
Aus dem Institut für Pathologie

des Zentrums für Klinisch-Theoretische Medizin

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

unter der Anleitung von PD Dr. Ronald Simon

**Mutationen von Zielgenen (EGFR, KIT, PDGFR) für
genspezifische Therapien: Keine unerwartete Anhäufung
in humanen Zelllinien verschiedener Primärtumoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Claudia Dammenhayn

aus Plauen

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 22.01.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD. Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD. Dr. A. Block

Für meine Familie

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
1.1. Tumorigenese.....	1
1.2. Molekulare Ursachen der Tumorentstehung.....	1
1.3. Tyrosinkinasen.....	3
1.3.1. EGF-Rezeptor.....	5
1.3.2. KIT-Rezeptor.....	8
1.3.3. PDGF-Rezeptor	12
1.4. Tyrosinkinasen als Therapieziele	14
1.4.1. `Biologicals` am Beispiel von Herceptin und Erbitux.....	15
1.4.2. `Small molecules` am Beispiel von Iressa, Tarceva und Glivec	18
1.5. Zelllinien als Modellsysteme.....	21
1.6. Fragestellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Verwendete Zelllinien	24
2.2. Sequenzierung	26
2.2.1. DNA-Isolation	26
2.2.2. PCR und Primersets.....	27
2.2.3. Nachweis der PCR-Produkte.....	31
2.2.4. Ethanolpräzipitation der Nukleinsäuren	32
2.2.5. Sequenzierreaktion.....	33
2.2.6. `Cycle sequencing`	34
2.2.7. Detektion der Sequenz.....	35
2.2.8. Auswertung der Sequenzen.....	36
3. Ergebnisse	39
3.1. Mutationsanalysen.....	39
3.1.1. Verwendetes Zelllinien-Material.....	39
3.1.2. Übersicht der gesamten Zelllinien für EGFR-Untersuchung.....	41
3.1.3. Übersicht der gesamten Zelllinien für PDGFR- und KIT-Untersuchung	43
4. Diskussion	46
5. Zusammenfassung	51
II. Abkürzungsverzeichnis.....	III

III.	Abbildungsverzeichnis.....	VI
IV.	Tabellenverzeichnis.....	VIII
V.	Literaturverzeichnis	IX
VI.	Lebenslauf	XXIII
VII.	Danksagung	XXIV
VIII.	Eidesstattliche Versicherung	XXV

1. Einleitung

1.1. Tumorigenese

Der normale Zellzyklus ist Regulationsmechanismen unterworfen, die ein Gleichgewicht zwischen Zellneubildung, Differenzierung und Zelluntergang erhalten. Extrazelluläre Signale wie Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Differenzierungsfaktoren werden an spezifische Rezeptoren der Zelle gebunden, wodurch über eine Signalkaskade die Zelle eine Aktivierung für spezifische Funktionen bzw. einen Stimulus zur Proliferation erfährt. Bei tumorösen Veränderungen sind die Regulatoren und Rezeptoren an den Zellen verändert, d.h. vermindert oder verstärkt. Durch Mutationen der Zellzyklusregulatoren kommt es zu einer Entkopplung der Wachstumskontrolle. Die Folge ist, dass Proliferationssignale und damit Zellvermehrungen im Vordergrund stehen. Weiterhin entkommen Tumorzellen durch genetische und molekulare Veränderungen dem programmierten Zelltod, wodurch diese unsterblich werden (1).

1.2. Molekulare Ursachen der Tumorentstehung

Auf der molekularen Ebene handelt es sich bei einer Mutation um eine Veränderung der Abfolge von Nukleinbasen im genetischen Material. Dabei gibt es verschiedene Mutationstypen: Punktmutation, Deletion und Insertion. Wird bei einer Punktmutation eine Base der DNA gegen eine andere ausgetauscht, so nennt man diesen Vorgang Substitution. Geschieht dieser Austausch in einer codierenden Region und bewirkt den Einbau einer abweichenden Aminosäure, führt dieses zu einem veränderten Protein. Für codierende Sequenzen kann man die Substitution in folgende Kategorien einteilen: die nonsense-Mutation (sinnentstellende Mutation), sie codiert für einen Stopp der Translation, weiterhin die missense-Mutation (sinnverändernde Mutation, 'gain of function'), bei ihr wird eine andere Aminosäure codiert und letztendlich die silent-Mutation (stille Mutation), bei dieser wird die gleiche Aminosäure codiert. Man spricht in diesem Fall auch von einem Polymorphismus. Schlimmer verlaufen kann eine Punktmutation, wenn eine Base

komplett wegfällt oder eine neue hinzukommt. Hierbei verliert das Leseraster hinter der Mutation seinen ursprünglichen Sinn, da es nach links oder rechts verschoben wird (frameshift). Dies hat zur Folge, dass das translatierte Protein später eine völlig andere Struktur aufweist. Seine ursprüngliche Funktion geht dabei meist verloren. Bei einer Deletion handelt es sich um den Verlust einer Base. Die nachfolgenden Basen rücken gegen die Leserichtung auf, was das Leseraster der nachfolgenden Codons in eben diese Richtung verschiebt. Bei der Insertion handelt es sich um den Zugewinn einer Base. Die nachfolgenden Basen rücken in Leserichtung auf (2) (3).

Eine ganze Reihe von Noxen sind in der Lage, DNA-Schäden zu induzieren und werden daher als Mutagene bezeichnet. Solche Mutagene sind z.B. chemische Substanzen, welche in der Lage sind sich in die DNA einzulagern, wodurch deren einwandfreie Replikation nicht mehr gewährleistet ist. Außerdem gehört energiereiche Strahlung dazu, die einerseits direkte Schäden der DNA verursachen kann, indem z.B. radioaktive Strahlung direkt den DNA-Strang trifft und einen Doppelstrangbruch verursacht oder eine Veränderung einzelner Nukleotide. Andererseits kann energiereiche Strahlung auch indirekte Strahlenschäden an der DNA verursachen, wenn der Strahl nicht die DNA direkt trifft, sondern Wassermoleküle, wodurch freie Radikale entstehen, die wiederum das Erbgut schädigen. Außerdem gibt es verschiedene Viren, die in der Lage sind, das Erbgut ihrer Wirtszelle so zu verändern, dass wachstumsregulierende Gene verstärkt oder vermindert werden, wodurch es zur Entstehung von Tumoren kommen kann (2).

Solche wachstumsregulierenden Gene nennt man allgemein Onkogene und Tumorsuppressorgene. Dabei sind Onkogene eigentlich normale Gene, die in jeder Zelle vorkommen und für Proteine codieren, die Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle kontrollieren und steuern. Durch Mutation kann es zu einer permanenten onkogenen Aktivierung der zur Proliferation benötigten Signalwege und infolgedessen zu unkontrolliertem Wachstum der entarteten Zelle kommen (3). Im Gegensatz dazu stehen die Tumorsuppressorgene. Sie codieren für Proteine, die den Onkogenen entgegenwirken und somit das Wachstum hemmen.

In Tumoren sind viele Tumorsuppressoren durch Mutation inaktiviert. Bereits eine einzige Punktmutation kann zur Inaktivierung eines Tumorsuppressor-Proteins ausreichen. Mittlerweile ist eine ganze Reihe von Tumorsuppressoren bekannt. Eines der Wichtigsten ist das p53, welches zwei Hauptwirkungen hat, zum Einen den Zellzyklus-Arrest, zum Anderen die Einleitung der Apoptose der Zelle, welches bei Funktionsverlust von p53 in Tumorzellen inaktiviert ist (2). Somit ist p53 ein grundlegender Faktor, der zur genetischen Instabilität führen kann. Schon seit längerem deuten zahlreiche Befunde darauf hin, dass die genetische Instabilität eine der zentralen molekularpathologischen Eigenschaften der Krebszelle ist, die nicht nur für die Entstehung, sondern auch für den weiteren raschen Progress des neoplastischen Wachstums verantwortlich ist (4) (5). Dabei lassen sich Manifestationen dieser genetischen Instabilität der Tumorzellen sowohl auf chromosomaler als auch auf DNA-Ebene nachweisen. Auf chromosomaler Ebene führt eine Störung der Chromosomenverteilung auf die Tochterzellen zu Aneuploidie, die für eine gesteigerte Mutabilität der aneuploiden Zellen verantwortlich gemacht wird (6) (7). Des Weiteren kann es zu Deletionen oder Amplifikationen von Chromosomenabschnitten kommen. Auf DNA-Ebene ist neben Punktmutation, Deletion und Veränderungen des Methylierungsstatus der DNA insbesondere das Phänomen der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zu erwähnen, welchem Veränderungen im Bereich sogenannter DNA-Reparaturgene zugrunde liegen.

1.3. Tyrosinkinasen

Eine Vielzahl von Prozessen, die an Invasion, Progression und Metastasierung von malignen Tumoren beteiligt sind, wird durch Signalmoleküle, wie z.B. Wachstumsfaktoren, über Bindung an spezifische Rezeptoren und nachfolgender Aktivierung von Signalkaskaden vermittelt. Eine wichtige Familie von Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind die Tyrosinkinase-Rezeptoren (TKR). Sie besitzen neben der extrazellulären Bindungsdomäne und dem transmembranösen Teil eine intrazelluläre Kinase-Domäne, die eine Tyrosin-Phosphorylierung katalysiert und damit wesentliche Bedeutung bei der intrazellulären Signalübertragung hat. Viele

Tyrosinkinaserzeptoren sind potentielle Onkogene, weil es durch eine unkontrollierte Aktivierung zu einer gesteigerten Tyrosinkinaseaktivität kommen kann, welche dann zu unkontrolliertem Zellwachstum, zur malignen Entartung und in der weiteren Folge zur Tumorprogression führt (1) (8).

Diese Signalkaskade wird zunächst durch die Bindung des Wachstumsfaktors (Ligand), z.B. TGF α / EGF, an den spezifischen Rezeptor, z.B. den EGF-Rezeptor (EGFR), initiiert. Nachfolgend der Tyrosin-Phosphorylierung werden Ras-Proteine gebunden bzw. aktiviert. Dieses kann verschiedene Pathways (downstream), so z.B. den RAS/RAF-MAP-Kinase-Signalweg oder den PI3K/AKT-Signalweg, regulieren (9).

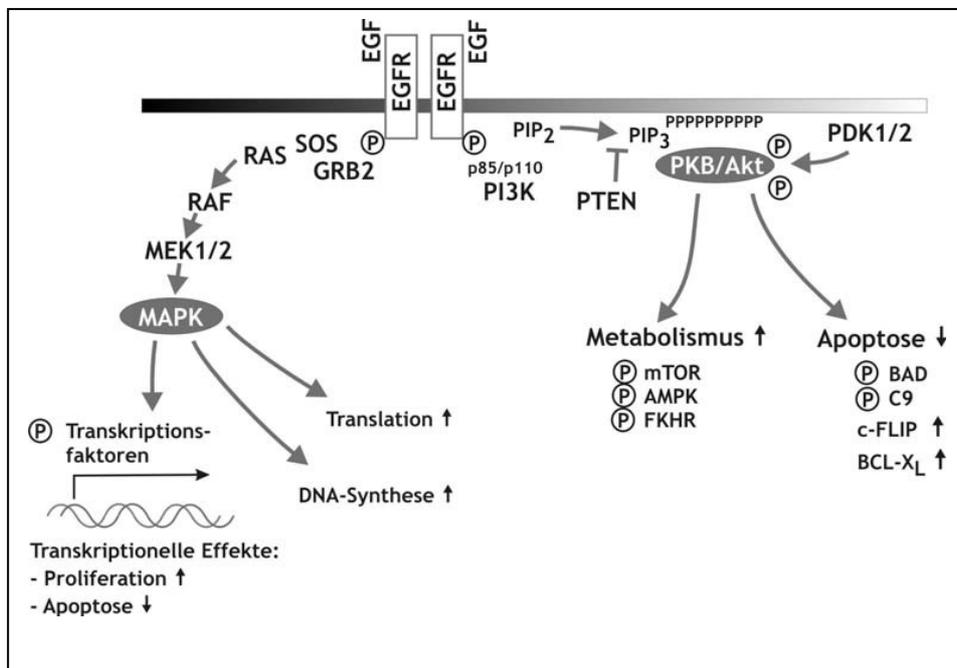


Abb. 1: Modell der EGFR-abhängigen Signaltransduktion: Liganden-induzierte Dimerisierung führt über Autophosphorylierung zur Aktivierung des EGFR. Über die Adaptorproteine GRB2 und SOS und das GTP-bindende Protein RAS wird die MAPK-Kaskade aktiviert. Die PI3K-PKB/AKT-Kaskade stellt einen zweiten Hauptsignalweg dar. Durch Aktivierung der PI3K und Bildung von Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PIP₃) wird PKB/AKT an die Zellmembran rekrutiert und phosphoryliert. PKB/AKT moduliert dann die Aktivität einer Vielzahl von Proteinen (10).

Zur Tumorigenese kommt es dann, wenn im Rahmen der Signalkaskade eine oder mehrere Mutationen auftreten, die durch das Reparatursystem der Normalzelle unbemerkt bleiben und es damit zu unkontrolliertem Zellwachstum kommt.

Die Mutation kann sich auf verschiedene Ebenen auswirken. Sie kann z.B. den Liganden (Überexpression) oder den Rezeptor (onkogene, ligandenunabhängige

Aktivierung) betreffen, aber auch zu Veränderungen im Bereich der zytoplasmatisch ablaufenden Signalkaskade führen. Ein Beispiel sind die RAS/RAF-Proteine, die oft durch Mutationen onkogen aktiviert werden können (11) (12). Allen Auswirkungen der Mutationen ist gemeinsam, dass die Signaltransduktion in Richtung Zellkern in der betroffenen Zelle verstärkt abläuft. Dies führt in der Folge zur Proliferation und zum Überleben von transformierten Zellen (9) (13).

1.3.1. EGF-Rezeptor

Der EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) gehört, wie bereits erwähnt, zu den membranständigen Rezeptorproteinkinasen. Synonym verwendet wird die Bezeichnung HER1 und ErbB1, die zur Familie der ErbB-Membran-Rezeptoren gehört. Weitere EGF-Membranrezeptoren werden als HER2, HER3 und HER4 bzw. als ErbB2 bis ErbB4 bezeichnet.

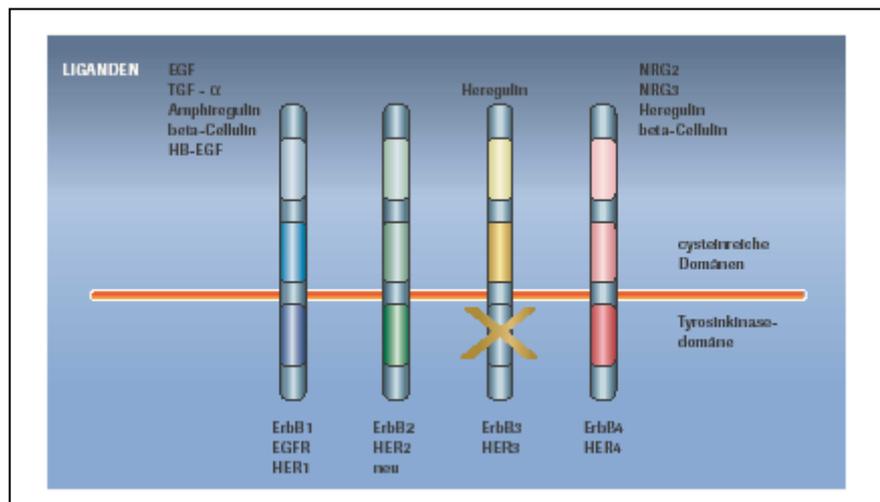


Abb. 2: EGF-Rezeptoren 1-4: Übersicht über HER, die weiteren gebräuchlichen Bezeichnungen für diese Rezeptoren und die Liganden, die an diese Rezeptoren binden. Besonderheit bei HER3: Tyrosinkinase-Domäne funktioniert nicht. Bedeutung der Abkürzungen: EGF: epidermal growth factor, TGF-α: transforming growth factor-α, HB-EGF: Heparin bindender EGF-ähnlicher Faktor, NRG: Neuregulin, eine Klasse von EGF-ähnlichen Liganden, die primär an HER3 und HER4 binden. Vier Typen, NRG1- NRG4, sind bekannt (14).

Die Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie sind eng in die Wachstumskontrolle von humanen Zellen einbezogen. In normalen Zellen werden sie durch Wachstumsfaktoren über parakrine und juxtakrine Mechanismen aktiviert. Als bedeutender kritischer Schritt in der neoplastischen Progression werden die ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen in Karzinomzellen Teil eines autokrinen

Wachstumsregulationskreislaufs, welcher zusätzlich die ErbB spezifischen Wachstumsfaktor-Liganden wie EGF, TGF- α oder Heregulin (HRG) einbezieht (15). Obwohl die Plasmamembran-Komponenten der ErbB-Rezeptoren eins bis vier als transmembrane 170 bis 200kDa große Glykoproteine wichtige Gemeinsamkeiten besitzen, erfüllt jede ErbB-Spezies innerhalb des ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinase-Netzwerks eine spezifische Funktion (16) (17) (18) (19) (20) (21). ErbB1 und ErbB4 sind vollständige Rezeptoren mit einer Liganden-Bindungsstelle in der extrazellulären NH₂-Komponente und einer Tyrosinkinase-Domäne in der zytoplasmatischen COOH-terminalen Komponente des Moleküls. Durch Assoziation mit einem Liganden, wie z.B. EGF oder TGF α , bildet der Rezeptor ein Homodimer bzw. ein Heterodimer mit anderen ErbB-Rezeptoren. Dabei werden durch Autophosphorylierungsprozesse an Tyrosinresten auf der zytosolischen Seite eine Reihe von Signalkaskaden initiiert (22) (23) (24) (25).

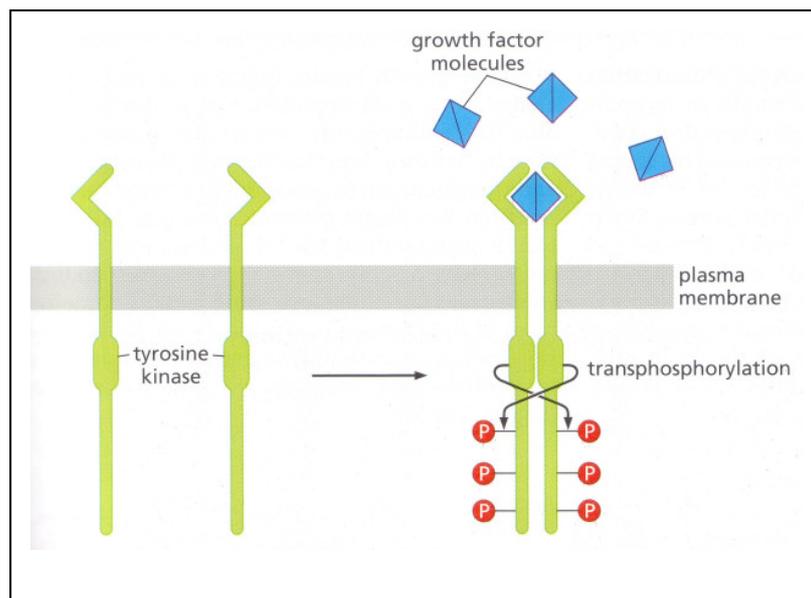


Abb. 3: Rezeptordimerisation nach Ligandenbindung (26)

ErbB2 (HER2/Neu) repräsentiert einen konstant aktiven Rezeptor, welcher keine Liganden-Bindungsstelle besitzt. ErbB3 teilt sich die Ligandenspezifitäten mit ErbB4, besitzt aber keine Tyrosinkinase-Aktivität. Daher sind ErbB2 und ErbB3 als wichtige Modulatoren der zellulären Antwort auf Wachstumsfaktoren durch Heterodimerisierung mit ErbB1 und ErbB4 zu verstehen (16) (17) (18) (19) (20) (22) (23) (24) (25).

Die wichtigsten beiden Signalwege, die durch EGFR eingeleitet werden, sind der bekannte RAS/RAF-MAP-Kinase-Signalweg sowie der PI3K/AKT-Signalweg, wie in Abbildung 1 bereits dargestellt. Des Weiteren findet eine Aktivierung von STAT3/5 und Proteinkinase C statt. Das so weitergereichte Signal stimuliert letztendlich das Zellwachstum, verhindert den apoptotischen Zelltod und trägt somit zur Transformation der Zelle bei.

In humanen Tumoren sind vor allem Veränderungen von HER1 (EGFR) und HER2 bekannt. Während bei EGFR insbesondere aktivierende Mutationen klinisch relevant sind (z.B. in Lungenkarzinomen) (27) fällt der HER2 durch eine massive Überexpression aufgrund einer starken Vermehrung der Genkopiezahl (=Amplifikation) auf (z.B. in Mamma- und Magenkarzinomen) (28) (29) (30).

Aber nicht nur der EGF-Rezeptor kann an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein, auch andere Rezeptoren tragen zur Tumorigenese bei. So z.B. der KIT-Rezeptor und der PDGF-Rezeptor (PDGFR), die eine bedeutende Rolle bei der Genese von gastrointestinalen Stromatumoren, kurz GIST, spielen. Sie gehören beide zu den Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche durch die Anwesenheit von fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen in der extrazellulären Region sowie eine Kinase-Insert-Sequenz zwischen der proximalen TK1- (Tyrosinkinase) und distalen TK2-Domäne gekennzeichnet sind (31) (32) (33).

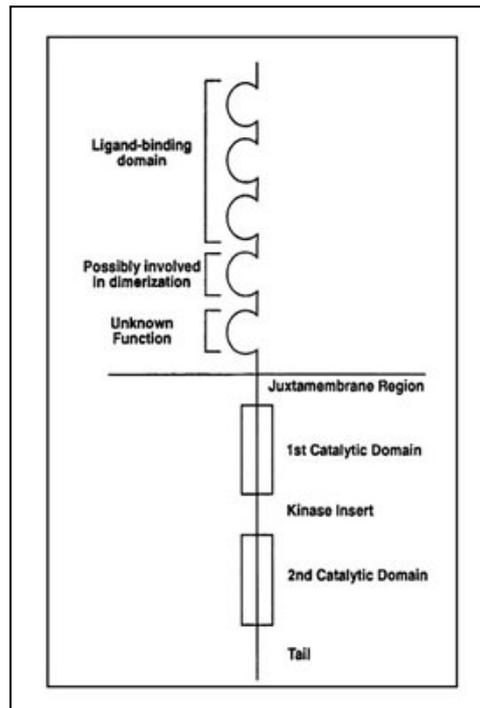


Abb. 4: Grundsätzlicher Aufbau des KIT- und PDGFR-A-Rezeptors

Es bestehen beide aus einer extrazellulären Domäne, einer die Membran durchspannenden Domäne sowie aus einer intrazellulären Kinase-Domäne, die sich wiederum in zwei Abschnitte teilt. Ein Abschnitt ist essentiell zur Bindung von ATP und der andere Abschnitt bewerkstelligt den Transfer einer Phosphatgruppe und somit einhergehend die Aktivierung der Kinase-Domäne. Exon9 des KIT-Gens codiert für die extrazelluläre Domäne, die die Rezeptordimerisierung einleitet. Exon11 des KIT-Gens und Exon12 des PDGFR-Gens codieren für die juxtamembranöse Domäne. Die ATP-Bindungs-Domäne von KIT und PDGFR werden von Exon13 und 14 und entsprechend die Phosphotransferase-Domäne von Exon17 und 18 codiert (31) (32) (33).

1.3.2. KIT-Rezeptor

KIT (synonym: cellular KIT bzw. c-KIT) wurde zunächst als virales Homolog v-KIT 1986 von Besmer und Mitarbeitern (34) im HZ4- (Hardy-Zuckerman4) Katzensarkomvirus nachgewiesen, wodurch die Bezeichnung KIT, das für kitten (deutsch: Kätzchen) steht, zustande kommt (35).

Das 1987 entdeckte zelluläre KIT (21 Exons) (36), lokalisiert auf Chromosom 4(q11-21) (37) (38), kodiert für die Rezeptor-Tyrosinkinase KIT. Dessen Ligand ist ein hämatopoetisches Zytokin, der sogenannte Stammzellofaktor (SCF), welcher 1990 identifiziert wurde. Folglich wird für den Rezeptor KIT, der ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 145 000 Dalton darstellt (36), synonym der Begriff Stammzellofaktor-Rezeptor (SCFR) verwendet (39) (40).

Der Ligand SCF, der in zwei Isoformen, einer löslichen und einer membrangebundenen Form, vorliegt (41), ist auch unter den Bezeichnungen KIT-Ligand, Mastzell-Wachstumsfaktor und `steel factor` bekannt (33). Die ersten drei aminoterminalen Ig-ähnlichen KIT-Domänen sind an der extrazellulären Ligandenbindung beteiligt, während die vierte Ig-ähnliche Domäne, wie bereits 1993 in den Arbeiten von Blechman und Lev postuliert, für die Rezeptordimerisierung verantwortlich ist (42) (43) (44) (45).

Die ligandeninduzierte Aktivierung von KIT führt intrazellulär durch die Interaktion mit verschiedenen Enzymen und Adapterproteinen über multiple Signaltransduktionswege (Abb. 5), wie das PI3K/AKT-System, das JAK/STAT-System, die RAS/RAF-MAP-Kinase-Kaskade oder Mitglieder der Src-Familie, zu einer Zellproliferation bzw. Apoptosehemmung (33) (46), wobei das Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT-System und die RAS/RAF-MAP-Kinase-Kaskade die beiden Hauptsignalwege darstellen (Abb.5) (47).

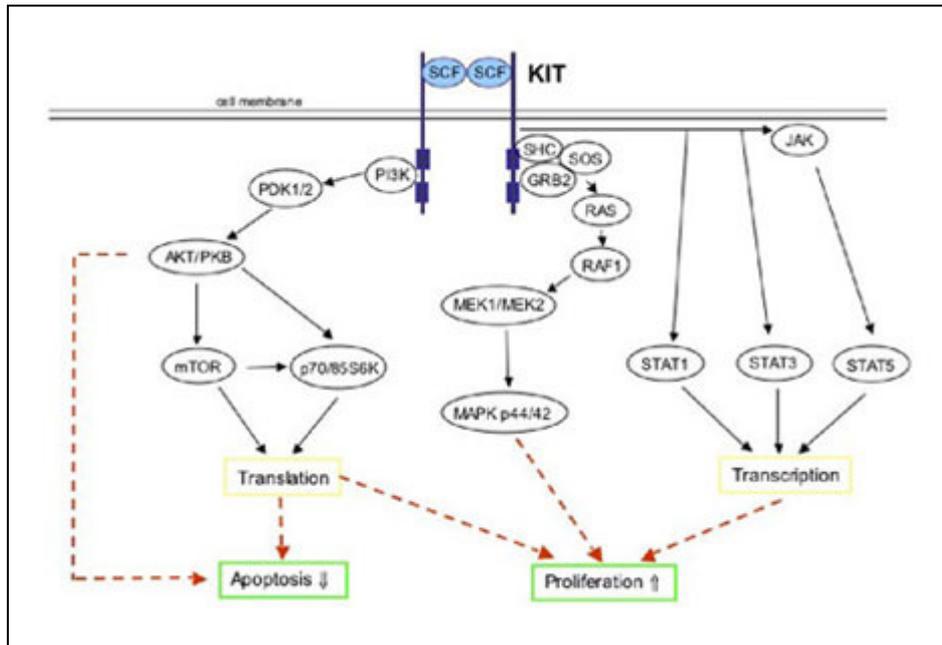


Abb. 5: KIT-Pathway: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktionswege. Die Aktivierung des KIT-Rezeptors erfolgt durch Bindung des dimeren Stammzellfaktors mit der Folge der Homodimerisation von zwei KIT-Molekülen. Mit den einhergehenden Konformitätsänderungen des KIT-Rezeptors kommt es dann zu einer Aktivierung der KIT-Kinase-Domäne, so dass intrazellulär Phosphorylierungen ablaufen, die ihrerseits wiederum dazu beitragen, dass intrazellulär verschiedene Signalproteine, wie z.B. das PI3K, am KIT-Rezeptor binden können und somit die verschiedenen Signalkaskaden in Richtung Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung einleiten können.

Zum Vorkommen von KIT lässt sich feststellen, dass es in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert wird, einschließlich hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (48) (49), Keimzellen, Melanozyten (50), Mastzellen (51) (52), interstitieller Cajal-Zellen (ICC), bestimmter epithelialer Basalzellen, Untergruppen von zerebellären Neuronen (53) sowie einiger embryonaler und fetaler Endothelzellen (54), in deren Entwicklung, Differenzierung und Funktion es eine wichtige Rolle einnimmt (33). Mit Ausnahme der reifen Mastzellen, Melanozyten und Cajalzellen sowie einiger Subpopulationen von Megakaryozyten und Monozyten (41) geht jedoch die physiologische KIT-Expression im Laufe der Zelldifferenzierung verloren (33).

Darüber hinaus findet sich KIT auch in unterschiedlicher Expressionsstärke bei einer Vielzahl von Tumortypen, wie z.B. bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Melanomen, adenoid-zystischen Karzinomen sowie bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) (35) (55).

Bei Letzteren sind ca. 95% KIT-positiv. Entscheidend für die Pathogenese scheint jedoch nicht der Nachweis von KIT per se zu sein, sondern eine aktivierende (‘gain of function’) Mutation im Rezeptor, die auf Proteinebene durch Zusammenlagerung zweier transmembranöser Kinasen zu einem Homodimer zu einer kontinuierlichen ligandenunabhängigen Aktivität der Tyrosinkinase führt. Diese ‘gain of function’-Mutation liegt bei KIT-positiven GIST’s zu 80 bis 85% vor. In einer Studie (322 GIST’s) von Corless et al ergaben sich folgende Mutationsereignisse im KIT-Gen: Am häufigsten im Exon11 (66,1%), seltener in den Exons9 (13%), 13 (1,2%) oder 17 (0,6%) (56).

Bemerkenswert ist, dass GIST’s aufgrund der verschiedenen Mutationen in Untergruppen eingeteilt werden können, die es sogar erlauben, Aussagen sowohl über die Lage als auch über die Prognose zu machen. So sind GIST’s mit einer aktivierenden Mutation im PDGF-Rezeptor häufig im Magen lokalisiert, wohingegen sich KIT-positive GIST’s eher im Dünndarm manifestieren können (57). Weiterhin haben GIST’s mit Mutation im Exon11 des KIT-Rezeptors häufiger eine bessere Prognose als GIST’s mit Mutationen im Exon9 des KIT-Rezeptors. Zudem kann man Aussagen darüber treffen, ob die Behandlung mit Imatinib (Glivec) sinnvoll ist, denn GIST’s mit Exon11 Mutationen sprechen auf Imatinib bis zu 80% an, hingegen reduziert sich die Ansprechrate bei GIST’s mit Exon9 Mutation auf bis zu 50%. GIST’s, die keine Mutation in vorher genannten Exons des KIT-Gens aufweisen, sind resistent gegenüber der Behandlung mit Imatinib.

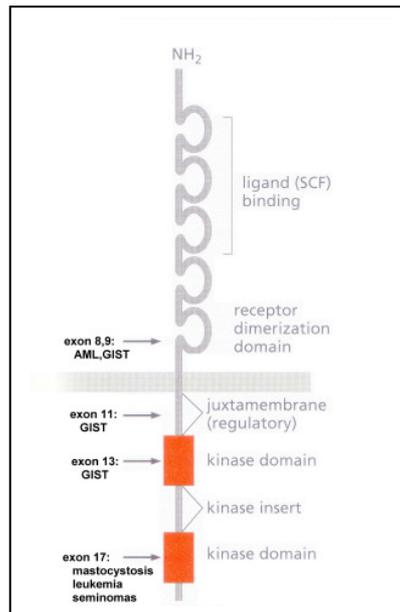


Abb. 6: KIT-Rezeptor mit seinen häufigsten Mutationen (26)

Die Entwicklung von sekundären Resistenzen gegenüber Imatinib bei der Behandlung treten in 40% der Fälle auf und sind darin begründet, dass weitere Mutationen auftreten, die durch Imatinib nicht therapiert werden können (58).

1.3.3. PDGF-Rezeptor

Der Wachstumsfaktor-Rezeptor PDGFR (platelet derived growth factor receptor) existiert in zwei Isoformen: PDGFR- α und PDGFR- β . Er wird durch die beiden Gene PDGFR-A (23 Exone) auf Chromosom 4q12 respektive PDGFR-B auf Chromosom 5q31-q32 codiert. Nach Abspaltung der Signalpeptide umfasst PDGFR- α 1063 Aminosäuren (170 kDa) und PDGFR- β 1067 Aminosäuren (190 kDa) (59). Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt über die extrazelluläre Bindung eines dimeren PDGF-Liganden (60), der im Jahre 1974 von Kohler und Lipton als wesentliche mitogene Komponente (61) von, wie sich später herausstellte, hauptsächlich mesenchymalen Zellen identifiziert wurde (62). Mittlerweile sind für die Familie der PDGF fünf Isoformen bekannt, die sich über Disulfidbrückenbildung aus vier verschiedenen Polypeptidketten zusammensetzen, und zwar PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD (63). Während die Isoformen A und B sowohl

Homo- als auch Heterodimere ausbilden können, existieren für C und D lediglich Homodimere.

Die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten zwischen den PDGF-Isoformen und den Rezeptor-Untereinheiten bilden die Basis für differenzierte PDGF-Isoform-spezifische Signaltransduktionswege und Funktionen (62) (64). Das PDGF/PDGFR-System stellt einen zentralen Regulator der Migration und Proliferation von Zellen mesenchymalen Ursprungs, einschließlich glatter Muskelzellen, Fibroblasten und Gliazellen, dar. Es ist an aktiven Umbauprozessen des Stütz- und Bindegewebes beteiligt, indem es die Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Fibronectin, Proteoglykan, Hyaluronsäure sowie der Kollagenase reguliert und beeinflusst. Zudem reguliert es verschiedene andere wichtige physiologische Zellprozesse wie Chemotaxis, Überleben, Apoptose oder Transformation in vitro. Während der Embryogenese obliegt ihm eine essentielle Funktion bezüglich der adäquaten Entwicklung einzelner Organe (z.B. Niere, Gehirn) bzw. Organsysteme (z.B. kardiovaskuläres System), und im reifen Organismus kommt ihm eine wichtige Bedeutung im Rahmen der Wundheilung, Angiogenese, Gefäßtonusregulation sowie von Entzündungsprozessen zu (62) (64) (65).

Weiterhin scheint PDGFR auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Tumorerkrankungen wie z.B. GIST zu spielen. Bei der Untersuchung der gastrointestinalen Stromatumoren, die den Wildtyp des KIT-Gens exprimieren, haben sich verschiedene Mutationen an zwei Exons des PDGFR-A gezeigt. Zum Einen im Bereich des Exons12, das für die juxtamembranöse Domäne codiert, und zum Anderen im Bereich des Exons18, welches für das aktive Zentrum (activation loop) codiert. Es hat sich durch Versuche an Hamstern herausgestellt, dass der PDGF-Rezeptor trotz der Abwesenheit von entsprechenden Liganden (PDGF) in phosphorylierter Form vorliegt und damit einhergehend onkogene Wirkung zeigt (65).

Die Morphologie der PDGFR-positiven GIST's zeigt sich in seiner Histologie eher epitheloid. Zudem sind offenbar viele von ihnen KIT-negativ bzw. exprimieren KIT nur in einem geringen Maße gleichzeitig mit PDGFR. Die Signalkaskaden, die bei

PDGFR-positiven GIST's ablaufen, sind von denen KIT-positiver GIST's nicht zu unterscheiden, so dass die PDGFR-Mutation in der Tumorigenese die KIT-Mutation ersetzen könnte. Gleichzeitig ist auszuschließen, dass simultan eine PDGFR-Mutation mit einer KIT-Mutation vorliegt. Wie häufig nun eine PDGFR-Mutation vorliegt, ist von Studie zu Studie unterschiedlich. Hirota et al stellten beispielsweise fest, dass fünf von acht GIST's, die den Wildtyp des KIT-Gens exprimieren, Mutationen im Bereich des PDGFR-A aufweisen (66) (67) (68) (66).

1.4. Tyrosinkinasen als Therapieziele

Um das wachstumsfördernde Verhalten von Tumoren zu unterbinden, wurden mehrere Strategien entwickelt, die in verschiedene Rezeptor-Signalwege eingreifen. Diese Signalwege bieten sich wegen ihrer Bedeutung in der Regulation von Proliferation, Transformation, Invasivität und Überleben bei verschiedenen malignen Tumoren als Ziel für eine therapeutische Intervention an. Wobei besonders RAS- und RAF-Proteinkinasen und deren übergeordnete Rezeptor-Tyrosinkinasen als Zielstrukturen für die Entwicklung von neuen Therapien attraktiv sind. So zielen auch alle zur Zeit gängigen genspezifischen Therapien auf Tyrosinkinasen ab (69) (70).

Diese als 'targeted therapy' bezeichnete Form der Behandlung vereint im Vergleich zu den bisherigen Therapiemöglichkeiten in sich gleich mehrere Vorteile. Wie der Name schon andeutet, handelt es sich um eine zielgerichtete Therapie, bei der die Medikamente gegen ganz bestimmte Gene, die mutierten Gene, wirken sollen. So besteht der Vorteil vor Behandlungsbeginn zu wissen, welche Patienten auf das Medikament ansprechen werden, zudem treten im Vergleich zur Chemotherapie deutlich weniger Nebenwirkungen auf (71). Dies ist darin begründet, dass die Chemotherapeutika ungezielt alle sich schnell teilenden Zellen angreifen und damit auch gesunde Zellen zugrunde gehen, wohingegen die Medikamente der 'targeted therapy' speziell nur Zellen mit entsprechender Mutation, also tumoröse Zellen, zugrunde gehen lassen. Es hat in den vergangenen Jahren schon mehrere Einsatzgebiete für solche Medikamente gegeben.

Zu den erfolgreichsten Prinzipien gehört dabei die Zuhilfenahme von spezifischen Antikörpern, sogenannte 'biologicals', zu denen als bekanntestes Medikament das Herceptin gehört. Ein weiteres ist das Erbitux (Cetuximab). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie besonders nebenwirkungsarm in der Anwendung am Patienten sind, jedoch sind sie sehr aufwendig in der Entwicklung. Ein anderer Ansatz ist die Anwendung von sogenannten 'small molecules'. Dabei handelt es sich um kleine Moleküle, die in verschiedene Signalkaskaden eingreifen können. Zu dieser Stoffklasse gehören unter anderem Iressa (Gefitinib), Tarceva (Erlotinib) und Glivec (Imatinib), die in der Entwicklung geringere Aufwendungen bedürfen, aber gleichzeitig ein größeres Nebenwirkungsspektrum aufweisen, das allerdings keinesfalls mit dem von Chemotherapeutika zu vergleichen ist.

1.4.1. 'Biologicals' am Beispiel von Herceptin und Erbitux

Herceptin, welches auch unter dem Namen Trastuzumab bekannt ist, ist eines der ersten Medikamente dieser Art. Es wurde im Jahre 1998 in den USA von der FDA und im Jahr 2000 in der Europäischen Union zunächst nur für Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs zugelassen (72).

Die europäische Zulassungsbehörde EMA genehmigte 2006 den erweiterten Einsatz dieses Medikaments. Damit kommt es nun auch den Patientinnen im Frühstadium zu Gute, bei denen der Tumor den Marker HER2 überexprimiert. Dazu gehören immerhin 20% bis 30% der an Brustkrebs erkrankten Patientinnen. Besonders auffällig bei diesen Patientinnen ist, dass die Krebserkrankung meist aggressiver als bei Patientinnen ohne HER2-Überexpression auf den Tumorzellen verläuft. Zudem ist bei ihnen die krankheitsfreie Überlebenszeit deutlich verkürzt (73).

Das Medikament Herceptin ist ein rekombinanter, humanisierter (95% humane Proteine), monoklonaler Antikörper. Er bindet selektiv an die extrazelluläre Domäne des 'human epidermal growth factor receptors' (HER2). Damit einhergehend kommt es intrazellulär zur raschen Aktivierung der PTEN-Lipid-Phosphatase, welche ihrerseits den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Pathway (PI3K) herunterreguliert. Das permanente Wachstum und die Teilung der HER2-überexprimierenden Krebszelle

werden damit blockiert. Darüber hinaus stimuliert der Einsatz des HER2-Antikörpers eine zellvermittelte Toxizität (ADCC: 'antibody dependent cell mediated cytotoxicity'), die zur Vernichtung der Tumorzelle führt (74).

Die Therapie mit Trastuzumab kann in unterschiedlicher Weise erfolgen, was verschiedene Studien belegen. Trastuzumab kann sowohl als adjuvante als auch als neoadjuvante Therapie zum Einsatz kommen, wobei der größte Erfolg in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, wie z.B. Anthrazyklinen, erzielt werden kann. Diese Kombinationstherapie birgt im Vergleich zu den anderen Therapieformen jedoch auch ein besonders hohes Risiko, einen Herzschaden zu erleiden (75).

Die Zahlen sprechen dabei für sich: Die Kombination von Anthrazyklinen und Cyclophosphamiden mit Trastuzumab bewirkt eine Kardiotoxizität von 27%, wobei auch asymptomatische Herzleiden einbezogen werden. Wird Trastuzumab allein mit Paclitaxel kombiniert, resultiert eine Kardiotoxizität von 13%. Als Monotherapie angewendet, verursacht Trastuzumab im Vergleich nur zu 4,7% ein Herzleiden. Allerdings sind 4,7% ein nicht zu vernachlässigender Wert. Die Kardiotoxizität ist aus diesem Grunde die schwerwiegendste Nebenwirkung des Herceptins. Deshalb bedarf es auch einer gründlichen Auswahl der Patientinnen, die Herceptin erhalten sollen (76).

Bei der Anwendung von Herceptin haben sich, besonders bei der Monotherapie, Misserfolge in der Behandlung des Mammakarzinoms ergeben. Es hat sich gezeigt, dass nach erfolgreichem Einsatz des Medikaments in einem folgenden Intervall Resistenzen auftreten können, die das Medikament unwirksam werden lassen. Der Grund hierfür ist, dass weitere Mutationen auftreten, die vom Medikament nicht erreicht werden können. Im Fall des Herceptins tritt die Mutation im Bereich der PTEN-Funktion auf, so dass erneut der PI3K/AKT-Signalweg heraufreguliert wird und damit ein Rezidiv bewirkt (74).

Ein weiteres Medikament aus der Gruppe der 'biologicals' ist das Cetuximab, das auf dem Markt als Erbitux gehandelt wird. Es ist ein therapeutischer monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1, welches spezifisch an die extrazelluläre Domäne des EGF-

Rezeptors bindet. Durch diese Bindung werden die Aktivierung des Rezeptors und die nachgeschalteten Signalkaskaden gehemmt, wodurch sowohl die Invasion der Tumorzellen in gesundes Nachbargewebe als auch die Ausbreitung der Tumore in neue Körperregionen vermindert werden. Darüber hinaus wird angenommen, dass es die Fähigkeit der Tumorzellen, die durch Chemo- und Strahlentherapie verursachten Schäden zu reparieren, verringert sowie die Ausbildung neuer Blutgefäße in den Tumoren herabsetzt, was zu einer generellen Hemmung des Tumorwachstums zu führen scheint (77). Nach einer Serie erfolgreicher klinischer Studien wurde Cetuximab 2003 in den USA, und im Jahre 2004 auch in der Europäischen Gemeinschaft zur Behandlung von Kolorektalkarzinomen zugelassen, und zwar als Mittel in Fällen, bei denen eine Irinotecan-haltige zytostatische Chemotherapie versagt hat (78).

Die Anwendung von Cetuximab am Patienten erweist sich als relativ nebenwirkungsarm. Als häufigste Nebenwirkung tritt dabei ein akneartiger Hautausschlag auf, der wiederum mit einem guten Ansprechen auf die Therapie zu korrelieren scheint. Bei etwa 5% aller Patienten können unter der Behandlung mit Cetuximab Überempfindlichkeitsreaktionen auftreten (77).

Für die Kombinationsbehandlung mit Irinotecan bei Patienten mit EGFR-exprimierendem metastasierendem Kolorektalkarzinom, die auf eine vorherige Irinotecan-haltige Therapie nicht mehr ansprechen, liegt die Zulassung in 58 Ländern, darunter China, Europäische Union, Lichtenstein, Schweiz und USA, vor. In 44 Ländern ist es in Kombination mit einer Strahlentherapie für die Behandlung von lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses (SCCHN) zugelassen, unter anderem in der Europäischen Union, der Schweiz und der USA. In Argentinien, Chile, Israel, Mexiko, den Philippinen und den USA ist Cetuximab auch als Monotherapie bei Patienten mit rezidivierenden und/oder metastasierenden Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses zugelassen, die auf eine vorherige Chemotherapie nicht mehr angesprochen haben (78) (79) (80).

1.4.2. 'Small molecules' am Beispiel von Iressa, Tarceva und Glivec

Ein Beispiel aus der Gruppe der 'small molecules' ist das Medikament Iressa (Gefitinib/ZD1839). Es ist ein besonders bioverfügbares Medikament, welches bei NSCLC-Patienten ('non small cell lung cancer'-Patienten) eingesetzt wird. Es kommt speziell in der EGFR-Signalkaskade zu einer kompetitiven Hemmung an der ATP-Bindungsstelle, so dass die intrazelluläre Tyrosinkinase keine Autophosphorylierungen vornehmen kann und damit die nachfolgende Signalkaskade nicht mehr ablaufen kann. Zu den Nebenwirkungen gehören unter anderem Hautausschlag und vor allem gastrointestinale Beschwerden (81).

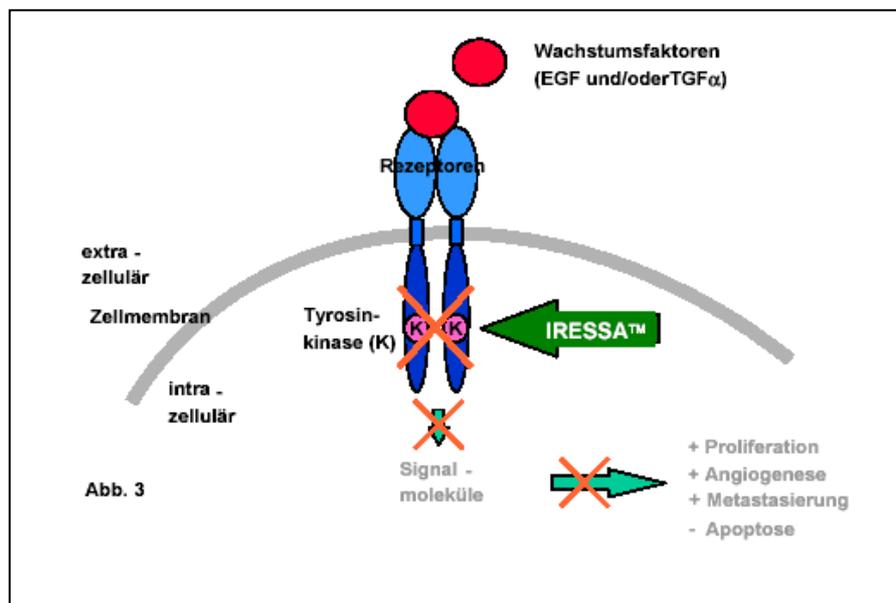


Abb. 7: Wirkungsweise von Iressa: Hemmung der Proliferation (Zellvermehrung), Hemmung der Angiogenese (Ausbildung von Blutgefäßen, um dem Tumor das Wachstum zu ermöglichen), Hemmung der Metastasierung (Ausbreitung des Tumors in andere Körpergewebe, Organe), Förderung der Apoptose (programmierter (normaler) Zelltod) (82)

Es hat sich auch bei diesem Medikament gezeigt, dass nach erfolgreichem Einsatz in einem folgenden Intervall Resistenzen auftreten können und somit die Medikamente unwirksam werden. Der Grund hierfür ist, dass sekundär Mutationen auftreten, die vom Medikament nicht erreicht werden können. Bei der Behandlung des Lungenkarzinoms mit Iressa kommt die Resistenz entweder durch eine sekundäre EGFR-Mutation oder K-RAS-Mutation zustande (83).

Tarceva (Erlotinib/OSI-774), das ebenfalls bei Patienten mit NSCLC zum Einsatz kommt, gehört wie auch das Medikament Iressa zu den 'small molecules'. Tarceva hemmt bei der EGFR-Signalübertragung die Tyrosinkinase-Aktivität innerhalb der Zelle, was zu einer Blockade des Tumorzellwachstums führen kann. Sehr häufige Nebenwirkungen sind Ausschlag zu 75% und Durchfälle zu 54%. Häufige Nebenwirkungen sind auch gastrointestinale Blutungen, Leberfunktionsstörungen und Keratitis (Hornhautentzündungen) (84) (85).

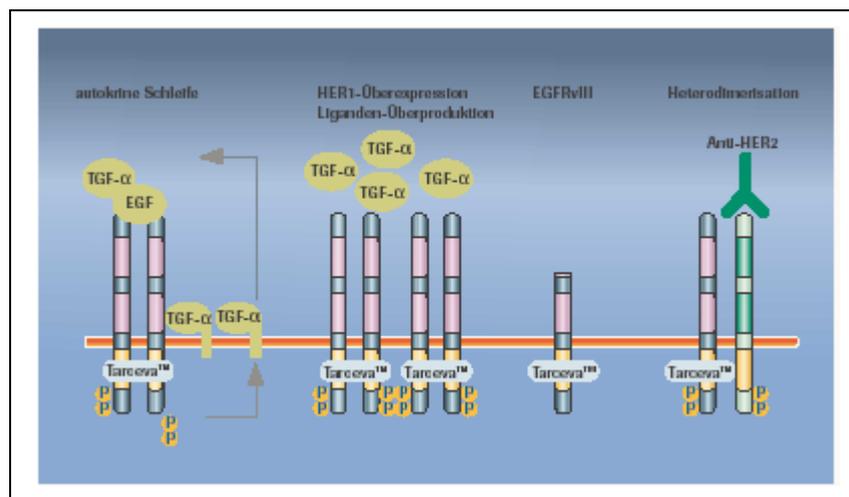


Abb. 8: Wirkungsweise von Tarceva: Tarceva hemmt die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasebereiche und kann daher jede Art der hier gezeigten HER1-Aktivierung auslöschen (86)

Auch das Medikament Glivec (Imatinib mesylate) ist in die Gruppe der 'small molecules' einzuordnen. Dabei ist es vielseitig einsetzbar. Es wird zur Behandlung der verschiedenen Phasen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt. Zudem ist es Ende 2001 auch zur Therapie KIT (CD117)-positiver nicht resezierbarer und/oder metastasierter gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) bei Erwachsenen zugelassen worden. Für die betroffenen Patienten mit fortgeschrittenem GIST änderte sich die Prognose ihrer Erkrankung schlagartig zum Positiven (87) (88).

Wie bereits erwähnt sind 95% aller gastrointestinalen Stromatumoren KIT (CD117)-positiv. Damit ist es möglich, GIST diagnostisch gegenüber anderen Tumoren abzugrenzen. Dies erfolgt über immunhistochemische Färbung von CD117, welches als Oberflächenantigen auf der extrazellulären Domäne des KIT-Rezeptors zu finden

ist. Nicht alle KIT-positiven Tumoren sprechen auf die Behandlung mit Glivec an. Es gibt verschiedene Faktoren, die die Wirksamkeit des Medikaments beeinflussen. Dazu gehören die Präsenz einer KIT-Mutation sowie dessen Typ (89) (90) (91). So beherbergen zirka 80% bis 85% der KIT-positiven GIST's eine aktivierende Mutation ('gain of function') (56). Weiterhin sind die Ansprechraten auf Glivec bei GIST's mit Mutationen im Exon11 des KIT-Rezeptors besonders hoch, wohingegen sich bei Mutationen in anderen Exons des KIT-Rezeptors (Exon9, 13) sowie auch in anderen Rezeptoren, wie z.B. den PDGF-Rezeptor-A, schon deutlich niedrigere Ansprechraten ergeben (89) (90).

Der Wirkmechanismus von Glivec besteht im Allgemeinen in der kompetitiven und selektiven Blockade der ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinase. Bei der CML speziell wird z.B. das Fusionsprotein Bcr-Abl geblockt. Beim gastrointestinalen Stromatumor wird vorwiegend die Tyrosinkinase des KIT-Rezeptors, im speziellen diejenigen mit Mutationen im Exon11, gehemmt und zu einem kleinen Teil auch die des PDGF-Rezeptors-A mit Mutationen im Bereich des Exons18. Insgesamt wird durch diese Blockade die Übertragung eines Phosphatrests auf das Substrat verhindert, womit die nachfolgende Signalkaskade nicht mehr ablaufen kann (88) (90). Glivec wird im Allgemeinen gut vertragen. Zu den unerwünschten Nebenwirkungen zählen Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Muskelschmerzen (Myalgie), Muskelkrämpfe, Hautrötungen, erhöhte Leberwerte (Transaminasenanstieg), Schwellungen (Ödeme) und Hautveränderungen. Weiterhin kann es zu Blutbildveränderungen wie Neutro- und Thrombozytopenien kommen (92).

In klinischen Studien ergab sich durch die Behandlung mit Glivec eine Erfolgsrate mit Rückgang des Tumors von 50%, bei den Übrigen stagnierte das Wachstum der Tumore. Allerdings traten auch bei diesem Medikament zirka 18 bis 26 Monate nach Therapiebeginn gehäuft Resistenzen auf (93). Dabei sind verschiedene Resistenzmechanismen bei fortgeschrittenen GIST's bekannt. Neben Mutationen in bestimmten Domänen der Kinase, hat man auch eine zwei- bis vierfache KIT-Überexpression beobachtet oder aber den Stopp der Expression, also einen kompletten Targetverlust, der von verstärkten alternativen Tyrosinkinase-Pathways

begleitet wurde (94). Deshalb unterliegt Glivec einer ständigen Weiterentwicklung, es liegt bereits in der dritten Generation vor.

Darüber hinaus laufen derzeit klinische Studien mit Patienten, die eine systemische Progression aufweisen und zusätzlich zu Glivec Substanzen erhalten, die zu einem späteren Zeitpunkt in die Signalkaskade eingreifen. Dazu zählt das Rapamycinderivat RAD001, welches als mTOR-Inhibitor (PI3K/AKT-Signalkaskade) einen direkten Antitumor- und Antiangiogeneseeffekt zeigt, sowie der Staurosporinabkömmling PKC412, der unter anderem konventionelle PKC-Isoformen hemmt. Alternativ zu Glivec könnte bei diesen Patienten künftig auch der Wirkstoff SU11248 eingesetzt werden, der mehrere Tyrosinkinasen, darunter auch KIT, hemmt (95).

Wie am Beispiel von Glivec und den anderen Medikamenten deutlich wird, erfordert die Ausbildung von Resistenzen immer wieder die Weiter- bzw. Neuentwicklung von Medikamenten, um vorzusehen, warum es zu den Resistenzen kommen kann und einen differenzierteren Einsatz der Medikamente zu ermöglichen. Um Erkenntnisse für diese genaueren Einsatzmöglichkeiten zu erlangen, ist es sinnvoll, diese an humanen Tumor-Zelllinien zu ergründen, dessen Mutationsstatus bekannt ist und somit genaueste Aussagen über die verschiedenen Wirkungsweisen und dessen mögliche Resistenzmechanismen treffen kann.

1.5. Zelllinien als Modellsysteme

Als Zellkultur wird die Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus bezeichnet. Zelllinien sind Zellen einer Gewebeart, die sich im Lauf dieser Zellkultur unbegrenzt fortpflanzen können. Es werden sowohl immortalisierte (unsterbliche) Zelllinien als auch primäre Zellen kultiviert (Primärkultur). Als Primärkultur bezeichnet man eine nicht immortalisierte Zellkultur, die direkt aus einem Gewebe gewonnen wurde. Zellkulturen finden breite Verwendung in der biologischen und medizinischen Forschung, Entwicklung und Produktion.

Vorteile der Zelllinien sind ihre leichte Verfügbarkeit bei geringem Kostenaufwand, zudem ist die Forschung an Zellkulturen ethisch vertretbar, denn sie reduziert Tierversuche und Probandenstudien.

Dabei muss aber eine Zelllinie bestimmte Bedingungen erfüllen, z.B. will man die Wirksamkeit eines neuen Medikaments untersuchen, das z.B. eine Resistenz gegen Glivec überwinden soll, muss dieses auch an einer entsprechenden Glivec-resistenten Zelllinie getestet werden. Davon gibt es allerdings nur wenige, der Grund dafür ist aber wahrscheinlich der allgemein schlechte Untersuchungszustand der vorhandenen Zelllinien. Wünschenswert wäre es, den Status möglichst aller zur Zeit verfügbaren Zelllinien, zumindest hinsichtlich der verfügbaren genspezifischen Therapien (z.B. der TRK-Inhibitoren), zu kennen (96) (97).

Es wäre somit beispielsweise möglich, direkt den Erfolg von Kombinationstherapeutika an ausgewählten Zelllinien, die mehrere Mutationen gleichzeitig in verschiedenen Genen aufweisen, wie z.B. eine EGFR-Mutation in Kombination mit einer KIT-Mutation, zu testen.

1.6. Fragestellung

Zelllinien sind wichtige Werkzeuge für die Erforschung zellulärer Regulationsmechanismen. Als nachteilig gilt allerdings, dass viele Zelllinien eine gewisse Diskrepanz zum Ursprungsgewebe zeigen. So haben zahlreiche Untersuchungen an humanen Tumorzelllinien gezeigt, dass oftmals ein „unphysiologisch“ hoher Grad an genetischer Instabilität vorliegt und Tumorzelllinien daher in der Regel viel mehr genetische Veränderungen zeigen als ihre klinischen „Vorläufer“-Tumoren.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass Zelllinien typischerweise aus weit fortgeschrittenen Tumoren etabliert werden, in denen bereits eine überdurchschnittlich hohe Zahl von chromosomalen Veränderungen akkumuliert worden ist. Alternativ wäre es aber auch denkbar, dass Zelllinien besonders anfällig für die Akkumulation von Mutationen sind, z.B. durch einen besonderen Selektionsdruck während der Kultivierung in oftmals körperfremden Medien in Verbindung mit einer unphysiologisch hohen Anzahl von Zellzyklen und Kulturpassagen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher abzuschätzen, wie „künstlich“ Zelllinien von humanen Tumoren tatsächlich sind. Dazu sollte untersucht werden, ob bestimmte Mutationen, die nur von einigen wenigen klinischen Tumorentitäten bekannt sind, tatsächlich nur in den erwarteten Zelllinien (d.h. in Zelllinien von Tumortypen, die ursprünglich diese Mutation zeigen) auftreten, oder ob auch Zelllinien aus anderen Tumortypen im Laufe ihrer weiteren Entwicklung solche „Indikatormutationen“ akquirieren können.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden 57 humane Zelllinien verwendet, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Dabei sind aus der Tabelle genauere Details zu den Zelllinien ersichtlich. Dazu gehören u.a. die Gewebeart, die Tumorentität sowie die Kurzbezeichnung der Zelllinie. All diese Zelllinien wurden auf gleiche Weise untersucht (siehe dazu Abschnitt 2.2.)

Organ	Zelllinien	Herkunftsgewebe
Kolon	DLD-1	kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C
Kolon	COLO 320 DM	kolorektales Adenokarzinom
Kolon	HCT-8	kolorektales Adenokarzinom
Kolon	COLO 201	kolorektales Adenokarzinom
Kolon	SK-CO-1	kolorektales Adenokarzinom (stammend aus Aszites)
Kolon	SW-620	epithelial; kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C
Kolon	HT 29	kolorektales Adenokarzinom
Kolon	HCT-15	kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C
Kolon	COLO 205	Adenokarzinom, Duke`s Typ D (stammend aus Aszites)
Kolon	HCT-116	kolorektales Adenokarzinom
Leber	HEP G2	hepatozelluläres Karzinom
Ovar	OVCAR-3	Adenokarzinom, (stammend von Aszites)
Ovar	OVCAR-4	Adenokarzinom
Ovar	OVCAR-5	Adenokarzinom
Ovar	OVCAR-8	Adenokarzinom
Ovar	OC-2	Adenokarzinom
Knochenmark	K-562	Leukämie (stammend aus Pleuraerguss)
Knochenmark	HL-60 (TB)	promyelotische Leukämie
Haut	SK-MEL-28	malignes Melanom
Haut	MEL-HO	malignes amelanotisches Melanom (stammend aus Lymphknoten)
Haut	IGR-1	malignes Melanom (stammend aus inguinalem Lymphknoten)
Haut	A 431	Epidermis; epidermoides Karzinom
Haut	HACAT	malignes Melanom
Haut	A-375	malignes Melanom

Organ	Zelllinien	Herkunftsgewebe
Brust	ZR-75-1	Karzinom (stammend aus Aszites)
Brust	HBL-100	Brustdrüse
Brust	BT 549	Brustdrüse; duktales Karzinom (stammend aus Lymphknoten)
Brust	HS-578T	Brustdrüse; duktales Karzinom
Brust	MCF 7	Brustdrüse, Adenokarzinom (stammend aus Pleuraerguss)
Brust	MDA-MB-435	Brustdrüse; duktales Karzinom
Brust	MDA-NEO	Brustdrüse; Adenokarzinom
Lunge	NCI-H23	Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom
Lunge	NCI-H226	Nicht-kleinzelliges Karzinom
Lunge	NCI-H322M	Nicht-kleinzelliges Karzinom
Lunge	NCI-H522	Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom
Niere	CAKI-2	Klarzellkarzinom
Niere	293	transformiert durch Adenovirus 5 DNS
Niere	786-0	Adenokarzinom
Gehirn	T98G	multiformes Glioblastom
Gehirn	SNB-19	links parietookzipital; Glioblastom
Gehirn	GaMG	Glioblastom
Gehirn	DBTRG-05MG	Gliazelle; multiformes Glioblastom
Gehirn	U-343MG	Glioblastom
Gehirn	172	Glioblastom
Knochen	SAOS-2	Osteosarkom
Harnwege	ECV 304	Harnblasenkarzinom
Harnwege	J-82	Harnblase; Transitionalzellkarzinom
Harnwege	SCABER	Harnblase, squam. Zellkarzinom
Harnwege	5637	Harnblasenkarzinom
Harnwege	TCC-SUP	Harnblase; Transitionalzellkarzinom
Harnwege	RT-II2	Harnblase; Transitionalzellkarzinom; Grad II
Gebärmutter	HELA	Zervixkarzinom
Schilddrüse	ONCO-DG-I	oxyphiles papilläres Karzinom
Schilddrüse	CAL-62	anaplastisches Karzinom
Schilddrüse	ML-1	follikuläres Karzinom
Schilddrüse	B-CPAP	Schilddrüsenkarzinom
Schilddrüse	8505C	Schilddrüsenkarzinom

Tab. 1: Verwendete Zelllinien

2.2. Sequenzierung

2.2.1. DNA-Isolation

Bei der Isolierung genomischer DNA aus Geweben ist der essentiellste Schritt der proteolytische Abbau der Zellproteine durch Proteinase K. Einfache Phenolextraktion der DNA zur Abtrennung sämtlicher Proteine würde in diesem Fall nicht ausreichen. Zudem ist die genomische DNA sehr komplex mit Histonen oder histonähnlichen Proteinen verpackt, deren Struktur durch Phenolisierung nicht vollständig aufgebrochen werden kann (98). Da ein vollständiger Proteinase-Verdau des Gewebes als entscheidend für die DNA-Ausbeute gesehen wird, wurde der Proteinase-Verdau solange durchgeführt bis die Lösung klar war, erschien sie noch trübe, wurde die Inkubation unter Proteinase K-Zugabe um einen weiteren Tag verlängert. Um eine möglichst hohe Ausbeute an hochmolekularer DNA zu erhalten und eine unnötige Scherung der DNA zu vermeiden, wurde der gesamte Extraktionsprozess so schonend wie möglich durchgeführt.

Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus Gewebe mit QIAamp DNA Mini Kit

- Je nach Größe der Gewebstücke 1 bis 4 Schnitte à 10µm in ein 2ml Reaktionsgefäß geben
- 1.200µl Xylol zum Entparaffinieren auf die Schnitte pipettieren, vortexen und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, dann 5 Minuten bei 13.200U/min zentrifugieren, Überstand vorsichtig in ein geeignetes Abfallgefäß pipettieren (Xylol ist gesundheitsschädlich und muss gesondert entsorgt werden)
- diesen Schritt wiederholen
- 1.200µl EtOH zu dem Pellet pipettieren, vortexen und 5 Minuten bei 13.200 U/min zentrifugieren, Überstand vorsichtig in ein geeignetes Abfallgefäß pipettieren (Xylolreste)
- diesen Schritt wiederholen
- Pellet mit geöffnetem Deckel 15 Minuten bei 37°C trocknen
- Pellet in 180µl ATL-Puffer resuspendieren und 20µl Proteinase K dazugeben, vortexen und 1-3 Stunden bei 56°C inkubieren (alle 20 Minuten vortexen) oder über Nacht inkubieren
- kurz zentrifugieren, 200µl AL-Puffer dazugeben, 15 Sekunden pulse-vortexen und 10 Minuten bei 70°C inkubieren
- kurz zentrifugieren, 200µl EtOH dazugeben, pulse-vortexen und wieder kurz zentrifugieren
- alles auf einen QIAamp Filter pipettieren und 1 Minute bei 8.000U/min zentrifugieren
- Filter in ein neues Reaktionsgefäß setzen, 500µl AW1-Puffer auf den Filter geben und 1 Minute bei 8.000U/min zentrifugieren
- Filter wieder in ein neues Reaktionsgefäß setzen, 500µl AW2-Puffer auf den Filter geben und 3 Minuten bei 13.200U/min zentrifugieren
- Flüssigkeit verwerfen und den Filter 1 Minute bei 13.200U/min trocken zentrifugieren

- Filter in ein sauberes 1,5ml Reaktionsgefäß setzen, 200µl AE-Puffer auf den Filter geben, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend 1 Minute bei 8.000U/min zentrifugieren
- DNA mittels Nano Drop messen und evtl. den vorherigen Schritt wiederholen
- DNA kurzfristig bei 4°C lagern ansonsten bei -20°C lagern

QIAamp: QIAGEN Catalog no.51304 (50)

Xylol: z.B. 2,51 Fa Sds 0750021

EtOH: z.B. 2,51 Ethanol Fa. J.T.Baker 8006

2.2.2. PCR und Primersets

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (‘polymerase chain reaction’), kurz PCR genannt, ist eines der etabliertesten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Dieses Verfahren findet seit seinen Anfängen im Jahre 1985 eine große Anwendungsbreite mit ständiger Weiterentwicklung in der modernen Molekularbiologie. Das einfache Prinzip ermöglicht eine rasche und effiziente Vervielfältigung der DNA, welche dann zu Forschungs- und diagnostischen Zwecken genutzt werden kann. Die Vorgänge bei der Vervielfältigung einer Nukleinsäure mittels PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, der Template-DNA. Bei der PCR werden als Starter-Moleküle synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die Template-DNA hybridisieren. Von deren 3`-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird. Das Grundprinzip beinhaltet somit drei sich immer wiederholende Schritte:

1. Denaturierungsschritt

Im Denaturierungsschritt erfolgt die Trennung des DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge, welches bereits bei einer Temperatur von 70°C beginnt und auf eine Temperatur von 94°C gesteigert wird. Einerseits leiden unter den hohen Temperaturen alle Komponenten, die Polymerase denaturiert, die Nukleotide

zerfallen und DNA sowie Primer werden depuriniert. Andererseits muss auf Grund der komplexen hochmolekularen Struktur der DNA die Temperatur so hoch gefahren werden, damit auch bei GC-reichen DNA-Fragmenten eine Denaturierung erfolgen kann. Deshalb hält man diese Phase so kurz wie möglich, aber so lange wie nötig (99).

2. Annealingschritt

Nun erfolgt die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA, dazu muss der Reaktionsansatz auf eine durch den Primer festgelegte Temperatur abgekühlt werden. Die Anlagerung des Primers an den Einzelstrang der Zielsequenz bestimmt entscheidend die Spezifität der PCR (99).

3. Elongationsschritt

Jetzt wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Diese Temperatur stellt ein Aktivitätsoptimum des verwendeten Enzyms der Taq-DNA-Polymerase dar. Diese hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wird verwendet, da sie die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne Enzymzugabe erlaubt. Sie gewährleistet somit die schnelle Bindung der Oligonukleotide an den komplementären DNA-Strang. Die Elongationszeit soll an die Länge des zu erwartenden Produkts angepasst sein. Ist die Zeit zu kurz, kann die Polymerase die Verknüpfung nicht beenden, genauso führt eine zu lange Zeit zu unerwünschten Ergebnissen. Üblicherweise rechnet man mit einer halben bis ganzen Minute je kb Länge. Wenn man Taq-Polymerase verwendet, rechnet man mit zwei Minuten je kb Länge (99).

Laborprotokoll: PCR

- die Konzentration der durch die Extraktion gewonnenen DNA, wird zunächst im Nano Drop gemessen (Werte siehe Tabelle 7)
- um gleiche Konzentrationen der Ausgangs-DNA zu schaffen, werden alle Lösungen auf einen DNA-Gehalt von 20ng/µl eingestellt
- für eine optimale Ausbeute wird ein DNA-Einsatz von 60ng/µl gewählt
- die Ansätze beinhalten folgende Komponenten: HPLC-Wasser, Puffer (MgCl₂), dNTP's (2pmol), Primermix forward/reverse (2,5pmol) (Primersets siehe Tabelle 2) und Taq-Polymerase (Ampli Taq Gold with Gene Amp)

Die folgenden Angaben gelten für 25µl Ansätze (3µl extrahierte DNA-Lösung + 22µl Mastermix). Der Mastermix setzt sich, wie aus Tabelle 2 zu ersehen, zusammen.

Mastermix	5x	6x	9x	12x	15x	18x	21x	24x	27x	30x	34x	37x
H ₂ O für 3µl DNA	81.5	98	147	196	245	93.5	342	391	439	489	554	603
10x Taq-Puffer	12.5	15	22.5	30	37.5	45	52.5	60	67.5	75	85	92.5
2mM dNTP's	10	12	18	24	30	36	42	48	54	60	68	74
Primermix	5	6	9	12	15	18	21	24	27	30	34	37
Taq-Polymerase	1	1.2	1.8	2.4	3	3.6	4.2	4.8	5.4	6	6.8	7.4

Tab. 2: Ansatzreihe für verwendete PCR-Ansätze

- die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl durchgeführter PCR-Reaktionen
- den Mastermix kurz vortexen, jeweils 22µl Mastermix in sterile Tubes vorgeben
- jeweils 3µl DNA-Lösung zupipettieren, die Röhrchen verschließen und in das PCR-Gerät stellen
- die Ansätze mit dem Programm der nachfolgenden Tabelle fahren lassen

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Aktivierung der Taq	10min	94°C
2. Denaturierung	15sec	94°C
3. Annealing	10sec	jeweilige Primertemperatur (siehe unten)
4. Elongation	20sec	72°C
5. Schlussreaktion	3min	72°C
6. Durchlauf Ende (hold)	hold	4°C

ein Zyklus beinhaltet die Schritte 2., 3. und 4.

Gen	Exon	Annealing-Temp.	Zyklen
EGFR	18	58°C	50
	19	58°C	50
	20	58°C	50
	21	56°C	50
c-KIT	9	55°C	50
	11	55°C	50
	13	55°C	50
PDGFR	12	55°C	60
	18	61°C	60

Tab. 3: PCR-Programme

Material und Methoden

Verwendetes PCR-Gerät:

Bio Rad PTC-100

Modell: PTC-1196 rev: FA
Rating: 100-200 VAC 50-60Hz 350watts
Fuses: 4.50A momentary (2) 4.0A 250V

Bei den Primern sollten folgende Parameter beachtet werden: Schmelztemperatur, 3'-Enden, Nukleotidzusammensetzung und -verteilung und Primer/Primerwechselwirkung. Die Primer sollten weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können, deshalb müssen Komplementaritäten innerhalb eines Primers und zwischen den Primern vermieden werden. Sie sollten dieselbe Schmelztemperatur besitzen. Für die sequenzspezifische Hybridisierung der Primer an die Template-DNA muss eine geeignete Temperatur, die Annealing-Temperatur, gewählt werden. Als Schmelztemperatur wird dabei diejenige Temperatur bezeichnet, bei der die betrachteten DNA-Moleküle zu 50% denaturiert sind, also einzelsträngig vorliegen. Die Schmelztemperatur (T_m) eines DNA-Doppelstrangs bis zu einer Größe von etwa 25bp kann annäherungsweise anhand der Zusammensetzung aus GC- und AT-Paaren berechnet werden. Der Beitrag eines GC-Paares zur Schmelztemperatur beträgt etwa 4°C, der eines AT-Paares 2°C.

Vereinfachte Formel zur Berechnung von T_m : $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C) (100)$.

Exon	Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	Annealing-Temp.
EGFR18	forward	TGG CAC TGC TTT CCA GCA TG	58°C
EGFR18	reverse	TCC CCA CCA GAC CAT GAG AG	58°C
EGFR19	forward	GCA GCA TGT GGC ACC ATC TC	58°C
EGFR19	reverse	GAG GTT CAG AGC CAT GGA CC	58°C
EGFR20	forward	CTT CTG GCC ACC ATG CGA AG	58°C
EGFR20	reverse	CCT TAT CTC CCC TCC CCG TA	58°C
EGFR21	forward	CTT CTT CCC ATG ATG ATC TGT C	56°C
EGFR21	reverse	GGA AAA TGC TGG CTG ACC TA	56°C
c-KIT9	forward	TCC TAG AGT AAG CCA GGG CTT	50°C
c-KIT9	reverse	TGG TAG ACA GAG CCT AAA CAT CC	50°C

Exon	Bezeichnung	Sequenz (5`->3`)	Annealing-Temp.
c-KIT11	forward	CCA GAG TGC TCT AAT GAC TG	50°C
c-KIT11	reverse	AGC CCC TGT TTC ATA CTG AC	50°C
c-KIT13	forward	GCT TGA CAT CAG TTT GCC AG	50°C
c-KIT13	reverse	AAA GGC AGC TTG GAC ACG GCT TTA	50°C
PDGFR12	forward	ATG TGG AGT GAA CGT TGT TGG	55°C
PDGFR12	reverse	CTA GTT CTT ACT AAG CAC AAG C	55°C
PDGFR18	forward	CAG GGG TGA TGC TAT TCA GC	61°C
PDGFR18	reverse	GAT TAA AGT GAA GGA GGA TGA GCC	61°C

Tab. 4: Verwendete PCR-Primer

2.2.3. Nachweis der PCR-Produkte

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Dies ist ein einfaches und effizientes Verfahren, welches eine visuelle Überprüfung über den Erfolg der zuvor gelaufenen PCR ermöglicht. Mit ihr ermittelt man, ob überhaupt das gewünschte DNA-Fragment vervielfältigt wurde und vor allem in welcher Menge es vorliegt, so dass im weiteren Verlauf bei der ersten Fällung gleiche Mengen des PCR-Produkts eingesetzt werden können. Durch das Auftragen eines Markers lässt sich zudem die Länge des Fragments abschätzen und damit auch eingrenzen, ob es sich wirklich um das gewünschte Fragment handelt. Zuletzt dient es vor allem in der Diagnostik dazu, verschieden lange Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass das PCR-Produkt, welches in eine Tasche des Agarosegels pipettiert wird, entsprechend seiner Länge durch Anlegen einer Spannung aufgetrennt wird. Die Detektion wird ermöglicht durch das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid, denn dieses interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren. Nach Anregung durch UV-Licht erscheint der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich als Bande. Aufgrund seiner interkalierenden Eigenschaften ist dieser Farbstoff ein starkes Mutagen und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen sind im Umgang bzw. bei der Entsorgung benutzter Gele zu treffen.

Laborprotokoll: Gelelektrophorese

- es werden 7µl pro PCR-Ansatz mit 1µl Loadingpuffer des Promega 50bp Sets gemischt und mittels Gelelektrophorese (1,6%-iges Agarosegel in 1xTAE-Puffer) analysiert
- die Herstellung des Gels erfolgt, indem man 1,6g Agarosepulver zusammen mit 100ml 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufkochen lässt
- anschließend werden 3µl Ethidiumbromid zugegeben und das flüssige Gel in ein 'Gel-Tray' gegossen und ein Kamm platziert
- nach der Aushärtung wird der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt
- die mit Loadingpuffer gemischten PCR-Proben werden in die Geltaschen pipettiert, sowie auch der DNA-Längenmarker (Promega 50bp)
- die Elektrophorese läuft 25 Minuten bei 110Volt
- die anschließende Analyse erfolgt mit dem Computerprogramm DC/DeVisionG (Decon Science Tec GmbH). Das Bild wird ausgedruckt und dem Protokoll beigefügt (siehe dazu Abbildung 9).

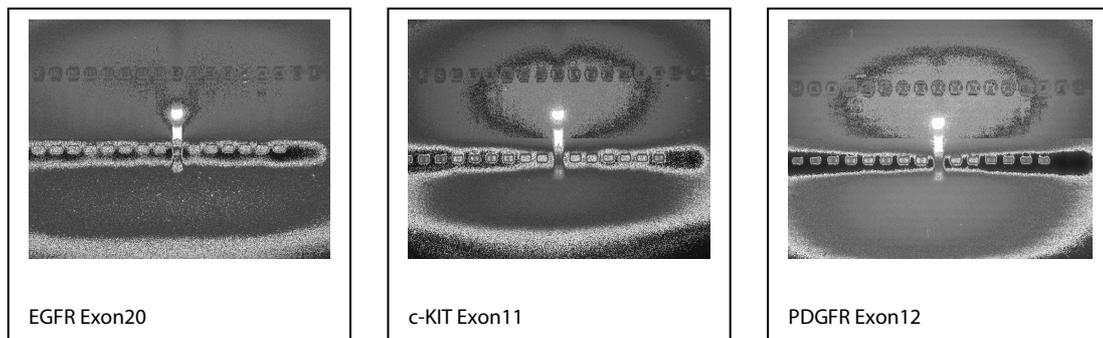


Abb. 9: Beispiele einer PCR-Produkt-Analyse: Mit einem Elektrophoresegel für EGFR, KIT und PDGFR

2.2.4. Ethanolpräzipitation der Nukleinsäuren

Die Ethanolpräzipitation ist die gebräuchlichste Methode zur Aufreinigung und Konzentrierung der DNA. In Gegenwart monovalenter Kationen bildet die DNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird. Die monovalenten Kationen werden durch das Natriumacetat bereitgestellt.

Laborprotokoll: 1. Alkoholfällung

- in ein 1,5ml Reaktionsgefäß werden 17,5µl 3M Natriumacetat (NaAC) pH 5,5 gegeben
- hierzu werden 180µl HPLC-Wasser zupipettiert
- nun wird entsprechend der Stärke der Banden auf dem Agarosegel 2µl und bei schwachen Banden bis zu 5µl des PCR-Produkts hinzu gegeben
- anschließend wird 500µl 2,5x100% Ethanol dazu pipettiert
- das Gesamtvolumen von 700µl wird mittels Vortexen und einmal überkopfhalten gemischt

- danach bei 14.000U/min bei 4°C 20 Minuten zentrifugieren und den Überstand absaugen (Vakuumpumpe)
- bei geöffnetem Tube das DNA-Pellet unter dem Abzug trocknen lassen

2.2.5. Sequenzierreaktion

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al (1977) wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Es handelt sich um eine enzymatische Methode, bei der die zu analysierende DNA als Matrize für die Synthese neuer DNA-Fragmente mit Hilfe einer DNA-Polymerase dient. Die DNA wird zuerst in eine einzelsträngige Form überführt. Diese Matrizen-DNA wird mit einem Oligonukleotid, dem Sequenzierprimer, hybridisiert. Ausgehend von diesem Primer erfolgt die Synthese des zur Matrize komplementären Strangs. Abhängig von den an das System gestellten Anforderungen (Schnelligkeit, Sensitivität, Genauigkeit, Thermostabilität) können dabei verschiedene, speziell für die DNA-Sequenzierung optimierte DNA-Polymerasen eingesetzt werden. Das Prinzip der Sequenzierreaktion ist in jedem Fall identisch.

Die DNA-Synthese wird parallel in vier Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt. Jedes Gefäß enthält Matrizen-DNA, Primer, Enzym, alle vier 2`-Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP's) und zusätzlich jeweils ein 2`, 3`-Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP's: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). In jedem der vier Reaktionsgefäße laufen nun gleichzeitig zahlreiche Primerverlängerungen ab. Das Enzym akzeptiert dabei sowohl die dNTP's als auch das jeweilige ddNTP als Substrat zur Kettenverlängerung. Wird ein ddNTP eingebaut, stoppt die Reaktion sofort (Kettenabbruch), denn auf Grund der fehlenden 3`-Hydroxygruppe kann kein weiteres Nukleotid angefügt werden. Man erhält damit in jedem der vier Reaktionsansätze eine Mischung an DNA-Fragmenten unterschiedlichster Kettenlängen. Das 5`-Ende eines jeden Fragments wird vom Sequenzierprimer gebildet, während das 3`-Ende aus dem für jeden Reaktionsansatz spezifischen Didesoxynukleotid besteht. Zur späteren Analyse wird jeder neusynthetisierte DNA-Strang entweder radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Da mittlerweile Reagenzien zur Verfügung stehen, die es erlauben, jedes der vier ddNTP's mit einem unterschiedlichen Fluorophor markiert in die Synthese

einzusetzen, kann die Sequenzierreaktion auch in einer Eintopfreaktion durchgeführt und das Reaktionsprodukt nach Auftrennen in nur einer Gelspur mit einem auf die vier Farbstoffe adaptierten laseroptischen System detektiert werden.

2.2.6. 'Cycle sequencing'

Die Anwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen ermöglicht in der DNA-Sequenzierung, analog zur PCR, die gleichzeitige Amplifikation und Sequenzierung. Dieses Verfahren wird 'cycle sequencing' genannt. Im Gegensatz zur PCR befindet sich in der Reaktion nur ein Primer, es wird also lediglich linear und nicht exponentiell amplifiziert. In einer Mischung aus DNA-Matrizen, Primer, thermostabiler Polymerase und einem dNTP/ddNTP-Gemisch wird ein thermisches Profil, bestehend aus Primerdenaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese etwa 30 mal durchlaufen, quasi eine Sequenzierungsreaktion 30 mal wiederholt. Entsprechend groß ist die Menge der produzierten Sequenzierungsfragmente (98).

Laborprotokoll: 'cycle sequencing'

- die Reaktionsgefäße mit den getrockneten Pellets mit 11 µl HPLC-Wasser versetzen
- dazu gibt man zu den entsprechenden Tubes (forward oder reverse) 1 µl des zugehörigen Primers
- auf niedriger Stufe vortexen damit sich das Pellet löst
- in die vorbereiteten Stripes 6 µl Puffer und 2 µl 'Big Dye' hinzu pipettieren
- aus den gevortexten Reaktionsgefäßen wird nun das Gesamtvolumen von 12 µl nach gründlichem Mischen in die Stripes überpipettiert
- die Stripes gibt man in den Thermocycler und startet das cycle sequencing-Programm
- die leeren Reaktionsgefäße werden aufbewahrt

(Big Dye Terminator V 1.1 cycle sequencing Kit)

Danach erfolgt noch einmal eine Aufreinigung der DNA, diese entspricht der 1. Alkoholfällung siehe 2.2.4. Ethanolpräzipitation der Nukleinsäuren.

Laborprotokoll: 2. Alkoholfällung

- in das aufbewahrte Reaktionsgefäß werden 10 µl 3M Natriumacetat (NaAC) gegeben
- hierzu werden 70 µl HPLC-Wasser zupipettiert
- nun wird der 'cycle sequencing'-Ansatz von 20 µl in das Reaktionsgefäß überpipettiert und 250 µl 2,5x Ethanol dazu pipettiert

- das Gesamtvolumen von 350µl wird mittels Vortexen und einmal überkopfhalten gemischt
- danach bei 14.000U/min bei 4°C 20 Minuten zentrifugieren und den Überstand absaugen (Vakuumpumpe)
- bei geöffnetem Tube das DNA-Pellet unter dem Abzug trocknen lassen

2.2.7. Detektion der Sequenz

Die Detektion von Fluorophor markierten DNA-Fragmenten erfolgt direkt im Gel nach Aktivierung mit einem Laser innerhalb einer Kapillare. Die detektierten Signale werden computerunterstützt direkt in die Sequenz umgewandelt. Die Vorteile bei Verwendung einer Kapillare sind die bessere Automatisierbarkeit, kleineres Probenvolumen und geringere Kosten pro Probenlauf. Hinzu kommt, dass bei der Elektrophorese auf Grund des hohen Oberflächen- zu Volumenverhältnisses die entstehende Wärme viel besser abgeleitet wird. Daher können höhere Feldstärken verwendet werden, was die Elektrophorese verkürzt. Während bei der Elektrophorese im flachen Gel bei Laufzeiten zwischen sechs und 18 Stunden im Schnitt zwischen 60 und 1.200 Nukleotide gelesen werden können, kommt man mit der Kapillare bei Laufzeiten von ein bis vier Stunden auf Leselängen von 500 bis 900 Nukleotiden. Der Nachteil, dass in einer Kapillare nur eine Probe bzw. ein Reaktionsansatz aufgetrennt werden kann, wird dadurch ausgeglichen, dass Kapillarbündel mit acht bis maximal 6x64 Kapillaren verwendet werden. Da das Sequenziergerät in der Lage ist, die vier verschiedenen Fluorophore gleichzeitig zu detektieren, bedeutet dieses, dass in der Sequenzierreaktion unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen in jeder der vier Kettenabbruchreaktionen eingebracht und alle vier Ansätze anschließend in einer Spur bzw. einer Kapillare aufgetrennt werden ('four-label', 'single-lane approach') (99).

Laborprotokoll: 'sequencing'

- die aufbewahrten Reaktionsgefäße mit den getrockneten DNA-Pellets werden mit 35µl Formamid versetzt und gemischt
- dann wird das Gesamtvolumen in die Mikrotiterplatten überpipettiert
- die Mikrotiterplatten werden in das Sequenziergerät gestellt, über Nacht läuft nun die Sequenzieranalyse

Verwendetes Sequenziergerät: AB Applied Biosystems Hitachi
3100 Genetic Analyzer
ABI Prism (Serial No.: 1476-016)

2.2.8. Auswertung der Sequenzen

Alle Sequenzen wurden ausgedruckt und mit einer Referenzsequenzvorlage verglichen. Die Sequenzvorlagen wurden aus einer öffentlichen Datenbank (National Center of Biotechnology Information, kurz NCBI, Genbank, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez) bezogen. Die entsprechenden Referenzsequenz-Identifikationsnummern sind in Tabelle 5 gelistet.

Gen	Referenzsequenz-Identifikationsnummern
EGFR	EGFR NM 005228
PDGFR	PDGFR NM 006206
KIT	KIT NM 0002222

Tab. 5: Referenzsequenz-Identifikationsnummern

Die Mutationsanalyse pro Zelllinie wurde an zwei separat angesetzten PCR-Reaktionen durchgeführt. Um eventuell auftretende Artefakte, wie z.B. falsche von der Taq-Polymerase verursachte Mutationen zu identifizieren, wird pro Exon die erste Probe vorwärts, die zweite Probe rückwärts sequenziert.

Als nicht mutiert wird gewertet, wenn:

- beide Exonsequenzen der Sequenzvorlage entsprechen
- nur eine Sequenz analysierbar ist und keine Mutation zeigt
- eine Sequenz mutiert ist, jedoch keine Mutation in der anderen Sequenz auftritt (entspricht Artefakt)

Als mutiert wird gewertet, wenn:

- beide Exonsequenzen an derselben Stelle dieselbe Mutation aufweisen
- als homozygote Mutation wird gewertet, wenn nur ein `peak` auf gleicher Höhe wie die umliegenden `peaks` vorliegt und klar die ausgetauschte Base zu erkennen ist
- als heterozygote Mutation wird gewertet, wenn zwei gleichhohe `peaks` vorliegen, die aber insgesamt nur die halbe Höhe der umliegenden `peaks` erreichen

Anhand der Codontabelle (siehe Tabelle 6) wurde dann der Aminosäureaustausch ermittelt.

		Zweite Position des Codons												
		T			C			A			G			
Erste Position des Codons	T	TTT	Phe	[F]	TCT	Ser	[S]	TAT	Tyr	[Y]	TGT	Cys	[C]	T
		TTC	Phe	[F]	TCC	Ser	[S]	TAC	Tyr	[Y]	TGC	Cys	[C]	C
		TTA	Leu	[L]	TCA	Ser	[S]	TAA	Ter	[end]	TGA	Ter	[end]	A
		TTG	Leu	[L]	TCG	Ser	[S]	TAG	Ter	[end]	TGG	Trp	[W]	G
	C	CTT	Leu	[L]	CCT	Pro	[P]	CAT	His	[H]	CGT	Arg	[R]	T
		CTC	Leu	[L]	CCC	Pro	[P]	CAC	His	[H]	CGC	Arg	[R]	C
		CTA	Leu	[L]	CCA	Pro	[P]	CAA	Gln	[Q]	CGA	Arg	[R]	A
		CTG	Leu	[L]	CCG	Pro	[P]	CAG	Gln	[Q]	CGG	Arg	[R]	G
	A	ATT	Ile	[I]	ACT	Thr	[T]	AAT	Asn	[N]	AGT	Ser	[S]	T
		ATC	Ile	[I]	ACC	Thr	[T]	AAC	Asn	[N]	AGC	Ser	[S]	C
		ATA	Ile	[I]	ACA	Thr	[T]	AAA	Lys	[K]	AGA	Arg	[R]	A
		ATG	Met	[M]	ACG	Thr	[T]	AAG	Lys	[K]	AGG	Arg	[R]	G
	G	GTT	Val	[V]	GCT	Ala	[A]	GAT	Asp	[D]	GGT	Gly	[G]	T
		GTC	Val	[V]	GCC	Ala	[A]	GAC	Asp	[D]	GGC	Gly	[G]	C
		GTA	Val	[V]	GCA	Ala	[A]	GAA	Glu	[E]	GGA	Gly	[G]	A
		GTG	Val	[V]	GCG	Ala	[A]	GAG	Glu	[E]	GGG	Gly	[G]	G

Tab. 6: Codontabelle zur Darstellung der zugehörigen Aminosäuren

Als nicht analysierbar gilt, wenn:

- trotz eingeleiteter Maßnahmen kein PCR-Produkt erhalten wird
- keine Sequenz erhalten wird

Die Sequenzierung wird wiederholt, wenn:

- trotz ausreichender PCR-Produktmenge keine Sequenz erhalten wird
- eine Mutation in einem PCR-Produkt auftritt, bei dem zweiten PCR-Produkt keine Sequenz (trotz ausreichender Produktmenge) erhalten wird

3. Ergebnisse

3.1. Mutationsanalysen

3.1.1. Verwendetes Zelllinien-Material

Das verwendete Zelllinien-Material wurde, wie bereits beschrieben, durch Extraktion aus dem Ursprungsgewebe gewonnen. Für die Erstellung eines aussagekräftigen Mutationsstatus ist es von großer Bedeutung Zelllinien mit einem hohen Reinheitsgrad und einer ausreichend hohen DNA-Konzentration auszuwählen. Qualitativ hochwertige DNA, die zur Sequenzierung geeignet war, konnte in der vorliegenden Arbeit aus 57 Zelllinien gewonnen werden. Die Konzentrationen der extrahierten DNA variierten je nach Zelllinie. Die DNA-Konzentrationen der verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Organ	Zelllinien	Datum	DNA ng/ul	ratio
Kolon	DLD-1	01.02.2006	572,6	1,99
Kolon	COLO 320DM	26.01.2006	146,6	1,9
Kolon	HCT-8	14.02.2006	745,5	2,01
Kolon	COLO 201	27.01.2006	683,8	1,9
Kolon	SK-CO-1	12.03.2006	384,7	1,99
Kolon	SW-620	28.06.2006	524,1	2
Kolon	HAT 29	14.05.2006	692,2	2,03
Kolon	HCT-15	22.12.2005	380,2	2,06
Kolon	COLO 205	18.03.2006	33,3	1,92
Kolon	HCT-116	27.04.2006	400,4	1,99
Leber	HEP G2	28.04.2006	92,1	1,98
Ovar	OVCAR-3	09.12.2005	418,5	2,05
Ovar	OVCAR-4	20.12.2005	59,5	1,93
Ovar	OVCAR-5	15.12.2005	77,4	2,07
Ovar	OVCAR-8	25.11.2005	140,8	1,99
Ovar	OC-2	08.12.2005	107,9	2,03
Knochenmark	K562	12.01.2006	114,2	2,02
Knochenmark	HL-60 (TB)	16.02.2006	262	1,98

Ergebnisse

Organ	Zelllinien	Datum	DNA ng/ul	ratio
Haut	SK-MEL-28	15.07.2006	6,4	2,29
Haut	MEL-HO	09.05.2006	65,9	2,02
Haut	IGR-1	25.05.2006	52,3	1,82
Haut	A 431	28.06.2006	47,3	1,98
Haut	HACAT	25.05.2006	32,9	2,04
Haut	A375	03.05.2006	64	2,06
Brust	ZR-75-1	07.06.2006	40,9	2,11
Brust	HBL-100	02.03.2006	258,2	2,03
Brust	BT 549	06.05.2006	12,3	2
Brust	HS-578T	05.04.2006	33,4	2,23
Brust	MCF-7	05.04.2006	259,9	2,03
Brust	MDA-MB 435	04.05.2006	178,5	1,99
Brust	MDA-NEO	26.04.2006	483,2	2,08
Lunge	NCI-H23	04.03.2006	155,8	1,92
Lunge	NCI-H226	15.06.2006	10,5	1,79
Lunge	NCI-H322M	04.03.2006	398,3	2,03
Lunge	NCI-H522	13.04.2006	48,1	2,01
Niere	CAKI-2	13.07.2006	39,3	2,05
Niere	293	06.04.2006	972,6	2,18
Niere	786-0	11.05.2006	10,4	2,24
Gehirn	T98G	28.04.2006	49,5	1,94
Gehirn	SNB-19	28.06.2006	20,7	1,99
Gehirn	GaMG	28.06.2006	48,7	2,18
Gehirn	DBTRG-05MG	18.05.2006	106,7	1,99
Gehirn	U-343MG	12.07.2006	18,4	2,04
Gehirn	172	21.07.2006	7,5	1,75
Knochen	SAOS-2	09.07.2006	36,6	1,92
Harnwege	ECV 304	12.04.2006	138,7	2,06
Harnwege	J-82	08.06.2006	62,6	2
Harnwege	SCABER	15.07.2006	34,3	1,94
Harnwege	5637	03.02.2006	103,6	1,98
Harnwege	TCC-SUP	27.04.2006	23,1	1,88
Harnwege	RT-112	26.05.2006	152,8	2,01
Gebärmutter	HELA	15.02.2006	56,4	2,06

Organ	Zelllinien	Datum	DNA ng/ul	ratio
Schilddrüse	ONCO-DG-I	13.07.2006	18,5	1,97
Schilddrüse	CAL-62	12.04.2006	100,6	2,06
Schilddrüse	ML-1	24.06.2006	40,5	1,97
Schilddrüse	B-CPAP	10.04.2006	243,6	2,02
Schilddrüse	8505C	01.06.2005	71,8	2,01

Tab. 7: DNA-Konzentrationen der Zelllinien-Extrakte

3.1.2. Übersicht der gesamten Zelllinien für EGFR-Untersuchung

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Zelllinien, welche auf EGFR-Mutationen geprüft wurden. Untersucht wurden vier Exons von EGFR, darunter Exon18, 19, 20 und 21, die allesamt für die Tyrosinkinase-Domäne codieren.

Es wurde neben verschiedenen Polymorphismen auch eine Mutation festgestellt.

Organ	Zelllinien	EGFR18	EGFR19	EGFR20	EGFR21
Kolon	DLD-I	X	X	Q 787 het	X
Kolon	COLO 320 DM	X	X	Q 787 het	X
Kolon	HCT-8	X	X	Q 787 het	X
Kolon	COLO 201	X	X	Q 787 het	X
Kolon	SK-CO-1	X	X	Q 787 hom	X
Kolon	SW-620	X	X	Q 787 het	X
Kolon	HT 29	X	X	Q 787 het	X
Kolon	HCT-15	X	X	Q 787 het	X
Kolon	COLO 205	X	X	X	X
Kolon	HCT-116	X	X	Q 787 hom	X
Leber	HEP G2	X	X	Q 787 het	X
Ovar	OVCAR-3	X	X	Q 787 hom	X
Ovar	OVCAR-4	X	X	Q 787 het	X
Ovar	OVCAR-5	X	X	Q 787 hom	X
Ovar	OVCAR-8	X	X	Q 787 hom	X
Ovar	OC-2	X	X	X	X
Knochenmark	K-562	X	X	Q 787 het	X
Knochenmark	HL-60 (TB)	X	X	Q 787 hom	X

Ergebnisse

Organ	Zelllinien	EGFR18	EGFR19	EGFR20	EGFR21
Haut	SK-MEL-28	X	P 753 S hom	Q 787 hom	X
Haut	MEL-HO	X	X	Q 787 het	X
Haut	IGR-1	X	X	Q 787 het	X
Haut	A 431	X	X	Q 787 hom	X
Haut	HACAT	X	X	Q 787 het	X
Haut	A-375	X	X	Q 787 het	X
Brust	ZR-75-I	X	X	Q 787 hom	X
Brust	HBL-100	X	X	Q 787 het	X
Brust	BT 549	X	X	Q 787 het	X
Brust	HS-578T	X	X	Q 787 het	X
Brust	MCF 7	X	X	Q 787 hom	X
Brust	MDA-MB-435	X	X	Q 787 hom	X
Brust	MDA-NEO	X	X	Q 787 hom	X
Lunge	NCI-H23	X	X	Q 787 het	X
Lunge	NCI-H226	X	X	Q 787 hom	X
Lunge	NCI-H322M	X	X	Q 787 het	X
Lunge	NCI-H522	X	X	Q 787 het	X
Niere	CAKI-2	X	X	Q 787 hom	X
Niere	293	X	X	Q 787 hom	X
Niere	786-0	X	X	Q 787 het	X
Gehirn	T98G	X	X	Q 787 het	X
Gehirn	SNB-19	X	X	Q 787 het	X
Gehirn	GaMG	X	X	Q 787 het	X
Gehirn	DBTRG-05MG	X	X	Q 787 het	X
Gehirn	U-343MG	X	X	X	X
Gehirn	172	X	X	Q 787 het	R 836 het
Knochen	SAOS-2	X	X	X	X
Harnwege	ECV 304	X	X	Q 787 hom	X
Harnwege	J-82	X	X	Q 787 het	X
Harnwege	SCABER	X	X	X	X
Harnwege	5637	X	X	X	R 836 het
Harnwege	TCC-SUP	X	X	Q 787 hom	X
Harnwege	RT-II2	X	X	X	X
Gebärmutter	HELA	X	X	Q 787 het	X

Organ	Zelllinien	EGFR18	EGFR19	EGFR20	EGFR21
Schilddrüse	ONCO-DG-I	X	X	Q 787 het	X
Schilddrüse	CAL-62	X	X	Q 787 hom	X
Schilddrüse	ML-1	X	X	Q 787 het	X
Schilddrüse	B-CPAP	X	X	X	X
Schilddrüse	8505C	X	X	X	X
Mutation	Polymorphismus	X = keine Mutation		hom = homozygot het = hereozygot	

Tab. 8: Übersicht der gesamten Zelllinien für EGFR-Untersuchung

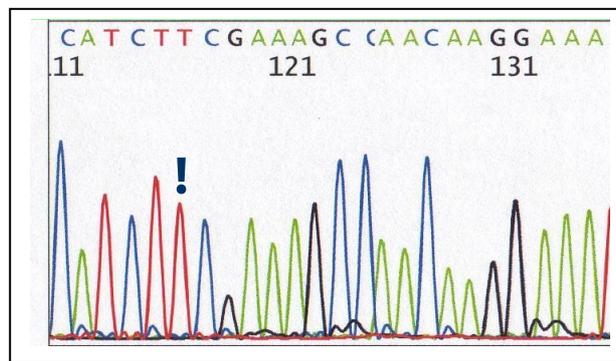


Abb. 10: Sequenzausschnitt: SK-Mel-28 EGFR19 forward P753S
Codon 753 CCG mutiert zu TCG

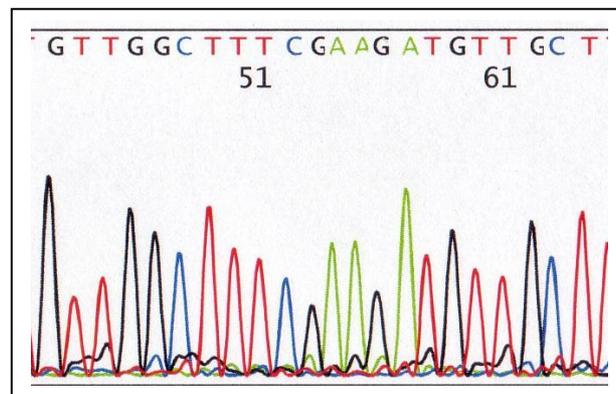


Abb. 11: Sequenzausschnitt: SK-Mel-28 EGFR19 reverse P753S

3.1.3. Übersicht der gesamten Zelllinien für PDGFR- und KIT-Untersuchung

Die folgende Tabelle zeigt alle auf KIT- und PDGFR-Mutationen geprüften Zelllinien. Untersucht wurden drei Exons des KIT-Gens, darunter Exon9, 11 und 13 sowie zwei Exons des PDGFR-Gens darunter Exon12 und 18. Dabei codiert KIT Exon9 für die extrazelluläre Domäne, die die Rezeptordimerisierung einleitet. Exon11 des KIT-

Ergebnisse

Gens und Exon12 des PDGFR-Gens codieren für die juxtamembranöse Domäne. Die ATP-Bindungs-Domäne von KIT und PDGFR werden von Exon13 und 14 und entsprechend die Phosphotransferase-Domäne von Exon17 und 18 codiert. Es haben sich neben zwei verschiedenen PDGFR-Polymorphismen keine Mutationen im KIT- und PDGFR-Gen feststellen lassen.

Organ	Zelllinien	PDGFR12	PDGFR18	c-KIT9	c-KIT11	c-KIT13
Kolon	DLD-I	P 567 hom	X	X	X	X
Kolon	COLO 320 DM	P 567 hom	X	X	X	X
Kolon	HCT-8	P 567 hom	X	X	X	X
Kolon	COLO 201	P 567 hom	X	X	X	X
Kolon	SK-CO-1	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Kolon	SW-620	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Kolon	HT 29	P 567 hom	X	X	X	X
Kolon	HCT-15	P 567 hom	X	X	X	X
Kolon	COLO 205	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Kolon	HCT-116	P 567 hom	X	X	X	X
Leber	HEP G2	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Ovar	OVCAR-3	P 567 hom	X	X	X	X
Ovar	OVCAR-4	P 567 hom	X	X	X	X
Ovar	OVCAR-5	P 567 hom	X	X	X	X
Ovar	OVCAR-8	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Ovar	OC-2	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Knochenmark	K-562	P 567 hom	X	X	X	X
Knochenmark	HL-60 (TB)	P 567 hom	X	X	X	X
Haut	SK-MEL-28	P 567 hom	X	X	X	X
Haut	MEL-HO	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Haut	IGR-1	P 567 hom	X	X	X	X
Haut	A 431	P 567 hom	X	X	X	X
Haut	HACAT	P 567 hom	X	X	X	X
Haut	A-375	P 567 hom	X	X	X	X
Brust	ZR-75-I	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Brust	HBL-100	P 567 hom	X	X	X	X
Brust	BT 549	P 567 hom	X	X	X	X
Brust	HS-578T	P 567 hom	X	X	X	X
Brust	MCF 7	P 567 hom	X	X	X	X
Brust	MDA-MB-435	P 567 hom	X	X	X	X
Brust	MDA-NEO	P 567 hom	X	X	X	X

Organ	Zelllinien	PDGFR12	PDGFR18	c-KIT9	c-KIT11	c-KIT13
Lunge	NCI-H23	P 567 hom	X	X	X	X
Lunge	NCI-H226	P 567 hom	X	X	X	X
Lunge	NCI-H322M	P 567 hom	X	X	X	X
Lunge	NCI-H522	P 567 hom	X	X	X	X
Niere	CAKI-2	P 567 hom	X	X	X	X
Niere	293	P 567 hom	X	X	X	X
Niere	786-0	P 567 hom	X	X	X	X
Gehirn	T98G	P 567 hom	X	X	X	X
Gehirn	SNB-19	P 567 hom	X	X	X	X
Gehirn	GaMG	P 567 hom	X	X	X	X
Gehirn	DBTRG-05MG	P 567 hom	X	X	X	X
Gehirn	U-343MG	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Gehirn	172	P 567 hom	X	X	X	X
Knochen	SAOS-2	P 567 hom	X	X	X	X
Harnwege	ECV 304	P 567 hom	X	X	X	X
Harnwege	J-82	P 567 hom	X	X	X	X
Harnwege	SCABER	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Harnwege	5637	P 567 hom	X	X	X	X
Harnwege	TCC-SUP	P 567 hom	X	X	X	X
Harnwege	RT-II2	P 567 hom	X	X	X	X
Gebärmutter	HELA	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Schilddrüse	ONCO-DG-I	P 567 hom	X	X	X	X
Schilddrüse	CAL-62	P 567 hom	X	X	X	X
Schilddrüse	ML-1	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Schilddrüse	B-CPAP	P 567 hom	X	X	X	X
Schilddrüse	8505C	P 567 hom	V 824 hom	X	X	X
Mutation	Polymorphismus	X = keine Mutation		hom = homozygot het = heterozygot		

Tab. 9: Übersicht der gesamten Zelllinien für PDGFR- und KIT-Untersuchung

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 57 gebräuchliche Zelllinien von humanen Tumoren auf Mutationen von EGFR, KIT und PDGFR untersucht. Dabei vertreten die untersuchten Zelllinien viele verschiedene Gewebetypen, einschließlich Kolon, Leber, Ovar, Knochenmark, Haut, Brust, Lunge, Niere, Gehirn, Knochen, Harnwege, Gebärmutter und die Schilddrüse, um ein breit gefächertes Gewebespektrum abzudecken. Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, wurden lediglich in einer dieser Zelllinien gefunden. Dieses Ergebnis gibt somit keine Anhaltspunkte für ein generell gehäuftes Auftreten dieser therapielevanten Mutationen in Zelllinien.

Die einzige detektierte Mutation wurde in der 1976 etablierten Melanomzelllinie SK-Mel-28 gefunden (101). Dieselbe Mutation wurde auch von Ikediobi et al im Jahr 2006 beschrieben (102). Da es äußerst unwahrscheinlich ist, dass der von Ikediobi untersuchte Klon der Zelllinie nur rein zufällig im Laufe der letzten 30 Jahre dieselbe Mutation erfahren hat wie der Klon in der vorliegenden Arbeit, muss die Mutation bereits seit geraumer Zeit sehr wahrscheinlich sogar seit der Etablierung der Zelllinie vorhanden sein. In einer parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie wurde die Zelllinie SK-MEL-28 auch auf weitere Genveränderungen untersucht. Hier fand sich eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (L145R) (103). P53-Mutationen gelten als Verursacher für genetische Instabilität, da die Kontrolle über wichtige DNA-Reparaturmechanismen verloren gehen. Dass die EGFR-Mutation dennoch über die Jahrzehnte in der Zelllinie erhalten geblieben ist, lässt darauf schließen, dass sie eine besondere Rolle für die Zelllinie spielt und einen Selektionsvorteil darstellt. Daher wäre die Zelllinie SK-Mel-28 vermutlich sehr gut geeignet, um die Wirkung inhibitorischer Substanzen gegen den EGF-Rezeptor zu untersuchen. Von bedeutendem Interesse wäre es zu ermitteln, in welchem Maß solche EGFR-Mutationen auch klinisch in Melanomen relevant sind. Es ist bisher nur eine Studie bekannt, die 165 Melanome von Schwarzafrikanern auf EGFR-Mutationen untersucht hat. Dabei konnten allerdings keine Mutationen detektiert werden (104).

EGFR-Mutationen sind bisher nur von wenigen weiteren Zelllinien bekannt, die allerdings nicht in dem von mir untersuchten Zelllinien-Repertoire vorhanden waren. Allerdings wurde auch erst in jüngster Zeit (siehe Tabelle 10) mit der Suche nach EGFR-Mutationen begonnen, so dass zu erwarten ist, dass noch weitere Zelllinien mit Mutationen gefunden werden. Zu den bekanntesten zählen z.B. die Myelom-Zelllinie RPMI8226 (Typ T751I) (102) sowie einige NSCLC-Zelllinien, u.a. die Zelllinien NCI-H3255, NCI-H1975, PC-9, DFCILU-011, NCI-H1650 (105) (106). Eine Auflistung der Zelllinien mit ihren EGFR-Mutationen ist in Tabelle 10 zu finden.

Tumortyp	Zelllinie	EGFR-Mutation	Autor	Jahr	Quelle
Myelom	RPMI8226	Typ T751I	Ikediyobi	2006	(102)
NSCLC	PC-9	del E746_A750	Jackman	2006	(106)
NSCLC	DFCILU-011	del L747_E749	Jackman	2006	(106)
NSCLC	NCI-H1650	del E746-A750	Shimamura	2005	(105)
NSCLC	NCI-H3255	L858R	Shimamura	2005	(105)
NSCLC	NCI-H1975	L858R + T790M	Shimamura	2005	(105)

Tab. 10: Zelllinien mit EGFR-Mutation

Ebenso wie für die Melanomzelllinie SK-MEL-28 ist es unerwartet eine EGFR-Mutation in einer Myelom-Zelllinie zu finden, weil auch hier keine EGFR-Mutationen bekannt sind. EGFR-Mutationen sind heute vor allem in Lungenkarzinomen klinisch von Bedeutung, da nur Tumore mit aktivierenden Mutationen von Anti-EGFR-Therapien profitieren können (71). Nur ausnahmsweise sind EGFR-Mutationen auch in Nicht-Lungentumoren identifiziert worden. Dazu zählen z.B. SCCHN's (107) und Thymome (108). Hierbei handelt es sich wie bei den Lungentumoren um Mutationen in den Exons18-21, die zu einer permanenten Aktivierung des EGFR-Signalwegs führen. Die Therapie dieser Tumortypen mit EGFR-Inhibitoren wird zur Zeit in klinischen Studien bei SCCHN (Phase II/III-Studie) geprüft (109).

Die EGFR-Mutationen, die in Zelllinien gefunden werden, unterscheiden sich nicht wesentlich von denen in den Primärtumoren. So zählen die Exon19-Deletion mit 53% (18/34), die häufig die Region E746-A750 umfasst (110), sowie die Punktmutation L858R in EGFR21 mit 26% (9/34) zu den häufigsten EGFR-Mutationen in NSCLC-Patienten, wie es auch die Studie von Sequist et al bestätigt: Von 89 untersuchten NSCLC-Patienten weisen insgesamt 34 Patienten (35%) eine

EGFR-Mutation auf, wobei wiederum davon die Exon19-Deletion und die Punktmutation L858R zusammen etwa 79% ausmachen. Weitere häufige Mutationen in Primärtumoren sind: Exon20-Insertionen, T790M/L858R, G719A, und L861Q (111).

Diese Mutationen treten offensichtlich auch in Zelllinien auf, wie es aus Tabelle 10 ersichtlich ist. So wird z.B. die häufige Mutation L858R in der Zelllinie NCI-H3255 und auch in NCI-H1975 gefunden, wobei bei letzterer gleichzeitig eine T790M-Mutation vorliegt. Genauso sind in Zelllinien auch Deletionen bekannt, beispielsweise in PC-9 (del E746_A750), DFCILU-011 (del L747_E749) und NCI-H1650 (del E746-A750) (105) (106). Dies deutet darauf hin, dass EGFR-mutierte Zelllinien als Modellsysteme für Tumore genutzt werden können.

Mutationen im KIT- oder im PDGFR-Gen wurden in der vorliegenden Studie nicht detektiert. Die Daten bestätigen daher die Hypothese, dass diese Veränderungen exklusiv in gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) vorkommen. Zelllinien von GIST-Tumoren waren in dem untersuchten Zelllinien-Repertoire jedoch nicht vorhanden.

Zurzeit sind etwa neun Zelllinien von GIST bekannt. Alle (100%) diese Zelllinien enthalten auch tatsächlich Mutationen im KIT-Gen. Die Mutationen in diesen Zelllinien sind identisch mit denen, die auch in klinischen Tumoren gefunden werden. Dies ist im Falle der GIST-Zelllinien nahezu selbstverständlich, sind diese Zelllinien doch bewusst aus klinischen GIST-Tumoren hergestellt worden, um Modellsysteme zur Erforschung der Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren zu erhalten. So finden sich in den GIST-Zelllinien die typischen 'in-frame'-Deletionen und Punktmutationen in den Exons9 und 11, die auch in den klinischen Tumoren am häufigsten auftauchen (siehe dazu Tabelle 11).

Zudem können in den Zelllinien auch sekundäre Mutationen gefunden werden, die zur Resistenz gegen die Anti-KIT-Therapie führen. Diese Mutationen sind typischerweise erst unter der Therapie entstanden bzw. herausselektiert. So berichten z.B. Tamborini et al von einem Patienten mit fortgeschrittenem GIST, der

unter der Anti-KIT-Therapie eine Sekundärmutation ausbildete. Dabei handelt es sich um eine Substitution im KIT-Gen, Exon14 T670I (112).

Zelllinie	Primäre Mutation	Sekundäre Mutation	Autor	Jahr	Quelle
GIST430	Exon11 16-bd del. (560-576)	Exon13 V654A	Fletcher	2005	(113)
GIST48	Exon11 V560D	Exon17 D820A	Fletcher	2005	(113)
GIST62	Exon11 K552-558T		Fletcher	2005	(113)
GIST522	Exon11 4-bp del. (554-558)		Fletcher	2005	(113)
GIST882	Exon13 K642E		Fletcher	2005	(113)
GIST-KUL-1	Exon9 dupAY502-503		Fletcher	2005	(113)
GIST-KUL-2	Exon9 dupAY502-503	Exon13 V654A	Fletcher	2005	(113)
GIST-T1	Exon11 57-bp del.		Jin	2006	(114)

Tab. 11: Zelllinien mit KIT-Mutation

GIST-Zelllinien mit PDGFR-Mutationen sind nicht verfügbar. Dies mag vor allem daran liegen, dass PDGFR-Mutationen nur in etwa 7,1% (23/322) der GIST vorkommen (56). In Anbetracht der Seltenheit von GIST, nur etwa 800 bis 1.200 Neuerkrankungen pro Jahr in der BRD, also etwa 100 Mal seltener als Brust- oder Prostatakrebs, (115) und der Schwierigkeiten, erfolgreich Zelllinien zu generieren, nur etwa jeder zehnten bis 100sten Versuch ist erfolgreich, erstaunt das Fehlen von PDGFR-mutierten Zelllinien jedoch nicht.

Allerdings sind KIT-Mutationen auch in geringem Maße von anderen Tumortypen bekannt. Dazu zählen Melanome (116), Osteosarkome (‘Ewing Sarcome’) 2,6% (2/71) (117), und ein Thymuskarzinom mit einer missense-Mutation (L576P) im KIT-Gen in Exon11 (108). Von diesen drei Tumortypen waren jeweils sechs Melanomzelllinien und eine Osteosarkomzelllinie in dem von mir untersuchten Zelllinien-Repertoire vorhanden. Da in diesen Zelllinien keine KIT-Mutationen gefunden worden sind, ergeben sich auch hier keine Anhaltspunkte für eine unerwartete „unphysiologische“ Akkumulation von PDGFR-Mutationen in Zelllinien.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass Mutationen von EGFR, KIT und PDGFR selten in humanen Tumorzelllinien auftreten. Dies mag in erster Linie daran liegen, dass die Mutationen auch in klinischen Tumoren selten sind und Zelllinien letztendlich aus den klinischen Tumoren generiert worden sind. Wenn Mutationen

in den Zelllinien vorliegen, handelt es sich daher auch um dieselben, die typischerweise auch in den klinischen Tumoren gefunden werden.

Ebenso spiegelt die Häufigkeit der EGFR-Mutationen in den verschiedenen Zelllinientypen bzw. Ursprungsgeweben der Zelllinien die Prävalenz in den klinischen Tumoren wieder. So werden EGFR-Mutationen vor allem in Zelllinien von Lungentumoren gefunden, Tumortypen, die auch klinisch EGFR-Mutationen aufweisen können (27) (105) (106) (118) (119).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in 56 von 57 Zelllinien das Vorliegen von EGFR-, KIT- und PDGFR-Mutationen mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Anhaltspunkte für eine künstliche Anhäufung von Mutationen ergeben sich somit in dieser Studie nicht.

5. Zusammenfassung

Zelllinienexperimente stellen eine wichtige Basis für (Tumor-)zellbiologische Experimente dar. Allerdings wird häufig vermutet, dass viele Zelllinien sich durch die fortgesetzte Kultivierung in einem „körperfremden“ Medium bereits weit von den ursprünglichen Eigenschaften des Gewebes entfernt haben und daher nicht mehr uneingeschränkt repräsentativ für die Biologie des Ursprungsgewebes sind.

Mutationen bestimmter Gene werden praktisch nur in einigen wenigen klinischen Tumoren gefunden. Dazu zählen EGFR-Mutationen (epidermal growth factor receptor) bei nicht-kleinzelligen Lungentumoren, sowie PDGFR-Mutationen (platelet derived growth factor receptor) und KIT-Mutationen (kitten) bei gastrointastinalen Stromatumoren (GIST). Das Vorliegen dieser Mutationen kann somit als ein Maß für die „Ursprünglichkeit“ einer Zelllinie hinsichtlich des Ausgangsgewebes angesehen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Mutationen der Tyrosinkinase-Rezeptoren EGFR, KIT und PDGFR von 57 humanen Zelllinien aus verschiedenen Ursprungsgeweben aufzunehmen. Dazu wurde DNA aus Zelllinien isoliert und mit spezifischen Primersets für die Exons 18, 19, 20, 21 (EGFR), 9, 11, 13 (KIT) und 12, 18 (PDGFR) sequenziert.

Es zeigte sich, dass kaum unerwartete Mutationen der untersuchten Gene in Zelllinien untypischer Ursprungsgewebe gefunden wurden. Dabei konnte in nur einer Zelllinie, der Melanom-Zelllinie SK-MEL-28, eine aktivierende homozygote Mutation P753S im Exon 19 detektiert werden. Für alle anderen Zelllinien wurden Wildtyp-Sequenzen bestimmt.

Diese Studie zeigt daher nicht nur, dass Mutationen von aktuellen Therapiezielgenen wie EGFR, PDGFR und KIT selten in humanen Zelllinien auftreten, sondern identifiziert gleichzeitig 56 Zelllinien mit EGFR-, KIT- und PDGFR-Wildtyp-Status. Diese Zelllinien könnten z.B. genutzt werden, um die Wirkung von Anti-EGFR- oder Anti-KIT-Medikamenten in Tumoren ohne aktivierende Mutationen zu testen.

Verzeichnisse

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cell mediated cytotoxicity
AT	Adenin, Thymin
ATP	Adenintriphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
c-KIT	cellular KIT, zelluläres KIT
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMA	European Medicines Agency
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
GC	Guanin, Cytosin
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GRB2	growth factor receptor bound protein2
GTP	Guanintriphosphat
HB-EGF	Heparin bindender EGF-ähnlicher Faktor
HER	human epidermal growth factor receptor
HPLC	high performance liquid chromatography
HRG	Heregulin
Hz	Hertz
HZ4	Hardy-Zuckerman4
ICC	interstitial cajal cells, interstitielle Cajal-Zellen

Verzeichnisse

JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KIT	kitten, Kätzchen
K-RAS	Kirsten rat sarcoma
M	Molar
MAPK	mitogen activated proteinkinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid, messenger-Ribonukleinsäure
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
NaAC	Natriumacetat
NRG	Neuregulin
ng	Nanogramm
NSCLC	non small cell lung cancer nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
pH	Potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol 3 ^l -Kinase
PIP3	Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat
PKB	Proteinkinase B
pmol	picomolar
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAS	rat sarcoma

Verzeichnisse

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SCCHN	squamous cell carcinoma of head and neck sqamöses Zellkarzinom des Kopfes und Halses
SCF	stem cell factor
SCFR	stem cell factor receptor
sec	Sekunde
SOS	son of sevenless
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
Temp.	Temperatur
TGF	transforming growth factor
TK	Tyrosinkinase
TKR	Tyrosinkinase-Rezeptoren
T _m	melting temperature
TNM-Klassifikation	von der International Union Against Cancer (UICC) festgelegte Tumorstadieneinteilung nach der klinisch und histopathologisch bestimmten anatomischen Ausdehnung eines Tumors aufgrund folgender Kriterien: Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T), Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen (N) und Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen (M)
TTP	Thymintriphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

III. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Modell der EGFR-abhängigen Signaltransduktion: Liganden-induzierte Dimerisierung führt über Autophosphorylierung zur Aktivierung des EGFR. Über die Adaptorproteine GRB2 und SOS und das GTP-bindende Protein RAS wird die MAPK-Kaskade aktiviert. Die PI3K-PKB/AKT-Kaskade stellt einen zweiten Hauptsignalweg dar. Durch Aktivierung der PI3K und Bildung von Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PIP3) wird PKB/AKT an die Zellmembran rekrutiert und phosphoryliert. PKB/AKT moduliert dann die Aktivität einer Vielzahl von Proteinen (10)..... 4

Abb. 2: EGF-Rezeptoren 1-4: Übersicht über HER, die weiteren gebräuchlichen Bezeichnungen für diese Rezeptoren und die Liganden, die an diese Rezeptoren binden. Besonderheit bei HER3: Tyrosinkinase-Domäne funktioniert nicht. Bedeutung der Abkürzungen: EGF: epidermal growth factor, TGF- α : transforming growth factor- α , HB-EGF: Heparin bindender EGF-ähnlicher Faktor, NRG: Neuregulin, eine Klasse von EGF-ähnlichen Liganden, die primär an HER3 und HER4 binden. Vier Typen, NRG1- NRG4, sind bekannt (14)..... 5

Abb. 3: Rezeptordimerisation nach Ligandenbindung (26)..... 6

Abb. 4: Grundsätzlicher Aufbau des KIT- und PDGFR-A-Rezeptors 8

Abb. 5: KIT-Pathway: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktionswege. Die Aktivierung des KIT-Rezeptors erfolgt durch Bindung des dimeren Stammzellsfaktors mit der Folge der Homodimerisation von zwei KIT-Molekülen. Mit den einhergehenden Konformitätsänderungen des KIT-Rezeptors kommt es dann zu einer Aktivierung der KIT-Kinase-Domäne, so dass intrazellulär Phosphorylierungen ablaufen, die ihrerseits wiederum dazu beitragen, dass intrazellulär verschiedene Signalproteine, wie z.B. das PI3K, am KIT-Rezeptor binden können und somit die verschiedenen Signalkaskaden in Richtung Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung einleiten können..... 10

Abb. 6: KIT-Rezeptor mit seinen häufigsten Mutationen (26) 12

Abb. 7: Wirkungsweise von Iressa: Hemmung der Proliferation (Zellvermehrung), Hemmung der Angiogenese (Ausbildung von Blutgefäßen, um dem Tumor das Wachstum zu ermöglichen), Hemmung der Metastasierung (Ausbreitung des Tumors in andere Körpergewebe, Organe), Förderung der Apoptose (programmierter (normaler) Zelltod) (82) 18

Abb. 8: Wirkungsweise von Tarceva: Tarceva hemmt die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasebereiche und kann daher jede Art der hier gezeigten HER1-Aktivierung auslöschen (86)..... 19

Abb. 9: Beispiele einer PCR-Produkt-Analyse: Mit einem Elektrophoresegel für EGFR, KIT und PDGFR..... 32

Abb. 10: Sequenzausschnitt: SK-Mel-28 EGFR19 forward P753S Codon 753 CCG mutiert zu TCG 43

Abb. 11: Sequenzausschnitt: SK-Mel-28 EGFR19 reverse P753S..... 43

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Zelllinien	25
Tab. 2: Ansatzreihe für verwendete PCR-Ansätze	29
Tab. 3: PCR-Programme	29
Tab. 4: Verwendete PCR-Primer	31
Tab. 5: Referenzsequenz-Identifikationsnummern	36
Tab. 6: Codontabelle zur Darstellung der zugehörigen Aminosäuren	37
Tab. 7: DNA-Konzentrationen der Zelllinien-Extrakte	41
Tab. 8: Übersicht der gesamten Zelllinien für EGFR-Untersuchung	43
Tab. 9: Übersicht der gesamten Zelllinien für PDGFR- und KIT-Untersuchung	45
Tab. 10: Zelllinien mit EGFR-Mutation	47
Tab. 11: Zelllinien mit KIT-Mutation.....	49

V. Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
2. Horn, F., Lindenmeier, G., Moc, I., Grillhösl, C., Berghold, S., Schneider, N., and Münster, B. *Biochemie des Menschen*, 1st edition, p. 307-314. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag, 2002.
3. Löffler, G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 4th edition, p. 359-363; p.681-689. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio: Springer Verlag, 2001.
4. Loeb, L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*, 51: 3075-3079, 1991.
5. Hartwell, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 71: 543-546, 1992.
6. Orr-Weaver, T. L. and Weinberg, R. A. A checkpoint on the road to cancer. *Nature*, 392: 223-224, 1998.
7. Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., and Hartwell, L. H. When checkpoints fail. *Cell*, 88: 315-321, 1997.
8. Bertram, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*, 21: 167-223, 2000.
9. Giehl, K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem*, 386: 193-205, 2005.
10. Schlessinger, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 110: 669-672, 2002.
11. Zhang, B., Halder, S. K., Zhang, S., and Datta, P. K. Targeting transforming growth factor-beta signaling in liver metastasis of colon cancer. *Cancer Lett*, 2009.

12. Wu, C. C., Hsu, H. Y., Liu, H. P., Chang, J. W., Chen, Y. T., Hsieh, W. Y., Hsieh, J. J., Hsieh, M. S., Chen, Y. R., and Huang, S. F. Reversed mutation rates of KRAS and EGFR genes in adenocarcinoma of the lung in Taiwan and their implications. *Cancer*, 113: 3199-3208, 2008.
13. Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 875-885, 2004.
14. Wagener, C. *Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1999.
15. Chrysogelos, S. A. and Dickson, R. B. EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 29: 29-40, 1994.
16. Alimandi, M., Romano, A., Curia, M. C., Muraro, R., Fedi, P., Aaronson, S. A., Di Fiore, P. P., and Kraus, M. H. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene*, 10: 1813-1821, 1995.
17. Gamett, D. C., Greene, T., Wagreich, A. R., Kim, H. H., Koland, J. G., and Cerione, R. A. Heregulin-stimulated signaling in rat pheochromocytoma cells. Evidence for ErbB3 interactions with Neu/ErbB2 and p85. *J Biol Chem*, 270: 19022-19027, 1995.
18. Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A., and Carraway, K. L., 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 8132-8136, 1994.
19. Riese, D. J., 2nd and Stern, D. F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*, 20: 41-48, 1998.
20. Segatto, O., Lonardo, F., Wexler, D., Fazioli, F., Pierce, J. H., Bottaro, D. P., White, M. F., and Di Fiore, P. P. The juxtamembrane regions of the epidermal growth factor receptor and gp185erbB-2 determine the specificity of signal transduction. *Mol Cell Biol*, 11: 3191-3202, 1991.

21. Zhang, K., Sun, J., Liu, N., Wen, D., Chang, D., Thomason, A., and Yoshinaga, S. K. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem*, 271: 3884-3890, 1996.
22. Earp, H. S., Dawson, T. L., Li, X., and Yu, H. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat*, 35: 115-132, 1995.
23. Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J*, 16: 1647-1655, 1997.
24. Gulliford, T. J., Huang, G. C., Ouyang, X., and Epstein, R. J. Reduced ability of transforming growth factor-alpha to induce EGF receptor heterodimerization and downregulation suggests a mechanism of oncogenic synergy with ErbB2. *Oncogene*, 15: 2219-2223, 1997.
25. Qian, X., LeVea, C. M., Freeman, J. K., Dougall, W. C., and Greene, M. I. Heterodimerization of epidermal growth factor receptor and wild-type or kinase-deficient Neu: a mechanism of interreceptor kinase activation and transphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1500-1504, 1994.
26. Weinberg, R. A. *The biology of cancer*, p. 137, 141. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis, 2007.
27. von Eyben, F. E. Epidermal growth factor receptor inhibition and non-small cell lung cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 43: 291-323, 2006.
28. Duchnowska, R. and Szczylik, C. Central nervous system metastases in breast cancer patients administered trastuzumab. *Cancer Treat Rev*, 31: 312-318, 2005.
29. Hoff, E. R., Tubbs, R. R., Myles, J. L., and Procop, G. W. HER2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade. *Am J Clin Pathol*, 117: 916-921, 2002.

30. Kim, M. A., Jung, E. J., Lee, H. S., Lee, H. E., Jeon, Y. K., Yang, H. K., and Kim, W. H. Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Hum Pathol*, 38: 1386-1393, 2007.
31. Broudy, V. C. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, 90: 1345-1364, 1997.
32. Reilly, J. T. Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol*, 116: 744-757, 2002.
33. Roskoski, R., Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 337: 1-13, 2005.
34. Besmer, P., Murphy, J. E., George, P. C., Qiu, F. H., Bergold, P. J., Lederman, L., Snyder, H. W., Jr., Brodeur, D., Zuckerman, E. E., and Hardy, W. D. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, 320: 415-421, 1986.
35. Jost, D., Stroszczyński, C., Chmelik, P., Gaffke, G., Schlecht, I., Pink, D., Reichardt, P., Schneider, U., Hohenberger, P., and Felix, R. [Morphology of gastrointestinal stromal tumors in advanced stages of the disease: baseline findings before chemotherapy with imatinib]. *Rofo*, 175: 791-798, 2003.
36. Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., and Ullrich, A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J*, 6: 3341-3351, 1987.
37. d'Auriol, L., Mattei, M. G., Andre, C., and Galibert, F. Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4. *Hum Genet*, 78: 374-376, 1988.
38. Vliagoftis, H., Worobec, A. S., and Metcalfe, D. D. The protooncogene c-kit and c-kit ligand in human disease. *J Allergy Clin Immunol*, 100: 435-440, 1997.

39. Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C. J., Park, L. S., Martin, U., Mochizuki, D. Y., Boswell, H. S., and et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell*, 63: 167-174, 1990.
40. Witte, O. N. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell*, 63: 5-6, 1990.
41. Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., and Shivakrupa, R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells*, 23: 16-43, 2005.
42. Lev, S., Blechman, J., Nishikawa, S., Givol, D., and Yarden, Y. Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor. *Mol Cell Biol*, 13: 2224-2234, 1993.
43. Blechman, J. M., Lev, S., Barg, J., Eisenstein, M., Vaks, B., Vogel, Z., Givol, D., and Yarden, Y. The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell*, 80: 103-113, 1995.
44. Blechman, J. M., Lev, S., Brizzi, M. F., Leitner, O., Pegoraro, L., Givol, D., and Yarden, Y. Soluble c-kit proteins and antireceptor monoclonal antibodies confine the binding site of the stem cell factor. *J Biol Chem*, 268: 4399-4406, 1993.
45. Zhang, Z., Zhang, R., Joachimiak, A., Schlessinger, J., and Kong, X. P. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 7732-7737, 2000.
46. Kitamura, Y. and Hirotab, S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci*, 61: 2924-2931, 2004.
47. Linnekin, D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 31: 1053-1074, 1999.

48. Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T., Nakauchi, H., and Nishikawa, S. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med*, 174: 63-71, 1991.
49. Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Miura, Y., and Suda, T. Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood*, 78: 1706-1712, 1991.
50. Wehrle-Haller, B. The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res*, 16: 287-296, 2003.
51. Ronnstrand, L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci*, 61: 2535-2548, 2004.
52. Akin, C. and Metcalfe, D. D. The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol*, 114: 13-19; quiz 20, 2004.
53. Miettinen, M. and Lasota, J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 13: 205-220, 2005.
54. Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., and Lasota, J. KIT expression in angiosarcomas and fetal endothelial cells: lack of mutations of exon 11 and exon 17 of C-kit. *Mod Pathol*, 13: 536-541, 2000.
55. Hohenberger, P. and Wardelmann, E. [Surgical considerations for gastrointestinal stroma tumor]. *Chirurg*, 77: 33-40, 2006.
56. Corless, C. L., Fletcher, J. A., and Heinrich, M. C. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*, 22: 3813-3825, 2004.
57. Wardelmann, E., Pauls, K., Merkelbach-Bruse, S., Hrychyk, A., Losen, I., Hohenberger, P., Buttner, R., and Pietsch, T. [Gastrointestinal stromal tumors carrying PDGFRalpha mutations occur preferentially in the stomach and exhibit an epithelioid or mixed phenotype]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 88: 174-183, 2004.

58. Wardelmann, E., Schildhaus, H. U., Merkelbach-Bruse, S., and Buttner, R. [Therapeutic targets in gastrointestinal stromal tumors]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 90: 73-79, 2006.
59. Claesson-Welsh, L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem*, 269: 32023-32026, 1994.
60. Bishayee, S., Majumdar, S., Khire, J., and Das, M. Ligand-induced dimerization of the platelet-derived growth factor receptor. Monomer-dimer interconversion occurs independent of receptor phosphorylation. *J Biol Chem*, 264: 11699-11705, 1989.
61. Kohler, N. and Lipton, A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res*, 87: 297-301, 1974.
62. Yu, J., Ustach, C., and Kim, H. R. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol*, 36: 49-59, 2003.
63. Fredriksson, L., Li, H., and Eriksson, U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15: 197-204, 2004.
64. Jones, A. V. and Cross, N. C. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci*, 61: 2912-2923, 2004.
65. Heldin, C. H., Ostman, A., and Ronnstrand, L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1378: F79-113, 1998.
66. Hirota, S., Ohashi, A., Nishida, T., Isozaki, K., Kinoshita, K., Shinomura, Y., and Kitamura, Y. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology*, 125: 660-667, 2003.
67. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C. J., Joseph, N., Singer, S., Griffith, D. J., Haley, A., Town, A., Demetri, G. D., Fletcher, C. D., and Fletcher, J. A. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 299: 708-710, 2003.

68. Heinrich, M. C., Corless, C. L., Demetri, G. D., Blanke, C. D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L. S., Chen, C. J., Van den Abbeele, A. D., Druker, B. J., Kiese, B., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Singer, S., Fletcher, C. D., Silberman, S., Dimitrijevic, S., and Fletcher, J. A. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*, 21: 4342-4349, 2003.
69. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3: 11-22, 2003.
70. Schreck, R. and Rapp, U. R. Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer*, 119: 2261-2271, 2006.
71. Bonomi, P. D., Buckingham, L., and Coon, J. Selecting patients for treatment with epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*, 13: s4606-4612, 2007.
72. Lebeau, A. [Herceptin therapy in breast cancer: new indication?]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 90: 99-106, 2006.
73. Lin, A. and Rugo, H. S. The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations. *Curr Treat Options Oncol*, 8: 47-60, 2007.
74. Crowder, R. J., Lombardi, D. P., and Ellis, M. J. Successful targeting of ErbB2 receptors-is PTEN the key? *Cancer Cell*, 6: 103-104, 2004.
75. Yeon, C. H. and Pegram, M. D. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs*, 23: 391-409, 2005.
76. McKeage, K. and Perry, C. M. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs*, 62: 209-243, 2002.

77. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, M., Santini, D., and Tonini, G. The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008.
78. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., and Van Cutsem, E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 351: 337-345, 2004.
79. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55: 74-108, 2005.
80. Mahtani, R. L. and Macdonald, J. S. Synergy between cetuximab and chemotherapy in tumors of the gastrointestinal tract. *Oncologist*, 13: 39-50, 2008.
81. Herbst, R. S., Maddox, A. M., Rothenberg, M. L., Small, E. J., Rubin, E. H., Baselga, J., Rojo, F., Hong, W. K., Swaisland, H., Averbuch, S. D., Ochs, J., and LoRusso, P. M. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol*, 20: 3815-3825, 2002.
82. AstraZeneca Backgrounder Iressa (Gefitinib, ZD1839). AstraZeneca, 2008.
83. Lind, J. S., Herder, G. J., and Smit, E. F. [New therapies for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: inhibitors of the epidermal growth factor receptor and angiogenesis]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 152: 928-932, 2008.
84. Shepherd, F. A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E. H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., van Kooten, M., Dediu, M., Findlay, B., Tu, D., Johnston, D., Bezjak, A., Clark, G., Santabarbara, P., and Seymour, L. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 353: 123-132, 2005.

85. Ostoros, G. and Dome, B. [Erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer]. *Magy Onkol*, 50: 237-241, 2006.
86. Penzberg Die Signalübertragung in Krebszellen blockieren. Roche, 2002.
87. Siddiqui, M. A. and Scott, L. J. Imatinib: a review of its use in the management of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs*, 67: 805-820, 2007.
88. Nakajima, M. and Toga, W. Tyrosine kinase inhibitor as a therapeutic drug for chronic myelogenous leukemia and gastrointestinal stromal tumor. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 122: 482-490, 2003.
89. Dirnhofer, S., Zimpfer, A., and Went, P. [The diagnostic and predictive role of kit (CD117)]. *Ther Umsch*, 63: 273-278, 2006.
90. Hornick, J. L. and Fletcher, C. D. The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol*, 38: 679-687, 2007.
91. Croom, K. F. and Perry, C. M. Imatinib mesylate: in the treatment of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs*, 63: 513-522; discussion 523-514, 2003.
92. O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J. J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Saglio, G., Shepherd, J., Simonsson, B., Gratwohl, A., Goldman, J. M., Kantarjian, H., Taylor, K., Verhoef, G., Bolton, A. E., Capdeville, R., and Druker, B. J. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 348: 994-1004, 2003.
93. Siehl, J. and Thiel, E. C-kit, GIST, and imatinib. *Recent Results Cancer Res*, 176: 145-151, 2007.
94. Sleijfer, S., Wiemer, E., Seynaeve, C., and Verweij, J. Improved insight into resistance mechanisms to imatinib in gastrointestinal stromal tumors: a basis

- for novel approaches and individualization of treatment. *Oncologist*, 12: 719-726, 2007.
95. Sleijfer, S., Wiemer, E., and Verweij, J. Drug Insight: gastrointestinal stromal tumors (GIST)--the solid tumor model for cancer-specific treatment. *Nat Clin Pract Oncol*, 5: 102-111, 2008.
96. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur*, 1st edition. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
97. Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 5th edition, p. 122-137. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
98. Lottspeich, F. and Engels, J. W. H. *Bioanalytik*, 2nd edition, p. 638; p.787. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
99. Mülhardt, C. *Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 3rd edition, p. 72. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
100. Schrimpf, G. H. *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 3rd edition, p. 72-73; p.148-151. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
101. Carey, T. E., Takahashi, T., Resnick, L. A., Oettgen, H. F., and Old, L. J. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 3278-3282, 1976.
102. Ikediobi, O. N., Davies, H., Bignell, G., Edkins, S., Stevens, C., O'Meara, S., Santarius, T., Avis, T., Barthorpe, S., Brackenbury, L., Buck, G., Butler, A., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Hunter, C., Jenkinson, A., Jones, D., Kosmidou, V., Lugg, R., Menzies, A., Mironenko, T., Parker, A., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Smith, R., Solomon, H., Stephens, P., Teague, J., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Reinhold, W., Weinstein, J.

- N., Stratton, M. R., Futreal, P. A., and Wooster, R. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther*, 5: 2606-2612, 2006.
103. Baumann, S. Mutationsanalyse von p53, HRAS und KRAS in humanen Zelllinien. 2009.
104. Akslen, L. A., Puntervoll, H., Bachmann, I. M., Straume, O., Vuhahula, E., Kumar, R., and Molven, A. Mutation analysis of the EGFR-NRAS-BRAF pathway in melanomas from black Africans and other subgroups of cutaneous melanoma. *Melanoma Res*, 18: 29-35, 2008.
105. Shimamura, T., Lowell, A. M., Engelman, J. A., and Shapiro, G. I. Epidermal growth factor receptors harboring kinase domain mutations associate with the heat shock protein 90 chaperone and are destabilized following exposure to geldanamycins. *Cancer Res*, 65: 6401-6408, 2005.
106. Jackman, D. M., Yeap, B. Y., Sequist, L. V., Lindeman, N., Holmes, A. J., Joshi, V. A., Bell, D. W., Huberman, M. S., Halmos, B., Rabin, M. S., Haber, D. A., Lynch, T. J., Meyerson, M., Johnson, B. E., and Janne, P. A. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*, 12: 3908-3914, 2006.
107. Schwentner, I., Witsch-Baumgartner, M., Sprinzl, G. M., Krugmann, J., Tzankov, A., Jank, S., Zwierzina, H., and Loeffler-Ragg, J. Identification of the rare EGFR mutation p.G796S as somatic and germline mutation in white patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 30: 1040-1044, 2008.
108. Yoh, K., Nishiwaki, Y., Ishii, G., Goto, K., Kubota, K., Ohmatsu, H., Niho, S., Nagai, K., and Saijo, N. Mutational status of EGFR and KIT in thymoma and thymic carcinoma. *Lung Cancer*, 2008.

109. Vokes, E. E. and Chu, E. Anti-EGFR therapies: clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers. *Oncology (Williston Park)*, 20: 15-25, 2006.
110. Uramoto, H., Uchiumi, T., Izumi, H., Kohno, K., Oyama, T., Sugio, K., and Yasumoto, K. A new mechanism for primary resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma: the role of a novel G796A mutation in exon 20 of EGFR. *Anticancer Res*, 27: 2297-2303, 2007.
111. Sequist, L. V., Martins, R. G., Spigel, D., Grunberg, S. M., Spira, A., Janne, P. A., Joshi, V. A., McCollum, D., Evans, T. L., Muzikansky, A., Kuhlmann, G. L., Han, M., Goldberg, J. S., Settleman, J., Iafrate, A. J., Engelman, J. A., Haber, D. A., Johnson, B. E., and Lynch, T. J. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol*, 26: 2442-2449, 2008.
112. Tamborini, E., Bonadiman, L., Greco, A., Albertini, V., Negri, T., Gronchi, A., Bertulli, R., Colecchia, M., Casali, P. G., Pierotti, M. A., and Pilotti, S. A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology*, 127: 294-299, 2004.
113. Fletcher, J. Group Leader Plan of Action for Priority Project H: Resource Development. Life Raft Group, 2005/12/21.
114. Jin, T., Nakatani, H., Taguchi, T., Nakano, T., Okabayashi, T., Sugimoto, T., Kobayashi, M., and Araki, K. STI571 (Glivec) suppresses the expression of vascular endothelial growth factor in the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1. *World J Gastroenterol*, 12: 703-708, 2006.
115. Groh, J. GIST - Ein seltener Tumor. *Lifeline*, 2008/07/16.
116. Hodi, F. S., Friedlander, P., Corless, C. L., Heinrich, M. C., Mac Rae, S., Kruse, A., Jagannathan, J., Van den Abbeele, A. D., Velazquez, E. F., Demetri, G. D., and Fisher, D. E. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol*, 26: 2046-2051, 2008.

117. Do, I., Araujo, E. S., Kalil, R. K., Bacchini, P., Bertoni, F., Unni, K. K., and Park, Y. K. Protein expression of KIT and gene mutation of c-kit and PDGFRs in Ewing sarcomas. *Pathol Res Pract*, 203: 127-134, 2007.
118. Ruhe, J. E., Streit, S., Hart, S., Wong, C. H., Specht, K., Knyazev, P., Knyazeva, T., Tay, L. S., Loo, H. L., Foo, P., Wong, W., Pok, S., Lim, S. J., Ong, H., Luo, M., Ho, H. K., Peng, K., Lee, T. C., Bezler, M., Mann, C., Gaertner, S., Hoefler, H., Iacobelli, S., Peter, S., Tay, A., Brenner, S., Venkatesh, B., and Ullrich, A. Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer Res*, 67: 11368-11376, 2007.
119. Zhang, X., Nagahara, H., Mimori, K., Inoue, H., Sawada, T., Ohira, M., Hirakawa, K., and Mori, M. Mutations of epidermal growth factor receptor in colon cancer indicate susceptibility or resistance to gefitinib. *Oncol Rep*, 19: 1541-1544, 2008.

VI. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Claudia Dammenhayn
Geboren am: 22.05.1982
Geburtsort: Plauen (Vogtland)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1988-1989 Polytechnische Oberschule "Ernst Schneller" Schwerin
1989-1992 Grundschule Neu Wulmstorf
1992-1997 Gymnasium Neu Wulmstorf
1997-2001 Städtisches Gymnasium Bad Segeberg
2001 Schulabschluss: Abitur

Hochschulausbildung:

2001 Beginn des Studiums der Zahnmedizin
an der Universität Hamburg
2002 Zahnmedizinisches Vorphysikum
2004 Zahnmedizinisches Physikum
2007 Zahnmedizinisches Staatsexamen

Berufsausübung:

2007-2009 Assistenz Zahnärztin in Osten (Niedersachsen)
ab August 2009 Niedergelassene Zahnärztin in Achim (Niedersachsen)

VII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Ausführung unterstützt haben. Ich danke Prof. Dr. Guido Sauter und besonders PD Dr. Ronald Simon, der mich sowohl im praktischen Teil als auch beim Erarbeiten der Dissertation im theoretischen Teil sehr gut unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich dem ganzen Laborteam, besonders Gaby und Agatha, für die nette Atmosphäre, die unkomplizierte Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danken, und dass sie mich im praktischen Teil bei der Erörterung von Problemen tatkräftig unterstützt und mir die Geräte zur Verfügung gestellt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre moralische Unterstützung und die Förderung meines Studiums, sowie meinem Bruder Andreas und seiner Freundin Jenny für ihre Unterstützung. Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Freund Sascha bedanken, der mir mit viel Verständnis, Geduld und Humor die Motivation und Kraft gibt viele Dinge im Leben zu meistern.

VIII. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: _____

(Claudia Dammenhayn)