetastasen des primären Plattenepithelkarzinoms der Lunge in die Untersuchung mit eingeschlossen. Eine vergleichbare Verteilung zwischen den Studien ergab sich wiederum bei Betrachtung des pN-Stadiums: Sowohl bei dem vorliegenden Kollektiv als auch bei Kadota et al. (2014) waren 60% der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen. Aus den beschriebenen Differenzen hinsichtlich der höheren pT- und der cM-Stadien erklärt sich die bei uns häufigere Zuteilung zum Prognosestadium IV mit 5,9% im Vergleich zu 1% bei Weichert et al. (2015). Die Prognosestadien I-III waren hinsichtlich ihrer Häufigkeit zwischen den Studien vergleichbar.

Die dichotome Aufteilung der einzelnen Parameter für die Vergleichs- und Überlebensanalyse orientierte sich an folgenden Studien: Die Unterteilung der pT-Stadien in die Vergleichsgruppen pT1-2 sowie pT3-4, der pN-Stadien in die Gruppen pN0 und pN1-2 sowie die Einteilung der Stadiengruppen in die Vergleichsgruppen I-II und III-IV wurde sowohl bei Untersuchung rein klinischer Parameter (Pilotto et al., 2015) als auch bei speziell auf FGFR Mutationen bezogenen Überlebensanalysen bei PEC der Lunge durchgeführt (Heist et al., 2012; Wang et al., 2015; Xie et al., 2016). Bei Verwendung der 6.TNM-Klassifikation konnte auch nachgewiesen werden, dass sich das Überleben der Stadiengruppen IIB und IIIA signifikant, das Überleben der Gruppen IIIA und IIIB im direkten Vergleich jedoch nicht signifikant unterscheidet, was die Einteilung in die oben beschriebenen Vergleichsgruppen zusätzlich rechtfertigt (Pfannschmidt et al., 2007).

## **5.2 Überlebensanalyse und prognostische Bedeutung von klinisch-histopathologischen Standardparametern beim PEC der Lunge**

Zur Feststellung des durchschnittlichen Alters der in die Studien eingeschlossenen Patienten wurde von uns und allen betrachteten Studien das Lebensalter zum Zeitpunkt der Tumoresektion erhoben. Mit einem medianen Durchschnittsalter der Patienten bei Operation von 68,77 Jahren ergab sich im Vergleich zum Patientendurchschnittsalter bei Operation in anderen Studien mit 69 Jahren (Heist et al., 2012; Kinoshita et al., 2014), 71 Jahren (Kadota

et al., 2014) und 65 Jahren (Weichert et al., 2015) ein hinsichtlich des Alters bei Operation vergleichbares Kollektiv.

Als Beginn der Nachbeobachtungszeit, die die Grundlage der Überlebensanalyse bildet, wurde sowohl bei uns als auch bei weiteren Studien das Datum der Operation verwendet (Kadota et al., 2014; Kinoshita et al., 2014). Mit knapp 34 Monaten war die mittlere Nachbeobachtungszeit im Rahmen unserer Studie kürzer als bei Weichert et al. (2015) mit 40 Monaten und bei Kadota et al. (2014) mit 49 Monaten. Dennoch war der Anteil der während der Nachbeobachtungszeit verstorbenen Patienten mit 50% in unserem Kollektiv und 58% bei Kadota et al. (2014) annähernd vergleichbar, bei Weichert et al. (2015) hingegen verstarben nur 33,3% der Patienten im Laufe der Nachbeobachtung.

Zur Auswertung wurde von uns ausschließlich das Gesamtüberleben ohne Betrachtung der genauen Todesursache verwendet. Im Rahmen unserer Überlebensanalyse wurde nicht auf das „disease free survival“ (DFS) oder auch rezidivfreie Überleben bzw. nicht auf das „cancer specific survival“ (CCS) oder das tumorspezifische Überleben eingegangen. Aufgrund mangelnder Patientendaten konnte im Gegensatz zu anderen Studien wie beispielsweise derjenigen von Pilotti et al. (2015), bei der sowohl die Vortherapie als auch das DFS und CCS zur Auswertung kamen, bei unserer Studie auch eine Dokumentation und Beachtung möglicher Vortherapien besonders von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Fokussiert man zunächst das Gesamtüberleben, so betrug die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten bei Kadota et al. (2014) 59% und bei Pfannschmidt et al. (2007) 53,6%. An unserem Kollektiv wurde eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 46% festgestellt. Mögliche Erklärung für diese Differenz könnte einerseits die Tatsache sein, dass bei Kadota et al. (2014) Patienten mit Fernmetastasen aus dem Kollektiv ausgeschlossen wurden sowie andererseits der bereits beschriebene Aspekt, dass in unserem Kollektiv tendenziell häufiger die T-Stadien pT3-4 bzw. die Prognosestadien III-IV auftraten und demnach dadurch eine geringere 5-Jahres-Überlebensrate bedingt sein könnte.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden bei der Überlebensanalyse von klinisch-histopathologischen Standardparametern das Geschlecht, der histologische Subtyp, die pT-pN- und cM-Stadien, das Grading, die Tumorlokalisation sowie die Stadiengruppen verwendet. In anderen Studien wurde zusätzlich die Raucheranamnese der Patienten als Parameter aufgeführt, was bei uns mangels klinischer Angaben nicht betrachtet werden konnte.

Das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Geschlecht der Patienten wurde bei non-small-cell-lung-cancer (NSCLC) bisher ausführlich untersucht; speziell für das PEC der Lunge liegen derzeit jedoch wenige Daten vor: Im Rahmen der Untersuchungen von Kadota et al. (2014) wurde eine signifikant längere Gesamtüberlebenszeit für Frauen festgestellt; Weichert et al. (2015) sowie Pilotto et al. (2015) hingegen konnten keinen signifikanten Überlebensvorteil für Frauen finden. Bei der von uns durchgeführten Überlebensanalyse wurde eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 50% für Frauen und von etwa 45% für Männer gefunden, ein signifikant längeres Gesamtüberleben für Frauen lag dabei nicht vor. Dagegen wurde sowohl bei uns als auch bei Kadota et al. (2014), Pilotto et al. (2015) und Weichert et al. (2015) eine signifikant längere Gesamtüberlebenszeit für die pT-Stadien pT1-2 im Vergleich zu den pT-Stadien pT3-4 bzw. für die Stadiengruppen I-II im Vergleich zu III-IV dokumentiert, wobei bei uns im Vergleich zu den drei genannten Studien kein Überlebensvorteil zwischen den Gruppen pN0 und pN1-2 sowie cM0 und cM1 gezeigt werden konnte.

Zur Einteilung der Tumore gemäß ihres Differenzierungsgrads kam das Gradingssystem von Damjanov and Fan für Plattenepithelkarzinome der Lunge zur Verwendung (Damjanov and Fan, 2013). Allerdings liegt derzeit kein einheitliches Gradingssystem bei PEC der Lunge vor, wodurch die Einteilung der Tumore hinsichtlich ihres Differenzierungsgrad in Abhängigkeit vom verwendeten Gradingssystem verschieden sein kann. Solange kein einheitliches Gradingssystem etabliert ist, sollte deshalb laut Pilotti et al. (2015) das Tumorigradung bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge bei Therapieentscheidungen und Überlebensanalysen nur mit Bedacht verwendet werden (Kadota et al., 2014; Pilotto et al., 2015; Weichert et al., 2015). Bei unseren Untersuchungen wurden daher alle Tumorschnitte von demselben Facharzt für Pathologie in die einzelnen Gradinggruppen eingeteilt, sodass eine interindividuelle Variabilität bei der Graduierung unserer Tumorproben weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Im Rahmen der Überlebensanalyse zeigte sich, dass an unserem Kollektiv das Tumorigradung keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hatte, während bei Pilotti et al. (2015) ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem hohen Grading und einem kürzeren Gesamtüberleben gezeigt wurde. Vor diesem Hintergrund ist zunächst ein einheitliches Gradingssystem für PEC der Lunge zu fordern, dessen prognostische Aussagekraft im Anschluss an die Etablierung erneut untersucht werden sollte.

Im Zuge der Bestrebungen, ein einheitliches Gradingssystem für PEC der Lunge zu etablieren, wurde zunächst die prognostische Bedeutung der histologischen Subtypen des verhornenden und nicht verhornenden PEC der Lunge untersucht. Die Ergebnisse divergieren jedoch: So

verzeichneten Weichert et al. (2015) ein signifikant günstigeres Gesamtüberleben bei Vorliegen eines nicht verhornenden PEC, Kadota et al. (2014) konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden histologischen Subtypen feststellen, während an unserem Patientenkollektiv verhornende PEC im Gegensatz zu nicht verhornenden PEC mit einem signifikant höheren Gesamtüberleben verknüpft waren. Somit scheint auch die Rolle des histologischen Subtyps für die Prognose des PEC der Lunge nicht geklärt und bedarf der weiteren Untersuchung, möglichst an größeren Patientenkollektiven.

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der Tumorlokalisation liegen nur wenige Daten vor: Whitson et al. (2012) konnten zeigen, dass ein Befall der Oberlappen mit einem längeren Gesamtüberleben verbunden ist; bei uns konnte dies nicht bestätigt werden. Allerdings zeigte sich, dass der Befall der rechten Lunge tendenziell prognostisch günstiger ist; in der Gruppe der von uns untersuchten männlichen Patienten war dieser Überlebensvorteil signifikant ( $p=0,044$ ). Neben der Tumorlokalisation ergab sich für Männer im Rahmen der Überlebensanalyse ein signifikant längeres Überleben bei niedrigem pT-Stadium bzw. Tumorstadium I-II. In der Gruppe der weiblichen Patienten war jedoch keiner der für das gesamte Patientenkollektiv beschriebenen Prognosefaktoren signifikant: Es ergab sich für Frauen bezüglich der Gesamtüberlebenszeit kein Unterschied zwischen den pT-Stadien pT1-2 und pT3-4 sowie den Stadien I-II und III-IV. Eine mögliche Erklärung könnte die Amplifikation des FGFR1-Gens sein, welche beim vorliegenden Kollektiv in der Gruppe der Frauen und hier besonders bei fortgeschrittenem Tumorstadium einen wichtigen Einfluss auf das Gesamtüberleben darstellt, wie in Abschnitt 4.4.4.2 gezeigt.

### **5.3 Immunhistochemische Anfärbung von $\Delta$ Np63 mit dem Antikörper p40**

#### **5.3.1 Methode zur immunhistochemischen Anfärbung des $\Delta$ Np63**

Der Nachweis der  $\Delta$ Np63 Variante des p63-Proteins an einem Lungenkarzinom durch den Antikörper p40 gilt aktuell als sensitiv und spezifisch für das Vorliegen eines PEC der Lunge. Die Standardmethode, um dieses nukleäre Protein nachzuweisen, ist die immunhistochemische Färbung an Gewebeschnitten. Bishop et al. (2011) konnten zeigen, dass eine für das Protein  $\Delta$ Np63 positive IHC bei primären Lungenkarzinomen mit einer Sensitivität von 100% sowie einer Spezifität von 98% das Vorliegen eines PEC der Lunge beweist. Im Rahmen unserer Untersuchungen waren alle 101 der von uns immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte für das Protein  $\Delta$ Np63 positiv, womit auch wir eine Sensitivität hinsichtlich des Nachweises des  $\Delta$ Np63 Proteins bei PEC der Lunge von 100% zeigen konnten.

Als Kontrolle wurde ein Adenokarzinom der Lunge verwendet, bei dem das Protein in den Tumorzellen nicht exprimiert war. Zur Verwendung kam bei uns der auch von Bishop et al. (2011) verwendete Antikörper der Firma CalBiochem. Für die Auswertung der gefärbten Schnitte wurden die Kriterien von Bishop et al. (2011), Ao et al. (2014) und Iwata et al. (2005) übernommen, womit auch hinsichtlich der Auswertung gleiche Bedingungen vorlagen.

#### **5.3.2 Vergleichs- und Überlebensanalyse im Rahmen der immunhistochemischen Färbung von $\Delta$ Np63**

$\Delta$ Np63 ist eine Proteinvariante des Gens TP63, die die Zelldifferenzierung sowie die Apoptoseeinleitung hemmt und damit der Gruppe der Protoonkogene zugeteilt werden kann (Bishop et al., 2011; Nobre et al., 2013).

Bei Betrachtung der verschiedenen p40 Immunreaktivitätsgruppen 1-5%, 6-20%, 21-50% sowie >50% im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge mit der Ausprägung der klinisch-histopathologischen Standardparameter kamen wir zum Ergebnis, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen der p40 Immunreaktivität und den einzelnen Standardparametern besteht. Jedoch zeigte sich, dass bei allen 28 verhornenden PEC sowie bei 99% der G2 Tumore mehr als 50% der Tumorzellen p40 positiv waren.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam bereits 2005 die Arbeitsgruppe von Iwata et al. (2005), die ihre Untersuchung an insgesamt 168 PEC der Lunge durchführte und keinen Zusammenhang zwischen der p40 Immunreaktivität und dem Geschlecht, dem Alter der Patienten, dem

Tumorgrad, dem pT- und pN-Stadium sowie den einzelnen Stadiengruppen finden konnte, ein möglicher Zusammenhang mit dem Tumorgrading wurde von ihnen nicht untersucht (Iwata et al., 2005).

Auch hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der p40 Immunreaktivität und damit der prognostischen Bedeutung der Expression des  $\Delta$ Np63 Proteins in Tumorzellen von PEC der Lunge ergab sich sowohl bei Iwata et al. (2005) als auch bei unserer Überlebensanalyse kein Anhalt: Sowohl bei Betrachtung der nach der Einteilung von Bishop et al. (2011) entstandenen Immunreaktivitätsgruppen als auch bei einer Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen mit p40 Immunreaktivität  $>50\%$  bzw.  $\leq 50\%$  zeigte sich bei uns kein Unterschied im Gesamtüberleben. Von Iwata et al. (2005) wurden die Gruppen in Immunreaktivität  $>40\%$  bzw.  $\leq 40\%$  eingeteilt, es ergab sich auch bei ihnen kein prognostischer Unterschied.

Bei Unterteilung der Patienten in 2 Gruppen mit einer p40 Immunreaktivität von  $>95\%$  bzw.  $\leq 95\%$  zeigte sich bei unseren Untersuchungen jedoch, dass Patienten mit einem Tumor, bei dem in mehr als 95% der Tumorzellen das Protein  $\Delta$ Np63 exprimiert ist, eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von knapp 60% aufwiesen, während Patienten mit einer Expression des  $\Delta$ Np63 Proteins von weniger als 95% mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von knapp 40% ein tendenziell schlechteres Gesamtüberleben hatten. Dies zeigt, dass die Expression von  $\Delta$ Np63 tendenziell mit einem prognostisch günstigeren Überleben verbunden sein kann und nicht prognostisch ungünstig für das Gesamtüberleben ist.

Abgesehen von der beschriebenen Studie von Iwata et al. (2005) ist nach unserer Kenntnis aktuell keine weitere Studie publiziert, die eine ähnliche Fragestellung hinsichtlich eines Zusammenhangs von  $\Delta$ Np63-Expression und klinisch-pathologischen Parametern bzw. der prognostischen Bedeutung der  $\Delta$ Np63-Variante bei PEC der Lunge untersucht hat. Daher können weitere valide Vergleiche unserer Ergebnisse derzeit nicht gemacht werden, allerdings sollten besonders im Hinblick auf die zunehmend große Rolle des  $\Delta$ Np63 Proteins in der Diagnostik des PEC der Lunge weitere Untersuchungen hinsichtlich der prognostischen Bedeutung dieses Proteins angestrebt werden.

## 5.4 Punktmutationsanalyse in den Genen von FGFR2 und FGFR3

### 5.4.1 Methode zur Punktmutationsanalyse in den Genen von FGFR2 und FGFR3

Im Rahmen der Untersuchungen des Cancer Genome Atlas Research Network wurden bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge im Gen des FGFR2 sieben verschiedene Basenmutationen und im Gen des FGFR3 vier verschiedene Basenmutationen mit nachfolgendem Aminosäureaustausch gefunden. Von beiden FGF-Rezeptoren wurden von uns jeweils vier beschriebene Mutationen ausgewählt und die Sequenzierung der entsprechenden Exonabschnitte etabliert. In der Auswahl der zu untersuchenden Mutationen wurde darauf geachtet, dass bei beiden Rezeptoren Mutationen sowohl der extrazellulären, der transmembranären sowie der Tyrosinkinasedomäne untersucht wurden.

Die Mutationen R248C und S249C des FGFR3 sowie die Mutation K660E bzw. K660N wurden von Liao et al. (2012) als „Driver“-Mutationen definiert (Liao et al., 2012). Basierend auf diesen Informationen wurde das Hauptaugenmerk der Untersuchung auf das Codon 660 im Exonabschnitt 14 des Gens für FGFR2 sowie auf die beiden Codons im Exonabschnitt 7 des Gens von FGFR3 gelegt, die für die Mutationen R248C und S249C verantwortlich sind, und diese Mutationen an allen 101 Tumorproben untersucht. Die Mutationen W290C in Exon 7, E471Q in Exon 10 und G584W in Exon 13 des Gens für FGFR2 sowie die Mutationen S435C in Exon 10 sowie K717M in Exon 15 des Gens für FGFR3 wurden zur Etablierung der PCR beispielhaft an 25 Tumorproben untersucht.

Nachgewiesen werden konnte von uns die Mutation S249C an einer Tumorprobe, hinsichtlich der anderen Mutationen lag bei allen Tumorproben der Wildtyp vor. Für die Mutation S249C ergab sich demnach eine Mutationsfrequenz von 1%; vergleichbar ist diese Mutationshäufigkeit mit dem Ergebnis von Liao et al. (2013), die diese Mutation an 3 von 178 Tumorproben von US-amerikanischen Patienten und damit eine Mutationsfrequenz von 1,6% nachweisen konnten. Ebenfalls vergleichbar ist dieses Ergebnis mit einer Studie aus Asien, bei der auch eine Mutationsfrequenz von etwa 1% festgestellt wurde (Kim et al., 2014).

#### **5.4.2 Überlebensanalyse der FGFR3 Mutation S249C sowie Rolle der FGFR2 Spleißvarianten**

Bezüglich der prognostischen Bedeutung der Mutation S249C gibt es derzeit bei Plattenepithelkarzinomen wenige Informationen. Da sie als „Driver“-Mutation definiert wurde, könnte erwartet werden, dass bei Vorliegen dieser die Karzinogenese unterstützende Mutation ein Nachteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens entsteht. Hierzu ergab sich bei unserer Auswertung jedoch kein Hinweis: Die Patientin, an deren Tumormaterial die Mutation gefunden wurde, war zwar zum Operationszeitpunkt mit 64 Jahren 4 Jahre jünger als der Durchschnitt des Patientenkollektivs, jedoch konnte sie insgesamt 44 Monate nachbeobachtet werden und war zum Stichtag am 01.01.2014 am Leben, während etwa die Hälfte der Patienten ohne die Mutation S249C nach 44 Monaten Nachbeobachtungszeit bereits verstorben war. Auch die histopathologischen Daten wie der Tumorgrad G2 sowie das TNM-Stadium pT2a, pN0, cM0 ergaben keinen Hinweis, dass die Mutation S249C mit einem aggressiveren Tumor und damit einem prognostisch ungünstigeren Überlebenszeitraum in Zusammenhang steht. Eine allgemeine Aussage ist jedoch aufgrund der niedrigen Fallzahl sowie des Fehlens vergleichbarer Studien derzeit nur bedingt möglich.

Bei anderen Karzinomen wie den Urothelkarzinomen, die eine Mutationsfrequenz von S249C von bis zu 54% aufweisen, steht das Auftreten der Mutation S249C im Zusammenhang mit einer niedrigeren Progressionsrate des Tumors und scheint auch bei dieser Karzinomentität kein kürzeres Gesamtüberleben zu bedingen (Hernandez, 2006).

Im Zusammenhang mit der prognostischen Bedeutung der FGF-Rezeptoren bei Tumorerkrankungen spielen auch die beiden in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen Spleißvarianten des FGFR2 eine wichtige Rolle: Bei Karzinomen der Prostata und der Harnblase konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass es durch eine vermehrte Expression von FGFR2IIIb und einen Verlust der FGFR2IIIc Spleißvariante zunächst zum Proliferationsstopp der Tumorzellen kommt (Katoh, 2009; Turner and Grose, 2010). Auch konnte der potenziell antionkogene Effekt von FGFR2IIIb im Tierversuch indirekt bestätigt werden: Bei Mäusen, denen die Spleißvariante FGFR2IIIb in Keratinozyten fehlte, traten vermehrt Plattenepithelkarzinome der Haut auf (Turner and Grose, 2010). Im Gegensatz dazu wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von FGFR2IIIc und einem erhöhten invasiven Wachstum des Tumors und damit einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit des Tumors festgestellt (Katoh, 2009).

Dies zeigt, dass mutierte FGF-Rezeptoren in verschiedenster Weise Karzinogenese sowohl fördern als auch hemmen können. Eventuell besitzt auch der FGFR3 ein derartig bivalentes Wirkungsspektrum in der Karzinogenese, was erklären würde, weshalb eine in der Literatur eigentlich als „Driver“-Mutation charakterisierte Mutation bei Urothelkarzinomen und unseren Ergebnissen zufolge auch bei PEC der Lunge anscheinend keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hat. Diese Diskrepanz in der Rolle der FGFR3 Mutation S249C für die Karzinogenese und für die Prognose der Patienten sollte weiter untersucht und geklärt werden.

## 5.5 Amplifikationsanalyse im Gen des FGFR1

### 5.5.1 Methode zur Amplifikationsanalyse des FGFR1-Gens

Beim PEC der Lunge wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine Amplifikation des Chromosomenabschnitts 8p11 beobachtet (Dutt et al., 2011; Schildhaus et al., 2012). In diesem DNA-Abschnitt finden sich neben dem FGFR1-Gen drei weitere Gene. Dutt et al. (2011) und Weiss et al. (2010) konnten jedoch zeigen, dass besonders die Genamplifikation des FGFR1-Rezeptors Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von Zellen in vitro hat, und beide kamen zu dem Ergebnis, dass die Amplifikation des FGFR1-Gens relevant für das PEC der Lunge ist und dass die Amplifikation des FGFR1-Gens kennzeichnende Mutation für diese pulmonale Tumorsubgruppe ist (Dutt et al., 2011; Weiss et al., 2010).

Zum Nachweis dieser Genamplifikation kann als Methode u.a. ein SNP Array oder die FISH-Analyse verwendet werden: Weiss et al. (2010) führten ihre Untersuchungen parallel mit beiden Methoden durch und kamen zu dem Ergebnis, dass mithilfe der FISH-Analyse eine bessere Unterscheidung zwischen physiologischen Lungenzellen und Tumorzellen möglich ist und in der Gesamtbetrachtung die auch von uns in der vorliegenden Arbeit verwendete FISH Analyse eine zuverlässige Nachweismethode der FGFR1-Genamplifikation darstellt (Weiss et al., 2010).

Im Rahmen der FISH Untersuchung können verschiedene Sonden zum Nachweis der FGFR1-Genamplifikation verwendet werden: Die in dieser Arbeit verwendete Sonde markiert sowohl den das FGFR1-Gen umfassenden DNA-Abschnitt als auch das Centromer des Chromosoms 8. Dies ermöglicht die Berechnung des FGFR1/CEN8 Quotienten, der sich bei der Detektion von FGFR1-Genamplifikationen als sensitiver und spezifischer Parameter für den Nachweis der FGFR1-Genamplifikation erwiesen hat (Jiang et al., 2015; Schildhaus et al., 2012). Aus diesem Grund wurden die von Schildhaus et al. (2012) aufgestellten Bewertungskriterien, die auf der Bestimmung dieses FGFR1/CEN8 Quotienten basieren, zur Auswertung unserer Schnitte herangezogen. Weiss et al. (2010) konnten eine erhöhte Proteinkonzentration von FGFR1 in den Zellen nachweisen, an denen mithilfe der FISH-Analyse die Diagnose der FGFR1-Amplifikation gestellt wurde. Sie bewiesen damit die Sensitivität der FISH-Analyse zum Nachweis der FGFR1-Amplifikation.

### 5.5.2 Vergleichs- und Überlebensanalyse im Rahmen der Amplifikationsanalyse des FGFR1-Gens

Im Rahmen unserer Untersuchung von 101 Plattenepithelkarzinomen der Lunge auf eine Amplifikation des FGFR1-Gens ergab sich eine Amplifikationsrate von 21,78%. Weltweit wurden bei gleichartigen Untersuchungen an PEC der Lunge Amplifikationsraten des FGFR1-Gens von 9,7% bis 32% festgestellt (Dutt et al., 2011; Heist et al., 2012; Jiang et al., 2015; Schildhaus et al., 2012; Wang et al., 2015). Zusätzlich erfolgte bei einigen Arbeitsgruppen die Unterteilung in „low“ und „high“ Amplifikation: Bei Schildhaus et al. (2012) setzte sich die Amplifikationsrate von 20% aus 16% Fällen mit hoher und 4% niedriger Amplifikationsrate zusammen, bei unseren Untersuchungen ergab sich eine Aufteilung der 21,78% in 7,9% mit niedrigem und 13,9% mit hohem Amplifikationsgrad. Aufgrund unserer relativ kleinen Fallzahl wurde für die Vergleichs- und Überlebensanalyse auf eine Auftrennung der Fälle gemäß ihres Amplifikationsgrads verzichtet. Insgesamt können unsere Ergebnisse der FGFR1-Genamplifikationsfrequenz in der Gesamtschau der aktuellen Datenlage als vergleichbar angesehen werden.

Mit knapp 22% trat bei den vorliegenden Untersuchungen die FGFR1-Amplifikation bei Männern und Frauen mit gleicher Häufigkeit auf: Es gab demnach keinen Zusammenhang zwischen Geschlecht und FGFR1-Genamplifikation. Während mehrere Einzelstudien diesen Aspekt bestätigen (Dutt et al., 2011; Heist et al., 2012; Kim et al., 2014), kommen Xie et al. (2016) in einer Metaanalyse zu dem Ergebnis, dass FGFR1-Genamplifikation sowohl bei NSCLC allgemein als auch bei SCC signifikant häufiger bei Männern auftritt als bei Frauen. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte einerseits die im Vergleich zur Metaanalyse niedrige Fallzahl unserer Studie sein, andererseits entstammen mehr als die Hälfte der in dieser Metaanalyse zusammengefassten Studien dem außereuropäischen Raum, sodass bezüglich der geschlechtsabhängigen FGFR1-Genamplifikationsinzidenz evtl. auch ethnische Einflüsse ursächlich sein könnten (Xie et al., 2016).

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ist die Datenlage bei der Vergleichsanalyse bezüglich der histologischen Subtypen des PEC, des pT-, pN-, cM- Stadiums, der Stadiengruppen sowie des Tumorgradings: Zwischen diesen Parametern und der FGFR1-Genamplifikation scheint kein signifikanter Zusammenhang zu bestehen (Dutt et al., 2011; Heist et al., 2012; Kim et al., 2014; Wang et al., 2015; Xie et al., 2016).

Hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen der FGFR1-Amplifikation und der Tumorlokalisation sowie der p40 Immunreaktivität liegen derzeit keine Daten vor; von uns wurde hier kein statistischer Zusammenhang festgestellt. Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse, dass die Auftrittshäufigkeit von Tumoren mit FGFR1-Genamplifikation in den Oberlappen fast doppelt so hoch ist wie in anderen Lungenarealen.

Beim Vergleich des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Operation wurde von uns ein signifikanter Unterschied nachgewiesen zwischen Patienten mit FGFR1-Genamplifikation, die im Median bei Operation 65,21 Jahre alt waren, und den Patienten ohne Amplifikation, bei denen ein Durchschnittsalter von 69,42 Jahren errechnet wurde. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Monaco et al. (2016), die ihrerseits einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Alters ausmachen konnten: Das Durchschnittsalter betrug in ihrem Kollektiv bei Patienten mit FGFR1-Genamplifikation 65 Jahre sowie 69 Jahre bei Patienten ohne FGFR1-Amplifikation (Monaco et al., 2016). Bei anderen Studien konnte dahingehend kein Unterschied ausgemacht werden, allerdings wurde von den anderen Arbeitsgruppen nicht das Durchschnittsalter errechnet, sondern Patienten in Altersgruppen älter/jünger als 60 Jahre eingeteilt, womit bei diesen Studien nur ein grober Altersvergleich durchgeführt wurde (Xie et al., 2016).

Auffallend war weiterhin, dass sich bei unserem Kollektiv trotz des durchschnittlich früheren Operationszeitpunktes der Patienten mit FGFR1-Amplifikation das mediane Todesalter im Vergleich zu Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation mit knapp 71 und 72,5 Jahren kaum unterschied. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die FGFR1-Genamplifikation zwar einerseits mit früherer Tumorentstehung in Verbindung steht, andererseits jedoch über verschiedene Mechanismen ein im Vergleich zum nicht amplifizierten FGFR1-Gen längeres Überleben nach Diagnosestellung bedingt. Ein möglicher Mechanismus stellt eine höhere Sensibilität für Chemotherapeutika bei Vorliegen einer FGFR1-Amplifikation dar: Kim et al. (2013) zeigten, dass bei gleicher Therapie von Patienten mit und ohne FGFR1-Genamplifikation eine adjuvante Chemotherapie bei FGFR1-Amplifikation zu einem signifikant längeren Gesamtüberleben führt. Um diesen Aspekt genauer untersuchen zu können, sollte in weiteren Studien auch die Therapie der Patienten in die Auswertung mit einbezogen werden, was bei unserer Studie mangels Patientendaten nicht in validem Ausmaß berücksichtigt werden konnte.

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von knapp 60% waren in unserem Patientenkollektiv 20% mehr Patienten mit FGFR1-Genamplifikation im Vergleich zu Patienten ohne FGFR1-

Genamplifikation nach 5 Jahren noch am Leben, ein signifikanter Zusammenhang von FGFR1-Genamplifikation und erhöhter 5-Jahres-Überlebensrate ergab sich nicht. Bei einem Teil der aktuell vorliegenden Studien wurde hingegen bei jeweiliger Betrachtung der kompletten Patientenkollektive ein für Patienten mit FGFR1-Genamplifikation ungünstigeres Gesamtüberleben festgestellt (Kim et al., 2014; Weiss et al., 2010), in Zusammenschau weltweiter Studien, darunter auch die Studien von Weiss et al. (2010) sowie Kim et al. (2014), wurde jedoch wiederum kein Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens gefunden. Aufgrund der Tatsache, dass ihre Daten auf Untersuchungen an sämtlichen Subtypen nicht kleinzelliger Lungenkarzinome basieren, wurde die Studie von Tran et al. (2013) nicht in diese Metaanalyse für PEC mit aufgenommen: Seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die FGFR1-Genamplifikation bei NSCLC mit einem signifikant höheren mittleren Gesamtüberleben verbunden ist (Tran et al., 2013).

Für weitere Überlebensanalysen ist deshalb eine strikte Trennung der Großgruppe der Lungenkarzinome in ihre einzelnen histologischen Subtypen zu fordern, um die prognostische Bedeutung der FGFR1-Genamplifikation bei Lungenkarzinomen differenzierter darstellen zu können.

Bei geschlechtergetrennter Überlebensanalyse ergab sich bei uns für die Gruppen der männlichen Patienten in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens. In der Gruppe der Frauen war die FGFR1-Amplifikation jedoch mit einem signifikant längeren Gesamtüberleben verknüpft: Keine der fünf Frauen mit FGFR1-Genamplifikation ist innerhalb der Nachbeobachtungszeit verstorben. Bei dem Vergleich der beiden Frauengruppen untereinander konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden zwischen FGFR1-Genamplifikation und Parametern, die das Gesamtüberleben möglicherweise begünstigen, wie dem Tumorstadium pT1-2 oder den Stadiengruppen I-II. Die Verteilung der klinisch-histologischen Parameter in der Gruppe der weiblichen Patienten mit FGFR1-Genamplifikation gestaltete sich als sehr heterogen: Hinsichtlich des Tumorgradings wurden 3 Fälle dem Grad 3 zugeteilt und 2 Fälle Grad 2; bezüglich der Histologie handelte es sich um ein verhornendes PEC und 4 nicht verhornende PEC, und die Aufteilung nach dem pT-Stadium ergab einen pT1b, einen pT2b und einen pT3 Fall sowie zwei pT4 Fälle. Somit wurden 3 der betrachteten 5 Fälle in die durch fortgeschrittenes Tumorwachstum charakterisierte Tumorgruppe pT3-T4 und 2 der 5 Fälle der Stadiengruppe III-IV zugeordnet. Mit Blick auf die histopathologischen Parameter handelte es sich bei der Gruppe der Patientinnen mit FGFR1-Genamplifikation demnach um eine heterogen zusammengesetzte Fallgruppe, in der Patientinnen mit sowohl frühen als auch

fortgeschrittenen Tumorstadien eingeschlossen waren.

Hinsichtlich des Alters bei Operation existierte zwischen Patientinnen mit und ohne FGFR1-Genamplifikation ein nicht signifikanter Unterschied von etwa 9 Jahren. Dies könnte zumindest teilweise erklären, weshalb keine Patientin mit FGFR1-Genamplifikation in einem Nachbeobachtungszeitraum von bis zu 5 Jahren verstorben ist. Dass die beiden Frauen, die der Prognosegruppe IIIa und IV zugeteilt wurden und dadurch eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 40% bzw 1,6% hätten (Cetin et al., 2011), mit 64,35 sowie 65,35 Monaten bereits länger als fünf Jahre überleben, zeigt jedoch andererseits, dass die Amplifikation des FGFR1-Gens bei unserem Kollektiv keinen prognostisch ungünstigen Faktor für das Gesamtüberleben von Frauen darstellt. Wie in Kapitel 4.1.2.3. beschrieben, hatten im Gegensatz zu den Männern das pT-Stadium und die Stadiengruppen bei Frauen hinsichtlich des Gesamtüberlebens keine prognostische Bedeutung: Es ergab sich kein signifikanter Überlebensunterschied zwischen pT1-2 und pT3-4 bzw. Stadium I-II sowie III-IV. Daher konnten pT-Stadium und Stadiengruppierung als Prognosefaktoren bei Frauen unseres Kollektivs nicht angewendet werden. Aufgrund des als äußerst günstig beschriebenen Überlebensverlaufs für Frauen mit FGFR1-Genamplifikation im Vergleich zu Frauen ohne FGFR1-Genamplifikation könnte die FGFR1-Genamplifikation als möglicher Einflussfaktor angesehen werden. Derzeit liegen allerdings keine uns bekannten Studien vor, in deren Rahmen die prognostische Bedeutung von FGFR1-Amplifikationen bei PEC der Lunge geschlechtergetrennt betrachtet wurde, weshalb hier keine Gegenüberstellung zu bisherigen Ergebnissen erfolgen kann. Angesichts der kleinen Fallzahl (n=5) sowie des Altersunterschieds muss der hier dargestellte Überlebensvorteil für Frauen bei Vorliegen der FGFR1-Genamplifikation an größeren Fallzahlen weiter analysiert werden.

Neben dem Geschlecht wurden von uns auch Histologie, Grading, Tumorlokalisierung, p40 Immunreaktivität, pT-, pN- und cM-Stadium sowie die Stadien jeweils in 2 Untergruppen aufgeteilt und der Einfluss der FGFR1-Amplifikation auf das Überleben der jeweiligen Untergruppen untersucht. Eine Überlebensanalyse unter diesen Voraussetzungen ist derzeit nur für die Unterteilung in Stadiengruppen in der Literatur dokumentiert, weshalb hier aktuell bei allen anderen Parametern keine Vergleiche durchgeführt werden können.

Bezüglich der Histologie ergab sich kein signifikanter Unterschied bei Patienten mit und ohne FGFR1-Amplifikation bei Vorliegen eines verhornenden PEC. Hingegen zeigte sich ein nicht signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit FGFR1-Genamplifikation und nicht verhornendem PEC. Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, gilt das verhornende PEC als

prognostisch günstiger als das nicht verhornende PEC; demnach scheint die FGFR1-Amplifikation auch im Bereich der Histologie einen günstigeren Verlauf für Patienten zu bedingen, die eigentlich von einem hinsichtlich des Überlebens ungünstigeren histologischen Subtyp betroffen sind.

Hinsichtlich des Tumorgradings, der Tumorlokalisation, der p40 Immunreaktivität sowie dem pN-Stadium ergaben sich keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Subgruppen für das Überleben in Abhängigkeit des FGFR1-Amplifikationsstatus.

Bei Betrachtung des pT-Stadiums konnte jedoch ein deutlicher Überlebensvorteil für Patienten mit FGFR1-Amplifikation bei Vorliegen eines fortgeschrittenen Tumorstadiums pT3-4 festgestellt werden. Mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 65% war in unserem Kollektiv für Patienten mit pT-Stadium pT3-4 und gleichzeitiger FGFR1-Genamplifikation die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit um 5% höher im Vergleich zu Patienten mit einem pT-Stadium 1, die in unserer Studie eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von knapp 60% aufwiesen.

Ähnliches konnte bei Analyse des cM-Stadiums festgestellt werden: Patienten ohne Fernmetastasen des Tumors unterschieden sich im Überleben in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus nicht signifikant, allerdings konnte tendenziell ein Überlebensvorteil bei Vorliegen der FGFR1-Genamplifikation beobachtet werden. Deutlicher wird dieser Unterschied hinsichtlich des Überlebens bei Untersuchung der Patienten mit Fernmetastasen: Beim PEC der Lunge weisen Patienten mit Fernmetastasierung (cM1) generell eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 1,6% auf. In unserem Kollektiv waren alle Patienten der Gruppe cM1, die keine FGFR1-Amplifikation aufwiesen, innerhalb von 21 Monaten verstorben. Bei zwei Patienten mit Fernmetastasen wurde eine FGFR1-Amplifikation gefunden: Beide Patienten waren zum Stichtag am Leben und hatten eine Nachbeobachtungszeit von 65,35 Monaten bzw. 33,15 Monaten. Dies zeigt auch hier einen möglichen, durch die FGFR1-Genamplifikation bedingten Überlebensvorteil bei fortgeschrittenem Tumorstadium, das hier durch das Vorhandensein von Fernmetastasen definiert ist.

Neben dem pN-Stadium bilden das pT-Stadium sowie das cM0-Stadium die Faktoren für die Einteilung der Patienten in die Stadiengruppen. Dies erklärt, weshalb sich auch bei Betrachtung der Stadiengruppen der beschriebene Trend fortsetzte: In der Stadiengruppe I-II ergab sich kein Unterschied im Überleben von Patienten mit und ohne FGFR1-Amplifikation.

Hingegen zeigte sich in den Stadiengruppen III-IV ein signifikanter Überlebensunterschied für Patienten mit FGFR1-Amplifikation. Bei dem Vergleich der Patienten der Stadiengruppe III-IV mit und ohne FGFR1-Amplifikation wurden hinsichtlich der klinisch-histopathologischen Standardparameter keine signifikanten Unterschiede gefunden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sich beide Gruppen hinsichtlich Geschlecht, Histologie, Tumorgrading und pT-pN-cM-Stadium nicht unterscheiden. Einzig die Betrachtung der Tumorlokalisation und des Überlebensstatus zum 01.01.2014 ergab einen signifikanten Unterschied: Bei Vorliegen einer FGFR1-Amplifikation waren die Tumore signifikant häufiger in der rechten Lunge gelegen und signifikant mehr Patienten mit FGFR1-Amplifikation waren zum Stichtag noch am Leben, was das Ergebnis der beschriebenen Überlebensanalyse unterstreicht. Eine Studie, die hinsichtlich des Überlebens ein ähnliches Ergebnis zeigen konnte, wurde von Heist et al. (2012) durchgeführt: Sie stellten fest, dass sich das Gesamtüberleben von Patienten der Stadiengruppe I-II in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus nicht unterscheidet, hingegen ergab sich auch in ihrer Studie, dass in der Stadiengruppe III-IV ein fast signifikanter Überlebensvorteil von Patienten mit FGFR1-Amplifikation besteht. Sowohl in der vorgestellten Studie von Heist et al. (2012) als auch in unserer Studie muss dieses Ergebnis mit Bedacht betrachtet werden, da die Fallzahlen der Patienten der Stadiengruppe III-IV mit gleichzeitiger FGFR1-Amplifikation mit n=9 bei uns sowie n=10 bei Heist et al. (2012) gering sind. Dennoch zeigt sich eindeutig, dass die FGFR1-Amplifikation bei Patienten mit PEC der Lunge kein kürzeres Überleben bedingt, sondern besonders bei fortgeschrittenen Tumorstadien mit längerem Gesamtüberleben der Patienten einhergeht.

## **5.6 Zusammenfassung und Ausblick: Prognosefaktoren beim PEC der Lunge**

### **5.6.1 Klinisch-histologische Prognosefaktoren**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten mit reseziertem PEC der Lunge eine stadienunabhängige 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 46,7% aufweisen. Als für die Prognose des Gesamtüberlebens günstiger Faktor zeigte sich bei unserem Kollektiv das Vorliegen von verhornenden Plattenepithelkarzinomen. Weiterhin waren die früheren Tumorstadien pT1-2 sowie die Stadiengruppen I-II bei unserem Kollektiv mit längerem Gesamtüberleben verknüpft und können demnach, wie bereits in der Literatur von Kadota et al. (2014), Pilotto et al. (2015) und Weichert et al. (2015) festgehalten, als günstige Prognosefaktoren angesehen werden. Bei geschlechtergetrennter Betrachtung trafen diese Faktoren als prognostisch bedeutsam für die männlichen Patienten zu, während für Frauen kein klinisch-histologischer Standardparameter Prognosepotenzial zeigte. In der Gruppe der männlichen Patienten konnte hingegen zusätzlich zu den beschriebenen Faktoren die Tumorlokalisation in der rechten Lunge als günstiger Prognosemarker ausgemacht werden.

Die p40 Immunreaktivität betreffend, wurde im gesamten Patientenkollektiv bei der durch die Literatur vorgegebene Unterteilung in vier Immunreaktivitätsgruppen keine prognostische Bedeutung gefunden. Allerdings war eine hohe Expression des durch den Antikörper p40 angefärbten  $\Delta$ Np63 Proteins mit einem tendenziell längeren Gesamtüberleben verbunden, weshalb festzuhalten ist, dass die Expression des Proteins  $\Delta$ Np63 in unserem Kollektiv keinen ungünstigen, sondern einen eher günstigen Prognosefaktor für Patienten mit PEC der Lunge darstellte.

### **5.6.2 Molekularbiologische Prognosefaktoren**

Bei der Punktmutationsanalyse der Gene für FGFR2 und 3 wurde die Mutation S249C im Gen für FGFR3 an einer Tumorprobe nachgewiesen. Es zeigte sich weder ein Überlebensvorteil noch ein Überlebensnachteil der Patientin, sodass keine sichere Beurteilung zur prognostischen Bedeutung dieser Mutation gegeben werden kann. Jedoch ergibt sich aus der Überlebensanalyse der betroffenen Patientin, die mit einem Überleben von mindestens 44 Monaten fast 50% der Patienten ohne S249C Mutation überlebt hat, kein Hinweis dafür, dass die in der Literatur als „Driver“-Mutation des PEC der Lunge angesehene Mutation S249C

(Liao et al., 2012) einen prognostisch ungünstigen Prognosemarker darstellt. Wie oben dargelegt, korreliert unser Ergebnis hinsichtlich der S249C Mutation des FGFR3-Gens mit den Ergebnissen von Überlebensanalysen bei anderen Karzinomen wie dem Urothelkarzinom (Hernandez, 2006).

Bei der FGFR1-Genamplifikationsanalyse konnten 22 Fälle mit FGFR1-Genamplifikation gefunden werden. Nach den Ergebnissen der aktuellen Literatur ist die FGFR1-Amplifikation bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge bei Betrachtung aller Patienten mit einem reduzierten Gesamtüberleben verbunden (Wang et al., 2015; Xie et al., 2016); im Rahmen unserer Überlebensanalysen konnten wir weder einen signifikanten Überlebensvorteil noch Überlebensnachteil bei Vorliegen einer FGFR1-Genamplifikation feststellen. Jedoch war die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit der 22 Patienten mit FGFR1-Genamplifikation etwa 20% höher im Vergleich zu Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation. Gleichzeitig ergab sich aus unseren Daten, dass Patienten mit FGFR1-Genamplifikation einen früheren Tumorresektionszeitpunkt und damit evtl. auch einen früheren Krankheitsbeginn aufwiesen, das Sterbealter aber vergleichbar mit dem der Patienten ohne FGFR1-Genamplifikation war. Beide Ergebnisse lassen vermuten, dass die FGFR1-Genamplifikation generell mit einem Überlebensvorteil der betroffenen Patienten verbunden ist.

Bei der geschlechtergetrennten Betrachtung wurde deutlich, dass die FGFR1-Genamplifikation für Frauen einen prognostisch günstigen Faktor darstellen kann, während sich für Männer kein Unterschied hinsichtlich des Überlebens in Abhängigkeit vom FGFR1-Amplifikationsstatus ergab. Obwohl die Fallzahl der jeweiligen Patientinnengruppe klein war, zeigte sich, dass Frauen mit fortgeschrittenem Tumorstadium und FGFR1-Amplifikation im Vergleich mit Patientinnen des gleichen Tumorstadiums ohne FGFR1-Amplifikation eine signifikant längere Gesamtüberlebenszeit aufwiesen.

Die Hypothese, dass eine FGFR1-Genamplifikation besonders im fortgeschrittenen Tumorstadium prognostische Bedeutung erlangt (Heist et al., 2012), konnte bei der Überlebensanalyse des pT-Stadiums sowie der einzelnen Stadiengruppen auch an unserem gesamten Patientenkollektiv bestätigt werden: Der Unterschied zwischen Patienten der Stadiengruppe III-IV mit und ohne FGFR1-Genamplifikation hinsichtlich des Gesamtüberlebens war signifikant ( $p=0,006$ ). Hierbei wiesen Patienten mit FGFR1-Genamplifikation, die gemäß ihres Tumorstadiums der Stadiengruppe III-IV zugeteilt waren, eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von mehr als 70% auf, wohingegen ein solcher Wert für die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge eigentlich nur annähernd bei der Stadiengruppe I zu erwarten wäre (Kadota et al., 2014).

Auf welche Weise die FGFR1-Genamplifikation diesen prognostisch günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten ausübt, ist derzeit offen: Es könnten hier einerseits direkte Wirkungen des FGFR1 auf die Proliferation von Tumorzellen eine Rolle spielen, andererseits könnte die FGFR1-Genamplifikation auch ein besseres Therapieansprechen bedingen. Interessant ist dabei die bereits dargelegte These von Heist et al. (2012) und Kim et al. (2013), die unabhängig voneinander einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer FGFR1-Genamplifikation und einem besseren Ansprechen auf eine adjuvante Cisplatin-basierte Chemotherapie beschrieben haben. Demnach sollte sowohl die Wirkung des amplifizierten FGFR1 auf Tumorzellen als auch der Zusammenhang zwischen Therapieerfolg und FGFR1-Genamplifikation besonders bei fortgeschrittenen Tumorstadien weiter untersucht und ausgewertet werden.

Als zusammenfassendes Ergebnis der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass die FGFR1-Genamplifikation bei Männern mit PEC keine prognostische Bedeutung besitzt, die FGFR1-Genamplifikation für Frauen keinen ungünstigen, sondern vielmehr einen günstigen Prognosefaktor darstellen kann und eine Amplifikation des Gens von FGFR1 für Patienten mit fortgeschrittenem Tumor der Stadien pT3-T4, des cM1-Stadiums sowie der Stadien-Gruppe III-IV einen für die Prognose der Gesamtüberlebenszeit günstigen Faktor darstellt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmad, I., Iwata, T., Leung, H.Y., 2012. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1823, 850–860.
- Albertson, D.G., 2006. Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* 22, 447–455.
- Ao, M.-H., Zhang, H., Sakowski, L., Sharma, R., Illei, P.B., Gabrielson, E., Askin, F., Li, Q.K., 2014. The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer. *Hum. Pathol.* 45, 926–934.
- Bishop, J.A., Teruya-Feldstein, J., Westra, W.H., Pelosi, G., Travis, W.D., Rekhtman, N., 2011. p40 ( $\Delta$ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod. Pathol.* 25, 405–415.
- Bizari, L., Silva, A.E., Tajara, E.H., 2006. Gene amplification in carcinogenesis. *Genet. Mol. Biol.* 29, 1–7.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U. (Eds.), 2001. *Pathologie*, 2. ed. Urban & Fischer, München Jena.
- Böhm, M., Hallek, M., Schmiegel, W., 2009. *Innere Medizin*, 6. Auflage. ed. Urban & Fischer, München.
- Burke, D., Wilkes, D., Blundell, T.L., Malcolm, S., 1998. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *Trends Biochem. Sciences* 59–62.
- Cetin, K., Ettinger, D.S., Hei, O'Malley, C., 2011. Survival by histologic subtype in stage IV nonsmall cell lung cancer based on data from the Surveillance, Epidemiology and End Results Program. *Clin. Epidemiol.* 139.
- Chang, S.Y., Keeney, M., Law, M., Donovan, J., Aubry, M.-C., Garcia, J., 2015. Detection of human papillomavirus in non-small cell carcinoma of the lung. *Hum. Pathol.* 46, 1592–1597.
- Chansky, K., Sculier, J.-P., Crowley, J.J., Giroux, D., Van Meerbeeck, J., Goldstraw, P., 2009. The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 4, 792–801.
- Damjanov, I., Fan, F., 2013. *Cancer Grading Manual*, 1. Auflage. ed. Springer Berlin-Heidelberg, Kansas.
- Davies, H., Hunter, C., Smith, R., Stephens, P., Greenman, C., Bignell, G., Teague, J., Butler, A., Edkins, S., Stevens, C., others, 2005. Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7591–7595.
- Di Martino, E., L'Hôte, C.G., Kennedy, W., Tomlinson, D.C., Knowles, M.A., 2009. Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signaling and cellular transformation in a cell type- and mutation-specific manner. *Oncogene* 28, 4306–4316.
- Dutt, A., Ramos, A.H., Hammerman, P.S., Mermel, C., Cho, J., Sharifnia, T., Chande, A., Tanaka, K.E., Stransky, N., Greulich, H., Gray, N.S., Meyerson, M., 2011. Inhibitor-Sensitive FGFR1 Amplification in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE* 6, e20351.
- Ehrenfels, Y., 2000. Mutationen in den“ fibroblast growth factor”(FGF)-Rezeptorgenen FGFR 1, 2 und 3 bei primären Craniosynostosen. Universitätsbibliothek Giessen.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I., Schlessinger, J., 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 139–149.
- Fan, X., Yu, K., Wu, J., Shao, J., Zhu, L., Zhang, J., 2015. Correlation between squamous cell carcinoma of the lung and human papillomavirus infection and the relationship to expression of p53 and p16. *Tumor Biol.* 36, 3043–3049.
- Goeckenjan, G., Sitter, H., Thomas, M., Branschoid, D., Flentje, M., Griesinger, F., Niederle, N., Stuschke, M., Blum, T., Deppermann, K.-M., Ficker, J., Freitag, L., Lübke, A.,

- Reinhold, T., Späth-Schwalbe, E., Ukena, D., Wickert, M., Wolf, M., Andreas, S., Auberger, T., Baum, R., Baysal, B., Beuth, J., Bickeböller, H., Böcking, A., Bohle, R., Brüske, I., Burghuber, O., Dickgreber, N., Diederich, S., Dienemann, H., Eberhardt, W., Eggeling, S., Fink, T., Fischer, B., Franke, M., Friedel, G., Gauler, T., Gütz, S., Hautmann, H., Hellmann, A., Hellwig, D., Herth, F., Heußel, C., Hilbe, W., Hoffmeyer, F., Horneber, M., Huber, R., Hübner, J., Kauczor, H.-U., Kirchbacher, K., Kirsten, D., Kraus, T., Lang, S., Martens, U., Mohn-Staudner, A., Müller, K.-M., Müller-Nordhorn, J., Nowak, D., Ochmann, U., Passlick, B., Petersen, I., Pirker, R., Pokrajac, B., Reck, M., Riha, S., Rübe, C., Schmitt, A., Schönfeld, N., Schütte, W., Serke, M., Stamatis, G., Steingraber, M., Steins, M., Stoelben, E., Swoboda, L., Teschler, H., Tessen, H., Weber, M., Werner, A., Wichmann, H.-E., Irlinger Wimmer, E., Witt, C., Worth, H., 2010. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. *Pneumologie* 64, e1–e164.
- Grose, R., Dickson, C., 2005. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 179–186.
- Hafner, C., Hartmann, A., 2010. R248C-FGFR3-Mutation: Einfluss auf Zellwachstum, Apoptose und Attachment in HaCaT-Keratinozyten. *Pathol.* 31, 221–224.
- Hammerman, P.S., Neil Hayes, D., Wilkerson, M.D., Schultz, N., Bose, R., Chu, A., Collisson, E.A., Cope, L., Creighton, C.J., Getz, G., Herman, J.G., Johnson, B.E., Kucherlapati, R., Ladanyi, M., Maher, C.A., Robertson, G., Sander, C., Shen, R., Sinha, R., Sivachenko, A., Thomas, R.K., Travis, W.D., Tsao, M.-S., Weinstein, J.N., Wigle, D.A., Baylin, S.B., Govindan, R., Meyerson, M., 2012. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489, 519–525.
- Heintz, N.H., Janssen-Heininger, Y.M.W., Mossman, B.T., 2010. Asbestos, Lung Cancers, and Mesotheliomas: From Molecular Approaches to Targeting Tumor Survival Pathways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 133–139.
- Heist, R.S., Mino-Kenudson, M., Sequist, L.V., Tammireddy, S., Morrissey, L., Christiani, D.C., Engelman, J.A., Iafrate, A.J., 2012. FGFR1 Amplification in Squamous Cell Carcinoma of The Lung: *J. Thorac. Oncol.* 7, 1775–1780.
- Hernandez, S., 2006. Prospective Study of FGFR3 Mutations As a Prognostic Factor in Nonmuscle Invasive Urothelial Bladder Carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 24, 3664–3671.
- Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Bertz, J., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wolf, U., 2010. Krebs in Deutschland 2009/2010 Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.
- Iwata, T., Uramoto, H., Sugio, K., Fujino, Y., Oyama, T., Nakata, S., Ono, K., Morita, M., Yasumoto, K., 2005. A lack of prognostic significance regarding  $\Delta Np63$  immunoreactivity in lung cancer. *Lung Cancer* 50, 67–73.
- Jain, D., Mathur, S.R., Guleria, R., Iyer, V.K., 2013. Utility and pattern of positivity of p40 in the diagnosis of squamous cell carcinoma of the lung by cytology: the first study on fine needle aspiration smears. *Cytopathology*.
- Jiang, T., Gao, G., Fan, G., Li, M., Zhou, C., 2015. FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma: A systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* 87, 1–7.
- Kaatsch, P., Spix, C., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Cernaj, J., Ernst, A., Folkerts, J., others, 2013. Krebs in Deutschland 2009/2010.
- Kadota, K., Nitadori, J., Woo, K.M., Sima, C.S., Finley, D.J., Rusch, V.W., Adusumilli, P.S., Travis, W.D., 2014. Comprehensive pathological analyses in lung squamous cell carcinoma: single cell invasion, nuclear diameter, and tumor budding are independent prognostic factors for worse outcomes. *J. Thorac. Oncol.* 9, 1126–1139.
- Katoh, 2009. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *Int. J. Mol. Med.* 23.

- Katoh, M., 2008. Cancer genomics and genetics of *FGFR2* (Review). *Int. J. Oncol.*
- Kievits, T., Dauwerse, J., Wiegant, J., Devilee, P., Breuning, M., Cornelisse, C., van Ommen, G., Pearson, P., 1990. Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.*
- Kim, H.R., Kim, D.J., Kang, D.R., Lee, J.G., Lim, S.M., Lee, C.Y., Rha, S.Y., Bae, M.K., Lee, Y.J., Kim, S.H., Ha, S.-J., Soo, R.A., Chung, K.Y., Kim, J.H., Lee, J.H., Shim, H.S., Cho, B.C., 2013. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene Amplification Is Associated With Poor Survival and Cigarette Smoking Dosage in Patients With Resected Squamous Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 731–737.
- Kim, Y., Hammerman, P.S., Kim, J., Yoon, J. -a., Lee, Y., Sun, J.-M., Wilkerson, M.D., Pdamallu, C.S., Cibulskis, K., Yoo, Y.K., Lawrence, M.S., Stojanov, P., Carter, S.L., McKenna, A., Stewart, C., Sivachenko, A.Y., Oh, I.-J., Kim, H.K., Choi, Y.S., Kim, K., Shim, Y.M., Kim, K.-S., Song, S.-Y., Na, K.-J., Choi, Y.-L., Hayes, D.N., Kim, J., Cho, S., Kim, Y.-C., Ahn, J.S., Ahn, M.-J., Getz, G., Meyerson, M., Park, K., 2014. Integrative and Comparative Genomic Analysis of Lung Squamous Cell Carcinomas in East Asian Patients. *J. Clin. Oncol.* 32, 121–128.
- Kinoshita, T., Ohtsuka, T., Hato, T., Goto, T., Kamiyama, I., Tajima, A., Emoto, K., Hayashi, Y., Kohno, M., 2014. Prognostic Factors Based on Clinicopathological Data Among the Patients with Resected Peripheral Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *J. Thorac. Oncol.* 9, 1779–1787.
- Kleihues, P., Cavenee, W.K., International Agency for Research on Cancer (Eds.), 2000. Pathology and genetics of tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, World Health Organization classification of tumours. IARC Press, Lyon.
- Knights, V., Cook, S.J., 2010. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* 125, 105–117.
- Koh, J., Go, H., Kim, M.-Y., Jeon, Y.K., Chung, J.-H., Chung, D.H., 2014. A comprehensive immunohistochemistry algorithm for the histological subtyping of small biopsies obtained from non-small cell lung cancers. *Histopathology* 65, 868–878.
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–1291.
- Lang, G., 2006. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, 1. Auflage. ed. Springer, Wien.
- Liao, R.G., Jung, J., Tchaicha, J., Wilkerson, M.D., Sivachenko, A., Beauchamp, E.M., Liu, Q., Pugh, T.J., Pdamallu, C.S., Hayes, D.N., Gray, N.S., Getz, G., Wong, K.-K., Haddad, R.I., Meyerson, M., Hammerman, P.S., 2013. Inhibitor-Sensitive *FGFR2* and *FGFR3* Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 73, 5195–5205.
- Liao, R.G., Watanabe, H., Meyerson, M., Hammerman, P.S., 2012. Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Manag.* 1, 293–300.
- Lipp, H.P., Berger, B., Enkel, S., Grischke, E.M., Käfer, G., Mayer, F., Pakaki, N., Röcken, M., Schleicher, J., Sökler, M., 2008. Supportive Therapie bei Tumorerkrankungen.
- Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C. (Eds.), 2007. *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage. ed. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Majewski, I.J., Mittempergher, L., Davidson, N.M., Bosma, A., Willems, S.M., Horlings, H.M., de Rink, I., Greger, L., Hooijer, G.K., Peters, D., Nederlof, P.M., Hofland, I., de Jong, J., Wesseling, J., Kluin, R.J., Brugman, W., Kerkhoven, R., Nieboer, F., Roepman, P., Broeks, A., Muley, T.R., Jassem, J., Niklinski, J., van Zandwijk, N., Brazma, A., Oshlack, A., van den Heuvel, M., Bernards, R., 2013. Identification of recurrent *FGFR3* fusion genes in lung cancer through kinome-centred RNA sequencing: Kinase fusion genes in NSCLC. *J. Pathol.* 230, 270–276.
- Matsui, A., Ihara, T., Suda, H., Mikami, H., Semba, K., 2013. Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer. *Biomol. Concepts* 4.

- Mendez, P., Ramirez, J.L., 2013. Copy number gains of FGFR1 and 3q chromosome in squamous cell carcinoma of the lung. *Transl. Lung Cancer Res.* 2, 101.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 107–137.
- Monaco, S.E., Rodriguez, E.F., Mahaffey, A.L., Dacic, S., 2016. FGFR1 Amplification in Squamous Cell Carcinoma of the Lung with Correlation of Primary and Metastatic Tumor Status. *Am. J. Clin. Pathol.* 145, 55–61.
- Mühlhardt, C., 2000. *Der Experimentator: Molekularbiologie*, 2. Auflage. ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin.
- Nobre, A.R., Albergaria, A., Schmitt, F., 2013. p40: A p63 Isoform Useful for Lung Cancer Diagnosis - A Review of the Physiological and Pathological Role of p63. *Acta Cytol.* 57, 1–8.
- Ornitz, D.M., Itoh, N., 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2, 1–12.
- Paez, J.G.; Jänne, P.A.; Lee, J.C.; Tracy, S.; Greulich, H.; Gabriel, S.; Herman, P.; Kaye, F.J.; Lindeman, N.; Boggon, T.J.; Naoki, K.; Sasaki, H.; Fujii, Y.; Eck, M.J.; Sellers, W.R.; Johnson, B.E.; Meyerson, M., 2004. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* 304, 1497-1500.
- Pelosi, G., Pasini, F., Olsen Stenholm, C., Pastorino, U., Maisonneuve, P., Sonzogni, A., Maffini, F., Pruneri, G., Frassetta, F., Cavallon, A., Roz, E., Iannucci, A., Bresola, E., Viale, G., 2002. p63 immunoreactivity in lung cancer: yet another player in the development of squamous cell carcinomas? *J. Pathol.* 198, 100–109.
- Pelosi, G., Rossi, G., Cavazza, A., Righi, L., Maisonneuve, P., Barbareschi, M., Graziano, P., Pastorino, U., Garassino, M., de Braud, F., others, 2013.  $\Delta$ Np63 (p40) Distribution Inside Lung Cancer A Driver Biomarker Approach to Tumor Characterization. *Int. J. Surg. Pathol.* 21, 229–239.
- Pfannschmidt, J., Muley, T., Bülzebruck, H., Hoffmann, H., Dienemann, H., 2007. Prognostic assessment after surgical resection for non-small cell lung cancer: Experiences in 2083 patients. *Lung Cancer* 55, 371–377.
- Pilotto, S., Sperduti, I., Novello, S., Peretti, U., Milella, M., Facciolo, F., Vari, S., Leuzzi, G., Vavalà, T., Marchetti, A., Mucilli, F., Crinò, L., Puma, F., Kinspergher, S., Santo, A., Carbognin, L., Brunelli, M., Chilosi, M., Scarpa, A., Tortora, G., Bria, E., 2015. Risk Stratification Model for Resected Squamous-Cell Lung Cancer Patients According to Clinical and Pathological Factors. *J. Thorac. Oncol.* 10, 1341–1348.
- Powers, C.J., McLeskey, S.W., Wellstein, A., 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 7, 165–197.
- Robertson, S.C., Meyer, A.N., Hart, K.C., Galvin, B.D., Webster, M., Donoghue, D.J., 1998. Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain. *Med. Sciences.*
- Rössner, A., Pfeifer, U., Müller-Hermelink, H.K. (Eds.), 2008. *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie*, 11. Auflage. ed. Urban & Fischer, München.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354.
- Sasaki, H., 2011. Increased FGFR1 copy number in lung squamous cell carcinomas. *Mol. Med. Rep.*
- Schildhaus, H.-U., Heukamp, L.C., Merkelbach-Bruse, S., Riesner, K., Schmitz, K., Binot, E., Paggen, E., Albus, K., Schulte, W., Ko, Y.-D., others, 2012. Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high- and low-level FGFR1 amplification types in squamous cell lung cancer. *Mod. Pathol.* 25, 1473–1480.

- Seyffert, W. (Ed.), 2003. Lehrbuch der Genetik, 2. Auflage. ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin.
- Sos, M.L., Thomas, R.K., 2012. Genetic insight and therapeutic targets in squamous-cell lung cancer. *Oncogene* 31, 4811–4814.
- Stewart, B., Wild, C., 2014. World Cancer Report 2014.
- Storlazzi, C.T., Lonoce, A., Guastadisegni, M.C., Trombetta, D., D'Addabbo, P., Daniele, G., L'Abbate, A., Macchia, G., Surace, C., Kok, K., Ullmann, R., Purgato, S., Palumbo, O., Carella, M., Ambros, P.F., Rocchi, M., 2010. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: Origin and structure. *Genome Res.* 20, 1198–1206.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A., 2009. The cancer genome. *Nature* 458, 719–724.
- Tran, T.N., Selinger, C.I., Kohonen-Corish, M.R.J., McCaughan, B.C., Kennedy, C.W., O'Toole, S.A., Cooper, W.A., 2013. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) copy number is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 81, 462–467.
- Travis, W., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A., Nicholson, A., 2015. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon.
- Turner, N., Grose, R., 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 116–129.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115–e115.
- Wang, Y., Gao, W., Xu, J., Chen, X., Yang, Y., Zhu, Y., Yin, Y., Guo, R., Liu, P., Shu, Y., Liu, L., 2015. The Role of FGFR1 Gene Amplification as a Poor Prognostic Factor in Squamous Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of Published Data. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–10.
- Webster, M., Donoghue, D., 1997. FGFR Activation in skeletal disorders: too much of a good thing.
- Weichert, W., Kossakowski, C., Harms, A., Schirmacher, P., Muley, T., Dienemann, H., Warth, A., 2015. Proposal of a prognostically relevant grading scheme for pulmonary squamous cell carcinoma. *Eur. Respir. J.* ERJ-00937-2015.
- Weiss, J., Sos, M.L., Seidel, D., Peifer, M., Zander, T., Heuckmann, J.M., Ullrich, R.T., Menon, R., Maier, S., Soltermann, A., Moch, H., Wagener, P., Fischer, F., Heynck, S., Koker, M., Schottle, J., Leenders, F., Gabler, F., Dabow, I., Querings, S., Heukamp, L.C., Balke-Want, H., Ansen, S., Rauh, D., Baessmann, I., Altmüller, J., Wainer, Z., Conron, M., Wright, G., Russell, P., Solomon, B., Brambilla, E., Brambilla, C., Lorimier, P., Sollberg, S., Brustugun, O.T., Engel-Riedel, W., Ludwig, C., Petersen, I., Sanger, J., Clement, J., Groen, H., Timens, W., Sietsma, H., Thunnissen, E., Smit, E., Heideman, D., Cappuzzo, F., Ligorio, C., Damiani, S., Hallek, M., Beroukhi, R., Pao, W., Klebl, B., Baumann, M., Buettner, R., Ernestus, K., Stoelben, E., Wolf, J., Nurnberg, P., Perner, S., Thomas, R.K., 2010. Frequent and Focal FGFR1 Amplification Associates with Therapeutically Tractable FGFR1 Dependency in Squamous Cell Lung Cancer. *Sci. Transl. Med.* 2, 62ra93.
- Whitson, B., Groth, S., Andrade, R., Habermann, E., Maddaus, M., D'Cunha, J., 2012. T1/T2 non-small-cell lung cancer treated by lobectomy: Does tumor anatomic location matter? *JSR J. Surg. Res.*
- Wilkinson, D.G. (Ed.), 1992. In situ hybridization: a practical approach, The Practical approach series. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Wittekind, C., Meyer, H.-J., 2010. TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-VCH Verlag.

- Xie, F., Lu, H.-Y., Zheng, Q.-Q., Qin, J., Gao, Y., Zhang, Y.-P., Hu, X., Mao, W.-M., 2016. The clinical pathological characteristics and prognosis of FGFR1 gene amplification in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *OncoTargets Ther.* 171.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134.
- Ziegler, H., Stabenow Roland, Holleczeck, B., Stegmaier, C., 2009. EKRS Krebsatlas - Atlas der Inzidenz und Mortalität 1997-2006.

## 7 Publikationen

I) *Flockerzi F., Holleczek B., Langer F., Roggia C., Schöpe J., Bohle R.*

„Prognostic value of Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) 1 gene amplification and FGFR2/FGFR3 driver-mutations in patients with Squamous Cell Carcinoma (SCC) of the lung“

Abstract

Virchows Archiv (European Journal of Pathology)

Volume 469 Supplement 1 September 2016

II) *Flockerzi F., Holleczek B., Langer F., Roggia C., Schöpe J., Bohle R.*

„Prognostic value of Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) 1 gene amplification and FGFR2/FGFR3 driver-mutations in patients with Squamous Cell Carcinoma (SCC) of the lung“

Vortrag: Oral Free Paper Session, Thoracic Pathology

XXXI International Congress of the International Academy of Pathology (IAP) and the 28th Congress of the European Society of Pathology (ESP)  
(25-29 September 2016, Cologne, Germany)

III) „FGFR1 gene amplification as a potential favourable prognostic marker for women and patients with advanced cancer in Squamous Cell Carcinoma (SCC) of the lung“  
(Manuskript in Vorbereitung)

## 8 Dank

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. R. M. Bohle, Direktor des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die umfassende Betreuung und allzeitige Unterstützung sowohl in Theorie als auch Praxis.

Für die Einführung in das Thema und die Hilfe bei der Etablierung der molekularbiologischen Methoden danke ich Frau Dr. C. Roggia; für die Anleitung in molekularbiologischen Techniken, für die praktischen und theoretischen Hilfestellungen sowie die konstruktiven Ratschläge danke ich in besonderer Weise Frau J. Michaely.

Frau G. Walter, Frau N. Hollinger und Herrn M. Ertz danke ich für die Unterstützung und Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Mein Dank gilt weiterhin Frau C. Zaharia, Assistenzärztin für Pathologie, für die Hilfestellung bei der Auswertung der FISH-Untersuchung sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie des UKS für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäß-Chirurgie des UKS unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Schäfers sowie der Klinik für Innere Medizin Abteilung Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des UKS unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. R. Bals danke ich für die Bereitstellung der Patientendaten sowie die konstruktive Zusammenarbeit.

Frau C. Stegmaier, Leiterin des Krebsregisters des Saarlandes, sowie den Mitarbeiterinnen des Tumorzentrums des UKS sei für die Hilfe bei der Erhebung und Dokumentation der Patientenüberlebensdaten gedankt.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. S. Wagenpfeil, Direktor des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik des UKS, für die Bereitstellung der für die Statistik benötigten Software sowie bei Herrn M. Sc. J. Schöpe für die Hilfestellung im Rahmen meiner statistischen Auswertungen.

Besonderer Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung und die Ermöglichung des Studiums einschließlich dieser Dissertation.

## 9 Anhang

### I) TNM-Klassifikation und Stadiengruppen 7. Auflage

IASLC, UICC TNM 7. Auflage		
T-Primärtumor		
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
Tis		Carcinoma in situ
T1		Tumor bis 3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus bronchoskopisch frei
	T1a	Läsion bis 2cm
	T1b	Läsion größer 2cm bis 3cm
T2		Tumor > 3 cm ≤ 7 cm mit Befall von –Hauptbronchus ≥ 2 cm entfernt von Carina oder –viszeraler Pleura oder –Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
	T2a	Läsion bis 5cm
	T2b	Läsion größer 5 cm bis 7cm
T3		T2-Tumor größer als 7 cm Tumor jeder Größe mit Infiltration von – Brustwand oder – Zwerchfell oder – mediastinaler Pleura oder – parietalem Perikard Hauptbronchus ≤ 2 cm entfernt von Carina, Carina selbst frei Atelektase oder obstruktive Entzündung der ganzen Lunge getrennte Herde im gleichen Lungenlappen
T4		Tumor jeder Größe mit Infiltration von – Mediastinum oder – Herz oder – großen Gefäßen oder – Trachea oder – Ösophagus oder – Wirbelkörper oder – Carina Tumorherde in anderen Lungenlappen ipsilateral

(Goeckenjan et al., 2010)

IASLC, UICC TNM 7. Auflage		
N Regionäre Lymphknoten		
Nx		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		Metastasen in ipsilateralen peribronchialen Lymphknoten und/oder in ipsilateralen Hilus-Lymphknoten (einschließlich einer direkten Ausbreitung des Primärtumors)
N2		Metastasen in ipsilateralen, mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3		Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
M Metastasen		
Mx		Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0		keine Fernmetastasen
M1	M1a	Tumor mit malignem Pleura- oder Perikarderguss/ Tumorherde in der kontralateralen Lunge
	M1b	Fernmetastasen

(Goeckenjan et al., 2010)

Stadiengruppeneinteilung für Lungenkarzinome (UICC 7. Auflage)			
Okkultes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a, T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T2b	N0	M0
	T1a, T1b, T2a	N1	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadium IIIB	T4	N2	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

(Goeckenjan et al., 2010)

II) Färbeprotokoll Immunhistochemie p40/ $\Delta$ Np63, BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul

- 1 \*\*\*\*\* EZ Prep Auswählen \*\*\*\*\*
- 2 \*\*\*\*\* Getimete Schritte Starten \*\*\*\*\*
- 3 \*\*\*\*\* Mischer Aus \*\*\*\*\*
- 4 Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 5 EZPrep Vol. ausgleichen
- 6 Objektträger waschen
- 7 EZPrep Vol. ausgleichen
- 8 Objektträger waschen
- 9 EZPrep Vol. ausgleichen
- 10 Coverslip auftragen
- 11 Aufheizen des Objektträgers bis 76 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 12 Objektträger waschen
- 13 Deparaffinierung Vol. ausgleichen
- 14 Coverslip auftragen
- 15 Objektträger-Heizung ausschalten
- 16 \*\*\*\*\* Mischer An \*\*\*\*\*
- 17 [ Kurz- 8 Minuten Conditioning ]
- 18 Objektträger waschen
- 19 Cell Conditioner Nr.1 lang auftragen
- 20 Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
- 21 \*\*\*\*\* SSC Wash Auswählen \*\*\*\*\*
- 22 Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C, und für 8 Minuten inkubieren
- 23 [ Mild - 30 Minuten Conditioning ]
- 24 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 25 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 26 Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 27 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 28 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 29 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 30 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 31 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 32 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 33 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 34 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 35 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 36 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 37 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 38 [ Standard - 60 Minuten Conditioning ]
- 39 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 40 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 41 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 42 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 43 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 44 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 45 Cell Conditioner Nr.1
- 46 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 47 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 48 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 49 Cell Cond Nr.1 kurz auftragen
- 50 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 51 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 52 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)

- 53 Objektträger-Heizung ausschalten
- 54 Inkubieren für 8 Minuten
- 55 Spülen mit Reaktionspuffer
- 56 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 57 Coverslip auftragen
- 58 Spülen mit Reaktionspuffer
- 59 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 60 Coverslip auftragen
- 61 \*\*\*\*\* Synchronisieren der Prozeduren
- 62 Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 63 Spülen mit Reaktionspuffer
- 64 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 65 Coverslip auftragen
- 66 Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 67 Spülen mit Reaktionspuffer
- 68 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 69 Coverslip auftragen
- 70 \*\*\*\*\* Handauftrag (Primär Antikörper), und für 0 Stunden 44 Min inkubieren \*\*\*\*\*
- 71 Aufwärmen der Objektträger auf 37 °C
- 72 Spülen mit Reaktionspuffer
- 73 Zugabe von 200 ul + Volumenausgleich Reaktionspuffer
- 74 1 Tropfen UV Red UNIV MULT auftragen, Coverslip auftragen, und für 12 Minuten inkubieren.
- 75 Spülen mit Reaktionspuffer
- 76 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 77 Coverslip auftragen
- 78 Spülen mit Reaktionspuffer
- 79 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 80 Coverslip auftragen
- 81 Spülen mit Reaktionspuffer
- 82 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 83 1 Tropfen UV Red Enhancer auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
- 84 1 Tropfen UV Fast Red A und einen Tropfen UV Red Naphthol auftragen und für 8 Minuten inkubieren.
- 85 1 Tropfen UV Fast Red B auftragen, und für 8 Minuten inkubieren.
- 86 Spülen mit Reaktionspuffer
- 87 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 88 1 Tropfen von HAEMATOXYLIN II ( Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für 12 Minuten inkubieren.
- 89 Spülen mit Reaktionspuffer
- 90 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 91 Coverslip auftragen
- 92 Spülen mit Reaktionspuffer
- 93 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 94 1 Tropfen von BLUING REAGENT ( Nach-Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für 4 Minuten inkubieren.
- 95 Spülen mit Reaktionspuffer
- 96 Coverslip auftragen
- 97 Objektträger-Heizung ausschalten
- 98 \*\*\*\*\* Optionalen Waschvorgang Auswählen \*\*\*\*\*
- 99 \*\*\*\*\* SSC Wash Auswählen \*\*\*\*\*
- 100 \*\*\*\*\* Starten \*\*\*\*\*
- 101 Spülen mit Reaktionspuffer