



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Die Rolle des FGF – Rezeptors 4 bei Wachstum,
Überleben und Migration von Kolonkarzinomzellen

Verfasserin

Elisabeth Dietersdorfer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt.

A 0202697

Studienblatt:

Studienrichtung lt.

Anthropologie

Studienblatt:

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Brigitte Marian

DANKSAGUNG

Ich danke meiner Betreuerin Prof. Dr. Brigitte Marian, die diese Diplomarbeit durch ihre Geduld und wissenschaftliche Betreuung möglich gemacht hat.

Prof. Michael Miksche möchte ich danken, dass er es mir ermöglichte am Institut für Krebsforschung meine Arbeit zu verfassen.

Weiters möchte ich mich bei meinen Laborkolleginnen, insbesondere bei Christine und Xenia, für ihre Geduld und Hilfe bedanken.

Bei meiner Familie, besonders bei meiner Mama, bedanke ich mich für die liebevolle Unterstützung in den letzten Jahren, ohne der es mir nicht möglich gewesen wäre mein Studium erfolgreich zu beenden.

Zu guter Letzt, danke ich Dir, Michi, dafür, dass Du mich immer wieder aufgebaut und unterstützt hast und für mich da warst.

1. INHALTSVERZEICHNIS

1. INHALTSVERZEICHNIS.....	1
2. EINLEITUNG	6
2.1. Definition von Krebs.....	6
2.2. Epidemiologie	6
2.2.1. Epidemiologie der Krebserkrankung	6
2.2.2. Epidemiologie der Darmkrebserkrankung	7
2.3. Krebsentstehung.....	9
2.3.1. Mehrstufenprozess der Kanzerogenese.....	12
2.4. Darmkrebsentstehung.....	14
2.4.1. Dukes Klassifizierung.....	14
2.4.2. TNM-System.....	15
2.4.3. Tumorgenese in der Darmschleimhaut	17
2.5. Signalwege	18
2.5.1. Wnt Signalweg (kanonischer Signalweg)	18
2.5.2. Mapkinase Signalweg	21
2.5.3. Phosphoinositol3kinase Signalweg	22
2.6. Genetische Veränderungen bei Darmkrebs	23
2.6.1. Adenomatous Polyposis Coli (APC).....	24
2.6.2. RAS	25
2.6.3. p53.....	25
2.6.4. Deleted in colon cancer.....	26
2.7. Erbliche Formen der Kolonkrebserkrankung	26
2.7.1. FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis)	27

2.7.2. HNPCC (Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom) ..	28
2.8. Rolle der Neoangionese bei der Krebsentwicklung	29
2.9. Transforming Growth Factor β (TGF β)	30
2.10. Transforming Growth Factor α (TGF α)	30
2.11. Vascular Endothelial growth factor (VEGF)	31
2.12. Insulin-like Growth Factor (IGF)	32
2.13. Fibroblast Growth Factor (FGF)	33
2.13.1. Biologische Aufgaben des FGF	34
2.13.2. FGFs während der Entwicklung	34
2.13.3. Mutationen des FGF	35
2.14. Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)	36
2.14.1 FGFR und Krebs	36
2.14.2 FGFR und Darmkrebs	38
2.15. FGFR4	39
3. MATERIAL UND METHODEN	41
3.1. Zellkultur	41
3.1.1. Zellkultur – Materialien	41
3.1.2 Zelllinie	41
3.1.3. Colony Formation Assay	42
3.1.4. Filter Migration Assay	42
3.1.5. Soft Agar Assay	43
3.2. Protein Expression	44
3.2.1. FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting)	44
3.3. RNA – und DNA-Expression	45

3.3.1. RNA Isolation	45
3.3.2. cDNA – Synthese.....	46
3.3.5. PCR Arg338Gly Polymorphismus	47
3.3.6. Real time quantitative PCR	48
3.4. Transfektion	49
3.4.2. Lipofektion	49
4. ERGEBNISSE	50
4.1. Herstellung von FGFR4 – überexprimierenden Zelllinien.....	50
4.1.1. Expression auf DNA-Niveau	50
4.1.2. Protein – Expression.....	51
4.2. Biologische Konsequenzen der FGFR4 - Überexpression	52
4.2.1. Colony formation Assay	52
4.2.2. Filter migration Assay	53
4.2.3. Soft Agar Assay	54
5. DISKUSSION.....	55
5.1. Ziel der Arbeit	55
5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	55
5.3. FGFR4 in Diagnose und Therapie des Kolonkarzinoms.....	56
6. LITERATURVERZEICHNIS	58
7. ANHANG	80
7.1. Abkürzungsverzeichnis	80
7.2. Zusammenfassung	81
7.2.1. Zusammenfassung deutsch	81
7.2.2. Abstract.....	82

2. EINLEITUNG

2.1. Definition von Krebs

Die American Cancer Society definiert Krebs als eine Gruppe von Krankheiten, die charakterisiert ist durch unkontrolliertes Wachstum und der Verbreitung entarteter Zellen. Wenn die Ausbreitung unkontrolliert passiert, kann sie zum Tode führen.

2.2. Epidemiologie

2.2.1. Epidemiologie der Krebserkrankung

Laut WHO Cancer Report 2008 wird geschätzt, dass in diesem Jahr bei über 12 Millionen Menschen Krebs diagnostiziert wurde (WHO, cancer report 2008).

Das macht Krebs, nach kardiovaskulären Erkrankungen, zur zweithäufigsten zum Tode führenden Erkrankung weltweit (Abb.2.1, American Cancer Society, Jemal et al. 2010).

RANK	CAUSE OF DEATH	NUMBER OF DEATHS	PERCENT (%) OF TOTAL DEATHS	DEATH RATE*
	All Causes	2,423,712	100.0	760.2
1	Heart diseases	616,067	25.4	190.9
2	Cancer	562,875	23.2	178.4
3	Cerebrovascular diseases	135,952	5.6	42.2
4	Chronic lower respiratory diseases	127,924	5.3	40.8
5	Accidents (unintentional injuries)	123,706	5.1	40.0
6	Alzheimer disease	74,632	3.1	22.7
7	Diabetes mellitus	71,382	2.9	22.5
8	Influenza & pneumonia	52,717	2.2	16.2
9	Nephritis, nephrotic syndrome, & nephrosis	46,448	1.9	14.5
10	Septicemia	34,828	1.4	11.0
11	Intentional self-harm (suicide)	34,598	1.4	11.3
12	Chronic liver disease & cirrhosis	29,165	1.2	9.1
13	Essential hypertension & hypertensive renal disease†	23,965	1.0	7.4
14	Parkinson disease	20,058	0.8	6.4
15	Assault (homicide)	18,361	0.8	6.1
	All other & ill-defined causes	451,034	18.6	

*Rates are per 100,000 population and age adjusted to the 2000 US standard population.

†Includes primary and secondary hypertension.

Note: Percentages may not total 100 due to rounding. In accordance with the National Center for Health Statistics' cause-of-death ranking, "Symptoms, signs, and abnormal clinical or laboratory findings" and categories that begin with "Other" and "All other" were not ranked.

Source: US Mortality Data, 2007. National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention.

Abb.2.1. Die 15 am häufigsten zum Tode führenden Krankheiten in Amerika 2007 (American Cancer Society, 2010)

In den europäischen und amerikanischen Industrieländern hat Krebs die Infektionskrankheiten als häufigste Todesursache abgelöst. Daher wird Krebs oft als Zivilisationskrankheit der modernen Welt bezeichnet. Allerdings gehört Krebs auch in den 3. Welt Ländern zu den häufigsten Todesursachen; und das obwohl

Infektionskrankheiten, unter anderem auch HIV, durch die, im Vergleich zu den europäischen und amerikanischen Industrieländern, viel schlechteren hygienischen Bedingungen und auch Ressourcenknappheit eine große Rolle spielen und die Menschen in vielen Fällen nicht das entsprechend hohe Alter erreichen, in dem die meisten Krebsarten auftreten.

Es lässt also daraus schließen, dass Krebs durch bessere hygienische Bedingungen, ausreichende Ernährung und das, aus diesen Faktoren resultierende, höhere Alter, begünstigt wird.

Die effektivere Behandlung anderer Erkrankungen und die daraus resultierende Abnahme jener Erkrankungen trugen einen weiteren Teil dazu bei, eine höhere Lebenserwartung zu ermöglichen, und aus diesem Grund sind verschiedene Krebsraten deutlich angestiegen.

2.2.2. Epidemiologie der Darmkrebserkrankung

Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Ernährungsweise bei der Darmkrebsentstehung eine bedeutende Rolle spielen dürfte, insofern, dass übermäßiger Fett- und Fleischkonsum zu einer höheren Inzidenz für Darmkrebs führt. Vor allem rotes Fleisch soll die Entstehung von Darmkrebs begünstigen (Giovanucci, Willet, 1994). Ein ausreichendes Maß an Obst und Gemüse soll das Risiko senken. Unzureichende Bewegung und Rauchen können den Verlauf und die Entstehung ebenfalls negativ beeinflussen. So haben Übergewichtige Personen gegenüber normalgewichtigen Personen eine schlechtere Prognose.

Daher ist es nicht überraschend, dass sowohl in Österreich, als auch weltweit Kolonkarzinome zu den häufigsten Krebsarten nach Prostata-, Lungen- und Brustkrebs gehören (Abb.2.2). Darmkrebs kommt viel häufiger in Wohlstandsgesellschaften vor als in 3. Welt Ländern.

Daraus resultierend sind die Kolonkarzinomraten weltweit sehr unterschiedlich. Allerdings ist durch die zunehmende Anpassung des Lebensstils der Dritte-Welt-Länder an den der westlichen Industrieländer ein Anstieg der Darmkrebsrate in diesen Ländern zu verzeichnen.

Prinzipiell kann gesagt werden, dass Darmkrebs eine Erkrankung des höheren Alters ist und dementsprechend auch das Kolonkrebs – Risiko mit dem Alter ansteigt; ungefähr 91 % aller Menschen bei denen Kolonkrebs diagnostiziert wird sind über 50 Jahre alt. Das Risiko bis zum 75. Lebensjahr an Darmkrebs mit

EINLEITUNG

Todesfolge zu erkranken, ging in den letzten 20 Jahren von 2,0% auf 1,1% zurück (Östat AUSTRIA 2010). Diese Tatsache ist wohl darauf zurückzuführen, dass die Vorsorgeuntersuchungen immer ernster genommen werden und dadurch eine Früherkennung eher möglich ist. Außerdem haben sich die Untersuchungs- und Behandlungsmethoden weiterentwickelt. Dadurch wiederum können schon viele kolorektale Polypen entfernt werden bevor sie sich überhaupt zu Krebs weiterentwickeln können (Abb.2.3).

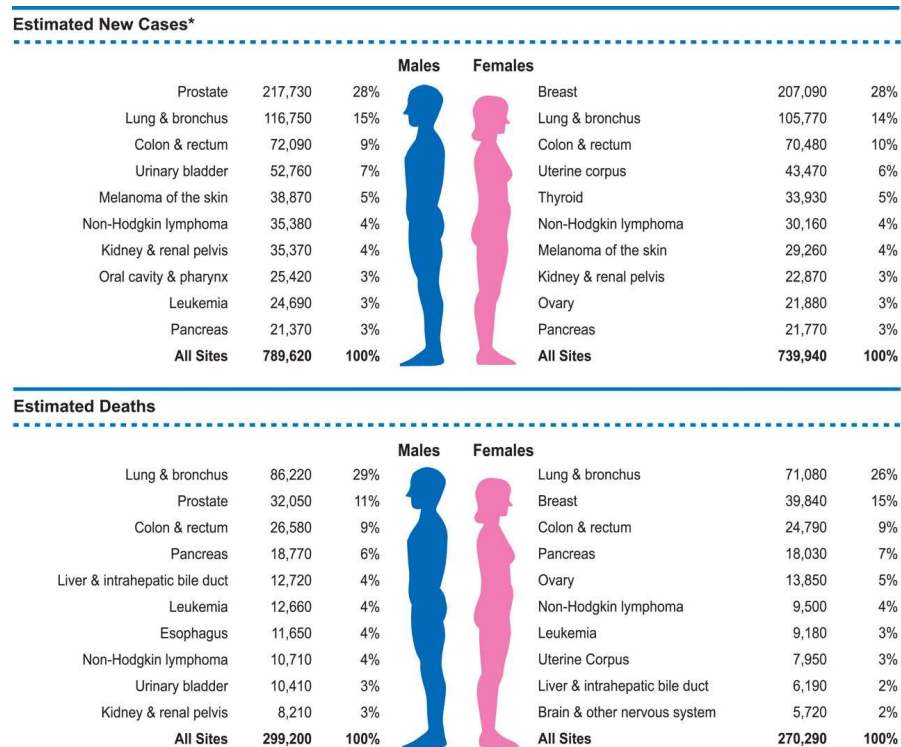


Abb.2. 3. Die häufigsten Arten neuer Krebsfälle und -tode nach Geschlecht, 2010 (American Cancer Society)

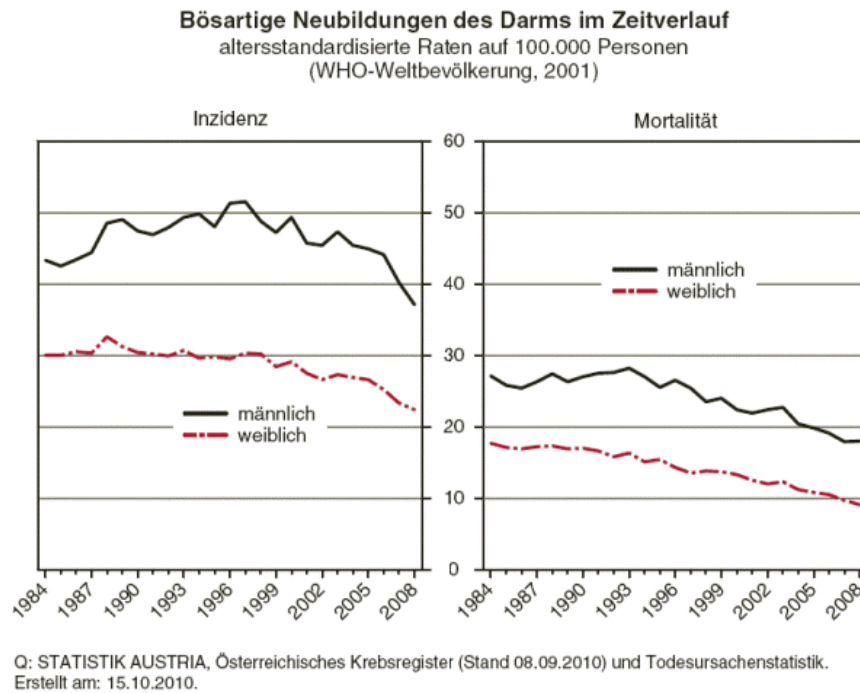


Abb.2.4. Bösartige Neubildungen des Darms von 1984-2008

2.3. Krebsentstehung

Krebs kann aufgrund genetischer Mutationen entstehen. Hannahan und Weinberg beschreiben in ihrem Artikel „Hallmarks of Cancer“ (Hannahan & Weinberg, 2000) typische Veränderungen in Zellen und Geweben die für die Entstehung von Krebs essentiell sind (Tab.2.1.):

Autarkie von Wachstumssignalen

**Unempfindlichkeit gegenüber
Wachstumshemmsignalen
Fähigkeit Apoptose zu umgehen**

uneingeschränktes Potential sich zu replizieren

ununterbrochene Angiogenese

lokale Invasion

Metastasierung

Tab.2.1. The Hallmarks of Cancer

1. Autarkie von Wachstumssignalen:

Diese Fähigkeit wurde als erste der 6 nachgewiesen. Es wurde eine gewisse Prävalenz an dominanten Onkogenen gefunden, die die Autarkie modulieren. Um von einem ruhenden zu einem aktiven Proliferationsstadium zu gelangen brauchen normale Zellen mitogene Wachstumssignale. Diese Signale werden über Transmembranrezeptoren die an Signalmoleküle (Wachstumsfaktoren) binden, ins Zellinnere übermittelt. Tumorzellen können ihre eigenen Wachstumsfaktoren herstellen und sind dadurch unabhängig von der Stimulation durch die normale Gewebs - Mikroumgebung. Viele Krebszellen erlangen die Fähigkeit Wachstumsfaktoren herzustellen, mit denen sie dann interagieren können. Dadurch entsteht ein positives feedback Signal – Loop, welches auch als autokrine Stimulation bezeichnet wird (*Fedi, Tronick, Aaronson, Growth factors in Cancer Medicine*).

Zelloberflächen–Rezeptoren werden während der Tumorphogenese häufig selbst dereguliert. Tyrosinkinaserzeptoren werden in Krebszellen häufig überexprimiert.

2. Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmsignalen:

Im gesunden Gewebe sorgen Antiproliferations – Signale für die Erhaltung von Gewebshomeostase und Zellruhe. Antiwachstums – Signale können die Proliferation auf 2 Arten verhindern: indem sie Zellen aus dem aktiven Proliferationszyklus in den ruhenden oder in den postmitotischen Zustand zwingen. Gerade entstehende Krebszellen müssen diesen Antiproliferationsignalen ausweichen um sich weiterzuentwickeln. Während der Kolon – Kanzerogenese dient die Inaktivierung des APC/ β -Catenin Signalwegs dazu, dass die Abwanderung der Enterozyten in die Krypten blockiert wird und in einen differenzierten, postmitotischen Zustand übergeht.

3. Fähigkeit Apoptose zu umgehen:

Die Fähigkeit von Tumorzellen ihre Zellzahl zu vergrößern wird nicht nur durch die Proliferationsrate sondern auch durch die Rate der Zellabnahme bestimmt. Apoptose, also programmierter Zelltod, ist eine Hauptursache der Zellabnahme. Das Programm zur Apoptose ist in latenter Form in allen Zelltypen im Körper vorhanden. Im Jahr 1972 entstand die Idee, dass Apoptose als Barriere gegen Krebs dienen könnte, als Kerr, Willie und Currie massive Apoptose in einer schnell wachsenden Zellpopulation beschrieben bei der hormonabhängige Tumore dem

Hormon – Verlust folgten (Behrens and Lustig 2004; Harris 1996; Hayflick 1997; Huelsken and Behrens 2002; Kerr et al. 1972; Kitaeva et al. 1997; Miyoshi et al. 1992; Rubinfeld et al. 1993; Shimokawa et al. 2003a; Sparks et al. 1998; Sporn 1996; Sporn 1997; Su et al. 1993). Resistenz gegen Apoptose kann auf unterschiedlichen Wegen von Krebszellen erreicht werden. Die häufigste Ursache den proapoptischen Regulator außer Kraft zu setzen ist eine Mutation des p53 – Tumorsuppressorgens. Dadurch wird sein Produkt, das p53 Protein, in mehr als 50% der Krebsarten, deaktiviert, was dazu führt, dass die Apoptose nicht induziert werden kann (Ornitz and Itoh 2001).

4. Uneingeschränktes Potential sich zu replizieren:

Viele Zellen im menschlichen Körper besitzen ein intrinsisches, zellautonomes Programm, das ihre Fähigkeit zur Vermehrung einschränkt. Dieses läuft unabhängig von Zell–Zell –Signalwegen ab. Zellkultur–Experimente zeigten, dass Zellen ein begrenztes Replikations – Potential haben. Nach einer Reihe von Verdopplungen hören die Zellen auf zu wachsen, ein Zustand der Seneszenz genannt wird. Viele Arten von Tumorzellen haben in Kultur das Potential sich scheinbar unendlich oft replizieren zu können, was zu der Annahme führt, dass die Zellen in vivo während der Tumorprogression auch dieses Potential haben, und dieses notwendig war um ihren malignen Zustand zu erreichen (Hayflick 1997).

.

5. Ununterbrochene Angiogenese:

Die Versorgung mit Blutgefäßen ist essentiell um das Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und so das Überleben der Zellen sicherzustellen. Der Prozess, neue Blutgefäße aus bereits bestehenden zu erzeugen, wird Angiogenese genannt. Man könnte annehmen, dass proliferierende Zellen die Fähigkeit besitzen das Wachstum von Blutgefäßen anzuregen, aber verschiedene Versuche beweisen das Gegenteil. Die neuentstandenen Tumorzellen müssen die Fähigkeit zur Angiogenese entwickeln (Bouck et al. 1996; Hanahan and Folkman 1996). Die Angiogenese initiierenden Signale stammen von VEGFs und FGFs (*Veikkola and Alitalo 1999*).

6. Lokale Invasion und Metastasierung:

Im Verlauf der Krebsentwicklung breitet sich der Tumor aus und befällt angrenzendes Gewebe. Er kann weit wandern und neue Kolonien bilden. Diesen Vorgang nennt man Metastasierung und er verursacht 90% aller durch Krebs verursachten Todesfälle (Sporn 1996). Krebs kann als eine Erkrankung zellulärer Signalmechanismen aufgefasst werden, die von genetischen Zellschäden ausgeht. In Krebszellen kommt es zu Störungen der Regelkreise, die notwendig sind um die Homöostase aufrechtzuerhalten; das heißt Wachstum und Differenzierung zu steuern. Diese Regelkreise sind aus inter- und intrazellulären Signalen aufgebaut. Diese Störungen basieren meist auf Mutationen von Genen deren Produkt in der Vermittlung von Wachstumssignalen aktiv ist. Krebsentwicklung wird dann ermöglicht wenn die Veränderungen zu einem Wachstumsvorteil für die Tumorzellen führen. Krebs entsteht in einzelnen Zellen, die Klone bilden deren Tochterzellen noch andere Mutationen tragen die weiter zu einem Wachstumsvorteil führe und außerdem zur Bildung neuer Klone führen.

2.3.1. Mehrstufenprozess der Kanzerogenese

Die Kanzerogenese ist ein Mehrstufenprozess. Das heißt sie führt schrittweise zur Entstehung bösartiger Zellen. Normale Körperzellen werden also nicht durch eine einzige Mutation oder spontan in maligne Zellen umgewandelt. Die Kanzerogenese lässt sich in Initiation, Promotion und Progression gliedern (Schulte Hermann 2004, Lehrbuch der Toxikologie). Das Modell mit Initiation und Progression wurde von Sall und Shear schon in den frühen 40ern entwickelt (*Shear and Ilfeld 1940*).

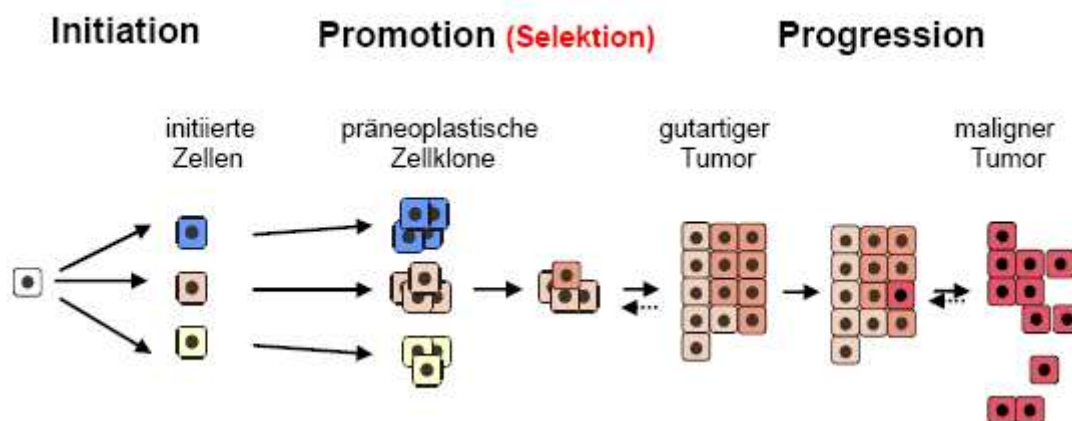


Abb.2.5. Der Mehrstufenprozess der Kanzerogenese (Vogelstein et al., abgeändert)

Initiation:

Der erste Schritt ist irreversibel und kommt häufig durch mutagene Noxen zustande. Für solche gentoxischen Wirkungen sind proliferierende Zellen besonders anfällig. Resultat der Mutation, muss ein Wachstumsvorteil für die mutierten Zellen sein, damit die Krebsentwicklung eingeleitet werden kann. Häufig haben die Zellen jedoch nur einen geringen Wachstumsvorteil. Allerdings stimulieren die Promotoren ihre selektive Vermehrung. Die Zellen verwandeln sich in prämaligne Zellen, potentielle Tumorzellen. Die Initiation alleine kann aber kein Tumorwachstum bewirken oder nur ein sehr langsames.

Promotion:

Tumorpromotion ist jener Vorgang, der präferentiell das Wachstum initiierten Zellen stimuliert. Dadurch werden initiierte Zellen selektiert und wachsen zu prämaligen Läsionen heran. Dieses selektive Wachstum fördert den Prozess der Krebsentwicklung. Im Gegensatz zu Initiation ist die Tumorpromotion reversibel und hängt von einer chronischen Wirkung der Promotoren ab.

Progression:

Es kommt zu Akkumulationen von Mutationen, und prämaligne Tumore entstehen. Als Progression bezeichnet man die Entwicklung von Karzinomen aus gutartigen Tumoren die in vorhergehenden Schritten entstanden sind. Das geschieht in der Mehrzahl durch weitere Mutationen. Dabei werden auch DNA-Reperaturgene ausgeschaltet, wodurch die Wahrscheinlichkeit weiterer Mutationen deutlich erhöht wird.

Triebfeder der Krebsentwicklung ist also das Prinzip der Evolution: Mutation und Selektion.

2.4. Darmkrebsentstehung

2.4.1. Dukes Klassifizierung

Die Dukes Klassifizierung aus dem Jahr 1932 ist das ursprüngliche System zur Einteilung der Kolonkrebsstadien von Patienten. Es wurden 3 Gruppen definiert (A, B und C) um die Tiefe und Ausbreitung des Tumorbefalls einzuteilen. A bezeichnet das Anfangsstadium und C ein weit fortgeschrittenes. Ein 4. Stadium (D) wurde von Astler-Coller eingeführt. Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) stellte das TNM (Tumor, Node, Metastasis) Stufensystem vor, ebenfalls mit 4 Abstufungen. Die beiden Systeme können einander ergänzend verwendet werden (Tab.4).

Stadium A	Tumor reicht in die Darm- Mucosa hinein, aber nicht darüber hinaus
Stadium B1	Tumor reicht in die Propria muscularis der Darmwand, aber nicht hindurch
Stadium B2	Tumor reicht sowohl in als auch durch die propria muscularis der Darmwand
Stadium C1	Tumor reicht in die Propria muscularis der Darmwand aber nicht hindurch, mit Krebsbefall der Lymphknoten
Stadium C2	Tumor reicht sowohl in die propria muscularis der Darmwand als auch hindurch, mit Krebsbefall der Lymphknoten
Stadium D	Tumor, der auch außerhalb der Lymphknoten gestreut hat (Befall v. Organen)

Tab.2.2. Modifizierte Dukes Klassifizierung

2.4.2. TNM-System

Tumor	
Stadium T1	Tumor befällt Submucosa
Stadium T2	Tumor befällt Propria muscularis
Stadium T3	Tumor reicht durch die Propria muscularis bis in die Subserosa oder in perirektales oder periphäres Kolongewebe
Stadium T4	Tumor befällt andere Organe und Strukturen und/oder durchbohrt das viszerale Peritoneum
Node	
Node N0	Keine regionalen Lymphknoten Metastasen
Node N1	Metastasen in 1-3 regionalen Lymphknoten
Node N2	Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten
Metastasen	
Stadium M0	Keine entfernten Metastasen vorhanden
Stadium M1	Entfernte Metastasen vorhanden
Stufen	
Stufe I	Der Krebs hat begonnen sich zu verbreiten, allerdings nur in der Innenschicht
Stufe II	Der Krebs hat sich zu anderen Organen ausgebreitet, die nahe Kolon und Rektum liegen, allerdings sind keine Lymphknoten befallen
Stufe III	Der Krebs hat sich bis zu den Lymphknoten ausgebreitet, aber noch nicht zu weiter entfernt liegenden Körperteilen
Stufe IV	Metastasenbefall anderer Körperteile und Organe, häufig Lunge und Leber

Tab.2.3. TNM-System

TNM Classification (American Joint Commission on Cancer)				Dukes' Classification
Stages	T	N	M	Stages
Stage 0	Tis	N0	M0	
Stage I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	B1
Stage II	T3	N0	M0	B2
	T4	N0	M0	B2
Stage III	T1, T2	N1 or N2	M0	C1
	T3, T4	N1 or N2	M0	C2
Stage IV	Any T	Any N	M1	D

Tab.2.4. TNM – Stufensystem mit Dukes Klassifizierung (American Joint Commission on Cancer)

Benigne (gutartige) Tumore treten in 3 histopathologischen Formen auf: Adenom, Hamartome und hyperplastische Polypen.

2.4.2. Kolon – Anatomie

Das Kolon (=Grimmdarm) bildet zusammen mit dem Rectum (=Mastdarm) und dem Caecum (=Blinddarm) das Intestinum Crassum (=Dickdarm).

Das Kolon wird unterteilt in Colon ascendens , Colon transversum , Colon descendens und Colon sigmoideum.

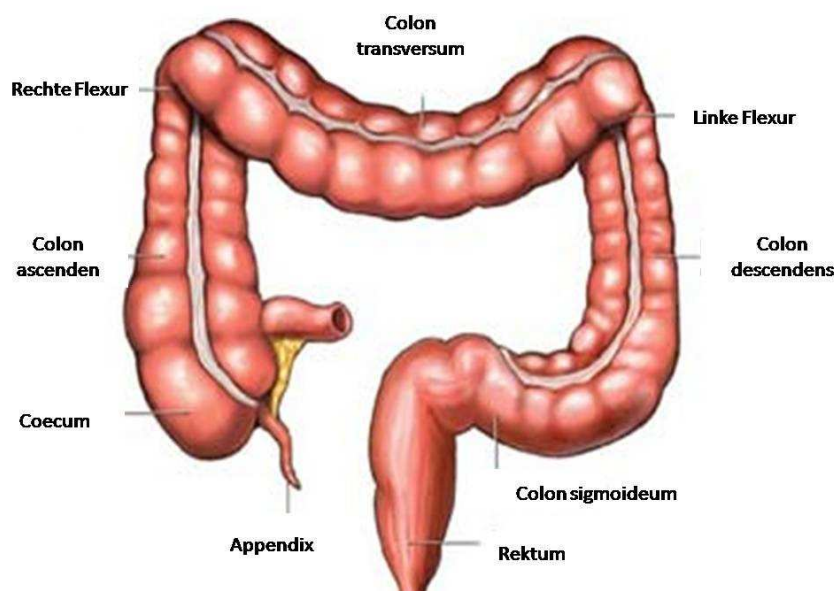


Abb.2.5. Die Anatomie des Kolons (Klinische Forschergruppe 179)

Im Kolon finden die Elektrolyt- und Wasserresorption statt, sowie die Resorption von Elektrolyten in die Blutbahn. Nachdem die Verdauung im Ileum beendet ist, erhält der Dickdarm unverdauliche Reste, die dann durch Bakterien zersetzt werden.

Hierbei spielen die Peristaltik und Antiperistaltik eine große Rolle, die den Nahrungsbrei durch den Dickdarm bewegen und eindicken.

Das Kolon weist typische äußere Merkmale auf, die Tänen, Verdickungen der äußeren Längsmuskelschicht. Die Wandschichten bilden Kontraktionsfalten, die sogenannten Plicae semilunares coli.

Zwischen zwei Plicae entstehen außen am Dickdarm Aussackungen, Haustra coli. (Taschenatlas Anatomie, Fritsch, Kühnel).

2.4.3. Tumorgenese in der Darmschleimhaut

Das Kolon-Epithel erneuert sich alle 4-6 Tage. Dies geschieht durch Zellproliferation, Migration und Differenzierung. Diverse Signalwege wirken an diesen Geschehnissen mit, wie zB. der Wnt – Signalweg.

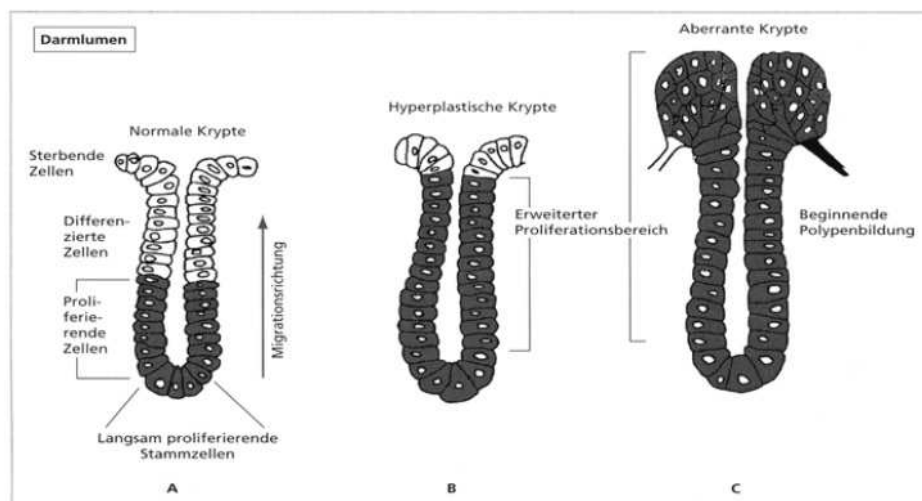


Abb.2.6. Normale und aberrante Krypten (Schulte – Hermann aus dem Lehrbuch: Toxicology)

Das Darmepithel besteht aus Epithelzellenschichten die zu Krypten (Einstülpungen) und Villi (Ausstülpungen) gefaltet sind. Es erneuert sich ständig, was zu sehr hohen Zellteilungsraten führt. Die Zellteilung findet in den Krypten statt. Am Boden dieser, sind undifferenzierte Stammzellen, die sich kontinuierlich teilen und aus denen auf diese Art alle Kryptenzellen hervorgehen. Diese wandern die Wände der Krypten entlang hinauf bis zur Oberfläche und zum Darmlumen, wo sie sich dann differenzieren. Der WNT pathway kontrolliert das Schicksal der Zellen während der differenzieren. Dann wird die Zellteilung beendet und die Zellen gehen in die G⁰-Phase über. Die Zellen unterliegen dem aktiven Zelltod (Schulte-Hermann, 2004).

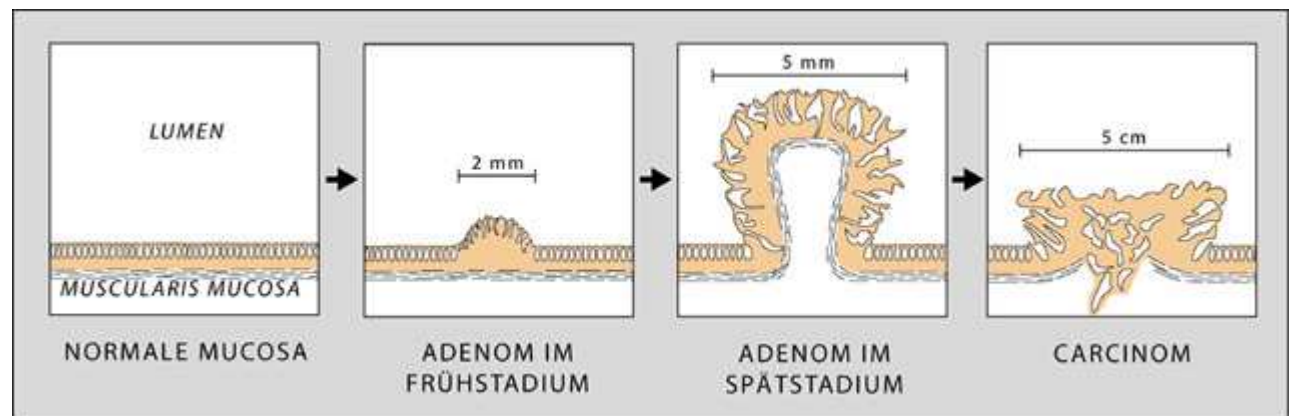


Abb.2.7. Die Entwicklung des Kolonkarzinoms durch stufenweise Transformation der Mukosa (charite website)

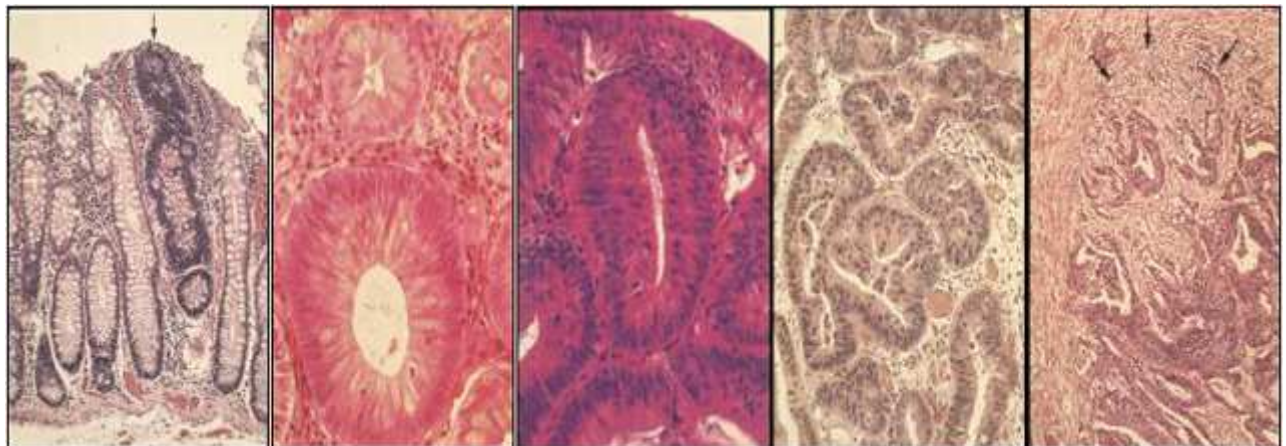


Abb.2.8. Grade der Dysplasie auf zellulärer Ebene (chrite Website)

Aberrante Krypten (Abb.2.6.) entstehen aus initiierten Stammzellen und stellen das erste prämaligne Stadium dar. Sie haben vergrößerte Lumina und eine höhere Zellzahl. Die Anzahl der aberranten Krypten korreliert mit der Kanzerogendosis. Das Vorhandensein von diesen aberranten Krypten dient häufig als früher Indikator in Tumorentwicklung im Darm.

Das langsame Wachstum der Adenome lässt sich auf die hohe Rate von aktiven Zelltod in diesen Tumoren zurückführen. Gleichzeitig kommt es zu phänotypischen Veränderungen (Dysplasie). Die meisten Karzinome entstehen innerhalb von Adenomen (Abb. 2.7. und 2.8).

2.5. Signalwege

2.5.1. Wnt Signalweg (kanonischer Signalweg)

Die Übertragung von extrazellulären Signalen ins Zellinnere wird durch verschiedene Signalwege bewerkstelligt. Einer davon ist der Wnt Signalweg (Abb.2.9). Zusätzlich zur Fähigkeit mitogene Signale zu übermitteln, befähigt der

Signalweg Zellen in einem relativ undifferenzierten Zustand zu verweilen. Dies ist ein wichtiges Merkmal von Krebszellen.

Wnt Gene codieren für eine große Polypeptid-Familie, die für die Zell-Zell-Kommunikation in verschiedensten Entwicklungsprozessen verantwortlich ist. Deregulierte Wnt-Signale können zur Tumorentstehung beitragen, da Wnts Zellproliferation, Zellmorphologie und Zellsterblichkeit beeinflussen. Wnt1 wurde als eines der ersten Proto – Onkogene entdeckt.

Wnt ist ein Glycoprotein, das den Frizzled (fz) – Rezeptor bindet, der an heterodimere G-Proteine gekoppelt sein kann. LRP5/6, die zur Familie der Low – density – Lipoproteine gehören, sind essentielle Co – Rezeptoren der Wnt – Liganden. Mehrere sezernierte Faktoren wie zB. FrzB binden an Wnts und blockieren so das Zusammenwirken mit frizzled Proteinen (*Huelsken and Behrens 2002*). Der Wnt – Signalweg kann auf mehrere Arten bei Krebs aktiviert werden: über den β -Catenin-Signalweg, den Zell-Polaritäts-Signalweg, der JNK miteinschließt, und den Wnt/ Ca^{2+} - Signalweg (*Behrens and Lustig 2004*).

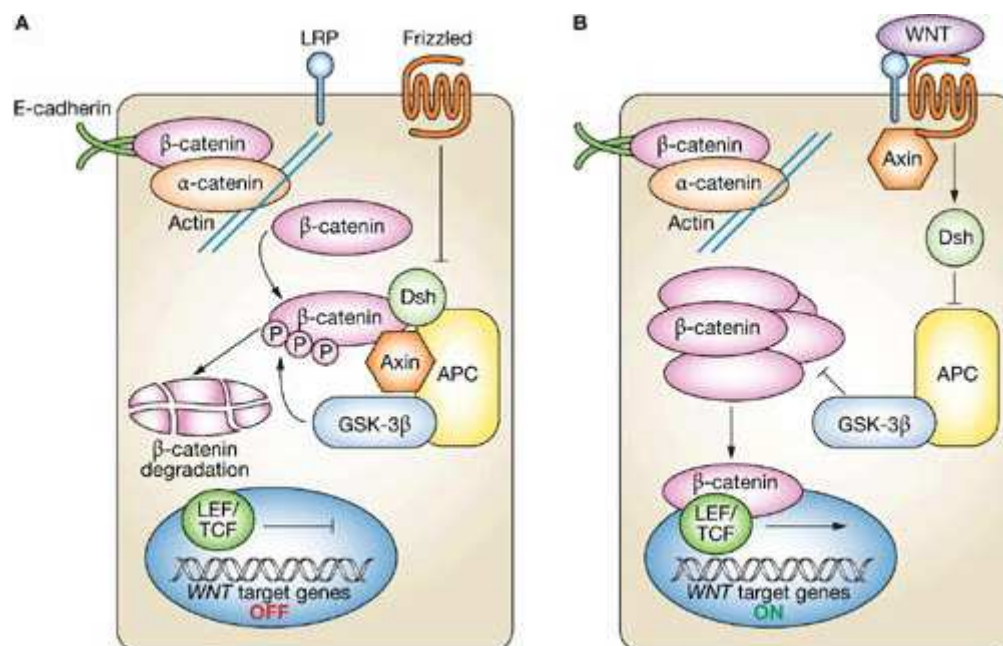


Abb.2.9. Der Wnt – Signalweg (Nature Publishing Group, Gastroenterol. Hepatol. 2006)

Wenn Wnt nicht vorhanden ist, phosphoryliert die Casein Kinase verschiedene Schlüsselsubstratproteine. Das wichtigste ist β -Catenin. Kurz nach der Synthese bildet das β -Catenin einen Multiproteinkomplex, auch „destruction compelix“ genannt, zusammen mit APC und Axin. Die Glykogen Synthase Kinase (GSK3 β) phosphoryliert die Serin/Threonin Reste 41, 33 und 37, wobei die Phosphorylierung der letzten beiden bewirkt, dass es mithilfe Ubiquitins abgebaut wird.

EINLEITUNG

Wnt – Faktoren unterdrücken die Aktivität von GSK-3 β . Wenn Wnt vorhanden ist wird die β - Catenin – Phosphorylierung durch dishevelled (Dsh) verhindert, indem GSK-3 β vom Axin gelöst wird. Dsh wird von der Par1 – Kinase reguliert, die auf der einen Seite Wnt im β –Catenin Signalweg aktivieren und auf der anderen Seite den JNK–Signalweg blockieren kann.

Das stabilisierte β –Catenin wandert in den Zellkern, wo es sich mit den Transkriptionsfaktoren LEF/TCF verbindet. Dadurch können spezifische Wnt – Zielgene transkribiert werden, auch jene die Proteine codieren, die in Zellwachstum und Proliferation involviert sind, wie zB. Myc und Cyclin D1.

Wnt und Kolonkrebs

Wnt – Zielgene regulieren häufig sowohl Entwicklungsprozesse und Zellproliferation als auch Tumorprogression (Abb.2.10).

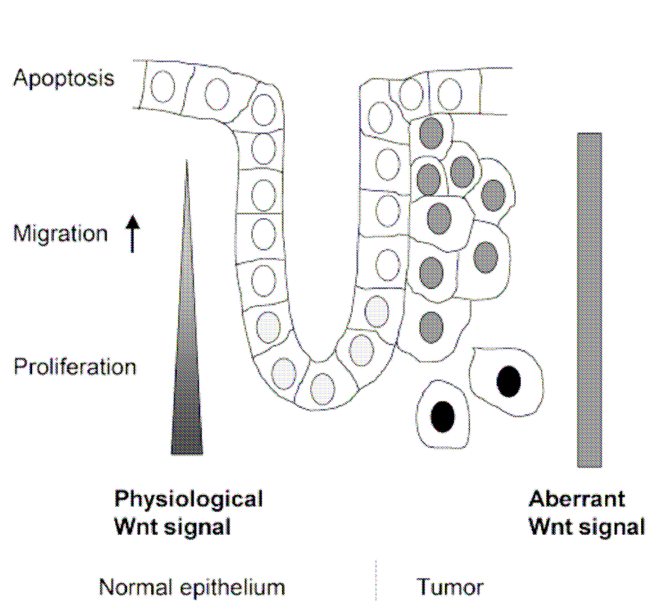


Abb.2.10. Rolle des Wnt – Signalweges während normaler Homöostase des Kolonepithels und im Tumor (Huelsken and Behrens 2002)

Der linke Teil zeigt den normalen Ablauf der Epithel–Proliferation, Migration und Apoptose, welcher vom Grund der Krypten nach oben abläuft. Es herrscht ein Gradient des wnt–Signals vor. Der rechte Teil zeigt die Entstehung des Kolontumors mit anormalem Wnt–Signal, zB. nach APC- oder β - Catenin – Mutationen. Die dunklen Nuclei deuten ein erhöhtes β –Cateninlevel an. Die Mutationen führen zu einer gesteigerten Proliferations- und einer erniedrigten Differenzierungsrate.

Da APC oder oder β – Catenin häufig in Kolonkarzinomen mutiert waren, schloß man darauf, dass der wnt-Siganlweg zu den für Krebs relevanten Signalwegen zählt.

Mutationen von β – Catenin wurden hauptsächlich in Mikrosatellit - instabilen Kolorektaltumoren gefunden (*Kitaeva et al. 1997*). Das Zusammenwirken von APC und β – Catenin ist bei der Kolonkarzinombildung von großer Bedeutung. Die meisten APC – Mutationen die zu Kolonkarzinombildung führten resultieren in einem Verlust der β -Catenin Bindungsstellen (*Rubinfeld et al. 1993*), (*Su et al. 1993*).

Die Bindung zwischen APC und β - Catenin ist essentiell für die Funktion APCs als Tumorsuppressorgen. Bei Kolonkarzinomen kommen häufig APC – Mutationen vor, die die Fähigkeit das β - Catenin – Level zu senken zerstören (*Miyoshi et al. 1992*).

In einer Studie wurde gezeigt dass 90% der untersuchten Kolonkarzinome genetische Änderungen in einer oder mehreren im Wnt – Signalweg involvierte Komponenten hatten (Thorstensen et al. 2005).

Wenn keine APC–Mutation vorhanden ist, trägt das Kolonkarzinom häufig inaktivierende Axin – (*Jin et al. 2003*), oder aktivierende β – Catenin – Mutationen (*Sparks et al. 1998*). Diese Beobachtung verdeutlicht die Wichtigkeit des Signalwegs während der Pathogenese.

Der FGF-Signalweg interagiert mit dem Wnt-Signalweg während einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie früher Embryogenese, Körperachsenformation, Neurogenese und kolorektaler Kanzerigenese. Der Signalweg kann die Zellproliferation beeinflussen indem er die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren induziert. ZB. fand man heraus, dass FGF18 bei Kolonkrebs durch TCF/ β – Catenin hinaufreguliert wurde. (*Shimokawa et al. 2003b*) .

Im Jahre 1986 konnte zum ersten Mal ein Zusammenwirken als Onkogene von FGF und dem Wnt – Signalweg während der Tumorgenese bei Brustkrebs gezeigt werden (*Peters et al. 1986*).

2.5.2. Mapkinase Signalweg

Mitogen–aktivierte Protein (MAP) Kinasen sind eine Familie der Protein Serin/Threonin Kinasen, die an vielen Signaltransduktionswegen beteiligt sind, welche intrazelluläre Geschehnisse wie verschiedene Veränderungen in der Entwicklung von Organismen kontrollieren. MAP Kinasen werden auch als ERKs (extracellulär-signal-related kinases) bezeichnet. MAP Kinasen wirken in einer Proteinkinasen – Kaskade. Diese Kaskade hat mindestens 3 aufeinanderfolgende

Proteinkinasen, die in der Aktivierung von multifunktionalen Map – Kinasen gipfeln (Lewis et al. 1998).

Sie stellen eine cytoplasmische Verbindung zwischen aktivierten RAS an der Plasmamembran und der Regulierung der Genexpression dar, da aktivierte MAPKs in den Nukleus gelangen. MAP Kinasen sind die Hauptbestandteile von Signalwegen, die Embryogenese, Zelldifferenzierung und Zelltod kontrollieren (Kyriakis and Avruch 2001). Sie werden durch Phosphorylationskaskaden reguliert.

Da viele Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung reguliert werden, kann MAPK via Phosphorylierung die Aktivität dieser Faktoren beeinflussen und regulieren. Transkriptionsfaktoren wiederum aktivieren MAPK. Der MAPKinase – Signalweg spielt auch bei immunvermittelten Entzündungsreaktionen eine große Rolle (*Hommes et al. 2003*). Es gibt 3 MAP–Kinasen-Signalwege: MAPK, JNK und p38. MAPK wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert, JNK und p38 durch Stresssignale aus der Umwelt. JNK und p38 lösen Apoptose aus. MAPK löst hauptsächlich Zellproliferation (*Dailey et al. 2005*), aber auch Zellzyklusarrest, Differenzierung und Apoptose aus (*Raucci et al. 2004*). MAPKs stellen eine Verbindung zwischen aktivierten RAS an der Plasmamembran und der Regulation der Genexpression dar, da sie in aktivierter Form in den Nukleus hineinwandern können. MAPK ist der wichtigste downstream Signalweg von FGFs während der Entwicklung (*Corson et al. 2003*).

2.5.3. Phosphoinositol3kinase Signalweg

Der Phosphoinositol3kinase–Signalweg ist ein Effektor–Signalweg von RAS und ist in diverse biologische Prozesse, wie Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Proliferation involviert. Auch spielt er eine Rolle bei der Determination von Organgröße und Körperwachstum. Die Aufgaben des Signalwegs sind häufig beschrieben (Sheng et al. 2003); (Vivanco and Sawyers 2002); (Datta et al. 1999; Kennedy et al. 1997).

PI3Ks besitzen eine regulatorische und eine katalytische Untereinheit. Die katalytische Untereinheit phosphoryliert die D3 Hydroxy–Gruppe der Phosphoinositide. Sie binden an die PH – Domäne (Akt) und an die Phosphoinositol - abhängige Kinase – 1 (PDK-1), dadurch werden sie an die Plasmamembran verlagert, wo dann PDK-1 phosphoryliert und dadurch Akt aktiviert wird (Katso et al. 2001) . Akt ist eine Serin – Threonin – Kinase und hat 3 Isoforme: Akt1, Akt2 und

Akt3. Die 3 Gene sind auf den Chromosomen 14, 19 und 1 lokalisiert und codieren für verschiedene Akt – Proteine. Diese befinden sich im Cytosol, werden von Wachstumsfaktorenzeptoren vermittelten Signalwegen aktiviert und spielen eine große physiologische Rolle in normalen und anomalen Zellen (Whiteman et al. 2002). PI3Ks vermitteln Signale von Tyrosinkinase – Rezeptoren und ihr Signalweg hat eine große Bedeutung bei mitogenen Prozessen. Bei verschiedenen Krebsarten wurde festgestellt, dass der PI3K – Signalweg genetisch verändert ist, zB. führt eine Deletion der katalytischen Untereinheit von PI3K γ bei Mäusen zu Kolorektalkarzinomen (Sasaki et al. 2000). Eine erhöhte Expression von Akt wurde bei verschiedensten Karzinomen beim Menschen gefunden, zB. bei Kolonkarzinomen (Roy et al. 2002); (Itoh et al. 2002; Shao et al. 2000), Thyroidkarzinomen (Ringel et al. 2001), Prostatakrebs (Graff et al. 2000), gastrischen Adenokarzinomen (Staal 1987) und Brust- und Gebärmutterhalskrebs (Page et al. 2000) .

PI3K kann auch Apoptose unterdrücken (Brunet et al. 2001); (Franke et al. 2003; Franke et al. 1997). *Weiters spielt der* Pi3K/Akt Signalweg eine Rolle bei der Proliferation von transformierten intestinalen Epitelzellen (Sheng et al. 2001).

Normale Zellen nutzen verschiedene, überflüssige Signalwege um Lebensprozesse zu kontrollieren, unter anderem das Überleben von Zellen. Dieser Überfluss könnte durch Krebs reduziert werden. Außerdem sind Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen abhängiger von bestimmten Signalwegen, die von ihren Onkogenen vorangetrieben werden (Weinstein and Joe 2006).

2.6. Genetische Veränderungen bei Darmkrebs

Auch für Kolorektalkrebs wurde der Mehrstufenprozess der Krebsentstehung nachgewiesen, eine Vielzahl an Mutationseignissen wie zB. D die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen und Aktivierung von Onkogenen sind das Ergebnis (Fearon and Vogelstein 1990).

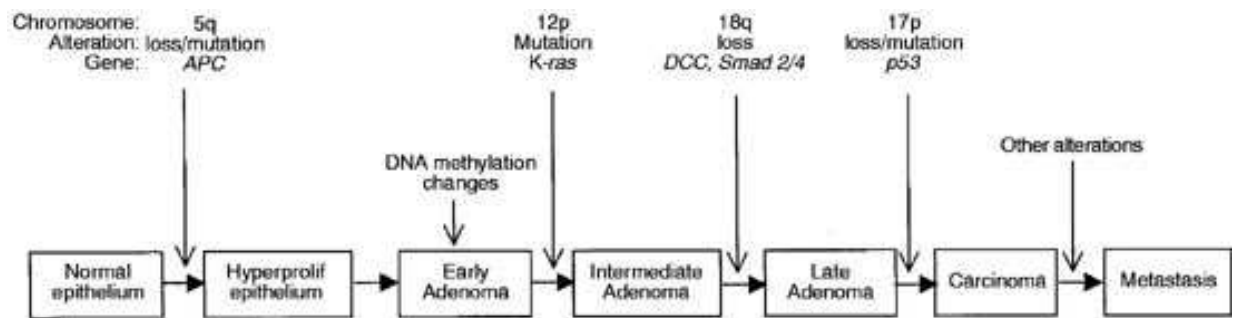


Abb.2.11. Mehrstufenprozess bei der Darmkrebserkrankung (verändert durch Longles, Dermott) (Longley et al. 2002)

Die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens kann zur Bildung von Kolonkrebs führen, wie dies z.B. bei APC der Fall ist. Allerdings kann der APC – Signalweg auch die Aktivierung von Onkogenen bewirken, wie z.B. K-RAS.

2.6.1. Adenomatous Polyposis Coli (APC)

Das APC Gen liegt am Chromosom 5q21 und codiert ein Protein, das eine entscheidende Rolle beim wnt/ β -catenin-Pathway spielt, der wiederum eine entscheidende Rolle bei Zelldifferenzierung, -proliferation und Apoptose spielt (Reya and Clevers 2005). Weiters ist APC an der interzellulären Adhäsion beteiligt. Kommt es nun zu Keimbahnmutationen im APCgen entsteht FAP, eine autosomal dominant vererbte Krankheit. Somatische Mutationen führen in ungefähr 80% zu sporadischen Tumoren. APC Mutationen führen in der Regel zu einem verkürzten Protein aufgrund dessen die Funktion gestört wird (Fearnhead et al. 2001).

APC ist weiters ein Mikrotubuli – assoziiertes Protein und ist an der Bildung und Funktion der mitotischen Spindel beteiligt. Zellen die kein oder zu wenig APC besitzen sind anfällig für chromosomale Segregation (Fodde et al. 2001).

APC Mutationen mit chromosomalen Anomalien wurden mit frühen kolorektalen Adenomen in Zusammenhang gebracht. Diese chromosomale Instabilität könnte ein die Tumorgenese vorantreibender Faktor sein (Leslie et al. 2006).

Das APC – Wildtyp – Allel ist beim Großteil der kolorektalen Tumoren nicht mehr vorhanden (Kinzler and Vogelstein 1996). Diese Tatsache entspricht der Knudsons „2 – hit“ Hypothese zur Tumorgenese (Knudson 1993), welche besagt, dass 2 Mutationen notwendig sind, eine somatische und eine Keimbahnmutation: eine Mutation aktiviert das Onkogen und die zweite ist erforderlich um ein Tumorsuppressorgen zu deaktivieren.

2.6.2. RAS

RAS ist ein Proto – Onkogen. Ras Mutationen zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Tumoren unterschiedlichen Typs. Die Ras–Gen–Familie besteht aus 3 Isoformen: Harvey- , Kirsten – und N – Ras – Genen.

Das GTPase aktivierende Protein (GAP) wirkt als Regulator der 3 RAS – Proteine. RAS-GAPs katalysieren die Hydrolyse von GTP durch RAS, welches aktives RAS-GTP zu RAS-GDP umwandelt, das die inaktive Konformation darstellt (Malumbres and Barbacid 2003). Dadurch wird die RAS-Aktivität negativ reguliert.

RAS reguliert mindestens 3 downstream Kaskaden, welche die Zellproliferation kontrollieren können. RAS Proteine können extrazelluläre Signale von diversen Rezeptorarten übermitteln. Die aktivierten Kinasen sind: RAF, MAPKK und MAPK. Ein weiterer Effektor ist Phosphoinositol-3-Kinase (PIK3). Er reguliert den AKT/PKB – Signalweg, welcher beim Überleben von Zellen eine Rolle spielt. In etwa einem Drittel aller Krebsvorkommnisse beim Menschen ist K-RAS mutiert (Bos 1989), bei Kolonkrebserkrankungen mehr als 50% (Andreyev et al. 1998) (Andreyev et al. 2001). K-RAS – Mutationen kommen in über 20% kolorektaler Tumoren zusammen mit B – RAF – Mutationen vor (Rajagopalan et al. 2002). Diese Tatsache zeigt die bedeutende Rolle des RAF/MAPK – Signalwegs während der Kolonkreb – Tumorgenese. Onkogenes K-RAS erzeugte in einem Mäusemodell im intestinalen Epithel eine spontane Tumorgenese (Janssen et al. 2005).

2.6.3. p53

Ist ein Tumorsuppressor – Gen und liegt am Chromosom 17p13. Da das p53 – Protein häufig im Nukleus von transformierten Zellen oder Tumorzelllinien vorkommt, konnte man darauf schließen, dass es eine große Rolle bei der Zelltransformation spielt. In normalen Zellen ist p53 nicht nachweisbar. Das p53 – Protein wird benötigt für das Fortschreiten des Zellzyklus. Das Proteinlevel erreicht ein Maximum beim Übergang der G1- zur S – Phase, also kurz vor dem Start der DNA – Replikation (Reich und Levine, 1984). Wenn p53 blockiert wird, dann wird die S-Phase erst gar nicht erreicht. Die Inhibition der Transkription von p53 in Zellen führt zu einem kompletten Wachstumsarrest (Shohat et al, 1987). Die signifikanteste Funktion des p53, als Tumorsuppressor, wurde entdeckt als man herausfand, dass Mäuse, die zu wenig Tp53 hatten, anfällig sind für spontane Tumorgenese (Donehower et al. 1992). P53 ist bei ungefähr 50% aller Krebsfälle weltweit

(Hollstein et al. 1991), 70% der spontanen Kolonkarzinome (Ilyas et al. 1999), und 50% aller primären Tumoren mutiert (Grady 2004).

P53 spielt eine große Rolle im „stress response pathway“ unter anderem bei der Entzündungsentstehung. P53 ist am Zellzyklusarrest, Apoptose (Polyak et al. 1997), DNA-Reparatur und Seneszenz beteiligt. Alle diese Schritte tragen zur zellulären Homöostase bei (Hofseth et al. 2004); (Vogelstein et al. 2000); (Harris and Levine 2005)).

Genetische Analysen von Kolorektalkrebs zeigten eine hohe Rate an heterozygoten Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17, das das p53 Gen trägt. (Vogelstein et al, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass p53 bei Kolonkrebs mutiert ist (Baker et al. 1989).

Am häufigsten kommen in TP53, dem Gen das p53 codiert, Missense - Mutationen vor. Diese Mutationen führen zu einer gesteigerten onkogenen Funktion. Das Generepertoire wird verändert, dessen Expression durch einen Transkriptionsfaktor kontrolliert wird (Dittmer et al. 1993; Lane and Benchimol 1990); (Hsiao et al. 1994).

2.6.4. Deleted in colon cancer

DCC ist ein Tumorsuppressorgen und axon geleiteter Rezeptor der Netrin - 1 binden kann (Keino-Masu et al. 1996). Es liegt auf Chromosom 18q und ist in 70% der kolorektalen Tumore deletiert (Fearon et al. 1990; Vogelstein et al. 1989)). Somatische Mutationen die das DCC - Allel inaktivieren wurden nur in einem Bruchteil der untersuchten Kolonkarzinome gefunden (Cho et al. 1994). Allerdings spricht für die Rolle von DCC als Tumorsuppressorgen, dass bei kolorektalen Tumoren und Zelllinien die Genexpression von diesem merklich verringert oder gar nicht vorhanden ist (Kikuchi-Yanoshita et al. 1992).

Auch bei anderen Krebsarten wurde festgestellt, dass DCC inaktiviert war, zB. bei Brustkrebs (*Cropp et al. 1990; Devilee et al. 1991; Thompson et al. 1993*), Prostatakrebs (Gao et al. 1993) und *Leukämie* (*Inokuchi et al. 2002; Miyake et al. 1994*).

2.7. Erbliche Formen der Kolonkrebserkrankung

Ungefähr 25% aller Fälle von Darmkrebs sind erblich bedingt. Die restlichen 75% entstehen spontan. Rund 10% sind erblich ohne konkreten genetischen Hintergrund, also nicht HNPCC und FAP etc. betreffend (Hisamuddin and Yang

2004). Patienten mit Keimbahnmutationen müssen nicht zwingend einen bösartigen Tumor entwickeln. Sie sind zwar prädisponiert dazu, müssen aber nicht an Krebs erkranken. Es sind weitere Mutationen notwendig, und die Mutationsrate ist bewiesenermaßen auch von Umweltfaktoren, wie zB. Ernährung abhängig.

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Ernährung einen großen Einfluß auf das Auftreten von Kolonkrebs haben kann (Giovannucci et al. 1994; Giovannucci and Willett 1994).

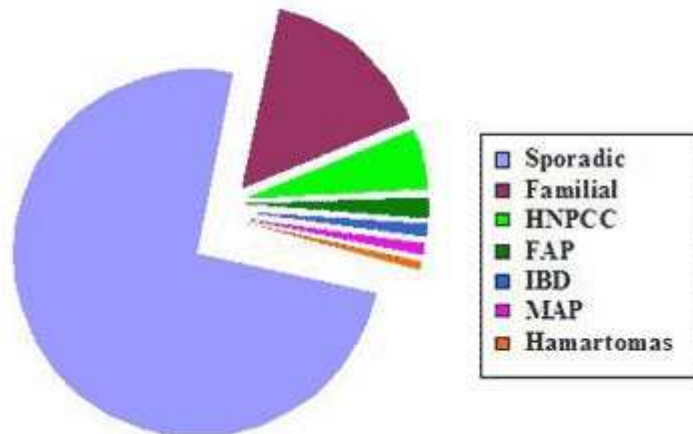


Abb.2.12. Verteilung der erblich bedingten Darmkrebsarten (MedGenMed, 2004)

FAP, die hamartomatöse Polyposis und HPCC werden in der Grafik getrennt von anderen erblichen Formen dargestellt. Spontane Formen: 75%, Erbliche Formen: 15%, HNPCC: 5%, FAP: 1%, IBD: 1%, MAP: 1%, Hamartomatöse Polyposis: <1 (Abb.2.12).

2.7.1. FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis)

Diese Krankheit wird autosomal dominant vererbt, betrifft in etwa ein von 7000 Individuen und kommt aufgrund einer Keimbahnmutation des APC – Gens zustande (Grodén et al. 1991; Nishisho et al. 1991). Diese Mutation führt zu einer Bildung von hunderten bis tausenden Adenomen, meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr des Patienten. Dadurch steigt das Risiko einer Karzinom – Bildung drastisch an. Die Adenombildung findet auch im oberen Gastrointestinaltrakt statt und Tumore können auch an anderen Stellen des Körpers, wie zB. Im Gehirn oder an der Schilddrüse entstehen ((Lipton and Tomlinson 2006).

Die APC- Keimbahnmutation alleine bedeutet nicht, dass der Patient zwangsläufig kolorektalen Krebs entwickeln wird, das Risiko dafür ist allerdings deutlich erhöht gegenüber Individuen ohne dieser Mutation. Zusätzliche genetische Veränderungen

sind zu einer Tumorbildung notwendig. Bei der Entstehung von FAP ist die Initiation der bedeutendste Schritt in der Tumorentwicklung. Während der Initiation ist die Mutationsrate gesteigert, was wiederum die Initiationsphase beschleunigt. Die APC – Mutation führt zu Proteinen mit verkürztem C-Terminus. Die Mutation der „gatekeeper“ – Funktion führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Zell – Teilung und –Tod (Kinzler and Vogelstein 1996). Komplett inaktivierte APC- Gene kommen in sehr frühen neoplastischen Läsionen vor, sogenannten dysplastische aberrante Kryptfoci, Vorläufer der Adenome. APC – Mutationen kommen in 80-85% aller FAP – Patienten vor (Aaltonen et al. 1993); (Aaltonen et al. 2007) .

2.7.2. HNPCC (Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom)

Diese Erkrankung wird autosomaldominant vererbt mit einer Häufigkeit von 1:1000. Bei dieser Form kommt es zu keinem Auftreten von Polypen. Dadurch ist keine Früherkennung der Erkrankung möglich. Patienten die an HPCC erkrankt sind, haben ein 80%iges Risiko an Kolonkrebs zu erkranken und ein 60%iges an Krebs des Endometriums. Sie haben prinzipiell ein höheres Risiko an Krebs zu erkranken, wie zB. des Magens oder der Eierstöcke (Hisamuddin, Yang, 2004). Im Gegensatz zu FAP ist bei HNPCC nicht die Initiationsrate gesteigert sondern die Progressions-/Transformationsrate (Kinzler and Vogelstein 1996); (Rijcken et al. 2002).

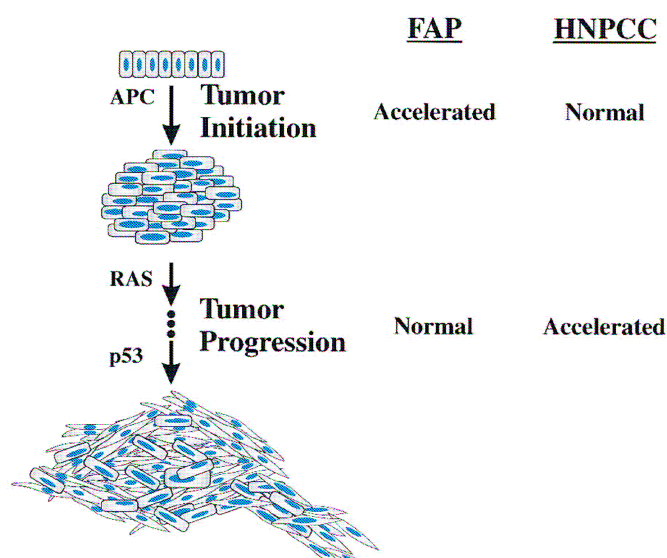


Abb.2.13. Vergleich der Krebsentstehung bei FAP- und HNPCC - Patienten

Sie kommt durch Mutationen in Mismatchreparaturgenen (MMR) zustande.

Die Pathogenese beruht auf einem Phänomen, bei dem es zu Veränderungen von kurzen, sich wiederholenden DNA – Sequenzen in den Tumorzellen kommt, das

Mikrosatellit – Instabilität genannt wird (*Aaltonen et al. 1993*). Dadurch kommt es zu einer Vielzahl an Replikationsfehlern. Die häufigsten Mismatchreparaturgene an denen Mutationen entstehen sind hMSH2, hPMS2, hMLH1 und hMSH6 (*Hisamuddin, Yang, 2004*). Die Progression schreitet sehr schnell voran aufgrund der Anhäufung von Mutationen. Mutationen in MMR - Genen verursachen genetische Defekte in anderen Genen aufgrund ihrer Mikrosatellit – Sequenzen in den Kodierungsregionen. Diese Gene können eine Rolle bei der Wachstumskontrolle spielen und sich wie Tumorsuppressorgene verhalten, zB. der Rezeptor Typ II des TGF – β oder des IGF2 und BAX, welche in die Apoptose – Kontrolle involviert sind (*Rampino et al. 1997*).

HCT116 ist eine typische Zelllinie für die erbliche Krebsvariante, da sie das sogenannte mismatchrepair – Defizit haben. Dies führt dazu, dass die Wahrscheinlichkeit einer Mutation bei jeder Zellteilung 100 – 1000fach erhöht ist.

2.8. Rolle der Neoangionese bei der Krebsentwicklung

Angiogenese/Neoangionese ist ein wichtiger Aspekt in der Entwicklung, Progression und Metastasierung maligner Tumore. Hierbei handelt es sich um die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen (*Bussolino et al. 1997*) . Sie ist notwendig um die Sauerstoffversorgung sicher zu stellen. Angiogenese ist ein normaler Vorgang sowohl beim Embryo (Vasculogenese) als auch beim erwachsenen Menschen, der auch eine große Rolle bei der Wundheilung spielt. In den 70er Jahren wurde nachgewiesen, dass das Tumorwachstum stoppt wenn keine Angiogenese stattfindet (*Folkman 1996*) .Der experimentelle Beweis für die Wichtigkeit die Angiogenese im Tumor zu induzieren und aufrechtzuerhalten, stammt von Hannahan und Folkman. Die Fähigkeit dazu wird über den sogenannten „angiogenic switch“ erreicht (*Hanahan and Folkman 1996*). Einige natürlich vorkommende Aktivatoren für die Angiogenese sind: TGF α , EGF, VEGF und FGF (*Lomberg 2010*). Bei Darmkrebs wurde ein Zusammenhang der VEGF – Expression, des p53 –Status und der Angiogenese gezeigt (*Faviana et al. 2002*) .Das Zusammenwirken zwischen Tumor und Tumor – Mikroumgebung ist essentiell für weiteres Wachstum und Ausbreitung des Tumors (Abb.2.14). Die extrazelluläre Matrix wirkt mit unterschiedlichen Zelltypen zusammen, wie Karzinomzellen, Fibroblasten, Immunzellen und extrazelluläre Matrimoleküle (

Fibroblasten in der stromalen Mikroumgebung umgeben die Krebszelle und kommunizieren mit ihr (Tlsty and Coussens 2006). Sie können die Tumorbildung beeinflussen (Bhowmick et al. 2004) und die Tumorprogression stimulieren (Olumi et al. 1999). Makrophagen induzieren bzw. stimulieren die Angiogenese in Krebszellen (Joimel et al. 2010) und sind der Hauptbestandteil entzündlicher Infiltrate die in Tumoren vorkommen, sie werden als tumorassoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet (Gottfried et al. 2003).

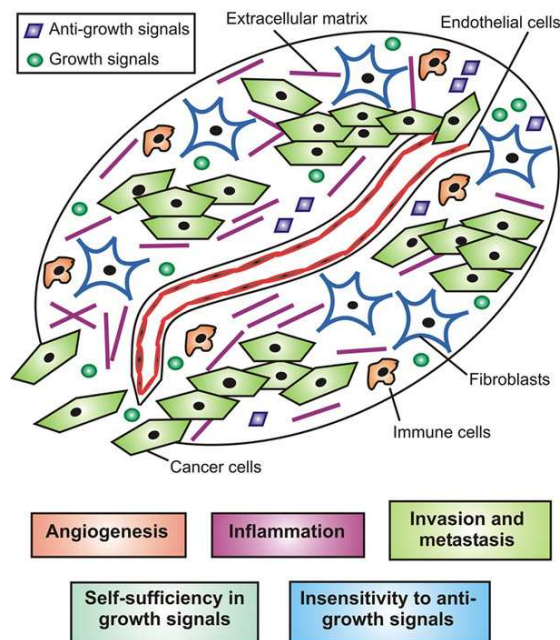


Abb.2.14. Tumor –Mikroumgebung (Hannahan and Weinberg, 2000, verändert durch Nyberg et al.: Tumor microenvironment and angiogenesis)

2.9. Transforming Growth Factor β (TGF β)

TGF β 's sind eine Cytokinfamilie, die antiproliferative Aktivitäten auf viele Zelltypen ausübt. Sie können einen Zellzyklusarrest bewirken und Apoptose induzieren.

Der TGF β Rezeptor – Komplex wirkt als Tumorsuppressorgen (Markowitz and Roberts 1996) .

2.10. Transforming Growth Factor α (TGF α)

Beim Tumorwachstum und Überleben von Tumorzellen spielt die autokrine Stimulation von TGF α eine große Rolle. TGF α wird zu Beginn der Tumorentwicklung hinaufreguliert. TGF α unterdrückt den Zelltod in Tumoren.

In kolorektalen Tumoren wurde gezeigt, dass Zellwachstum und –überleben durch TGF α gefördert wird (Untawale et al. 1993). Ein Zusammenhang von TGF α mit verringerten Apoptoseraten konnte gezeigt werden (Habel et al. 2002).

Die Hemmung des TGF α – Signalwegs führte wiederum zu einer verstärkten Apoptose (Partik et al. 1999).

2.11. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF wirkt endothelspezifisch und ist vorallem während der Initiation der Angiogenese von großer Bedeutung, während Ephrine und Angiopoietine erst bei der nachfolgenden Reifung wirken. Alle 3 Rezeptoren gehören zu den Thyrosinkinaserzeptoren. Die Erkenntnis, dass VEGF wirksam und spezifisch für vaskuläre Endothelzellen ist, führte zu der Annahme, dass er eine bedeutende Rolle bei der Wachstumsregulation (sowohl physiologisch als auch pathologisch) spielen könnte (Leung et al. 1989; Ferrara et al. 1991). Das kardiovaskuläre System entwickelt sich als erstes Organsystem im Embryo und erreicht auch als erstes volle Funktion. Die Entwicklung des Gefäßsystems ist essentiell für die Reparatur beschädigten Gewebes und die Reproduktionsfunktionen des Erwachsenen. Angiogenese spielt auch eine große Rolle während der Pathogenese diverser Funktionsstörungen wie Tumore, Schuppenflechte, rheumatoide Arthritis, Makulardegeneration und Retinopathien (Folkmann et al., 2005).

Die Hemmung von VEGF resultiert in einem klinischen Vorteil, wie zum Beispiel höhere Überlebensrate von Patienten mit fortgeschrittenen bösartigen Tumoren. Dadurch wurde die Hypothese bestärkt, dass ein Hemmen der Angiogenese eine gute Strategie ist um Krebs zu behandeln (Yang et al. 2003 ; Hurwitz et al. 2004) In vitro fördert VEGF das Wachstum von vaskulären Endothelzellen, die von Arterien, Venen und Lymphgefäßen stammen (Pepper et al. 1992). In Tumoren konnte nachgewiesen werden, dass VEGF in neu entstandenen, nicht aber in schon länger bestehenden Gefäßen vorhanden ist (Benjamin et al. 1999; Yuan et al. 1996).

VEGF spielt eine große Rolle in Knochenmarkszellen bei der Hämatopoese (Broxmeyer et al. 1995). Ein VEGF-abhängiger Signalweg ist essentiell in der Hämatopoese in Drosophila, wo er Migration und Proliferation von Blutgefäßen kontrolliert (Cho et al. 2002); (Munier et al. 2002). VEGFR1 fördert die Migration und Invasion in Pankreas-Carcinom-Zellen (Wey et al. 2005).

Strukturell ist der VEGF dem PDGF (Platelet Derived Growth Factor) homolog. VEGF ist ein heparinbindendes, homodimeres Glycoprotein (Ferrara and Henzel 1989). Der Verlust der heparinbindenden Domäne führt zu einer Verminderung der mitogenen Aktivität von VEGF (Keyt et al. 1996). Andere wichtige

Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF-I, PDGF, TGF α , TGF β und FGF regulieren die VEGF mRNA – Expression hinauf (*Pertovaara et al. 1994; Warren et al. 1996*), was zu der Annahme führt, dass die autokrine und parakrine Ausschüttung dieser Faktoren zusammen mit einer Hypoxie wirkt um die Freisetzung von VEGF ins Microenvironment zu regulieren. VEGF bindet an 2 Tyrosinkinase: VEGFR1 und VEGFR2. Beide haben 7 immunoglobuline – like (ig-) Domänen in der extrazellulären Domäne, eine single Transmembranregion und eine Konsensus Tyrosinkinasesequenz (*Terman et al. 1991*). Insgesamt sind 7 Formen des VEGF beschrieben.

2.12. IGF

Das Wachstum in der Kindheit von Menschen und Mäusen hängt von der Wirkung der IGFs ab (*Pollak et al. 2004*). Das IGF-System besteht aus IGF1 und IGF2, welche mit den beiden Rezeptoren IGFR1 und IGFR2 interagieren.

IGF1 (=Somatomedin C) wird hauptsächlich in der Leber gebildet und Wachstumshormone können eine Hinaufregulierung der IGF1-Gen- Expression bewirken. IGF1 besitzt mitogene Eigenschaften durch Steigerung der DNA-Synthese und Stimulierung der Cyclin D1 – Expression. Dieses Cyclin beschleunigt den Zellzyklus, von der G1- zur S-Phase (*Furlanetto et al. 1994*); (*Dufourny et al. 1997*). Eine weitere wichtige Eigenschaft von IGF1 ist die Hemmung von Apoptose (*Minshall et al. 1997; Parrizas and LeRoith 1997*). Die Aktivierung von FGFR1 geschieht meistens durch Ligandenbindung (*Yee 2006*). Eine IGF1R - Aktivierung erfolgt als Endokrinantwort auf eine hohe IGF1 Konzentration oder als Antwort auf eine autokrine Produktion von Tumorzellen (*Khandwala et al. 2000; Pollak et al. 2004*).

Man fand heraus, dass eine Überexprimierung von IGFR1 in bestimmten Tumoren zu einer aggressiven Ausprägung führt (*Xie et al. 1999*). In einer Studie konnte IGF1 die VEGF-Genexpression hinaufregulieren und so die Angiogenese einer Brustkrebszelllinie stimulieren (*Oh et al. 2002*). Auch Motilität und Migration können in Melanom- und Neuroblastoma Krebszelllinien durch IGF1 gesteigert werden (*Meyer et al. 2001; Satyamoorthy et al. 2002*).

IGFII hat antiapoptotische und mitogene Eigenschaften, die zur Regulierung von Zellproliferation und Differenzierung beitragen. Allerdings wird angenommen, dass sie eine weniger bedeutende Rolle im postnatalen Wachstum spielen als FGF1.

Tierexperimente stützen die Hypothese, dass die Wirkungen des FGF2 durch FGF1 nach der Geburt ersetzt werden (*Yu and Rohan 2000*). IGFII reguliert die Proliferation von Medullablastoma und seinen cerebralen Vorläuferzellen und hat einen wachstumsfördernden Effekt, welcher durch den IGF1R vermittelt wird (*Hartmann et al. 2005*), IGF2 hat ähnliche Wirkungen, der Verlust des genomischen Imprints im IGFII-Gen wurde oft in Zusammenhang mit bösartigen Tumoren gefunden (*Jarrard et al. 1995; Oda et al. 1997*).

IGF2 hat höhere Expressionsraten in Krebszellen, die eine starke Tendenz zu metastasieren haben (*Guerra et al. 1996*). Sowohl IGF1 als auch IGF2 werden in kolorektalen Tumorzellen überexprimiert (*Dignass and Sturm 2001; Thompson et al. 1990*).

2.13. Fibroblast Growth Factor (FGF)

FGFs sind unspezifische Wachstumsfaktoren, die viele Zellarten beeinflussen. Sie wurden sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten identifiziert (*Gen Bank/ncbi*). Sie gehören zu einer großen Peptidfamilie mit gemeinsamen Strukturmerkmalen. FGFs von Vertebraten können in Subgruppen und –familien eingeteilt werden. Mitglieder einer Familie haben haben große Sequenzgemeinsamkeiten und Entwicklungseigenschaften. (*Ornitz et al. 1992; Zhang et al. 2006*) Das Molekulargewicht der unterschiedlichen FGFs liegt zwischen 17 und 34 kDa.

Die meisten FGFs besitzen eine core Region mit zum Teil identen oder sehr ähnlichen Aminosäurenresten (*Ornitz 2000*). FGFS haben eine hohe Heparansulfatproteoglycane – Affinität und benötigen Heparansulfat um einen der vier FGF-Rezeptoren zu aktivieren. Durch diese Bindung werden die FGFs gegenüber Hitze - Denaturierungen und Proteolyse stabilisiert und limitieren die Diffusion und Freisetzung in den Interstitialraum (*Moscatelli 1987; Flaumenhaft et al. 1990*). FGF benötigt Heparin um FGFR in Zellen zu aktivieren, welche HSPC nicht synthetisieren können oder in Zellen die mit Heparin vorbehandelt sind (*Ornitz et al. 1992; Rapraeger et al. 1991; Yayon et al. 1991*).

Ornitz konnte in genetischen Studien weiter zeigen, dass Mutationen von Enzymen welche bei der HS-Biosynthese mitwirken den FGF-Signalweg während der Entwicklung beeinflussen können (*Ornitz 2000*).

2.13.1. Biologische Aufgaben des FGF

Angiogenese und Wundheilung:

Die Vermutung, dass FGFs als positive Regulatoren während der Angiogenese wirken und bei der Wundheilung eine Rolle spielen, wird durch Versuche mit FGF2 bestätigt. Die Heilung von Hautverletzungen bei Mäusen wurde beschleunigt (*Tsuboi and Rifkin 1990*). In Tiermodellen mit Hunden und Schweinen wurde gezeigt, dass die Wundheilung nach einem Myocard - Infarkt vorangetrieben wurde (*Yanagisawa-Miwa et al. 1992; Watanabe et al. 1998*). Verschiedene Wachstumsfaktoren, unter anderem auch FGF-2, werden bei verletzten Endothelzellen freigesetzt. Als Stimulus dient die Wunde selbst (*McNeil et al. 1989*). Die Wundheilung wird in 4 Stufen unterteilt: Entzündung, Kontraktion, Wiederherstellung und Regeneration. FGFs spielen in mindestens 3 dieser Stufen eine Rolle: Entzündung, Wiederherstellung und Regeneration.

Während der Entzündungs – Phase können FGFs, zusammen mit anderen Faktoren, die Migration von entzündlichen Zellen verursachen: FGF1 stimuliert die Produktion von Interleukin2, welcher ein Lymphozyt – Wachstumsfaktor ist (*Byrd et al. 1999*). Auch die Platelet - Produktion ganz am Anfang der Wundheilung kann von FGFs beeinflusst werden. FGF4 kann die Proliferation von Megakaryozyten Vorläuferzellen stimulieren (*Konishi et al. 1996*). Während der Wiederherstellungsphase können FGFs ihr Proliferations - Potential nutzen und so Endothelzellen und Fibroblasten beeinflussen.

Während der Regenerationsphase wirken FGFs unterstützend bei der Erneuerung von Epithelzellen mittels eines autokrinen loops. Bei der Wiederherstellung nach chemisch verursachten Schäden am renalen proximalen Tubulus wird FGF7 in interstitiellen Zellen und FGFR2(IIIb), ein spezifisches FGF7 – Rezeptor – Isoform, im tubulären Epithel exprimiert. Stromale Zellen geben FGF7 frei und die Ziel – Epithelzelle exprimiert den passenden Rezeptor (*Ichimura et al. 1996*).

2.13.2. FGFs während der Entwicklung

Beim Menschen sind 23 FGFs bekannt, die Zellwachstum und -differenzierung Migration und Proliferation während der Embryonalentwicklung regulieren. Im erwachsenen Organismus spielen sie eine bedeutende Rolle bei Angiogenese und Wundheilung (*Ornitz and Itoh 2001*). Weiters spielen FGFs eine große Rolle in

Wachstum und Überleben von Stammzellen, während der Embryogenese, Gewebsregeneration und Karzinogenese (Kato 2002; Kato 2006; (Eswarakumar et al. 2005; Dailey et al. 2005; Chaffer et al. 2007). FGF2 und FGF20 sind die wichtigsten FGFs Embryogenese und Gewebsregeneration im Darm betreffend (Gonzalez et al. 1996; Kirikoshi et al. 2000). Zahlreiche Studien beweisen, dass FGFs eine entscheidende Rolle bei Migration, Proliferation, Morphogenese und Differenzierung spielen (Powers 2000, Goldfarb 1996). FGFs sind mesoderminduzierende Faktoren in Xenopus (Slack et al. 1990) Weiters werden auch Spezifität und Erhaltung des Mesoderms durch FGFs reguliert (Griffin et al. 1995; Zhao et al. 2003). FGF8 spielt eine Rolle bei der Gastrulation, weiters wurde gezeigt, dass FGF8 und/oder FGF4 Einfluß auf die Zellmigration haben (Sun et al. 1999).

Auch an der Organogenese sind FGFs beteiligt, zB. FGF2 und FGF4 bei der Ausbildung der Gliedmaßen in Mausmodellen (Webb et al. 1997). Die Rolle des FGF – Signalwegs während der Neuralinduktion wurde unter anderem bei Xenopus untersucht, es gibt Hinweise, dass FGFs maßgebend an dem Vorgang der Neuralinduktion beteiligt sind (Streit et al. 2000).

2.13.3. Mutationen des FGF

Mithilfe von Knock – Out – Mouse-Versuchen wurde gezeigt, dass FGFs bei allen Geweben an der Differenzierung beteiligt sind. Besonders bei der embryonalen Entwicklung spielen FGFs eine Schlüsselrolle und haben eine besondere Bedeutung während der Gastrulation. Auch an der Organogenese sind sie beteiligt. Aus diesem Grund führen Deletionen vieler FGFs oder FGFRs zu schweren Auswirkungen im Phänotyp, bis hin zu embryonaler Sterblichkeit (Ornitz and Itoh, 2001).

Gene	Survival	Phenotype
FGF1	Viable	No obvious phenotype
FGF2	Viable	Neuronal, skeletal and skin phenotypes
FGF3	Viable	Inner ear, tail outgrowth
FGF4	Lethal E5.5	Inner cell mass proliferation
FGF5	Viable	Long hair, "Angora" phenotype
FGF6	Viable	Muscle regeneration
FGF7	Viable	Hair follicle and kidney deficiency
FGF8	Lethal E8.5	Many phenotypes including gastrulation, brain, heart and craniofacial development
FGF9	Lethal Po	Lung, xy sex reversal
FGF10	Lethal Po	Many phenotypes including limbs, lungs, kidneys and others
FGF14	Viable	Neurological phenotype-ataxia and a paroxysmal hyperkinetic movement disorder
FGF15	Viable	No defect in inner ear development; poor survival rate
FGF17	Viable	Midline cerebral development
FGF18	Lethal P1	Delayed ossification and increased chondrocyte proliferation; decreased alveolar spaces in the lung
FGF23	Viable	Hyperphosphatemia, hypoglycemia, reduced bone density and infertility

Tab.2.5. Knock – Out – Maus - Versuche (Eswarakumar,Lax, & Schlessinger, 2005)

Es wurde bei einem Screening nach somatischen Mutationen im menschlichen Genom festgestellt, dass die Komponenten des FGF – Signalwegs die am häufigsten mutierten Kodierungsregionen sind (Greenman et al. 2007).

Sie vermitteln ihre zelluläre Antworten durch Bindung und Aktivierung einen der vier verschiedenen FGF – Rezeptoren.

2.14. Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)

Beim Menschen gibt es 4 Rezeptoren: FGFR1 – 4, die zwischen 55-72% Homologien auf Proteinlevel aufweisen (*Johnson and Williams 1993*).

	<u>FGFR-1 vs. FGFR-2</u>	<u>FGFR-1 vs. FGFR-3</u>	<u>FGFR-1 vs. FGFR-4</u>
Signal peptide 	43%	17%	20%
Ig domain I 	40%	27%	19%
Acidic region 	43%	33%	27%
Ig domain II 	79%	64%	61%
Ig domain III 	78%	81%	74%
Transmembrane domain 	62%	33%	24%
Kinase 1 	88%	83%	75%
Kinase 2 	92%	91%	84%
C-tail 	62%	46%	42%

Abb.2.15: Vergleich der FGF – Rezeptoren verschiedener Gene auf Aminosäurelevel

Die Rezeptoren verfügen über eine extrazelluläre Region, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Region. Die N-terminale extrazelluläre Region hat 3 verschiedene immunglobulin – like Loops: IgI, IgII und Ig-III. Die transmembrane Domäne verbindet extrazellulär mit intrazellulär. Weiters gibt es eine heparinbindende Sequenz (*Lee et al. 1989; Johnson et al. 1990; McKeehan et al. 1998*).

2.14.1 FGFR und Krebs

Während der Tumorgenese spielt die Deregulation von FGF-Signalen auf FGFR-Level eine große Rolle und kann in 3 Formen auftreten: Fehlexpression, Punktmutation und Splice Variation (Powers, McLeskey, & Wellstein, 2000). Weiters können die FGFs überexprimiert werden, was aufgrund des vielfältigen Wirkungsspektrums von FGFs Einfluss auf Migration, Proliferation und Angiogenese

haben kann (Eswarakumar, Lax & Schlessinger, 2005). Bei verschiedenen Krebsarten wurde festgestellt, dass verschiedenste FGFs im Tumorgewebe, verglichen mit normalen Zellen, überexprimiert wurden. Allerdings wurden auch gegensätzliche Ergebnisse gefunden und zwar eine Herunterregulierung von FGFRs in Verbindung mit Tumorgenese.

Genetic alterations of FGFRs in human cancers

Cancer	Gene alteration
8P11 myeloproliferative syndrome (EMS)	Translocation and fusion of <i>FGFR1</i> with <i>ZNF-198</i> (also called <i>FIM</i> or <i>RAMP</i>) t(8;13); fusion of <i>FOP</i> with <i>FGFR1</i> t(6;8); fusion of <i>FGFR1</i> with <i>CEP 110</i> t(8;9); fusion of <i>FGFR1</i> with endogenous human retroviral sequence t(8;19); and fusion of <i>FGFR1</i> with <i>BCR</i> t(8;22)
Breast cancer	Over expression of FGFR1
Pancreatic adenocarcinoma	Abnormal expression of FGFR1 and FGFR4
Prostate cancer	Class switch of FGFR2 from IIIb isoform to IIIc isoform
Astrocytoma	Abnormal expression of FGFR1c in prostate epithelial cells Elevated expression of FGFR1 in white matter and down regulation of FGFR2 in malignant astrocytomas
Gastric cancer	<i>FGFR2</i> splice site mutation (940-2A → G) and Ser267Pro mutation
Transitional cell carcinoma of bladder	Frequent <i>FGFR3</i> mutations: Arg248Cys; Ser249Cys; Gly372Cys; Lys652Glu
Thyroid carcinoma	Over expression of FGFR3
Cervical carcinoma	Low frequency of <i>FGFR3</i> mutation: Ser249Cys
Colorectal cancer	Aberrant splicing and activation of cryptic splice sequences in <i>FGFR3</i>
Peripheral T cell lymphoma	Translocation and fusion of <i>FGFR3</i> with <i>ETV6</i> t(4;12)
Multiple myeloma	Activating mutations of <i>FGFR3</i> (Lys650Glu; Lys650Met) associated with chromosomal translocation t(4;14) (p16.3;q32.3)
Head and neck squamous cell carcinoma	FGFR4 polymorphism: Gly388Arg

Tab.2.6. Genetische Mutationen des FGFRs bei Krebserkrankungen des Menschen (Eswarakumar, Lax, & Schlessinger, 2005).

Splice-Varianten der FGFRs:

Verschiedene FGF – Rezeptoren können auf 2 Arten exprimiert werden: Die Exprimierung von Splicevarianten eines FGFR Gens oder verschiedener FGFR Gene.

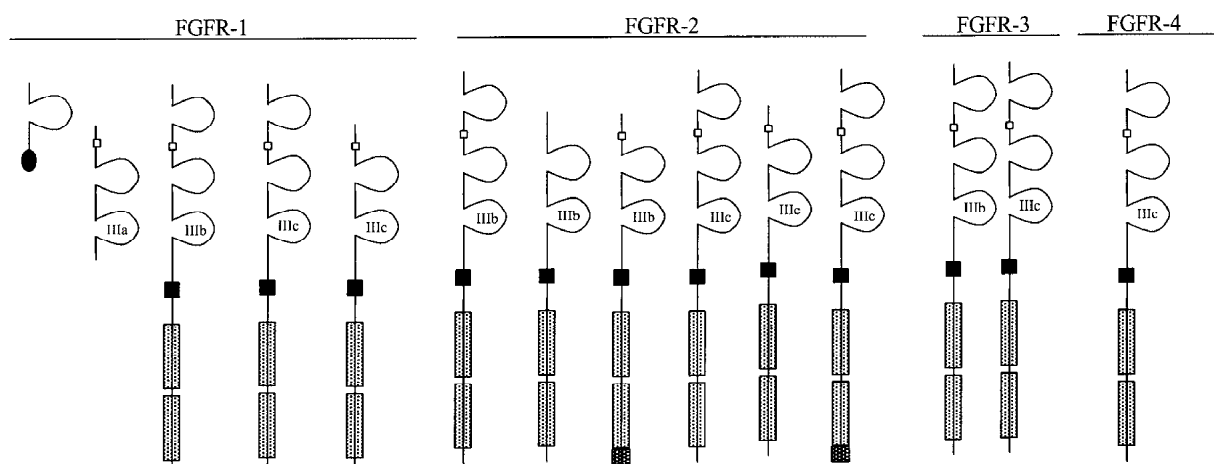


Abb.2.16. Mögliche representative Vielfalt an FGFR durch die Verwendung von splice Varianten

Einer der wichtigsten Mechanismen, durch welchen FGFRs die Spezifität für verschiedene FGFs bestimmen, ist die abwechselnde Exon Verwendung der IgIII – Formen. Die für die 3 möglichen IgIII – Domänen (IgIIIa, IgIIIb und IgIIIc) codierenden Exons sind in FGFR-1, -2 (*Johnson et al. 1991*) und -3 (*Chellaiah et al. 1994*) nebeneinander im selben Muster angeordnet.

Beim FGFR4 gibt es nur eine mögliche Form von IgIII Domäne (*Vainikka et al. 1992*).

IgIIIa codiert für ein gekürztes Protein, welches sezerniert wird aber kein Transmembranprotein ist. Daher kann es nicht selbstständig ein extrazelluläres Signal übermitteln, obwohl es FGFs absondern und FGF – Signalisierung verhindern kann.

Da die unterschiedliche Expressierung von IgIIIb wichtig für die FGF – Signal – Spezifität ist, könnte man daraus schließen, dass dieselbe IgIII – Domäne Bindungsspezifität verleiht unabhängig welches FGFR – Gen exprimiert wird. Dies ist aber nicht der Fall, zB. FGF7 bindet FGFR2 (IIIb) aber nicht FGFR1 (IIIb) oder FGFR3(IIIb), obwohl alle 3 die gleiche Splicevariante (IgIIIb) besitzen (Ornitz: 1996). Alternatives mRNA Splicing im FGFR – Gen bestimmt die Sequenz der Carboxy-terminal –Hälfte der Immunglobulin-Domäne, was zu den 2 Isoformen von FGFR führt, IIIb und IIIc (*Miki et al. 1992; Chellaiah et al. 1994*).

Bei in vitro - Modellen wurde eine Bindungsspezifität festgestellt für jede splice Form von FGFR1-3 und für FGFR4, der nicht alternativ gespliced wird (*Ornitz et al. 1996*). Das FGFR2 - Gen codiert für mehrere Splice – Varianten (*Dionne et al. 1990; Miki et al. 1991; Savagner et al. 1994; Katoh and Katoh 2005*).

2.14.2 FGFR und Darmkrebs

Dass FGF und ihre Rezeptoren im Darm vorhanden sind wurde mehrfach beschrieben. Weiters wurde gezeigt, dass sie die Proliferation von Darmepithelzellen stimulieren (*Nice et al. 1991; Dignass et al. 1994; Housley et al. 1994*).

Bei Kolonkazinomzellen wurde gezeigt, dass FGFR1-IIIc autokrin überreguliert, wohingegen FGFR3-IIIb runterreguliert wurde (Tomlinson, Hurst, & Knowles, 2007). In unserem Labor wurde nachgewiesen, dass die Expression von FGF18 während der Tumorprogression in Kolonkarzinomzellen erhöht wird, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinniveau. Weiters wurde gezeigt, dass FGF18 das Wachstum von

Tumorzellen stimuliert und ihr Überleben und ihre Fähigkeit zur Migration fördert. Zusätzlich erhöht er Wachstum und Migration von Tumor-assoziierten Fibroblasten und induziert Gefäßbildung in Endothelzellen (Sonvilla et al. 2008). Ebenso wurde gezeigt, dass FGFR3-IIIc bei Colocarzinomen Zellwachstum und Zellmigration stimuliert (Sonvilla et al. 2010).

2.15. FGFR4

FGF4 (genauso wie FGF3F und FGF19) liegt am Chromosom 11q13 lokalisiert. Beim FGF – Rezeptor 4 Gen wurde ein Polymorphismus (Gly388Arg) gefunden, der mit erhöhtem individuellen Risiko für Brust-, Prostata- und kolorektalem Krebs korreliert. Patienten mit Arg388 – Allel haben geringere Überlebenschancen als Träger des Gly/Gly – Homozygoten (Falvella et al. 2009; Spinola et al. 2005; *FitzGerald et al. 2009; FitzGerald et al. 2009*).

Es kommt aufgrund einer Keimbahn – Mutation im FGFR4 – Gen zu einer Expression von FGFR4, die entweder Glycin oder Arginin am Codon 388 enthält. Bei diesem Single – Nukleotid - Polymorphismus wird also Glycin durch Arginin an der Aminosäure 388 ersetzt. Lungenkrebs betreffend wurde gezeigt, dass Patienten des Arg/Arg – Genotyps oder Gly/Arg – Genotyp verglichen mit Gly/Gly Genotyp – Trägern schon jünger an Krebs erkranken, durchschnittlich 60,2 gegenüber 63,4 Jahre (*Spinola et al. 2005*). Die Rolle des FGFR4 während der Tumorgenese wird durch eine erhöhte Expression deutlich. Zum Beispiel wird FGFR4 sehr stark exprimiert in RMS (Rhabdomyosarcoma), sowohl auf RNA- als auch auf Protein – Niveau und agiert so als Onkogen (*Khan et al. 2001; Baird, Davis et al. 2005; Taylor et al. 2009*). Die Überexprimierung von entscheidenden Genen, wie zB. FGFR4, die zu einem unkontrollierten Zellwachstum führt, ist eines der ausschlaggebenden Ereignisse bei maligner Progression (*Bange et al. 2002*). FGFR4 spielt weiters eine Schlüsselrolle bei myogener Differenzierung und Muskelregeneration nach Verletzungen (*Zhao et al. 2006; Zhao and Hoffman 2004*). Auch Kolonkrebs betreffend wird das FGFR4 Arg388 – Allel mit schlechterer Prognosen in Zusammenhang gebracht (Bange et al. 2002).

Die Expression des FGFR4 Arg388- Allel resultiert in gesteigerter Zellmotilität und Gewebsbefall, sowie einer Hochregulierung von Genen wie uPAR (*Wang et al. 2004*) und Ehm2 (*Wang et al. 2008*), welche Gewebsbefall und Metastasierung steigern. Yang vermutet einen ein Zusammenwirken des Polymorphismus mit TP53

das krankheitsspezifische Überleben der Patienten betreffend (Yang et al. 2006). Es wurde weiters gezeigt, dass FGF4 die Proliferation und Reifung von Megakaryocyten stimuliert (Konishi, Yasuda, Sakamoto, 1996).

Bei Brustkrebs wurde gezeigt, dass FGFR4 zur Aktivierung des MAPK - Signalwegs beiträgt und dadurch die Proliferation stimuliert (*Koziczak and Hynes 2004*); (*Shaoul et al. 1995*). Das FGFR4 – Protein wird bei über 30% der Brustkrebs - Patienten überexprimiert (*Koziczak et al. 2004*). Die Inhibition des FGFR – Signals führt zu einer Blockierung der Proliferation in von Brustkrebszellen abgeleiteten Zelllinien, die FGFR2 und FGFR4 überexprimieren (Ray et al. 2004). Daraus kann geschlossen werden, dass beide Rezeptoren als Onkogene bei Brustkrebserkrankungen agieren.

Eine neue Studie zeigt, dass die Hinaufregulierung der Expression des FGFR4 - Gens zu einer Chemotherapie – Resistenz führen kann (Roidl et al. 2009). Dabei wurde gezeigt, dass die FGFR4 – Expression bei Doxorubicin - behandelten, apoptoseresistenten Krebszellklonen erhöht ist. (Knights and Cook 2010). FGFR4 wird mit aggressiven und großen Tumoren in Zusammenhang gebracht. Bisher ist dieser Zusammenhang Darmkrebs betreffend allerdings noch umstritten.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zellkultur – Materialien

Zellkulturschalen: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 oder 10cm. 6- und 12-Wellplatten

Medium: Minmal Essential Medium (MEM), Sigma, St. Louis, MO, USA mit 10%FCS, 1g/l D-Glucose, sowie 0,3g/l Glutamin und 25mM HEPES. Weiters sind Vitamine, essentielle Aminosäuren und anorganische Salze., sowie 20µg/ml Penicilin – Streptomycin beigemischt.

Penicilin – Streptomycin: PAA Pasching, Österreich

Fötales Kälberserum (FCS): PAA, Pasching, Österreich

Rinderserumalbumin (BSA): Sigma, St. Louis, MO, USA

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): Sigma St. Louis, MO, USA

PBS – EDTA: Merck, Darmstadt, Deutschland, 10mM EDTA in PBS

Trypsin/EDTA: PAA, Pasching, Österreich

G418: PAA, Pasching, Österreich, Stocklösung 50mg/ml

Serumfreies Medium (SFM)

3.1.2 Zelllinie

HCT116

Humane kolorektale Karzinomzellen, von ATCC (CCL.247)

Die Zelllinie HCT116 wurde aus einem primären Kolonkarzinom durch MG Brattain et al. isoliert (*Brattain et al. 1981*). Der Patient hatte das HNPCC – Syndrom und daher weisen die Zellen einen homozygoten Verlust des hMLH – Gens auf. Weiters weist die Zell – Linie eine K-ras Mutation am Codon 13 auf.

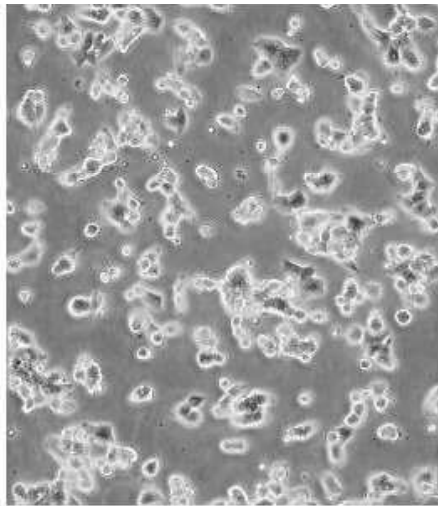


Abb.3.1. . HCT116 Zellen (ATCC)

Splitten der Zellen:

Wenn Zellen zu cirka 90% konfluent sind, werden sie gesplittet: 1:5, 1:10, 1:20. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen mit PBS/EDTA gewaschen, dannach für 5-10 Minuten mit Trypsin bei 37Grad inkubiert. Wenn sie sich abgelöst haben, werden sie in Medium aufgenommen und umgesetzt, je nach Versuchsansatz in Petrischalen mit 6cm-, 10cm – Durchmesser, 6-Well-Palppen, 24-Well-Platten oder 96-Wellplatten.

3.1.3. Colony Formation Assay

Der Assay bestimmt die Fähigkeit von Tumorzellen aus sehr dünnen Kulturen zu Kolonien heranzuwachsen.

Es werden 6 Wellplatten verwendet und 1×10^2 Zellen/Well hingesezt. 10% FCS MEM werden zugegeben. Zellen, die sich nicht angeheftet haben, werden nach 24 Stunden entfernt und frisches Medium wird zugegeben. Nach 7 Tagen wird das Medium abgesaugt und die Kulturen mit PBS gewaschen und 20min bei -20°C mit Methanol fixiert. Dann wird wieder mit PBS gewaschen und die Kolonien mit 0,01% Kristallviolet in PBS für ein paar Minuten gefärbt. Es wird mit PBS gewaschen, die Platten trocknen gelassen und die Kolonien ausgezählt.

3.1.4. Filter Migration Assay

Der Filter Migration Assay prüft die Fähigkeit der Zellen zu wandern.

Es werden Filtermembranen mit 8- μm -Poren – Größe in 24 – Wellplatten verwendet. Die Zellen werden mit einer Dichte von 8×10^4 Zellen/Wellen zu jeweils

0.2 ml Medium in den Filter und 0.8 ml Medium in die untere Kammer gegeben. Der Filter wird nach 24h entfernt.

- Der Filter wird mit PBS gewaschen, und die an der oberen Seite des Filters sitzenden Zellen werden mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt, es wird ein zweites Mal mit PBS gewaschen. Dann werden die Zellen mit Methanol fixiert bei -20°C. Es wird wieder mit PBS gewaschen und danach die Zellen mit 0.01% Kristallviolett in PBS für ein paar Minuten gefärbt. Es wird nochmals mit PBS gewaschen, dann trocknen gelassen und zuletzt die Kolonien gezählt.
- Das Medium in der unteren Kammer wird gewechselt und für 4-7 Tage inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und es wird mit PBS gewaschen, dann wieder fixiert und gefärbt wie oben beschrieben.

3.1.5. Soft Agar Assay

Der Soft Agar Assay prüft die Fähigkeit der Zellen zu wachsen, ohne an eine Unterlage angeheftet zu sein. Dazu werden sie in Softagar kultiviert. Die Größe und Anzahl der gebildeten Kolonien ist ein Maß für die Malignität der Zellen.

Es wird zuerst ein Boden aus Agar in 6-Well-Platten gegossen der über Nacht im Brutschrank fest wird. Am nächsten Tag wird eine weitere Agar-Schicht darüber gegeben, in der die Zellen enthalten sind. Die Platte kommt für 3min in den Kühlschrank, damit der Agar fest werden kann und danach für 3 Wochen in den Brutschrank.

Medium für den Soft Agar Assays:

10ml 10x RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA)

2ml NaHCO₃

1ml L-Glutamin,

17ml Aqua Bidest,

50µl Folsäure (amg/ml in NaHCO₃)

Die Lösung sollte einen pH – Wert von 8 haben. Das Medium wird steril filtriert und FCS und Penicillin/Streptomycin dazugegeben. Das Medium wird auf 37-40°C bis zum nächsten Tag gelagert.

Zubereitung des Agars:

1,2g Agar und 80ml steriles Aqua Bidest werden in der Mikrowelle aufgekocht, 20ml vorgewärmtes Wasser hinzugegeben und im Wasserbad auf eine Temperatur von 40°C gebracht. Zum Gießen des Bodens wird der Agar mit dem Medium 1:1 gemischt. 5×10^3 Zellen werden mit Trypsin/EDTA gelöst, in 750µl Medium aufgenommen und dieselbe Menge warmer Agar wird zum Medium mit den Zellen gemischt. Jeweils 1,5ml werden auf die Wells der 6 – Wellplatte, welche schon eine Schicht Agar enthielten, aufgetragen. Diese wird für 3 min auf 4C abgekühlt, dadurch wird der Agar fest. Anschließend werden die Platten für 3 Wochen im Brutschrank bei 37C inkubiert.

Die Anzahl der gebildeten Mikroskop wird unter dem Mikroskop auf 5 verschiedenen Feldern der Wells ausgezählt.

3.2. Protein Expression

3.2.1. FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting)

Mithilfe der Durchflußzytometrie werden Zellen nach Fluoreszenzintensität analysiert und sortiert. Sowohl fluoreszenzmarkierte Antikörper als auch DNA und RNA können so bestimmt werden. Um den DNA – Gehalt zu bestimmen werden die Kerne isoliert und mit PE inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet an die DNA. Die Kerne werden durch eine Kapillare einzeln aufgesaugt und passieren einen Anregungslichtstrahl. Das erzeugt Fluoreszenzlicht wird mittels Detektoren gemessen und korreliert mit dem Gehalt der DNA. Die Bestimmung von Zelloberflächenproteinen ist mithilfe von Antikörpern möglich die mit Fluoreszenz – Farbstoffen konjugiert sind. So kann eine Sortierung verschiedener Merkmale erfolgen.

Aufbereitung der Zellen für die FACS:

Die Zellen sollten 50-70% konfluent sein. Zuerst wird das Medium abgesaugt, dann werden die Zellen mit PBS-EDTA gewaschen und abtrypsinisiert. Zellen werden in neuem Medium resuspendiert und ausgezählt: $0,25-1 \times 10^6$. Waschen mit 1ml PBS, vortexen, zentrifugieren 5min bei 1500rpm. Resuspendieren in 100µl PBS. Blocken durch Zugabe von 30µl FCS und Inkubation von 10 Minuten auf Eis.

Von nun an muss im Dunklen gearbeitet werden, da sonst der Antikörper ausbleicht. Zugabe des Antikörpers:

Normale Proben: Zugabe des PE - konjugierten Antikörpers, pro 130µl Volumen der Probe kommen 13µl Antikörper.

Kontrollen: gleiches Volumen an Kontroll –Antikörper (Maus Ig alpha PE konj.) zugeben.

Mindestens 45 Minuten inkubieren, mit Alufolie abdecken! Waschen mit 1ml PBS, vortexen und zentrifugieren für 5min bei 1500rpm, 4°C. Überstand absaugen und Pellet in 500µl PBS resuspendieren und in FACS – Röhrchen überführen.

Es wird ein FACScalibur Gerät (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) zur Messung verwendet. Die verwendete Software ist CELLQUEST (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) und MOD-FIT.

3.3. RNA – und DNA-Expression

3.3.1. RNA Isolation

Die RNA – Isolation liefert eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit, da nur die Gene, welche zu dem exakten Moment in der Zelle transkribiert werden, vorliegen.

Lösungen für die RNA - Isolation:

0,1M NaOH

DEPC – Wasser

70% EtOH in DEPC

Trizol

Chloroform

Isopropanol

Es muss unbedingt RNase – frei und auf Eis gearbeitet werden. Auch die Zentrifuge sollte gekühlt sein (4°C).

Das Medium wird gründlich abgesaugt, 1ml Trizol auf 10er PD gegeben und für 10min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden abgeschabt und 3x in steriler Spritze aufgezogen und ausgestoßen, 200µl Chloroform zugeben und gevortext, 10min auf Eis stehen gelassen, bei 15000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und in steriles Eppi übergeführt. Die Hälfte der Trizolmenge (0,5ml) Isopropanol wird zugeben (RNA-Fällung), für 30sec geschüttelt, 10min auf Eis stehen gelassen, zentrifugiert bei 12200rpm für 10min, der Überstand mit Pipette abgenommen und das Pellet in 1ml 70%EtOH in DEPC gewaschen, zentrifugiert bei 15000rpm für 15min, der Überstand abgesaugt, das Pellet trocknen gelassen und in 30-50µl DEPC aufgenommen und bei 65-70°C inkubiert (um RNA zu denaturieren).

Die RNA-Lösung wird bei -80°C gelagert oder quantitativ photometrisch gemessen bei 260/280nm.

RNA – Quantifizierung:

Um die RNA Menge in den Proben zu messen wird ein NanodropTM Spektrophotometer (Peylab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) verwendet. Die verwendete Software ist ND1000.

3.3.2. cDNA – Synthese

Die RNA – Konzentration sollte 5 µg/10µl nukleasefreies Wasser betragen, es werden 2,5µl Random Hexamer Primer Mix hinzugegeben und bei 70°C für 5min inkubiert. Danach wird auf 4°C abgekühlt. 6.5µl des zuvor zubereiteten Mastermix werden hinzugegeben und für 5min bei 25°C inkubiert. Es wird 1µl reverse Transkriptase (RevertAidTM MmuLV) hinzugegeben und bei 20°C für 10min inkubiert, danach für eine Stunde bei 42°C, bei 70°C für 10min und dann wieder auf 4°C abgekühlt. Es werden 80µl DEPC - Wasser dazugegeben und die cDNA – Lösung mit einer Konzentration von 5µg/100µl, wird bei -20°C gelagert.

Lösungen für die cDNA – Synthese:

Random Hexamer Primer Mix:

1 µl 100µM Hexamer Primer Lösung (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)

0.5 µl DEPC - Wasser

Mastermix:

4 µl 5 x Einzelstrang Puffer (MmuLV – Puffer, Fermentas, Burlington, Kanada)

2 µl dNTP Mix (10 µl jedes Nukleotids in 60 µl DEPC – Wasser, Roche, Basel, Schweiz)

0.5 µl RNase inhibitor (Fermentas, Burlington, Kanada)

3.3.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR bewirkt eine selektive Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnitts.

Es muss auf Eis gearbeitet werden während die PCR in Tubes angesetzt wird. Es werden jeweils 6,5µl cDNA-Mix für das Haushaltsgen und für das gesuchte Gen pipettiert. Dann werden 6µl Primer-Mix zugegeben. Zu den 12,5µl wird dieselbe Menge PCR-Mastermix zugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 25µl zustandekommt. Die Proben kommen ins PCR-Gerät (iCycler, BioRad, Hercules).

Das Haushaltsgen (GAPDH) wird früher, nach 22 Zyklen, herausgenommen. Die DNA wird anschließend auf -20°C eingefroren.

Lösungen für die PCR:

DEPC – Wasser

Nukleasefreies Wasser

PCR-Mastermix

Primer-Stocks

CDNA-Mix : 1µl cDNA

5µl DEPC

Primer-Mix : 1µl 3'-Primer

1µl 5'-Primer

4µl DEPC

3.3.4. Gelelektrophorese

Es werden 10µl PCR-Produkt und 2µl 6xloading buffer zusammenpipettiert. Weiters 1µl Marker und 2µl 6xloading buffer. Die Proben werden auf das Gel aufgetragen und für 60min bei Volt laufengelassen.

Lösungen für das Gel:

150µl TAE 50%

1,125 ml Acrylamid

6,175ml Abidest

5µl TEMED

50µl 10%APS

6x loading buffer:

-0,24g Harnstoff

-0,4g Saccharose

-0,001g Bromphenolblau

-0,001g Xylenolblau

Auf 1l mit 1xTAE auffüllen

Marker: 100bp

3.3.5. PCR Arg338Gly Polymorphismus

Lösungen für den Verdau:

2,5µl Wasser

1µl MspI

1,5µl 10xPuffer Tango

10µl PCR Produkt

Eine Stunde bei 37°C inkubieren.

Lösungen für das Gel:

2,4ml 5xTBE

2,76ml PA

6,84ml Wasser

100µl APS

10µl TEMED

1,5h auspolymerisieren lassen. Dann wird das Gel für 60min bei 125 Volt laufen gelassen.

3.3.6. Real time quantitative PCR

Die rt – PCR (qPCR) bietet, wie die normale PCR, die Möglichkeit zur Amplifizierung eines DNA -Abschnittes, macht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich. Sogenannte Taqman® Proben binden während dem Vorgang der Amplifizierung an das zu untersuchende Gen. Dieses Taqman® Proben sind mit 2 unterschiedlichen Farbstoffen markiert, einem Reporter und einem sogenannten Quencher („Löcher“). Es kann keine Fluoreszenz gemessen werden solange sich der Reporter in der Nähe des Quenchers befindet, der Quencher unterdrückt diese. Wenn sich der Quencher infolge des Abbaus der Taqman® Probe durch die Taq-Polymerase vom Reporter wegbewegt, kann die Reporterfluoreszenz gemessen werden.

9µl cDNA-Mix werden zu 11µl Mastermix pipettiert und auf eine speziell für rt-PCRs angefertigte 96Well-Platte aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgeklebt und anschließend für 5min bei Raumtemperatur und 1500rpm zentrifugiert. Die rt-PCR läuft in einem ABI PRISM 7000 Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Expressionslevel folgender Gene wurden gemessen: GAPDH, FGFR4^{Arg}, FGFR4^{Gly}, FGFR4^{pcDNA3} und FGFR4^{GFP}.

Die Auswertung erfolgt mit der ABI PRISM 7000 SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und der sogenannten $\Delta\Delta C$ Berechnungsmethode. Das untersuchte Gen wird in Korrelation zum Haushaltsgen, GAPDH, gesetzt, um eine genaue Quantifizierung der Expression zu gewährleisten.

Lösungen für die rt-PCR:

cDNA-Mix:

1µl cDNA

8µl nukleasefreies Wasser

rtPCR-Mastermix:

1µl Taqman®-Probe, spezifisch für bestimmtes Gen (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

10µl Taqman® Universal PCR-Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

3.4. Transfektion

3.4.1. Elektroporation

Mithilfe eines elektrischen Feldes, das durch einen Kondensator erzeugt wird die Zellmembran durchlässig gemacht und die DNA kann eingeschleust werden.

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und abtrypsinisiert. Anschließend werden 800µl mit 5×10^6 Zellen in Küvetten gegeben.

3.4.2. Lipofektion

Die angehefteten Zellen werden auf 6 - Wellplatten transfektiert, Mittels Biorad - *Transfectin Lipid Reagents*.

Lösungen für die Lipofektion:

3 µg Plasmid DNA

10 µl Transfectin

125 µl SFM

Die Plasmid- und die Transfectin –Mischungen werden zusammengemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA – Transfectin Komplexe werden nun zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden bei 37°C inkubiert und nach 4-6 Stunden wird das Medium gewechselt. Anschließend erfolgt eine Selektion der stabilen Klone mit Geneticin (G418) für 3 Wochen.

3.5. Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Es wurden folgendes Test durchgeführt: Kruskal – Wallis - Verfahren, Two way ANOVA- und Bonferroni – Test.

4. ERGEBNISSE

4.1. Herstellung von FGFR4 – überexprimierenden Zelllinien

4.1.1. Expression auf DNA-Niveau

Es wurden Plasmide die unterschiedliche Arten von FGFR4 exprimieren in die Zelllinie HCT116 transfektiert : eine Gly –und eine eine Arg – Variante des Rezeptors, sowie pCDNA3 und GFP als Kontrollen (Abb.4.1).

Stabile Klone wurden durch Selektion mithilfe von G418 selektioniert. Nach ungefähr 3 Wochen bildeten sich überexprimierende Klone und die Überexpression auf mRNA – Niveau wurde mittels RT-PCR nachgewiesen.

Die lipofektierten Zellen zeigten bessere Expressionsraten als die elektroporierten., und zwar exprimieren die FGFR4^{Arg} - Transfektanten den Rezeptor 12,5 mal stärker als die pcDNA3 – Kontrolle. FGFR4^{Gly} – Transfektanten 7,5-fach stärker (Abb.4.1.). Die elektroporierten FGFR4^{Arg} – Transfektanten zeigen eine 8,3 mal und die FGFR4^{Gly} – Transfektanten eine 6,6 mal stärkere Expression. Abb. 4.1. zeigt die unterschiedlichen Expressionsraten.

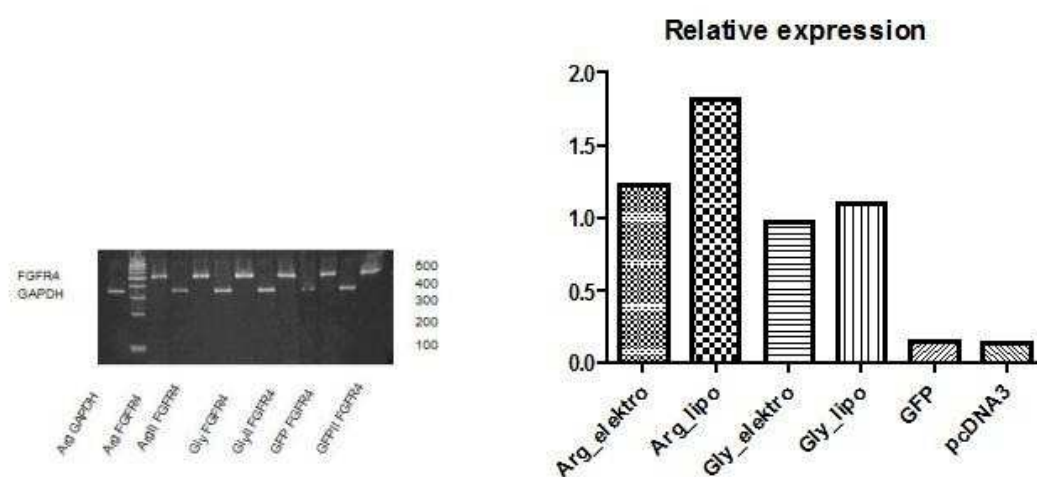


Abb.4.1. PCR der FGFR4^{Arg} –, FGFR4^{Gly} - Transfektanten, sowie der pcDNA3- und GFP - Kontrollen
2. Die Expressionsraten der FGFR4^{Arg} –und FGFR4^{Gly} - Transfektanten, sowie der Kontrollen, pcDNA3 und GFP, wurden mittels rt – PCR ermittelt

Zum Nachweis der polymorphen Formen von FGFR die die Zellen exprimieren, wurden FGFR4^{Arg} und FGFR4^{Gly} PCR – Produkte einer Restriktionsfragmentanalyse unterworfen. Abb.4.2. zeigt, dass die Transfektanten tatsächlich die gewünschte Rezeptorvariante exprimieren. Es wurden jene Klone untersucht, die die stärkste Überexprimierung zeigten, also die lipofektierten Varianten.

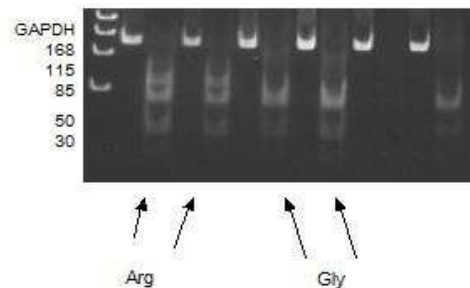


Abb.4.2. PCR des Arg/Gly – Polymorphismus, FGFR4^{Arg} haben die erste Schnittstelle verloren, wodurch ein größeres Bruchstück übrigbleibt. Ohne Schnittstelle liegt die Bande bei 168b, bei FGFR4^{Arg} jeweils bei 50b und 115b. Bei FGFR4^{Gly} bei 30b, 50b und 85b.

4.1.2. Protein – Expression

Um eine Überexpression von FGFR4 an der Zellmembran zu zeigen wurde eine FACS – Analyse durchgeführt. Der Anteil von FGFR4 - positiv gefärbten Zellen in den Kontrollkulturen ist äußerst niedrig (6,21%). In FGFR4^{Gly} Transfektanten ist der Anteil gleich während in FGFR4^{Arg} Tranfektanten eine Verdopplung auf 13,9% zu beobachten war. Es wurde nach dem Kruskal – Wallis – Verfahren getestet, die Ergebnisse sind nicht signifikant.

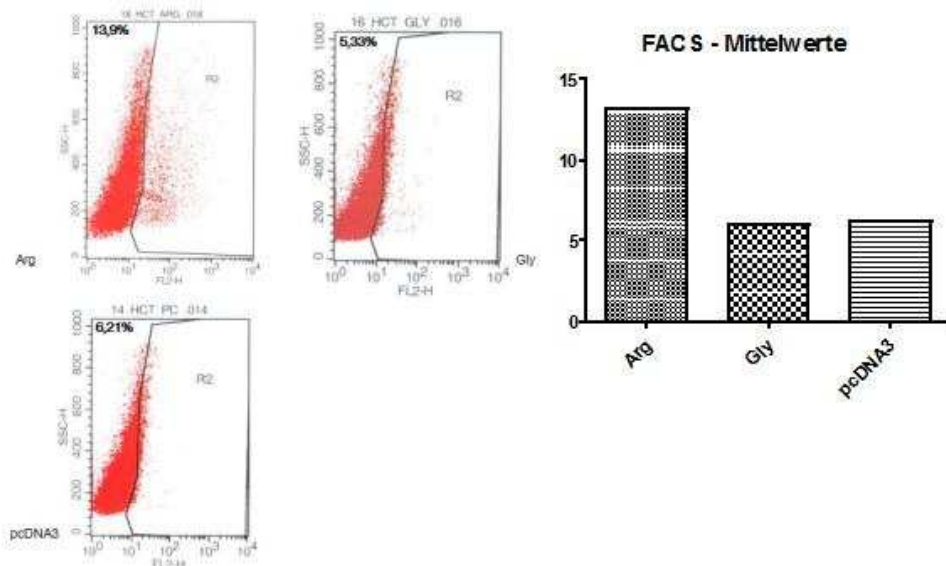


Abb.4.3.1. FACS - Analyse der FGFR4^{Arg} -, FGFR4^{Gly} - Transfektanten sowie der Kontroll - Kultur pcDNA3, 4.3.2. Zusammenfassung der Mittelwerte der betreffenden Kulturen

4.2. Biologische Konsequenzen der FGFR4 - Überexpression

4.2.1. Colony formation Assay

Um die Fähigkeit der Transfektanten zu bestimmen, in sehr dünnen Kulturen zu wachsen und Kolonien zu bilden, wurden je 400 Zellen in 6-Well-Platten angesetzt und nach 5 Tagen die Anzahl der gebildeten Kolonien bestimmt.

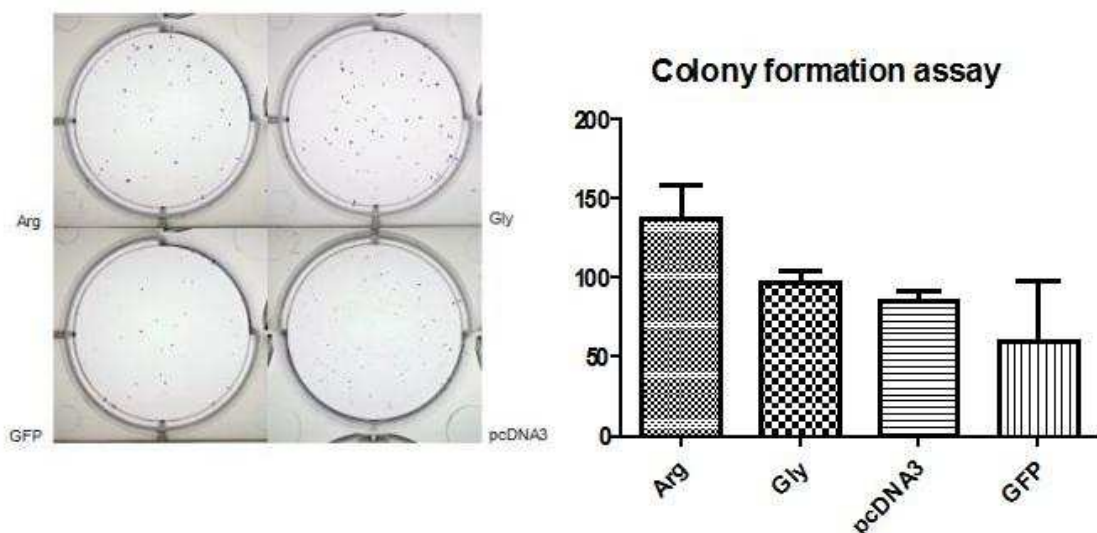


Abb.4.4.1. Kolonie - Bildung der FGFR4^{Arg} -, FGFR4^{Gly} Transfektanten sowie der Kontrollen GFP und pcDNA3, 4.4.2. Vergleich der Mittelwerte der Kolonienanzahl der betreffenden Kulturen

Eine quantitative Auswertung der Kolonienzahl zeigt, dass die Fähigkeit Kolonien zu bilden bei FGFR4^{Arg} und FGFR4^{Gly} – Zellen deutlich besser war als bei den Kontrollen (Abb.4.4.1). Dieses Ergebnis ist signifikant (ANOVA; $p=0,0136$). Insbesondere ist die Zahl der Klone der FGFR4^{Arg}-Transfektanten gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Dies wurde mit ANOVA und Bonferroni – Posttest herausgefunden. Weiters fiel auf, dass die FGFR4^{Gly} - Zellen große Kolonien und die FGFR4^{Arg} – Zellen kleine Kolonien bilden (Abb. 4.5).

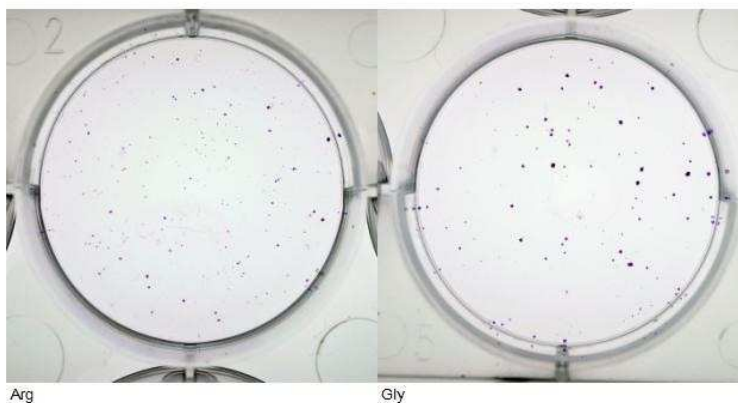


Abb.4.5. Größenvergleich der FGFR4^{Arg} - und FGFR 4^{Gly}- Kolonien

4.2.2. Filter migration Assay

Mit diesem Assay wird das Migrationsverhalten verschiedener Zellen untersucht. Es wurden jeweils 80 000 Zellen/Well auf Filter in 24-Well-Platten hingestetzt. Nach 24 Stunden wurde der Filter entfernt und weitere 3 Tage später fixiert, gefärbt und ausgezählt, wieviele Zellen hindurch gewandert sind (Abb.4.6). Die quantitative Auswertung ergab, dass die FGFR4^{Arg} - Transfektanten am besten gewandert sind und zwar die 6 fache Menge an Zellen gegenüber der Kontrolle. Bei den FGFR4^{Gly} – Transfektanten migrierten doppelt so viele. Das Ergebnis ist signifikant (ANOVA; $p=0,0020$). Vorallem ist die Migrationsfähigkeit der FGFR4^{Arg} - Transfektanten gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Die FGFR4^{Arg} – Transfektanten wandern signifikant besser als die FGFR4^{Gly} – Transfektanten. Dies wurde mit ANOVA und Bonferroni – Posttest bestätigt. Auffallend war wieder, dass die Gly - Variante die größten Kolonien bildete (Abb.4.6).

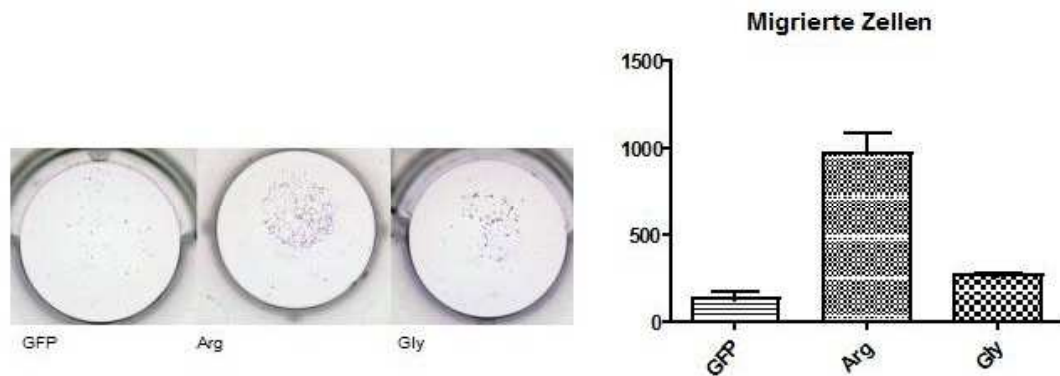


Abb.4.6.1. Migration Assay der Kontrolle GFP und der FGFR4^{Arg} - und FGFR 4^{Gly}- Zellen 4.6.2. Zusammenfassung der Mittelwerte der jeweiligen Zellarten

4.2.3. Soft Agar Assay

Die Fähigkeit ohne Kontakt zu einem spezifischen Untergrund Kolonien zu bilden, und somit autonom zu wachsen wurde mit dem Soft Agar Assay untersucht. Es wurden je 5000 Zellen hingesezt und 3 Wochen später ausgezählt. Die FGFR4^{Gly} - Zellen wuchsen am besten und bildet die größten Kolonien, während die FGFR4^{Arg} - Zellen zwar mehr Kolonien als die Kontrollen bildeten, diese waren aber deutlich kleiner als jene der FGFR4^{Gly} - Zellen (s. Abb.4.7). Dieses Ergebnis ist nicht signifikant.

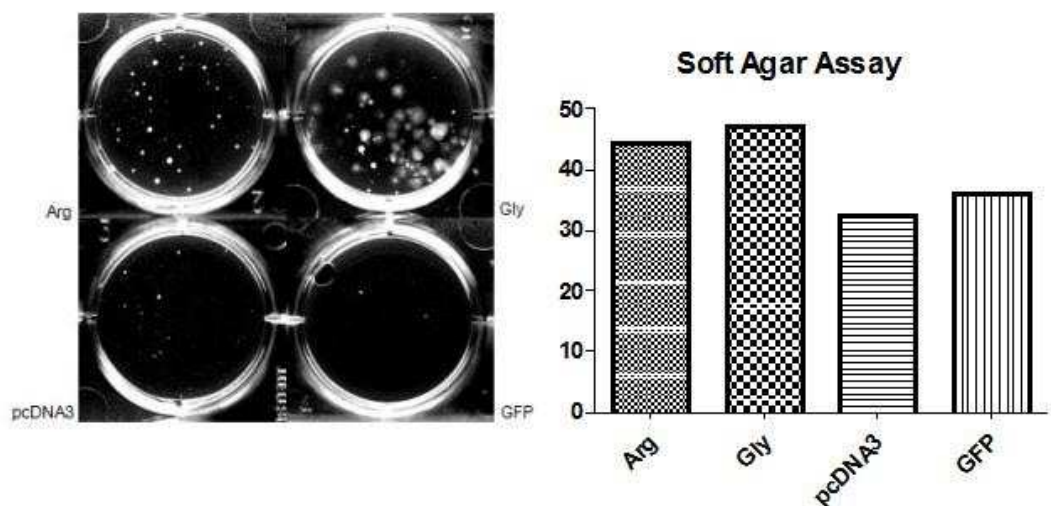


Abb.4.7.1. Soft Agar Assay der FGFR4^{Arg} , FGFR 4^{Gly}- Zellen, sowie der Kontrollen pcDNA3 und GFP 4.7.2. Vergleich der Mittelwerte der unterschiedlichen Zellarten

5. DISKUSSION

5.1. Ziel der Arbeit

Ziel der Diplomarbeit war es, die Auswirkungen einer FGFR4 Überexpression in HCT116 Kolonkarzinomzelllinien zu untersuchen. Aus früheren Arbeiten mit SW480 Kolonkarzinomzellen in der Gruppe war bekannt, dass beide polymorphen Formen des Rezeptors Clonogenicity, Migration sowie auch Wachstum in Soft-Agarmedien stimulierten. Die beiden Zelllinien haben einen Gly/gly homozygoten Genotyp, unterscheiden sich aber deutlich in Ihrer Expression von FGFR4, die in HCT116 deutlich höher liegt. Daher ergab sich die Frage, ob dieser Unterschied in der endogene Expression die Auswirkungen einer Überexpression beeinflusst und möglicherweise abmildern kann.

5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurden Transfektanten hergestellt die größere Mengen FGFR4 exprimieren sollen als die Kontrollen. Die FGFR4^{Arg} – Transfektanten zeigen eine 12,5 fach stärkere Expressionsrate als die Kontrollen, die Gly – Transfektanten eine 7,5fache. Die Überexpression von FGFR4 wurde an der Zellmembran mittels FACS – Analyse überprüft. Nur die FGFR4^{Arg} - Transfektanten zeigten eine Verdopplung der angefärbten Zellen mit 13,9% im Vergleich zu den Kontrollkulturen (6,21%), die FGFR4^{Gly} Transfektanten hatten einen gleichgroßen Anteil angefärbter Zellen wie die Kontrolle.

Die Fähigkeit der Transfektanten zu wachsen und Kulturen zu bilden wurde mithilfe des Colony formation Assays untersucht. Sowohl die FGFR4^{Arg} - als auch die FGFR4^{Gly} - Transfektanten wuchsen schneller als die Kontrollen.

Ob dieses Überexpression zu verstärkter Migration und anderen biologischen Konsequenzen führt wurde mit verschiedenen Assays überprüft. Die Ergebnisse der Migrationassays zeigen, dass die FGFR4^{Arg} - Transfektanten besser migrieren und dadurch eine verstärkte Metastasierung bewirken können. In FGFR4^{Gly} - Transfektanten ist die Fähigkeit nicht so stark ausgeprägt. Die FGFR4^{Gly} - Transfektanten bilden hingegen viel größere Kolonien als die FGFR4^{Arg} - Transfektanten. Der Grund dafür, dass die FGFR4^{Gly} - Transfektanten weniger

migrieren könnte eine stärkere Anheftung an den Untergrund oder anderen Zellen in ihrer Umgebung sein.

Der Soft Agar Assay unterstützt die Ergebnisse des Colony formation Assays insofern, dass die FGFR4^{Gly} - Transfektanten größere Kolonien als FGFR4^{Arg} - Transfektanten bildet, allerdings im Gegensatz zu dem anderen Assay eine größere Anzahl an Kolonien bildet. Im Agarmedium wachsen Zellen, ohne sich an eine Unterlage anheften zu können. Unter diesen Bedingungen hatten FGFR4^{Gly} - Transfektanten beider Zelllinien das klar bessere Wachstumspotential. Diese Eigenschaft stellt im allgemeinen die in vitro Entsprechung des Tumorwachstums in Xenotransplantationsmodellen dar. Das war auch in unseren Versuchen mit SW480-FGFR4 Zellen der Fall: SW480^{Gly} Zellen wuchsen schneller und wurden größer als SW480^{Arg} Tumore.

Insgesamt ergibt sich auch für HCT116-Transfektanten das Bild, dass beide FGFR4 Allele onkogene Aktivität besitzen. Die Wirkqualitäten sind allerdings etwas unterschiedlich gewichtet: während FGFR4^{Gly} eher wachstumsfördernd wirkt, ist FGFR4^{Arg} eher ein Metastasierungs-Onkogen. Das bestätigt Befunde über die Korrelation von FGFR4^{Arg} mit der Tumorprogression und der Aggressivität eines Tumors (Bange, aber auch andere). Es widerspricht aber jenen Berichten, die dem FGFR4^{Gly} Allel eine tumorsuppressive Wirkung bescheinigen {(Stadler et al. 2006), Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen in Brustkrebszellen sehen wir mit Kolonkarzinomzellen durchaus eine Stimulation der Migration auch mit dem gly-Allel. Alle Berichte über SW480 – Transfektanten stammen aus persönlicher Kommunikation von C. Heinzle (2011).

5.3. FGFR4 in Diagnose und Therapie des Kolonkarzinoms

Da die klassischen chemotherapeutischen Wirkstoffe, zB. Doxorubicin, durch ihre ungerichtete Wirksamkeit gegen alle in Teilung befindlichen Zellen starke Nebenwirkungen verursachen und sowohl intrinsische als auch erworbene Resistenzen gegen viele Substanzen bekannt sind, die zu Rezidiven und Progression der Metastasierung des Tumors führen können, werden zunehmend krebsspezifische Zielstrukturen in Tumorzellen erforscht.

FGFRs spielen wie viele Rezeptor – Tyrosin – Kinasen eine große Rolle bei diversen Wachstums- und Entwicklungsprozessen spielen. Wird ihre Aktivität dereguliert können sie als Onkogene wirken und erhalten das Tumorwachstum und

die malignen Eigenschaften der Tumorzellen aufrecht. Daher werden sie als Zielstrukturen für die Krebstherapie betrachtet (Beenken and Mohammadi 2009); (Knights and Cook 2010); (Turner and Grose 2010).

Besonders FGFRs unterstützen das Überleben der Zellen, wenn diese mit einem chemotherapeutischen Wirkstoff behandelt wurden. FGFR-abhängige Signale regulieren antiapoptotischen Mechanismen hoch und tragen so zur Therapieresistenz bei. In diesem Zusammenhang fanden Roidl et al. heraus, dass down-stream MAPK-Signale aktiviert und die Genexpression der anti-apoptotischen Proteins bcl-xl und XIAP von FGFR-Signalen als Antwort auf die Behandlung mit Doxorubicin bzw. Cyclophosphamide hinaufreguliert wurde (Roidl et al. 2009; Pardo et al. 2002; Pardo et al. 2003). Blockade von FGFR Signalen wirkt daher synergistisch mit anderen Krebstherapeutika zB. (Fischer et al. 2008).

Aber auch die Blockade von FGFRs als Alleintherapie wird erforscht. Pharmaunternehmen haben TKI's (Tyrosinkinaseinhibitoren) entwickelt die in früher Phase der klinischen Testung sind (Turner and Grose 2010).

Martinez et al. haben FGFR3 mit Antikörpern geblockt und zeigten, dass diese antitumorale Wirkstoffe beim Blasenkrebs sein können. Auch Qunig et al. zeigten dass Antikörper gegen FGFR3 gute Wirkung bei hämatologischen und epithelialen Krebsarten haben. Wirkstoffe, die gezielt FGFR4 blockieren gibt es allerdings noch nicht.

Durch seine deutliche Auswirkung auf die Zellmigration ist FGFR4 ein wichtiger Kandidat als Therapietarget im kolorektalen Karzinom. Durch seine starke Assoziation mit schlechter klinischer Prognose kann es auch als diagnostischer / prognostischer Marker genutzt werden. Im Fall des her2 (erbb2) im Brustkrebs gibt es eine ähnliche Konstellation: die her2-überexprimierenden Tumore haben die deutlich schlechtere Prognose. Allerdings ist her2 ein geeignetes Therapietarget und seine Blockierung wirkt gezielt bei Patientinnen mit überexprimiertem her2 (Ghosh et al. 2011). Für den FGFR4 im Darmkrebs besteht diese Möglichkeit heute noch nicht. Da jedoch FGFR blockierende Medikamente von mehreren Firmen entwickelt werden, kann mit einer Einbindung dieser Rezeptoren in innovative Therapiestrategien in nächster Zeit gerechnet werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaltonen L, Johns L, Jarvinen H, Mecklin JP, and Houlston R. 2007. Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin Cancer Res* 13(1):356-361.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR et al. . 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260(5109):812-816.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N et al. . 2001. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85(5):692-696.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, and Clarke PA. 1998. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 90(9):675-684.
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y et al. . 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science (New York, NY)* 244(4901):217-221.
- Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, Knyazeva T, Muller S, Gartner S, Sures I et al. . 2002. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res* 62(3):840-847.
- Beenken A, and Mohammadi M. 2009. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8(3):235-253.
- Behrens J, and Lustig B. 2004. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 48(5-6):477-487.
- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, and Keshet E. 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103(2):159-165.

- Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, and Moses HL. 2004. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science (New York, NY)* 303(5659):848-851.
- Bos JL. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49(17):4682-4689.
- Bouck N, Stellmach V, and Hsu SC. 1996. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69:135-174.
- Brattain MG, Fine D, Khaled M, 1981. Heterogeneity of Malignant Cells from Human Colonic Carcinoma. *Cancer Res* 41:1751-1756.
- Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, Warren RE, and Donner DB. 1995. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol* 62(4):203-215.
- Brunet A, Datta SR, and Greenberg ME. 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11(3):297-305.
- Bussolino F, Mantovani A, and Persico G. 1997. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 22(7):251-256.
- Byrd VM, Ballard DW, Miller GG, and Thomas JW. 1999. Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) enhances IL-2 production and nuclear translocation of NF-kappaB in FGF receptor-bearing Jurkat T cells. *J Immunol* 162(10):5853-5859.
- Chaffer CL, Dopheide B, Savagner P, Thompson EW, and Williams ED. 2007. Aberrant fibroblast growth factor receptor signaling in bladder and other cancers. *Differentiation* 75(9):831-842.
- Chellaiah AT, McEwen DG, Werner S, Xu J, and Ornitz DM. 1994. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J Biol Chem* 269(15):11620-11627.
- Cho KR, Oliner JD, Simons JW, Hedrick L, Fearon ER, Preisinger AC, Hedge P, Silverman GA, and Vogelstein B. 1994. The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 19(3):525-531.

- Cho NK, Keyes L, Johnson E, Heller J, Ryner L, Karim F, and Krasnow MA. 2002. Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* 108(6):865-876.
- Corson LB, Yamanaka Y, Lai KM, and Rossant J. 2003. Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* 130(19):4527-4537.
- Cropp CS, Lidereau R, Campbell G, Champene MH, and Callahan R. 1990. Loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 18 in breast carcinoma: two additional regions identified. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19):7737-7741.
- Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, and Basilico C. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):233-247.
- Datta SR, Brunet A, and Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13(22):2905-2927.
- Devilee P, van Vliet M, Kuipers-Dijkshoorn N, Pearson PL, and Cornelisse CJ. 1991. Somatic genetic changes on chromosome 18 in breast carcinomas: is the DCC gene involved? *Oncogene* 6(2):311-315.
- Dignass AU, and Sturm A. 2001. Peptide growth factors in the intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13(7):763-770.
- Dignass AU, Tsunekawa S, and Podolsky DK. 1994. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* 106(5):1254-1262.
- Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, and Schlessinger J. 1990. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J* 9(9):2685-2692.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, and Levine AJ. 1993. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* 4(1):42-46.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, and Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are

developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature 356(6366):215-221.

Dufourny B, Alblas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Steenbergh PH, and Sussenbach JS. 1997. Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 272(49):31163-31171.

Eswarakumar VP, Lax I, and Schlessinger J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. Cytokine Growth Factor Rev 16(2):139-149.

Falvella FS, Frullanti E, Galvan A, Spinola M, Noci S, De Cecco L, Nosotti M, Santambrogio L, Incarbone M, Alloisio M et al. . 2009. FGFR4 Gly388Arg polymorphism may affect the clinical stage of patients with lung cancer by modulating the transcriptional profile of normal lung. Int J Cancer 124(12):2880-2885.

Faviana P, Boldrini L, Spisni R, Berti P, Galleri D, Biondi R, Camacci T, Materazzi G, Pingitore R, Miccoli P et al. . 2002. Neoangiogenesis in colon cancer: correlation between vascular density, vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 protein expression. Oncol Rep 9(3):617-620.

Fearnhead NS, Britton MP, and Bodmer WF. 2001. The ABC of APC. Hum Mol Genet 10(7):721-733.

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW et al. . 1990. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science (New York, NY 247(4938):49-56.

Fearon ER, and Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61(5):759-767.

Ferrara N, and Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161(2):851-858.

Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, and Leung DW. 1991. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. J Cell Biochem 47(3):211-218.

- Fischer H, Taylor N, Allerstorfer S, Grusch M, Sonvilla G, Holzmann K, Setinek U, Elbling L, Cantonati H, Grasl-Kraupp B et al. . 2008. Fibroblast growth factor receptor-mediated signals contribute to the malignant phenotype of non-small cell lung cancer cells: therapeutic implications and synergism with epidermal growth factor receptor inhibition. *Mol Cancer Ther* 7(10):3408-3419.
- FitzGerald LM, Karlins E, Karyadi DM, Kwon EM, Koopmeiners JS, Stanford JL, and Ostrander EA. 2009. Association of FGFR4 genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 12(2):192-197.
- Flaumenhaft R, Moscatelli D, and Rifkin DB. 1990. Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 111(4):1651-1659.
- Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH et al. . 2001. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 3(4):433-438.
- Folkman J. 1996. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med* 2(2):167-168.
- Folkmann J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1(1):27-31
- Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, and Sugimoto C. 2003. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22(56):8983-8998.
- Franke TF, Kaplan DR, and Cantley LC. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88(4):435-437.
- Furlanetto RW, Harwell SE, and Frick KK. 1994. Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro. *Mol Endocrinol* 8(4):510-517.
- Gao X, Honn KV, Grignon D, Sakr W, and Chen YQ. 1993. Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of the putative tumor suppressor gene DCC in prostatic carcinomas. *Cancer Res* 53(12):2723-2727.
- Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, Liu S, Chakrabarty A, Balko JM, Gonzalez-Angulo AM, Mills GB, Penuel E, Winslow J et al. . 2011.

- Trastuzumab Has Preferential Activity against Breast Cancers Driven by HER2 Homodimers. *Cancer Res* 71(5):1871-1882.
- Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, and Willett WC. 1994. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 54(9):2390-2397.
- Giovannucci E, and Willett WC. 1994. Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 26(6):443-452.
- Goldfarb M. 1996. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev* 7(4):311-325.
- Gonzalez AM, Hill DJ, Logan A, Maher PA, and Baird A. 1996. Distribution of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor-1 messenger RNA expression and protein presence in the mid-trimester human fetus. *Pediatr Res* 39(3):375-385.
- Gottfried E, Faust S, Fritsche J, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Miyake K, and Kreutz M. 2003. Identification of genes expressed in tumor-associated macrophages. *Immunobiology* 207(5):351-359.
- Grady WM. 2004. Genomic instability and colon cancer. *Cancer metastasis reviews* 23(1-2):11-27.
- Graff JR, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, Paul JD, Hbaiu A, Goode RG, Sandusky GE et al. . 2000. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem* 275(32):24500-24505.
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C et al. . 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446(7132):153-158.
- Griffin K, Patient R, and Holder N. 1995. Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development* 121(9):2983-2994.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M et al. . 1991.

- Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66(3):589-600.
- Guerra FK, Eijan AM, Puricelli L, Alonso DF, Bal de Kier Joffe E, Kornblihtt AR, Charreau EH, and Elizalde PV. 1996. Varying patterns of expression of insulin-like growth factors I and II and their receptors in murine mammary adenocarcinomas of different metastasizing ability. *Int J Cancer* 65(6):812-820.
- Habel O, Bertario L, Andreola S, Sirizzotti G, and Marian B. 2002. Tissue localization of TGF α and apoptosis are inversely related in colorectal tumors. *Histochem Cell Biol* 117(3):235-241.
- Hanahan D, and Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3):353-364.
- Hanahan D, and Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Harris CC. 1996. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17(6):1187-1198.
- Harris SL, and Levine AJ. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24(17):2899-2908.
- Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schuller U, Dani I, Denkhaus D, Langmann W, Bode U, Wiestler OD et al. . 2005. Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol* 166(4):1153-1162.
- Hayflick L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62(11):1180-1190.
- Hisamuddin IM, and Yang VW. 2004. Genetics of colorectal cancer. *MedGenMed* 6(3):13.
- Hofseth LJ, Hussain SP, and Harris CC. 2004. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25(4):177-181.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, and Harris CC. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science (New York, NY)* 253(5015):49-53.

- Hommes DW, Peppelenbosch MP, and van Deventer SJ. 2003. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52(1):144-151.
- Housley RM, Morris CF, Boyle W, Ring B, Biltz R, Tarpley JE, Aukerman SL, Devine PL, Whitehead RH, and Pierce GF. 1994. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 94(5):1764-1777.
- Hsiao M, Low J, Dorn E, Ku D, Pattengale P, Yeargin J, and Haas M. 1994. Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *Am J Pathol* 145(3):702-714.
- Huelsken J, and Behrens J. 2002. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115(Pt 21):3977-3978.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E et al. . 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350(23):2335-2342.
- Ichimura T, Finch PW, Zhang G, Kan M, and Stevens JL. 1996. Induction of FGF-7 after kidney damage: a possible paracrine mechanism for tubule repair. *Am J Physiol* 271(5 Pt 2):F967-976.
- Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, and Bodmer WF. 1999. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 35(14):1986-2002.
- Inokuchi K, Yamaguchi H, Hanawa H, Tanosaki S, Nakamura K, Tarusawa M, Miyake K, Shimada T, and Dan K. 2002. Loss of DCC gene expression is of prognostic importance in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 8(6):1882-1888.
- Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, and Yamakawa M. 2002. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 94(12):3127-3134.
- Janssen KP, Abal M, El Marjou F, Louvard D, and Robine S. 2005. Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1756(2):145-154.

- Jarrard DF, Bussemakers MJ, Bova GS, and Isaacs WB. 1995. Regional loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs in human prostate tissues. *Clin Cancer Res* 1(12):1471-1478.
- Jemal, Ahmedin, Siegel, Rebecca, Xu, Jiaquan, Ward, Elizabeth. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010 60: 277-300
- Jin LH, Shao QJ, Luo W, Ye ZY, Li Q, and Lin SC. 2003. Detection of point mutations of the Axin1 gene in colorectal cancers. *Int J Cancer* 107(5):696-699.
- Johnson DE, Lee PL, Lu J, and Williams LT. 1990. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 10(9):4728-4736.
- Johnson DE, Lu J, Chen H, Werner S, and Williams LT. 1991. The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol Cell Biol* 11(9):4627-4634.
- Johnson DE, and Williams LT. 1993. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60:1-41.
- Joimel U, Gest C, Soria J, Pritchard LL, Alexandre J, Laurent M, Blot E, Cazin L, Vannier JP, Varin R et al. . 2010. Stimulation of angiogenesis resulting from cooperation between macrophages and MDA-MB-231 breast cancer cells: proposed molecular mechanism and effect of tetrathiomolybdate. *BMC Cancer* 10:375.
- Katoh M. 2002. WNT and FGF gene clusters (review). *Int J Oncol* 21(6):1269-1273.
- Katoh M. 2006. Bioinformatics for cancer management in the post-genome era. *Technol Cancer Res Treat* 5(2):169-175.
- Katoh Y, and Katoh M. 2005. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 4(10):1050-1054.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, and Waterfield MD. 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:615-675.

- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, and Tessier-Lavigne M. 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87(2):175-185.
- Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, and Hay N. 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 11(6):701-713.
- Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-257.
- Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, and Ferrara N. 1996. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271(13):7788-7795.
- Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C et al. . 2001. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 7(6):673-679.
- Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, and Friend KE. 2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 21(3):215-244.
- Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Fukunari H, Tanaka K, and Miyaki M. 1992. Loss of expression of the DCC gene during progression of colorectal carcinomas in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 52(13):3801-3803.
- Kinzler KW, and Vogelstein B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87(2):159-170.
- Kirikoshi H, Sagara N, Saitoh T, Tanaka K, Sekihara H, Shiokawa K, and Katoh M. 2000. Molecular cloning and characterization of human FGF-20 on chromosome 8p21.3-p22. *Biochem Biophys Res Commun* 274(2):337-343.
- Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, DeNobile JW, Soballe PW, and Kirsch IR. 1997. Mutations in beta-

- catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 57(20):4478-4481.
- Knights V, and Cook SJ. 2010. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* 125(1):105-117.
- Knudson AG. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23):10914-10921.
- Konishi H, Ochiya T, Yasuda Y, Sakamoto H, Muto T, Sugimura T, and Terada M. 1996. HST-1/FGF-4 stimulates proliferation of megakaryocyte progenitors synergistically and promotes megakaryocyte maturation. *Oncogene* 13(1):9-19.
- Koziczak M, Holbro T, and Hynes NE. 2004. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. *Oncogene* 23(20):3501-3508.
- Koziczak M, and Hynes NE. 2004. Cooperation between fibroblast growth factor receptor-4 and ErbB2 in regulation of cyclin D1 translation. *J Biol Chem* 279(48):50004-50011.
- Kyriakis JM, and Avruch J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2):807-869.
- Lane DP, and Benchimol S. 1990. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 4(1):1-8.
- Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, and Williams LT. 1989. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245(4913):57-60.
- Leslie A, Stewart A, Baty DU, Mechan D, McGreavey L, Smith G, Wolf CR, Sales M, Pratt NR, Steele RJ et al. . 2006. Chromosomal changes in colorectal adenomas: relationship to gene mutations and potential for clinical utility. *Genes Chromosomes Cancer* 45(2):126-135.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, and Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246(4935):1306-1309.
- Lewis TS, Shapiro PS, and Ahn NG. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139.

- Lipton L, and Tomlinson I. 2006. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer* 5(3):221-226.
- Lomberk G. 2010. Angiogenesis. *Pancreatology* 10(2-3):112-113.
- Longley DB, McDermott U, and Johnston PG. 2002. Clinical significance of prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2(4):209-216.
- Malumbres M, and Barbacid M. 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3(6):459-465.
- Markowitz SD, and Roberts AB. 1996. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 7(1):93-102.
- McKeehan WL, Wang F, and Kan M. 1998. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59:135-176.
- McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder E, and D'Amore PA. 1989. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol* 109(2):811-822.
- Meyer GE, Shelden E, Kim B, and Feldman EL. 2001. Insulin-like growth factor I stimulates motility in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 20(51):7542-7550.
- Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM, and Aaronson SA. 1992. Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1):246-250.
- Miki T, Fleming TP, Bottaro DP, Rubin JS, Ron D, and Aaronson SA. 1991. Expression cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. *Science* 251(4989):72-75.
- Minshall C, Arkins S, Straza J, Conners J, Dantzer R, Freund GG, and Kelley KW. 1997. IL-4 and insulin-like growth factor-I inhibit the decline in Bcl-2 and promote the survival of IL-3-deprived myeloid progenitors. *J Immunol* 159(3):1225-1232.
- Miyake K, Inokuchi K, and Nomura T. 1994. Expression of the DCC gene in human hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 16(1-2):13-18.

- Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, and Nakamura Y. 1992. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1(4):229-233.
- Moscatelli D. 1987. High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Physiol* 131(1):123-130.
- Munier AI, Doucet D, Perrodou E, Zachary D, Meister M, Hoffmann JA, Janeway CA, Jr., and Lagueux M. 2002. PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in *Drosophila* larvae. *EMBO Rep* 3(12):1195-1200.
- Nice EC, Fabri L, Whitehead RH, James R, Simpson RJ, and Burgess AW. 1991. The major colonic cell mitogen extractable from colonic mucosa is an N terminally extended form of basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 266(22):14425-14430.
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, and Hedge P. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science (New York, NY)* 253(5020):665-669.
- Oda H, Shimizu S, Minami K, Kaneko K, and Ishikawa T. 1997. Loss of imprinting of the IGF2 gene in a Wilms' tumor in an adult. *J Natl Cancer Inst* 89(23):1813-1814.
- Oh JS, Kucab JE, Bushel PR, Martin K, Bennett L, Collins J, DiAugustine RP, Barrett JC, Afshari CA, and Dunn SE. 2002. Insulin-like growth factor-1 inscribes a gene expression profile for angiogenic factors and cancer progression in breast epithelial cells. *Neoplasia* 4(3):204-217.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, and Cunha GR. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 59(19):5002-5011.
- Ornitz DM. 2000. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22(2):108-112.

- Ornitz DM, and Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2(3):REVIEWS3005.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, and Goldfarb M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271(25):15292-15297.
- Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, and Leder P. 1992. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* 12(1):240-247.
- Page C, Huang M, Jin X, Cho K, Lilja J, Reynolds RK, and Lin J. 2000. Elevated phosphorylation of AKT and Stat3 in prostate, breast, and cervical cancer cells. *Int J Oncol* 17(1):23-28.
- Pardo OE, Arcaro A, Salerno G, Raguz S, Downward J, and Seckl MJ. 2002. Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277(14):12040-12046.
- Pardo OE, Lesay A, Arcaro A, Lopes R, Ng BL, Warne PH, McNeish IA, Tetley TD, Lemoine NR, Mehmet H et al. . 2003. Fibroblast growth factor 2-mediated translational control of IAPs blocks mitochondrial release of Smac/DIABLO and apoptosis in small cell lung cancer cells. *Mol Cell Biol* 23(21):7600-7610.
- Parrizas M, and LeRoith D. 1997. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 138(3):1355-1358.
- Partik G, Hochegger K, Schorkhuber M, and Marian B. 1999. Inhibition of epidermal-growth-factor-receptor-dependent signalling by tyrphostins A25 and AG1478 blocks growth and induces apoptosis in colorectal tumor cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 125(7):379-388.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, and Montesano R. 1992. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 189(2):824-831.

- Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, and Alitalo K. 1994. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269(9):6271-6274.
- Peters G, Lee AE, and Dickson C. 1986. Concerted activation of two potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumour virus. *Nature* 320(6063):628-631.
- Pollak MN, Schernhammer ES, and Hankinson SE. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4(7):505-518.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, and Vogelstein B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389(6648):300-305.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, and Velculescu VE. 2002. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418(6901):934.
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, and Perucho M. 1997. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* (New York, NY 275(5302):967-969.
- Rapraeger AC, Krufka A, and Olwin BB. 1991. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252(5013):1705-1708.
- Raucci A, Laplantine E, Mansukhani A, and Basilico C. 2004. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J Biol Chem* 279(3):1747-1756.
- Ray ME, Yang ZQ, Albertson D, Kleer CG, Washburn JG, Macoska JA, and Ethier SP. 2004. Genomic and expression analysis of the 8p11-12 amplicon in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 64(1):40-47.
- Reya T, and Clevers H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434(7035):843-850.
- Rijcken FE, Hollema H, and Kleibeuker JH. 2002. Proximal adenomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer are prone to rapid malignant transformation. *Gut* 50(3):382-386.

- Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, Bernet V, Burman KD, Kohn LD, and Saji M. 2001. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 61(16):6105-6111.
- Roidl A, Berger HJ, Kumar S, Bange J, Knyazev P, and Ullrich A. 2009. Resistance to chemotherapy is associated with fibroblast growth factor receptor 4 up-regulation. *Clin Cancer Res* 15(6):2058-2066.
- Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, and Smyrk TC. 2002. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23(1):201-205.
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, and Polakis P. 1993. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262(5140):1731-1734.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Horie Y, Bachmaier K, Fata JE, Li M, Suzuki A, Bouchard D, Ho A, Redston M et al. . 2000. Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature* 406(6798):897-902.
- Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Kalabis J, and Herlyn M. 2002. Insulin-like growth factor-I-induced migration of melanoma cells is mediated by interleukin-8 induction. *Cell Growth Differ* 13(2):87-93.
- Savagner P, Valles AM, Jouanneau J, Yamada KM, and Thiery JP. 1994. Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 5(8):851-862.
- Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, and DuBois RN. 2000. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 275(43):33951-33956.
- Shaoul E, Reich-Slotky R, Berman B, and Ron D. 1995. Fibroblast growth factor receptors display both common and distinct signaling pathways. *Oncogene* 10(8):1553-1561.
- Schulte-Hermann R, Marian B, Bursch W, Grasl-Kraupp B : „Tumor Promotion” in „ Lehrbuch der Toxikologie ”, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1st edition 1994, 2nd edition 2004.

- Shear MJ, and Ilfeld FW. 1940. Studies in carcinogenesis: IX. Hydrocarbon-cholesterol pellets in strain D mice. *Am J Pathol* 16(3):287-293.
- Sheng H, Shao J, and DuBois RN. 2001. Akt/PKB activity is required for Ha-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 276(17):14498-14504.
- Sheng H, Shao J, Townsend CM, Jr., and Evers BM. 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells. *Gut* 52(10):1472-1478.
- Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, Li M, Miwa N, Lin Y-M, and Nakamura Y. 2003a. Involvement of the FGF18 Gene in Colorectal Carcinogenesis, as a Novel Downstream Target of the {beta}-Catenin/T-Cell Factor Complex. *Cancer Res* 63(19):6116-6120.
- Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, Li M, Miwa N, Lin YM, and Nakamura Y. 2003b. Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. *Cancer Res* 63(19):6116-6120.
- Slack JM, Darlington BG, Gillespie LL, Godsave SF, Isaacs HV, and Paterno GD. 1990. Mesoderm induction by fibroblast growth factor in early *Xenopus* development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327(1239):75-84.
- Sonvilla G, Allerstorfer S, Heinzle C, Stattner S, Karner J, Klimpfinger M, Wrba F, Fischer H, Gauglhofer C, Spiegl-Kreinecker S et al. . 2010. Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration. *Br J Cancer* 102(7):1145-1156.
- Sonvilla G, Allerstorfer S, Stattner S, Karner J, Klimpfinger M, Fischer H, Grasl-Kraupp B, Holzmann K, Berger W, Wrba F et al. . 2008. FGF18 in colorectal tumour cells: autocrine and paracrine effects. *Carcinogenesis* 29(1):15-24.
- Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, and Kinzler KW. 1998. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 58(6):1130-1134.
- Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U, and Dragani TA. 2005. Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol* 23(29):7307-7311.

- Sporn MB. 1996. The war on cancer. *Lancet* 347(9012):1377-1381.
- Sporn MB. 1997. The war on cancer: a review. *Ann N Y Acad Sci* 833:137-146.
- Staal SP. 1987. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(14):5034-5037.
- Stadler CR, Knyazev P, Bange J, and Ullrich A. 2006. FGFR4 GLY388 isotype suppresses motility of MDA-MB-231 breast cancer cells by EDG-2 gene repression. *Cell Signal* 18(6):783-794.
- Streit A, Berliner AJ, Papanayotou C, Sirulnik A, and Stern CD. 2000. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406(6791):74-78.
- Su LK, Vogelstein B, and Kinzler KW. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262(5140):1734-1737.
- Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, and Martin GR. 1999. Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 13(14):1834-1846.
- Taylor JGt, Cheuk AT, Tsang PS, Chung JY, Song YK, Desai K, Yu Y, Chen QR, Shah K, Youngblood V et al. . 2009. Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J Clin Invest* 119(11):3395-3407.
- Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, and Shows TB. 1991. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6(9):1677-1683.
- Thompson AM, Morris RG, Wallace M, Wyllie AH, Steel CM, and Carter DC. 1993. Allele loss from 5q21 (APC/MCC) and 18q21 (DCC) and DCC mRNA expression in breast cancer. *Br J Cancer* 68(1):64-68.

- Thompson MA, Cox AJ, Whitehead RH, and Jonas HA. 1990. Autocrine regulation of human tumor cell proliferation by insulin-like growth factor II: an in-vitro model. *Endocrinology* 126(6):3033-3042.
- Thorstensen L, Lind GE, Lovig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO, and Lothe RA. 2005. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* 7(2):99-108.
- Tlsty TD, and Coussens LM. 2006. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 1:119-150.
- Tsuboi R, and Rifkin DB. 1990. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *J Exp Med* 172(1):245-251.
- Turner N, and Grose R. 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10(2):116-129.
- Untawale S, Zorbas MA, Hodgson CP, Coffey RJ, Gallick GE, North SM, Wildrick DM, Olive M, Blick M, Yeoman LC et al. . 1993. Transforming growth factor-alpha production and autoinduction in a colorectal carcinoma cell line (DiFi) with an amplified epidermal growth factor receptor gene. *Cancer Res* 53(7):1630-1636.
- Vainikka S, Partanen J, Bellosta P, Coulier F, Birnbaum D, Basilico C, Jaye M, and Alitalo K. 1992. Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO J* 11(12):4273-4280.
- Veikkola T, and Alitalo K. 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9(3):211-220.
- Vivanco I, and Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7):489-501.
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, and White R. 1989. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science (New York, NY)* 244(4901):207-211.
- Vogelstein B, Lane D, and Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810):307-310.

- Wang J, Stockton DW, and Ittmann M. 2004. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res* 10(18 Pt 1):6169-6178.
- Wang J, Yu W, Cai Y, Ren C, and Ittmann MM. 2008. Altered fibroblast growth factor receptor 4 stability promotes prostate cancer progression. *Neoplasia* 10(8):847-856.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, and Donner DB. 1996. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 271(46):29483-29488.
- Watanabe E, Smith DM, Sun J, Smart FW, Delcarpio JB, Roberts TB, Van Meter CH, Jr., and Claycomb WC. 1998. Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Res Cardiol* 93(1):30-37.
- Webb SE, Lee KK, Tang MK, and Ede DA. 1997. Fibroblast growth factors 2 and 4 stimulate migration of mouse embryonic limb myogenic cells. *Dev Dyn* 209(2):206-216.
- Weinstein IB, and Joe AK. 2006. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3(8):448-457.
- Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ et al. . 2005. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer* 104(2):427-438.
- Whiteman EL, Cho H, and Birnbaum MJ. 2002. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13(10):444-451.
- Xie Y, Skytting B, Nilsson G, Brodin B, and Larsson O. 1999. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma: association with an aggressive phenotype. *Cancer Res* 59(15):3588-3591.
- Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, Sugimoto T, Kaji K, Utsuyama M, Kurashima C et al. . 1992. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 257(5075):1401-1403.

- Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, and Rosenberg SA. 2003. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349(5):427-434.
- Yang YC, Lu ML, Rao JY, Wallerand H, Cai L, Cao W, Pantuck A, Dalbagni G, Reuter V, Figlin RA et al. . 2006. Joint association of polymorphism of the FGFR4 gene and mutation TP53 gene with bladder cancer prognosis. *Br J Cancer* 95(11):1455-1458.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, and Ornitz DM. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64(4):841-848.
- Yee D. 2006. Targeting insulin-like growth factor pathways. *Br J Cancer* 94(4):465-468.
- Yu H, and Rohan T. 2000. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 92(18):1472-1489.
- Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, and Jain RK. 1996. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25):14765-14770.
- Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, and Ornitz DM. 2006. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281(23):15694-15700.
- Zhao J, Cao Y, Zhao C, Postlethwait J, and Meng A. 2003. An SP1-like transcription factor Spr2 acts downstream of Fgf signaling to mediate mesoderm induction. *EMBO J* 22(22):6078-6088.
- Zhao P, Caretti G, Mitchell S, McKeehan WL, Boskey AL, Pachman LM, Sartorelli V, and Hoffman EP. 2006. Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway. *J Biol Chem* 281(1):429-438.

Zhao P, and Hoffman EP. 2004. Embryonic myogenesis pathways in muscle regeneration. *Dev Dyn* 229(2):380-392.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungsverzeichnis

APC	Adinomatöse Polyposis coli
Arg	Arginin
BSA	Bovines Serumalbumin
CDNA	complementary DNA
DCC	Deleted in Colon cancer
DEPC	Dietyldicarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence acitvated cell sorting, Durchflußzytometrie
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälber Serum
FGF	Fiboblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptos
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierndes Protein
GKS-3	Glykogensynthase-3
Gly	Glycin
HNPPC	Hederitäres non-polypöses kolorektales Krazinom
IGF	Insulin like Growth Factor
JNK	cJun N-terminale Kinase
MEM	Minimum Essential Medium
MMR	mismatch-repair
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
QPCR	Real time PCR
TCF	Cell Transcription Factor
TEMED	N, N, N, N-Tetramethyl-ethylenediamin
TGF	Tumor Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

7.2. Zusammenfassung

7.2.1. Zusammenfassung deutsch

Während der Tumorgenese spielt die Deregulation von FGF-Signalen eine große Rolle. FGFs können überexprimiert werden, was aufgrund des vielfältigen Wirkungsspektrums von FGFs Einfluss auf Migration, Proliferation und Angiogenese haben kann. Bei verschiedenen Krebsarten wurde festgestellt dass verschiedenste FGFs im Tumorgewebe verglichen mit normalen Zellen überexprimiert wurden. Auf Rezeptorlevel wurde beim FGF – Rezeptor 4 Gen ein Polymorphismus (Gly388Arg) gefunden, der mit erhöhtem individuellen Risiko für Brust und kolorektalem Krebs korreliert. Patienten mit dem Arg388 – Allel haben geringere Überlebenschance als Träger des homozygoten Gly-Gens. FGFR4 wird mit aggressiven und großen Tumoren in Zusammenhang gebracht. Bisher ist dieser Zusammenhang Darmkrebs betreffend allerdings noch umstritten. In unserem Labor wurden bereits FGFR4 überexprimierende Darmkrebszellen hergestellt und deren biologische Eigenschaften untersucht. Die dabei verwendete Zelllinie SW480 ist typisch für die spontane Entstehung von Darmkrebs. Sie exprimiert nur geringe Mengen an FGFR4 und besitzt einen Gly/Gly Genotyp. Es ist bei der Arbeit mit in vitro Modellen jedoch wichtig, mehrere unterschiedliche Zelllinien einzusetzen. Die zweite ausgewählte Zelllinie ist HCT116. Die Zellen sind (so wie SW480) Gly/Gly in ihrem Genotyp, exprimieren aber deutlich höhere Mengen an FGFR4 mRNA.

Die Aufgabe meiner Diplomarbeit war die Herstellung FGFR4 überexprimierender HCT116 Zellen und ihre biologische Charakterisierung. Es wurden Transfektanten hergestellt, welche FGFR4 überexprimierten. Die Fähigkeit der Transfektanten zu wachsen und Kulturen zu bilden wurde mithilfe des Colony Formation Assays untersucht. Sowohl die FGFR4^{Arg} - als auch die FGFR4^{Gly} - Transfektanten wuchsen schneller als die Kontrollen. Es konnte weiters gezeigt werden, dass die FGFR4^{Arg} - Transfektanten besser migrieren und dadurch eine verstärkte Metastasierung bewirken können. Mit einem Soft Agar Assay, der ein Wachstum ohne Anheftungsmöglichkeit bietet, wurde gezeigt, dass die Transfektanten das bessere Wachstumspotential hatte gegenüber den Kontrollen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass beide FGFR4 Allele onkogene Aktivität besitzen. FGFR4^{gly} wirkt eher wachstumsfördernd, wohingegen FGFR4^{arg} eher ein Metastasierungs-Onkogen ist.

7.2.2. Abstract

During tumorigenesis the deregulation of FGF-signals play an important role. FGFs can be overexpressed and thus influence migration, proliferation and angiogenesis. An overexpression of different FGFs compared to normal tissues has been observed in different types of tumours. At FGFR-level a polymorphism was found in the FGFR4 gene, that correlates with an increased risk for breast- and colorectal cancer. Patients carrying the Arg388 allele have a decreased survival rate as compared to homozygous carriers of the Gly-allele. A correlation between FGFR4 and aggressive and large tumours has been observed. Concerning colon cancer, this correlation is controversial so far. In our lab FGFR4 overexpressing coloncancer cells were already constructed. The used cell line SW480 is typical for spontaneous development of colon cancer. It expresses low amounts of FGFR4 and has a Gly/Gly genotype. Because it is very important to use different cell lines when working with in vitro models, we chose HCT116 as the second cell line. Like SW480, HCT 116 cells have a Gly/Gly genotype, but they express higher amounts of FGFR4 mRNA. The aim of my diploma thesis was the production of FGFR4 overexpressing HCT116 cells and their biological characterization. Transfectants, overexpressing FGFR4, were produced and their ability to grow in cell cultures was tested with a Colony Formation assay. Both FGFR4^{Arg} and FGFR4^{Gly} transfectants grew faster than the controls. Further, the FGFR4^{Arg} were better in migrating and could therefore cause an increased metastasis. To study the growth of the cells without an adhesion to a substrate we performed a Soft Agar assay and also here the transfectants have the better potential to grow, compared to the controls. In summary it could be shown that both FGFR4 alleles have oncogenic activities. FGFR4^{Gly} acts more growth-enhancing, whereas FGFR4^{Arg} appears as a metastasis-oncogene.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Elisabeth Dietersdorfer

Geburtsdaten: 7. April 1984, Wien

Geburtsort: Wien

Nationalität: Österreich

Ausbildung

Von 1994 – 2002: AHS Rosasgasse, 1120 Wien, Abschluss mit gutem Erfolg

Von 2002 – 2004 Studium der Medizin, Wien

Von 2003 – 2010 Studium der Anthropologie mit Spezialisierung auf Humangenetik

2007 Studienauslandsaufenthalt in Oulu, Finnland

Seit Februar 2009 Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. Marian, Institut für Krebsforschung, Wien. Diplomarbeitsthema: Die Rolle des FGFR4 bei Wachstum, Überleben und Migration von Kolonkarzinomzellen

Seit Sommer 2010 Wissenschaftliche Mitarbeit an einer Feldforschungsstudie über Malaria in Mae Sot (Thailand) bei Prof. Dr. Wernsdorfer