

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik II (Hämatologie und Onkologie)
mit den Sektionen Pneumologie und Knochenmarktransplantation
Hubertus Wald Tumorzentrum
Universitäres Cancer Center Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Mutationsanalysen des VEGF-Rezeptors 2 und des FLT3-Rezeptors bei verschiedenen Tumorentitäten

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jan Ralph Pfränger
aus Werneck

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 12.01.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. W. Fiedler

Prüfungsausschuss: 2. Gutachterin: Prof. Dr. S. Harendza

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. G. Schuch

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	1
II Tabellenverzeichnis.....	1
III Abbildungsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Proteintyrosinkinasen.....	4
1.1.1 Die Familie der Rezeptortyrosinkinasen	4
1.1.2 Aktivierungsmechanismus und physiologische Funktion von RTKs.....	6
1.1.3 Die Rolle von RTKs in der Pathogenese und Therapie von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen.....	8
1.1.4 Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren	9
1.1.5 Der FLT3-Rezeptor (FMS-like tyrosine kinase 3).....	11
1.2 Die Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib und SU14813.....	12
1.2.1 Angriffspunkte und Wirkungsmechanismus.....	13
1.2.2 Pharmakokinetik und Nebenwirkungen	14
1.2.3 Auswirkungen genetischer Veränderungen auf den Therapieerfolg ...	14
1.3 Studie SU14813.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2 Kits, Chemikalien und Software	18
2.1.3 Patientenkollektiv der SU14813 Studie	18
2.1.4 Beurteilung der Tumorproben	21
2.1.5 Kolonkarzinomproben.....	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten	22
2.2.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	23
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion [Polymerase Chain Reaction (PCR)]	25
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.5 Reinigung der PCR-Produkte	29
2.2.6 DNA-Sequenzierung	30
3 Ergebnisse	32
3.1 VEGF-Rezeptor 2 Exon 15	35
3.2 VEGF-Rezeptor 2 Exon 16	37
3.3 VEGF-Rezeptor 2 Exon 21	38
3.4 VEGF-Rezeptor 2 Exon 23	40
3.5 VEGF-Rezeptor 2 Exon 24	40
3.6 VEGF-Rezeptor 2 Exon 26	41
3.7 FLT3-Rezeptor Mutation D835.....	42
3.8 FLT3-Rezeptor interne Tandemduplikation	43
4 Diskussion	46
5 Zusammenfassung	52
6 Literaturverzeichnis	53
7 Danksagung.....	57
8 Lebenslauf.....	58
9 Eidesstattliche Erklärung.....	59

II Tabellenverzeichnis

- Tab.1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien
- Tab.2: Verwendete Kits und Chemikalien
- Tab.3: Verwendete Software
- Tab.4: Eastern Cooperative Oncology Group performance status nach Oken
- Tab.5: Charakteristika der untersuchten Studienproben
- Tab.6: DNA-Konzentrationen der extrahierten Proben
- Tab.7: Charakteristika der Primer
- Tab.8: Standard PCR Ansatz
- Tab.9: Sigma REDTaq ReadyMix Bestandteile
- Tab.10: Thermocycler Protokoll
- Tab.11: pTNM Klassifikation der Kolonkarzinome
- Tab.12: Charakteristika der Kolonkarzinomproben

III Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Subfamilien der Rezeptortyrosinkinasen
- Abb.2: Aktivierungsmechanismus der Rezeptortyrosinkinasen
- Abb.3: Schema der Dimerisierung und Signalkaskade von Rezeptortyrosinkinasen
- Abb.4: Strukturformeln von Sunitinib-malat und SU14813-malat
- Abb.5: Basensequenz Wildtyp Exon 15
- Abb.6: Basensequenz Probe P21 Exon 15
- Abb.7: Basensequenz Wildtyp Exon 16
- Abb.8: Basensequenz Wildtyp Exon 21 Position 3219
- Abb.9: Basensequenz Wildtyp Exon 21 Position 3253
- Abb.10: Basensequenz Probe P2 Exon 21
- Abb.11: Basensequenz Wildtyp Exon 24
- Abb.12: Basensequenz Wildtyp Exon 26
- Abb.13: Basensequenz Wildtyp FLT3-Mutation D835
- Abb.14: Beispielhafte Gelelektrophorese
- Abb.15: Agarose-Gelelektrophorese der Proben P1-P30
- Abb.16: Agarose-Gelelektrophorese der Proben E1-13

1 Einleitung

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), wie der Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor (VEGFR), der Platelet-Derived Growth Factor-Rezeptor (PDGFR) und die FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3), vermitteln in einer Vielzahl von Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Wachstum, Differenzierung und Überleben (Ullrich and Schlessinger 1990; Blume-Jensen and Hunter 2001). Diese RTKs werden auch in Tumorzellen exprimiert und treiben dort, vor allem durch Überexpression und aktivierende Mutationen, Tumorwachstum und Metastasierung voran (Hanahan and Weinberg 2000; Blume-Jensen and Hunter 2001). Deshalb bietet die Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen in der heutigen Hämatologie und Onkologie vielversprechende Therapieansätze (Patyna, Laird et al. 2006). Wurden anfänglich nur verhältnismäßig seltene Neoplasien, wie beispielsweise die chronischen myeloischen Leukämien oder die gastrointestinalen Stromatumoren mit Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren behandelt, so sind diese Therapiemöglichkeiten mittlerweile auch in der Behandlung häufiger Neubildungen, wie dem Kolonkarzinom oder dem Bronchialkarzinom, angelangt (Querings, Altmüller et al. 2011).

Momentan sind viele Rezeptortyrosinkinasen hemmende Wirkstoffe zugelassen und viele weitere befinden sich in klinischen Studien. Ein weiteres Medikament, das therapeutisch eingesetzt wird, ist Sunitinib. Es blockiert diverse Rezeptortyrosinkinasen wie die VEGF- und Platelet-Derived Growth Factor-Rezeptoren (PDGFR) (Faivre, Demetri et al. 2007).

SU14813 ist ein Nachfolgepräparat von Sunitinib, wird schneller absorbiert und eliminiert als Sunitinib (Fiedler, Giaccone et al. 2010). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Zusammenhang zwischen Therapieerfolg bei der Behandlung mit SU14813 und Mutationen im VEGF-Rezeptor- oder FLT3-Gen. Am Beispiel des Adenokarzinoms der Lunge wird deutlich, dass Tumorzellen, die bestimmte Mutationen aufweisen, sich im Ansprechen auf Tyrosinkinase-Inhibitoren drastisch von Zellen ohne diese Mutationen unterscheiden können. Die meisten Patienten mit einem chemotherapieresistentem Adenokarzinom der Lunge sprechen auf eine Therapie mit Gefitinib bzw. Erlotinib, Inhibitoren des Epidermal Growth Factor-Rezeptors (EGFR), nicht an.

Bei 10-19% der Patienten lässt sich jedoch ein schneller und dramatischer Therapieerfolg beobachten (Fukuoka, Yano et al. 2003; Kris, Natale et al. 2003; Lynch, Bell et al. 2004). Mutationsanalysen der Gefitinib/Erlotinib-sensiblen Tumoren zeigten genetische Veränderungen in Exon 18, 19 und 21 des EGFR-Gens, diese Mutationen ließen sich in den nicht-sensiblen Tumoren nicht nachweisen (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Pao, Miller et al. 2004). Auch bei der Therapie der gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) wird dieses Prinzip angewendet. So profitieren GIST-Patienten mit einer Mutation im Exon 9 des c-kit- Rezeptors, im Vergleich zu denen mit einer Mutation im Exon 11, von einer höheren Dosis des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (Casali, Jost et al. 2008).

Die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren bringt zahlreiche Nebenwirkungen mit sich und ist sehr kostenintensiv (Eskens and Verweij 2006). Könnte man vor Beginn der Behandlung bereits eine Aussage über deren Wirksamkeit treffen, so wäre es möglich, dem Patienten Nebenwirkungen zu ersparen, möglichst schnell mit einer Alternativbehandlung zu beginnen und finanzielle Ressourcen zu schonen.

Ding *et al.* konnten im Rahmen einer umfangreichen Studie an Patienten mit Lungenkrebs mehrere Mutationen im Gen des VEGF-Rezeptors 2 feststellen (Ding, Getz et al. 2008). In einer weiteren Veröffentlichung wurde berichtet, dass Angiosarkome, die VEGF-Rezeptor 2 Mutationen tragen, sensibel auf Tyrosinkinase-Inhibitoren ansprechen (Antonescu, Yoshida et al. 2009).

SU14813 inhibiert, neben dem VEGF-Rezeptor, auch den FLT-3 Rezeptor, der bei Leukämien eine wichtige Rolle spielt und in ca. 30% der Patienten mutiert ist (Yokota, Kiyoi et al. 1997; Yamamoto, Kiyoi et al. 2001). Somit liegt der Gedanke nahe, dass auch hier Mutationen Einfluss auf den Erfolg der Therapie haben könnten (Patyna, Laird et al. 2006). Bei den hier untersuchten Patienten, die mit SU14813 behandelt wurden, zeigten sich Unterschiede in der Wirksamkeit. Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Mutationen im VEGF-Rezeptor 2, dem FLT-3-Rezeptor und dem unterschiedlichen klinischen Ansprechen auf SU14813 zu untersuchen.

1.1 Proteintyrosinkinasen

Proteintyrosinkinasen sind an der Signalübermittlung für zahlreiche wichtige Zellfunktionen beteiligt und regulieren so beispielsweise die Zelldifferenzierung, die Zellproliferation, den Zellzyklus sowie die Apoptose und Migration von Zellen (Zwick, Bange et al. 2001). Ihre Aktivität ist normalerweise streng kontrolliert und reguliert. Werden Proteintyrosinkinasen durch Mutationen dereguliert können sie zu zellulärer Transformation und im weiteren Verlauf zur Entstehung von Neoplasien beitragen (Blume-Jensen and Hunter 2001).

Die Gruppe der Proteintyrosinkinasen lässt sich, je nach katalysierter Reaktion in drei Gruppen aufteilen. Es findet immer eine Übertragung einer Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf eine Hydroxylgruppe des Substratproteins statt. Serin/Threoninkinasen katalysieren die Reaktion bei Serin- oder Threoninresten, während Tyrosinkinasen die Phosphatübertragung auf Tyrosinreste vermitteln, ferner existieren Proteinkinasen die zu beidem fähig sind (Hunter 1991).

Im Rahmen des Human Genome Projects wurde ermittelt, dass von den ca. 32000 kodierenden Genen, etwa 20% für Proteine kodieren die an der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Über 90 dieser Gene kodieren wiederum für Proteinkinasen, von diesen 58 Gene für Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), unterteilt in 20 Subfamilien, und 32 Gene für Non-Rezeptortyrosinkinasen, eingeteilt in 10 Untergruppen (Robinson, Wu et al. 2000; Blume-Jensen and Hunter 2001).

1.1.1 Die Familie der Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen sind transmembranäre Proteine, die extrazellulär eine Ligandenbindungsdomäne und zytoplasmatisch eine Tyrosinkinasedomäne aufweisen. Diese Tyrosinkinasedomäne wird durch eine juxtamembranäre Domäne von der transmembranären Domäne getrennt. Die juxtamembranäre Domäne übernimmt bei einigen Rezeptortyrosinkinasen eine autoinhibitorische Funktion, die durch Phosphorylierung außer Kraft gesetzt werden kann (Wybenga-Groot, Baskin et al. 2001; Irusta, Luo et al. 2002).

Die Kinasedomänen sind hochkonserviert (Hanks, Quinn et al. 1988) und beinhalten drei Proteindomänen: Die Aktivierungsschleife (Activation-Loop), welche die Kinaseaktivität reguliert, die ATP-Bindungstasche (ATP-binding pocket) und die Kinaseschleife (catalytic loop), die katalytisch aktiv ist. Die Kinaseaktivität wird über die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife reguliert. Die ATP-Bindungstasche wird im inaktiven Zustand von der Aktivierungsschleife blockiert, so dass die Anlagerung des Substrats verhindert wird. Die Kinasedomäne einiger Rezeptortyrosinkinasen wird durch eine kinase-insert-sequence unterteilt. An der C-terminalen Domäne finden sich häufig Autophosphorylierungsstellen, die essentiell für die Signaltransduktion sind und denen ferner eine inhibitorische Funktion zugeschrieben wird (Shewchuk, Hassell et al. 2000).

Basierend auf der Sequenz der Kinasedomänen und der molekularen Struktur wird eine Einteilung in 20 Subfamilien oder Rezeptorklassen vorgenommen (Abb. 1).

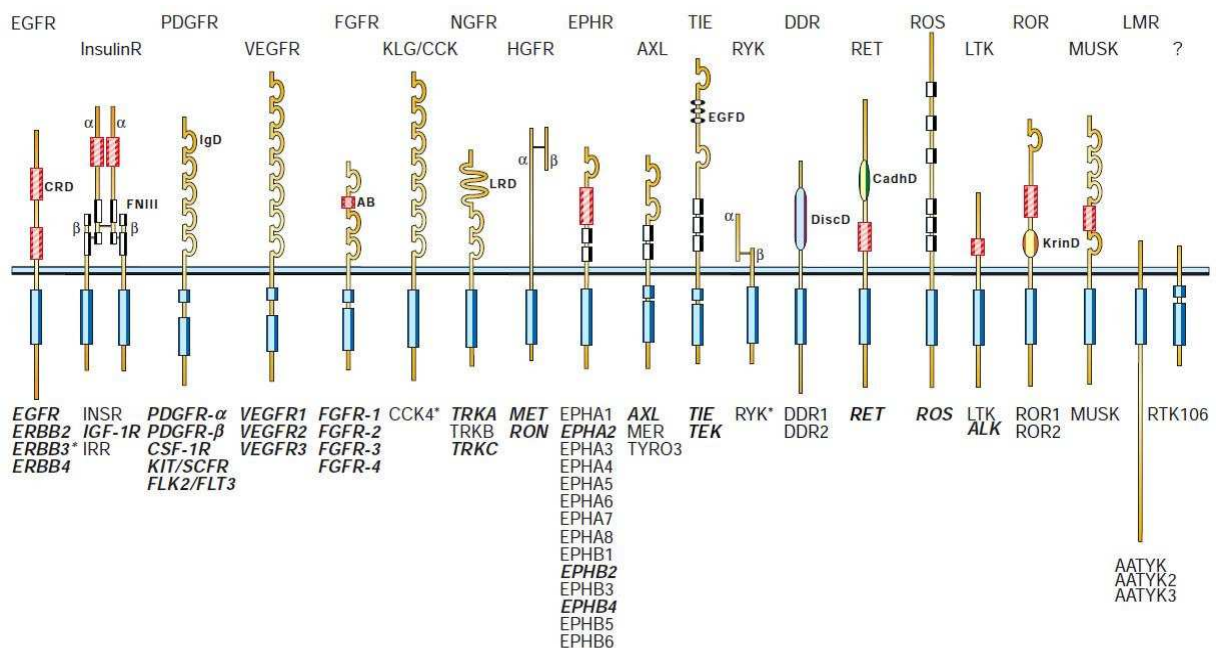


Abb.1: Subfamilien der Rezeptortyrosinkinasen (nach Blume-Jensen und Hunter,2001)

Der Name der Subfamilie ist jeweils oben und die einzelnen Mitglieder unten aufgelistet. Fett und kursiv gedruckte Mitglieder sind an der Entstehung maligner Erkrankungen beteiligt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren (VEGFR-2/KDR und FLT3) gehören der Subfamilie der Platelet-Derived Growth Factor- (PDGFR) bzw. der Vascular Endothelial Growth Factor- (VEGFR) Rezeptoren an.

1.1.2 Aktivierungsmechanismus und physiologische Funktion von RTKs

Rezeptortyrosinkinasen liegen unstimuliert für gewöhnlich als Monomer vor. Die Dimerisierung, also damit auch die Aktivierung des Rezeptors, wird durch die Konformation in der inaktiven Form sterisch inhibiert. Diese inhibierende Konformation wird vor allem von der Aktivierungsschleife, aber auch von der juxtamembranen und C-terminalen Domäne aufrecht erhalten (Huse and Kuriyan 2002).

Die Aktivierung erfolgt in drei Schritten: Ligandenbindung, Dimerisierung und Autophosphorylierung. Zuerst induzieren Wechselwirkungen der extrazellulären Domäne mit dem Liganden die Dimerisierung des Rezeptors.

Die Dimerisierung führt zu einer Konformationsänderung der Aktivierungsschleife, so kann ATP binden und die Autophosphorylierung des Rezeptors stattfinden. Dies hat zwei Folgen, zum einen wird die offene Konformation der Aktivierungsschleife stabilisiert und erlaubt so die Anlagerung von Substraten, zum anderen werden Bindungsstellen für Effektorproteine der Signalübermittlung bereitgestellt (Heldin 1995; Schlessinger 2000).

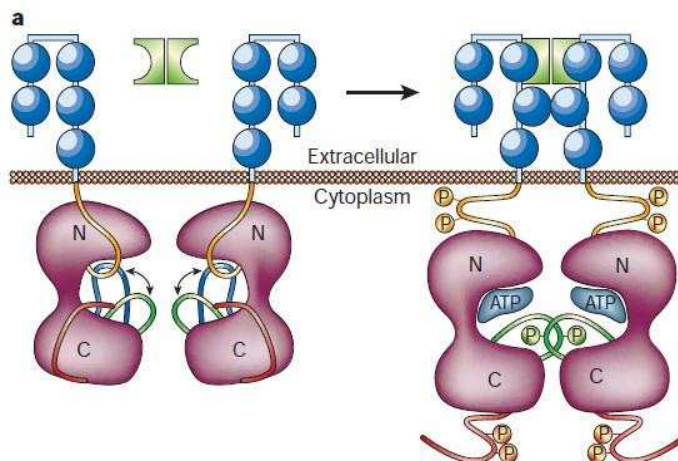


Abb.2: Aktivierungsmechanismus der Rezeptortyrosinkinasen (Blume-Jensen and Hunter 2001)

Links: Die Rezeptormonomere liegen im unstimulierten Zustand vor. Die aktivierende und katalytische Schleife befindet sich im Gleichgewicht zwischen substratunzugänglicher (blau) und substrataffiner (grün) Konformation. Außerdem können die juxtamembranäre- (orange) und die C-terminale Domäne (rot) mit der Konformation der N-terminalen Kinaseschleife („N“) und/oder der Substratbindungsstelle interferieren.

Rechts: Durch Ligandenbindung induzierte Rezeptordimerisierung und Autophosphorylierung („P“) an Tyrosylresten des Rezeptormoleküls führt zur Kinaseaktivierung.

Diese Bindungsstellen werden dann von Proteinen erkannt, die hierfür über eine phosphotyrosinbindende Domäne wie SH2 (Src Homologie-2) oder PTB (Phosphotyrosinbindende Domäne) verfügen (Heldin 1995). Vielfältige nachgeschaltete Signalwege verändern anschließend die Genexpression, was beispielsweise Effekte auf die Proliferation, Migration oder Angiogenese hat.

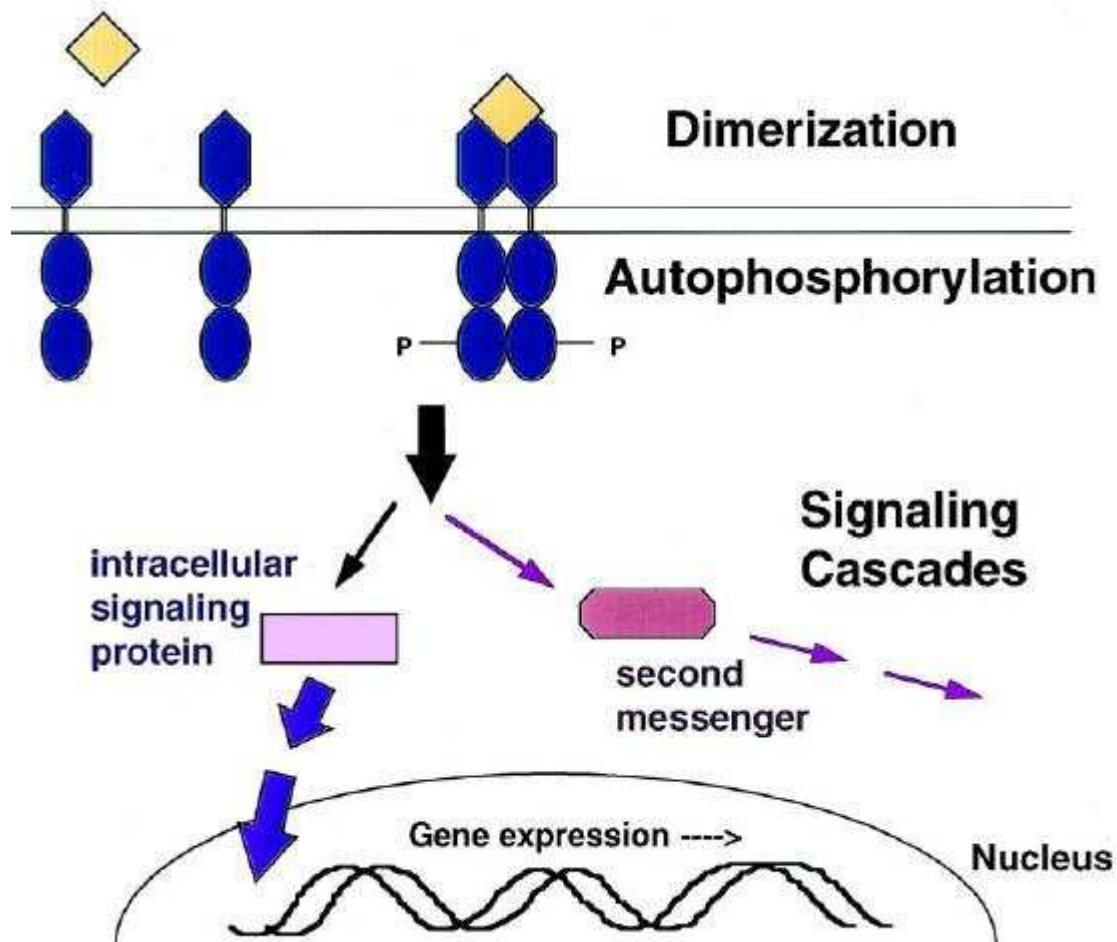


Abb.3: Schema der Dimerisierung und Signalkaskade von Rezeptortyrosinkinasen modifiziert nach Kolibaba (Kolibaba and Druker 1997).

Links: Rezeptormonomere (blau) und ungebundener Ligand (gelb)

Rechts: Rezeptordimer mit gebundenem Ligand und Signalkaskade.

1.1.3 Die Rolle von RTKs in der Pathogenese und Therapie von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen

Rezeptortyrosinkinasen sind zentrale Vermittler des zellulären Wachstums, der Zellteilung und des Überlebens, weshalb sie auch in der Pathogenese vieler Erkrankungen häufig involviert sind. Etwas mehr als die Hälfte aller bekannten RTKs wurden wiederholt mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht, wobei die jeweiligen Gene dabei entweder mutiert oder überexprimiert waren. Es gibt vier verschiedene Prinzipien wodurch eine onkogene Transformation durch RTKs zustande kommen kann. Erstens durch retrovirale Transduktion eines Proto-Onkogens, welches mit einer RTK korrespondiert, zweitens können Strukturveränderungen auf Genomebene, wie z.B. chromosomale Translokationen, onkogene Fusionsproteine mit einer Tyrosinkinasedomäne hervorbringen, drittens sogenannte gain-of-function- Mutationen, wie Punktmutationen oder Deletionen und viertens Überexpression aufgrund einer Gen-Amplifikation. Mutationen, die zu einer ständigen Aktivierung der Signalkaskade führen, können sowohl die ligandenbindende als auch die juxtamembranäre oder katalytische Domäne betreffen. Rezeptortyrosinkinasen spielen bei vielen soliden Tumoren, wie dem Nierenzellkarzinom, dem Kolonkarzinom, dem Adenokarzinom der Lunge, den gastrointestinalen Stromatumoren sowie hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien und Lymphomen eine große Rolle (Blume-Jensen and Hunter 2001). Daher bieten sie sich als Angriffspunkte einer zielgerichteten Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren an.

Das prominenteste Beispiel ist hier sicherlich die chronisch myeloische Leukämie, dort findet sich in 95% aller Patienten die Translokation t(9,22), auch Philadelphia-Chromosom genannt. Durch diese charakteristische zytogenetische Anomalie wird das BCR-ABL-Onkogen gebildet, welches für zwei Tyrosinkinasen kodiert. In der Folge zeigen die Zellen eine dysregulierte Signalübermittlung, eine hohe Proliferationsrate und eine Resistenz gegenüber Apoptose. Der spezifische Kinasehemmer Imatinib blockiert die Aktivität des BCR-ABL Fusionsproduktes und ist der erste zugelassene Wirkstoff einer neuen Generation von zielgerichteten Medikamenten gegen Tyrosinkinasen (Druker, Tamura et al. 1996; Savage and Antman 2002).

Zum jetzigen Zeitpunkt befinden sich über 80 verschiedene Kinase- Inhibitoren in verschiedenen Stadien klinischer Studien; so auch Sunitinib und sein Nachfolger SU14813, welche Bestandteil dieser Arbeit sind (Zhang, Yang et al. 2009).

1.1.4 Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren

Die „Vascular Endothelial Growth Factor“-Familie (VEGF) spielt zusammen mit ihren VEGF-Rezeptoren (VEGFRs), die zu den Rezeptortyrosinkinasen gehören, die entscheidende Rolle in der Angiogenese (Takahashi and Shibuya 2005).

Derzeit sind sieben Mitglieder der VEGF-Familie bekannt: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF (Placenta Growth Factor) und svVEGF (snake venom VEGF) (Takahashi and Shibuya 2005). Die Genexpression von VEGF wird von diversen Faktoren reguliert, unter anderem Hypoxie, Stickstoffmonoxid (NO), p-53 Mutationen, Östrogen und Wachstumsfaktoren sind hier zu nennen (Takahashi and Shibuya 2005).

VEGF-A wurde 1983 von Senger *et al.* entdeckt, aufgrund seines Einflusses auf die Permeabilität von Blutgefäßen wurde dieses Protein anfangs auch als VPF (Vascular Permeability Factor) bezeichnet (Senger, Galli et al. 1983). Dieses Zytokin gilt als der wichtigste Wachstumsfaktor für Endothelzellen. Das VEGF-A-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 6 an Position 6p21.3 lokalisiert (Vincenti, Cassano et al. 1996). Es besteht aus acht Exons, die durch sieben Introns getrennt sind. Die kodierende Region besteht aus etwa 14 kb. Durch alternatives Splicing können neun VEGF-Subtypen entstehen. VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉ sind die häufigsten Isoformen. VEGF₁₆₅ weist durch viele basische Aminosäuren im Exon 7 eine mäßige Affinität für Heparin auf. VEGF₁₂₁ ist ein frei diffundierendes Protein und bindet kein Heparin, da die Exons 6 und 7 fehlen. VEGF₁₈₉ besitzt durch das Exon 6 eine hohe Affinität für Heparin und findet sich überwiegend in der extrazellulären Matrix.

VEGF-A bindet an den VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1), auch bekannt als Flt-1, sowie an den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2), der beim Menschen alternativ KDR (kinase insert domain rezeptor) genannt wird.

VEGF-B bindet nur an den VEGFR-1. In Versuchen mit VEGF-B knock-out-Mäusen wurden dysfunktionale Koronargefäße und ein vermindertes Herzwachstum beobachtet (Bellomo, Headrick et al. 2000).

VEGF-C und VEGF-D sind sich ähnlich und unterscheiden sich von VEGF-A durch Erweiterungen am C- und N-Terminus, die man bei anderen Mitgliedern der VEGF-Familie nicht findet. Beide Faktoren binden sowohl an den VEGF-Rezeptor-2, als auch an den VEGF-Rezeptor-3. Versuche mit geeigneten Mausmodellen zeigten, wie wichtig diese Faktoren und Rezeptoren für die Lymphangiogenese sind (Jeltsch, Kaipainen et al. 1997; Lohela, Saaristo et al. 2003).

VEGF-E bezeichnet eine Gruppe von VEGF-Homologen, die im Parapoxvirus Orf entdeckt wurden. Alle Formen binden an den VEGFR-2, nicht aber an VEGFR-1 oder VEGFR-3. Obwohl die Heparin bindende Domäne fehlt, regt VEGF-E die Endothelzellproliferation ebenso an wie VEGF₁₆₅ (Ogawa, Oku et al. 1998).

PlGF (Placenta Growth Factor) wird während der Schwangerschaft in der Plazenta hoch exprimiert. PlGF bindet nur an den VEGFR-1 und ähnelt VEGF-A strukturell sehr (Takahashi and Shibuya 2005).

svVEGF (snake venom VEGF) werden die Vertreter der VEGF-Familie genannt, welche man im Gift verschiedener Schlangen entdeckte. Diese Faktoren scheinen ähnlich wie VEGF-A zu wirken und könnten die Toxizität der Schlangengifte erhöhen (Takahashi and Shibuya 2005).

Es existieren drei VEGF-Rezeptoren: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, sie gehören der Tyrosin-Kinase Rezeptorfamilie an.

Der VEGFR-1 ist 180 kDa groß und bindet VEGF-A, VEGF-B, PlGF und svVEGF mit hoher Affinität. Der Rezeptor wird auf vaskulären Endothelzellen und einigen nicht-endothelialen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Takahashi and Shibuya 2005).

VEGF-A bindet zehnfach stärker an VEGFR-1 also an VEGFR-2, jedoch ist die Kinase-Aktivität im Vergleich zu VEGFR-2 nur um das Zweifache erhöht.

Eine lösliche Variante des Rezeptors, die durch alternatives Splicing entsteht, hat einen hemmenden Einfluss auf die Angiogenese. Der lösliche Rezeptor bindet VEGF und vermindert somit seine Verfügbarkeit, so dass die Angiogenese über den VEGFR-2 gehemmt wird (Shibuya 2001).

Der VEGFR-2 ist ein Protein mit 200-230 kDa, das über eine hohe Bindungsaffinität für VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und svVEGF verfügt. Vaskuläre und lymphatische Endothelzellen, Megakaryozyten sowie hämatopoetische Stammzellen exprimieren diesen Rezeptor (Takahashi and Shibuya 2005).

Die Wirkung von VEGF-A, also der mitogene, angiogene und die Permeabilität erhöhende Effekt, wird hauptsächlich vom VEGFR-2 vermittelt. Weiterhin unterstützt er noch die Lymphangiogenese (Nagy, Vasile et al. 2002).

Der VEGFR-3 weist eine Masse von 195 kDa und eine hohe Bindungsaffinität für VEGF-C und VEGF-D auf. Die Stimulation von VEGFR-3 leitet Lymphangiogenese ein und kann bei Überexpression des Rezeptors zur Bildung von Lymphgefäßen führen, die unabhängig vom umgebenden Blutgefäßsystem sind (Veikkola, Jussila et al. 2001).

1.1.5 Der FLT3-Rezeptor (FMS-like tyrosine kinase 3)

Ein weiterer Rezeptor, der von Sunitinib und SU14813 inhibiert wird, ist der FLT3-Rezeptor (Mendel, Laird et al. 2003; Patyna, Laird et al. 2006).

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) gehört zur Klasse 3 der Rezeptortyrosinkinasen und ist somit verwandt mit dem PDGFR und c-Kit. Das FLT3-Gen ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert, es besteht aus über 1000 kb, ist in 24 Exons organisiert und kodiert für ein Protein mit 993 Aminosäuren (Lyman, James et al. 1993; Rosnet, Schiff et al. 1993; Abu-Duhier, Goodeve et al. 2001).

FLT3 reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. Transkription, Proliferation und Apoptose, weshalb die FLT3-Aktivität eine entscheidende Rolle in der Regelung der normalen Hämatopoese einnimmt (Ray, Paige et al. 1996; Rusten, Lyman et al. 1996). Auch an pathologischen Prozessen der Hämatopoese ist FLT3 beteiligt.

Mutationen im FLT-3-Gen sind die am häufigsten beobachteten genetischen Veränderungen in akuten myeloischen Leukämien (AML). In ca. 30% aller AML-Patienten sind Mutationen nachweisbar. Die beiden häufigsten dieser Mutationen sind die interne Tandemduplikation (ITD) und eine Punktmutation, die sich auf die aktivierende Schleife der zweiten Kinasedomäne an Aminosäureposition D835 auswirkt (Yokota, Kiyoi et al. 1997; Yamamoto, Kiyoi et al. 2001). Das Wachstum leukämischer Zellen, die diese Mutationen tragen, konnte in vitro durch Sunitinib stärker inhibiert werden als das Wachstum von Zellen ohne diese Mutationen (Ikezoe, Nishioka et al. 2006). Tumorzellen die eine FLT3-ITD Mutation tragen können auch durch SU14813 wirksam inhibiert werden (Patyna, Laird et al. 2006).

1.2 Die Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib und SU14813

Sunitinib und sein Nachfolgepräparat SU14813 sind Multityrosinkinase-Inhibitoren und gehören zu Gruppe der sogenannten „small molecules“, die im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern die Zellmembran durchdringen können. Die großen monoklonalen Antikörper können nur mit Molekülen auf der Oberfläche von Zellen interagieren, während die „small molecules“ intrazelluläre Domänen von Rezeptoren blockieren können.

Folglich ist es den „small molecules“ möglich, die Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden zu hemmen. Ein weiterer Vorteil besteht in der Darreichungsform, da sie oral verfügbar sind, wohingegen die Antikörper intravenös verabreicht werden müssen (Imai and Takaoka 2006; Gotink and Verheul 2010)

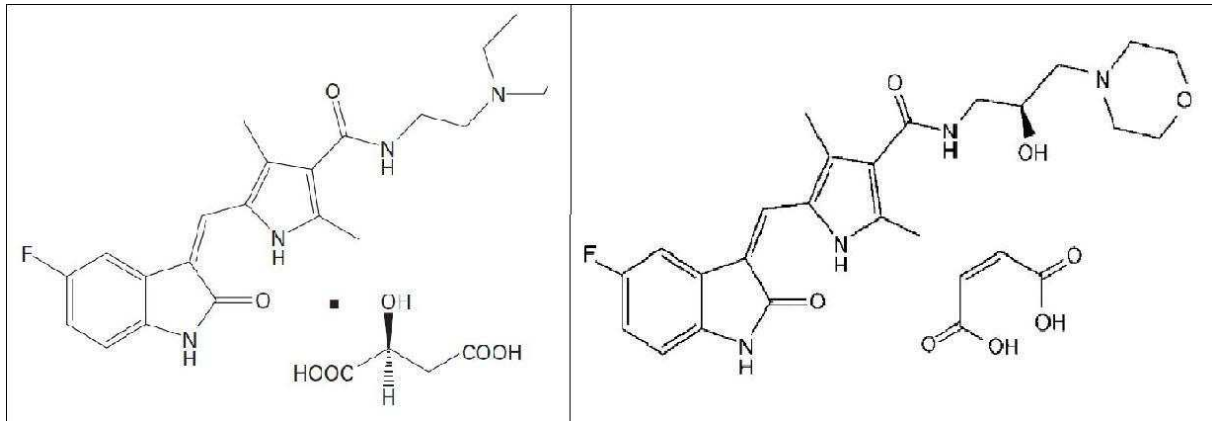


Abb.4: Links: Strukturformel von Sunitinib-malat (Sun, Liang et al. 2003)

Rechts: Strukturformel von SU14813-malat (Patyna, Laird et al. 2006)

1.2.1 Angriffspunkte und Wirkungsmechanismus

Sunitinib hemmt, neben anderen Rezeptortyrosinkinasen, am stärksten VEGFR-1 und -2, PDGFR- α und - β , c-KIT und FLT3 (Chow and Eckhardt 2007).

Wie die meisten anderen dieser Inhibitoren erkennt Sunitinib die aktive Konformation der Kinase, bindet kompetitiv an die ATP-Tasche des Enzyms und verhindert so die Übertragung von Phosphatgruppen auf Effektorproteine (Zhang, Yang et al. 2009).

Sunitinib ist derzeit zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms und des gastrointestinalen Stromatumors bei Imatinib-Resistenz oder Unverträglichkeit zugelassen, eine Vielzahl von Studien prüft jedoch derzeit auch die Wirksamkeit von Sunitinib bei anderen Tumoren (Izzedine, Buhaescu et al. 2007).

SU14813 ist ein Nachfolgepräparat von Sunitinib, das ein ähnliches Wirkungsspektrum aufweist und auch die oben genannten Rezeptoren hemmt. Wie in Abb.4 zu sehen ist, weist es Analogien im Molekülbau auf, scheint aber weniger Nebenwirkungen zu verursachen.

Es konnte gezeigt werden, dass SU14813 die Rezeptoren VEGFR-2 und PDGFR sowie FLT3 im gleichen Maße inhibieren kann. In Xenograft-Tiermodellen wurde eine Anti-Tumoraktivität von SU14813 beobachtet.

Bei den humanen Zelllinien Colo205 (Kolonkarzinom), 786-O (Nierenzellkarzinom) und MV411 (akute myeloische Leukämie) konnte eine Tumorregression bewiesen werden (Patyna, Laird et al. 2006).

1.2.2 Pharmakokinetik und Nebenwirkungen

Nach oraler Gabe von Sunitinib wird nach ca. 5 Stunden die maximale Plasmakonzentration erreicht (Faivre, Delbaldo et al. 2006). Die Metabolisierung geschieht hepatisch, hauptsächlich über CYP3A4, wobei ein aktiver Metabolit (SU21662) entsteht, dieser wird dann weiter über CYP3A4 abgebaut (Chow and Eckhardt 2007).

Zum Spektrum der häufigen (>20%) Nebenwirkungen gehören Müdigkeit, Kraftlosigkeit, Übelkeit, Obstipation und Anorexie, wohingegen schwerwiegende Nebenwirkungen wie Neutropenie, Thrombopenie oder asymptotische Lipaseerhöhung nur bei ca. 10% der Patienten auftreten (Chow and Eckhardt 2007).

SU14813 wird ebenfalls oral verabreicht und schnell resorbiert, so dass in Mäusen, Ratten und Affen die maximale Plasmakonzentration bereits nach 1,5 Stunden erreicht ist. Metabolisiert wird es auch hepatisch, vorwiegend von CYP3A4 und CYP1A2, wobei keine anderen Metaboliten nachgewiesen wurden. Zu den Nebenwirkungen zählen Müdigkeit, Übelkeit, Anorexie und Erbrechen. (Patyna, Laird et al. 2006; Fiedler, Giaccone et al. 2010)

1.2.3 Auswirkungen genetischer Veränderungen auf den Therapieerfolg

Genetische Veränderungen können einen erheblichen Einfluss auf den Erfolg einer Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren oder monoklonalen Antikörpern haben. Hierzu existieren bereits einige gut untersuchte Beispiele. So ist seit 1996 bekannt, dass Imatinib Zellen mit einer BCR-ABL-Mutation hemmt oder deren Zelltod verursacht, während das Medikament gesunde Zellen nur geringfügig schädigt. Diese Entdeckung zeigte einen völlig neuen Therapieansatz für die chronisch myeloische Leukämie auf (Druker, Tamura et al. 1996).

In gastrointestinalen Stromatumoren verursachen c-kit-Mutationen therapeutische Konsequenzen. Auch hier wird mit dem Multityrosinkinase-Inhibitor Imatinib behandelt, Mutationen in Exon 11 des c-kit zeigen hohe Ansprechraten (>80%) auf diesen Wirkstoff, während Tumoren mit Exon-9-Mutationen deutlich resistenter sind und nur in ca. 50% der Fälle ansprechen. In der Folge werden Patienten mit Exon-9-Mutationen von Anfang an mit doppelter Dosis behandelt, was die Ansprechrate erhöht (Debiec-Rychter, Sciot et al. 2006).

Mehrere retrospektive Studien an Patienten mit kolorektalen Karzinomen bestätigten einen Zusammenhang zwischen KRAS-Mutationen und der Wirksamkeit einer anti-EGFR-Therapie. Mutationen in KRAS sind prognostisch ungünstig, da sie die Effektivität einer Therapie mit EGFR-Antikörpern stark einschränken (Lievre, Blons et al. 2010).

Bei der Behandlung von chemotherapierefraktären Adenokarzinomen der Lunge fällt auf, dass nur wenige Patienten auf eine Therapie mit Inhibitoren des Epidermal Growth Factor-Rezeptors (EGFR), wie Gefitinib oder Erlotinib, ansprechen. Bei den 10-19% der Patienten mit Gefitinib/Erlotinib-sensiblen Tumoren ist allerdings ein schneller und dramatischer Therapieerfolg zu beobachten (Fukuoka, Yano et al. 2003; Kris, Natale et al. 2003). Dies ist auf Mutationen im EGFR-Gen zurückzuführen, diese Veränderungen zeigen sich in fast allen sensiblen Adenokarzinomen der Lunge und führen sowohl zu einer gesteigerten Rezeptoraktivierung nach Ligandenbindung, als auch zu einer verstärkten Hemmung durch EGFR-Inhibitoren wie Gefitinib oder Erlotinib (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Pao, Miller et al. 2004).

Vor kurzem wurden in Angiosarkomen und Adenokarzinomen der Lunge Mutationen im VEGFR-2 entdeckt. Diese Mutationen führen zu einer Autophosphorylierung und damit zur Aktivierung der RTKs auch in Abwesenheit von Liganden. Vor dem Hintergrund dass SU14813 den VEGF-Rezeptor-2 spezifisch hemmt, könnte eine solche Mutation sich eventuell auch auf den Therapieerfolg auswirken (Ding, Getz et al. 2008; Antonescu, Yoshida et al. 2009).

SU14813 blockiert weiterhin auch den FLT3-Rezeptor und hat sich als wirksam bei Tumoren mit der internen Tandemduplikation (ITD) erwiesen (Patyna, Laird et al. 2006). Da sich in der von Fiedler *et al.* durchgeführten Phase I Studie mit SU14813 ebenfalls erhebliche Unterschiede im Therapieerfolg zeigten, wurden diese aktuellen Erkenntnisse zu VEGFR-2 und FLT3 im Zusammenhang mit SU14813 in dieser Arbeit weiter untersucht (Fiedler, Giaccone et al. 2010).

1.3 Studie SU14813

Das in dieser Arbeit untersuchte Tumormaterial stammt von Patienten, die an der Phase I dose-escalation study mit SU14813 teilgenommen haben. Die von Fiedler *et al.* durchgeführte Studie untersuchte die maximal tolerierte Dosis (MTD) von SU14813 bei täglicher Gabe über 5 Wochen. Außerdem wurden die DLTs (dose limiting toxicities), die nicht dosislimitierende Toxizität und der Anti-Tumor-Effekt untersucht. Detaillierte Informationen zur Studie, den Patienten und dem untersuchten Tumormaterial werden im Abschnitt 3.1.3 Patientenkollektiv der SU14813 Studie aufgeführt. (Fiedler, Giaccone et al. 2010)

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezugsquelle	Herstellerbezeichnung	Gerät
Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5415	Zentrifuge für Reaktionsgefäße
	Reference 10, 100 und 1000	Pipetten
	Thermomixer Comfort	Thermomischer
Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel	GFL Wasserbad	Wasserbad
Heidolph, Schwabach	Reax Control	Vortex-Rüttler
Biometra, Göttingen	IT1 Thermocycler	Thermocycler
Thermo Fisher, Wilmington	NanoDrop ND-1000	Spektrophotometer
Bio-Rad Laboratories, München	DNA Sub Cell	Elektrophorese Kammer
Ohaus, Nänikon, Schweiz	Pioneer	Waage
Consort, Turnhout, Belgien	Microcomputer electrophoresis	Elektrophorese Spannungs-transformator
	Power supply E443	
Stratagene, La Jolla, CA, USA	CCD Kamera Eagle Eye	Gelkamera
	Thermoprinter	Thermoprinter
Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf	Tumorstanze	Tumorstanze
Sarstedt, Nümbrecht	Biosphere Filter Tip	Pipettenspitzen; 10, 100, 1000 µl

Tab.1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.2 Kits, Chemikalien und Software

Hersteller	Produkt
QIAGEN, Hilden	QIAamp DNA Mini-Extraktionskit
	QIAamp DNA Micro-Extraktionskit
Merck, Darmstadt	Xylol
	Ethanol
	Tris Base
	EDTA ph 8,0
	Essigsäure 100%
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	REDTaq PCR Reaktions-Mix
Seqlab, Göttingen	PCR Purification Kit
FMC Bio-Products, Philadelphia, PA, USA	SeaKem LE Agarose Gel Pulver
invitrogen, Darmstadt	100bp DNA Ladder
	Ethidiumbromid Lösung
Ambion, Darmstadt	DEPC-treated water (Nukleasenfrei)
Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Primer

Tab.2: Verwendete Kits und Chemikalien

Bezeichnung	Funktion
UniPro Ugene v1.5.2	Visualisierung der Sequenzen
http://frodo.wi.mit.edu/primer3	Primer Design
http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Quelle für Wildtypsequenzen
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov	Sequenzabgleich

Tab.3: Verwendete Software

2.1.3 Patientenkollektiv der SU14813 Studie

Das untersuchte Tumormaterial stammt aus Patienten die an der Phase I dose-escalation study mit SU14813 teilgenommen haben.

Die von Fiedler *et al.* durchgeführte Studie untersuchte die maximal tolerierte Dosis (MTD) von SU14813 bei täglicher Gabe über 5 Wochen.

Außerdem wurden die DLTs (dose limiting toxicities), die nicht dosislimitierende Toxizität und der Anti-Tumor-Effekt untersucht (Fiedler, Giaccone et al. 2010).

2.1.3.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Zugelassen wurden Patienten mit einem histologisch gesicherten soliden Tumor, wenn dieser therapieresistent war, oder keine andere Standardtherapie verfügbar war. Alle Teilnehmer mussten mindestens 18 Jahre alt sein und nach umfangreicher Aufklärung ihr Einverständnis zu allen durchgeführten Maßnahmen geben. Weitere Einschlusskriterien waren ein ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance status von 0 oder 1, sowie adäquate hämatologische sowie Organfunktion.

Grade	ECOG
0	Vollständig mobil, fähig alle Tätigkeiten ohne Einschränkung auszuführen
1	Eingeschränkt bei physisch anstrengenden Aktivitäten, aber fähig leichte Arbeit zu verrichten, z.B. Hausarbeit und Bürotätigkeiten
2	Mobil und fähig sich selbst zu versorgen, jegliche Arbeiten sind nicht möglich. Aktiv in mehr als 50% der wachen Stunden
3	Nur begrenzt fähig sich selbst zu versorgen, in mehr als 50% der wachen Stunden auf Bett oder Stuhl beschränkt
4	Vollständig behindert. Selbstversorgung nicht möglich. Ständig an Bett oder Stuhl gefesselt.
5	Tot

Tab.4: Eastern Cooperative Oncology Group performance status nach Oken (Oken, Creech et al. 1982)

Ein Abstand von mindestens 3 Wochen zur letzten Chemotherapie, 4 Wochen zur letzten Bestrahlung und 6 Wochen zur Gabe von Nitrosoharnstoffen oder Mitomycin C musste gewährleistet sein. Das Serumalbumin musste $\geq 3,0$ g/dl sein. Weiterhin war eine gute hämatopoetische Funktion gefordert (Neutrophile $\geq 1500/\mu\text{l}$, Thrombozyten $\geq 75000/\mu\text{l}$ und Hb ≥ 10 g/dl), sowie eine gute Nieren- und Leberfunktion (Serumkreatinin $< 1,5$ x des jeweiligen oberen Maximalwertes,

ALAT/ASAT/Alkalische Phosphatase $\leq 2,5 \times$ vom oberen Grenzwert, bei Knochen und Lebermetastasen $\leq 5x$).

Ausgeschlossen wurden Patienten, die mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, anti-VEGF-Wirkstoffen oder Angiogenesehemmern vorbehandelt waren. Weitere Ausschlusskriterien waren bekannte Hirnmetastasen, spinale Kompressionen, eine Vorgeschichte kardialer Ereignisse, Infektion mit HIV (human immunodeficiency virus) schwerer Bluthochdruck, Lungenembolien und tiefe Beinvenenthrombosen in den letzten 12 Monaten. Die Patienten durften weiterhin keine Chemotherapeutika, keine Immuntherapeutika und keine Hormontherapie erhalten, hiervon ausgenommen waren Kontrazeptiva und Appetitanreger.

2.1.3.2 Auswertung

Ziel der Studie war es, die maximal tolerierte Dosis, Sicherheit, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik sowie die therapeutische Wirksamkeit von SU14813 zu evaluieren.

Die Wirksamkeit von SU14813 auf den Tumor wurden mittels RECIST Kriterien bestimmt (Therasse, Arbuck et al. 2000). Die Wirksamkeit wurde hier in komplette Remission, partielle Remission, Progression und stabile Situation eingeteilt.

Dem Sponsor wurden während der Studie folgende Ereignisse sofort gemeldet: Ereignisse, die einen längeren Klinikaufenthalt veranlassen oder zur Hospitalisierung führen, lebensbedrohliche Situationen und der Tod.

Auffällige Laborwerte oder auffällige Befunde der körperlichen Untersuchung wurden dem Sponsor ebenfalls mitgeteilt. Bei allen Patienten wurde vor Beginn eine Blut- und Urinuntersuchung durchgeführt, bei Frauen außerdem ein Schwangerschaftstest (Fiedler, Giaccone et al. 2010).

Folgende Tabelle enthält Details zu den untersuchten Proben aus der SU14813 Studie.

Probe	Diagnose	Therapieansprechen	Dosis	Zyklen	OD260/ OD280*
E1	NNR Karzinom	SD später PD	150	2	2,16
E2	NSCLC	PR	100	6	2,06
E3	alveoläres Weichteilsarkom	SD (fast PR)	250	1	1,97
E4	NNR Karzinom	SD später PD	150	2	1,48
E5	Kolonkarzinom	PD	100	3	1,86
E6	Kolonkarzinom	SD	100	4	1,97
E7	Sarkom	PD	200	2	2
E8	Sarkom	PD	200	2	1,95
E9	NET, VHL-Syndrom	SD	150	18	1,87
E10	NSCLC	NA	150	2	2,15
E11	Kolonkarzinom	PD	150	3	2,2
E12	Nierenzellkarzinom	PR	250	1	1,74
E13	Nierenzellkarzinom	SD	100	2	1,89

Tab.5: Charakteristika der untersuchten Studienproben

SD = stable disease, PD = progressive disease, PR = partial remission, NA = not available

NNR = Nebennierenrinde, NSCLC = Non small cell lung cancer, NET = Neuroendokriner Tumor,

VHL = Von-Hippel-Lindau * Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm, gemessen mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer

2.1.4 Beurteilung der Tumorproben

Von den Paraffinblöcken wurden HE-Schnitte angefertigt und diese im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf beurteilt. Nahm der Tumoranteil 70% oder mehr der Schnittfläche ein, so wurde aus 2 Schnitten einer Schichtdicke von je 5 µm direkt DNA extrahiert. Lag der Tumoranteil unter 70% wurde eine Stanze (Durchmesser: 0,5 mm, Länge: 5 mm) aus dem markierten Tumoranteil entnommen und daraus DNA extrahiert.

2.1.5 Kolonkarzinomproben

Es wurden weiterhin 30 Proben von histologisch gesicherten kolorektalen Karzinomen untersucht.

Die untersuchten DNA-Proben aus Kolonkarzinomen entstammen dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Die 30 Proben wurden zufällig ausgewählt. Die DNA lag hier bereits extrahiert vor, da diese Proben routinemäßig auf die klinisch bedeutsame KRAS Mutation untersucht wurden. Alle Proben wurden auf eine Konzentration von 50 ng/µl DNA eingestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten

Aus insgesamt 13 Paraffinschnitten bzw. Stanzen wurde mittels QIAamp DNA Mini (bzw. Micro) Kit DNA isoliert. Von dem in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden jeweils 2 Schnitte mit einer Schichtdicke von je 5 µm, oder eine Stanze mit einem Durchmesser von 0,5 mm und einer Länge von 5 mm in ein Eppendorf-Tube verbracht. Die Schnitte wurden dann mit 500 – 1000 µl Xylol bedeckt, kurz gevortext, 5 Minuten inkubiert, erneut kurz gevortext und dann bei maximaler Umdrehungszahl 5 Minuten zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abpipettiert ohne das Gewebe zu entfernen und der gesamte Schritt wiederholt.

Danach wurden die Schnitte mit 500 – 1000 µl 100%igem Ethanol bedeckt, kurz gevortext und bei maximaler Umdrehungszahl 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert ohne das Gewebe zu entfernen und der gesamte Schritt wiederholt.

Dann wurde das Gewebe bei 70°C im Thermoblock getrocknet. Das gewonnene Sediment wurde je nach Menge mit 90, 180 oder 270 µl ATL Puffer (zur Gewebelyse) sowie 10, 20 oder 30 µl Proteinase K resuspendiert und über Nacht bei 10 µl Proteinase K vermischt und nochmals 1 Stunde bei 56°C verdaut.

Nach 1 Minute Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl wurde der Überstand über dem entstandenen Pellet in ein frisches Eppendorf-Tube überführt, mit 100, 200 oder 300 µl AL Puffer vermengt, gevortext und 10 Minuten bei 70°C im Thermoblock inkubiert.

Nach Zugabe desselben Volumens Ethanol wie AL Puffer (Präparationspuffer) und kurzem Vortexen wurden die Proben auf QIAamp Säulen überführt. Diese Säulen wurden dann 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert und das Filtrat verworfen.

Die Säulen wurden in neue Collectiontubes gestellt, 500 µl AW1 Puffer (Waschpuffer) darauf pipettiert und anschließend 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert und das Filtrat verworfen.

Die Säulen wurden nochmals in neue Collectiontubes gestellt, 500 µl AW2 Puffer (Waschpuffer) darauf pipettiert, 3 Minuten bei 13200 U/min zentrifugiert und das Filtrat wieder verworfen.

Alle Säulen wurden danach in 1,5 ml Eppendorf-Tubes bei 13200 U/min 1 Minute lang trocken zentrifugiert.

Nun wurden die Säulen in frisches 1,5 ml Eppendorf-Tube gesteckt, mit 50 µl oder 20 µl destilliertem Wasser eluiert, bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert und dann bei 8000 U/min 1 Minute zentrifugiert.

Abschließend wurde der DNA Gehalt am NanoDrop Spektrophotometer gemessen.

2.2.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Nukleinsäuren besitzen die Eigenschaft UV-Licht bei einer Wellenlänge zwischen 260 nm und 280 nm zu absorbieren. Bei einer Wellenlänge von 260 nm weisen sie ein charakteristisches Absorptionsmaximum auf und lassen sich somit photometrisch quantifizieren. Proteinbeimischungen können das Ergebnis verfälschen, da sie ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Daher kann man von einer verlässlichen Messung ausgehen, wenn das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm bei 1,6 bis 2 zu 1 liegt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist also ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung. Werte unter 1,6 sprechen für eine Verunreinigung mit Phenol oder Proteinen.

In diesem Fall kann sowohl die genaue photometrische Bestimmung, als auch die PCR-Amplifikation gehemmt oder unmöglich sein.

Die Messungen wurden mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer durchgeführt. Vor Messung jeder Probenreihe wurde das Spektrophotometer geeicht, hierzu dienten 1,5 µl autoklaviertes, destilliertes Wasser. Anschließend wurden von jeder Probe 1,5 µl auf den Sensor pipettiert und der DNA-Gehalt, sowie das Verhältnis der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm zu 280 nm bestimmt.

Folgende Konzentrationen wurden nach der DNA Extraktion bestimmt:

E-Nummer	Probenbezeichnung	c(DNA) ng/µl	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀
04416/03	E1	77,7	2,16
04416/03	E1.1	22,3	2,2
01021/95	E2	187,7	2,06
01021/95	E2.1	55	2,09
00212/04	E3	393,7	1,97
01633/98	E4	220,9	1,48
07974/04	E5	721,3	1,86
06985/03	E6	1076	1,97
15021/05 2A (1)	E7	1022	2
15021/05 2A (2)	E8	820	1,95
16081/97	E9	705,8	1,87
22399/02	E10	32,4	2,15
02442/05	E11	187,5	2,2
02442/05	E11.1	70,7	2,26
12351/94	E12	516,3	1,74
11584/04	E13	4,3	1,89

Tab.6: DNA-Konzentrationen der extrahierten Proben

Die DNA Lösungen wurden entsprechend den PCR-Bedingungen verdünnt, konzentriert oder es wurde mehr Volumen in die PCR eingesetzt. Als Verdünnungsmedium diente DEPC-treated H₂O.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion [Polymerase Chain Reaction (PCR)]

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis and Faloona 1987) zählt in der medizinischen Diagnostik und Forschung zu den wichtigsten Standardtechniken in der Analyse von Genen.

Mittels der PCR können bestimmte Genabschnitte *in vitro* vervielfältigt werden. Das Prinzip der PCR ähnelt der physiologischen DNA-Replikation und hat die Herstellung von Kopien eines ausgewählten DNA-Abschnitts zum Ziel. Zur Amplifikation der DNA wird ein Oligonukleotidpaar benötigt, die sogenannten Primer. Dies sind Einzelstrang DNA Moleküle mit einer Länge zwischen 18 und 30 Nukleotiden. Die beiden Primer sind komplementär zu einem spezifischen Abschnitt der DNA-Matrize und flankieren den zu untersuchenden Genabschnitt. Mit Hilfe einer hitzebeständigen Taq-DNA-Polymerase wird der Bereich zwischen den Primern durch Anlagerung von Desoxynukleosid-Triphosphaten vervielfältigt. Diese Taq-DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq), hat ein Temperaturoptimum von 72°C und hält längeren Inkubationszeiten bei bis zu 95°C stand (Saiki, Gelfand et al. 1988). Die DNA muss vorher durch starkes Erhitzen von der Doppel- in die Einzelstrang Konformation überführt werden. Folgende Reaktionsschritte bilden die Grundlage der PCR:

- Denaturierung der DNA bei 95°C (Spaltung der Doppelhelix in Einzelstränge)
- Anlagerung der Primer (Annealing), die Bindungstemperatur der Primer liegt etwa 5-10°C niedriger als ihre Schmelztemperatur
- Elongation der DNA durch die Taq-Polymerase bei 72°C

Dieser Zyklus aus drei Schritten wird 35mal wiederholt. Abschließend folgt eine längere Inkubation bei 72°C um die vollständige Synthese aller DNA-Stränge durch die Polymerase zu ermöglichen.

Im ersten Schritt wird die Menge des gewünschten DNA-Segments verdoppelt.

Da die entstandenen Kopien im nächsten Schritt wieder als Matrize dienen, verdoppelt sich die DNA Menge erneut. Dies resultiert in exponentieller Vervielfältigung des Fragments, in etwa 2^n wobei n der Anzahl an PCR-Zyklen entspricht (Saiki, Gelfand et al. 1988).

Ein Thermocycler garantiert hierbei die exakte Einhaltung der Temperaturen und Zeiten im PCR-Zyklus.

Die verwendeten Primer haben eine Länge zwischen 18 und 23 Nukleotiden und einen GC-Gehalt von 35-66%. Da sich zwischen G-C-Basenpaarungen drei, zwischen AT-Paarungen nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, hat der GC-Gehalt Auswirkungen auf Stabilität und Schmelzpunkt der Primer. Alle Primer wurden mit „Primer 3“ entworfen und von Eurofins MWG-Biotech synthetisiert. Sie wurden so ausgewählt, dass sie Fragmente in einer Länge von 114-447 Basenpaaren amplifizieren. Die Charakteristika der verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle aufgezeigt.

Gen	Bezeichnung	Richtung	5'-3'-Sequenz	Amplifikatgröße
KDR	Exon 15	vorwärts	caagatgaagggcagcattt	320bp
		rückwärts	gcagctgcaaaggacatgat	
	Exon 16	vorwärts	ccagcctggaacatagaaaga	447bp
		rückwärts	caactcaaagaaccccagtca	
	Exon 21	vorwärts	ggagtttgttgtcctttgc	210bp
		rückwärts	gcatgcaggaagcactagc	
	Exon 23	vorwärts	tggcttctgatgtgggatt	309bp
		rückwärts	tctgaacacaggtcctgaa	
	Exon 24	vorwärts	ttcaggacctgtgttcagga	304bp
		rückwärts	tccgagaagtttgcctgat	
	Exon 26	vorwärts	tgaaatcagtgtttgccttctt	155bp
		rückwärts	gcttcttgatggaggtgac	
FLT3	ITD	vorwärts	caatttaggtatgaaagccagc	328bp
		rückwärts	ctttcagcattttgacggcaacc	
	mD835	vorwärts	ccgccaggaacgtgcttg	114bp
		rückwärts	gcagcctcacattgcccc	

Tab.7: Charakteristika der Primer

Die wasserfreien Vorwärts- und Rückwärts-Primer wurden mit DEPC-treated H₂O auf eine Konzentration von 100 pm/μl eingestellt. Aus den zusammengehörigen Primerpaaren wurde dann für jedes Exon eine Primerlösung hergestellt.

Hierzu wurden je 20 μl ($c=100\text{pm}/\mu\text{l}$) des Vorwärts- und Rückwärts-Primers mit 960 μl nukleasefreien Wassers vermischt. So entstanden 1000 μl einer Primerlösung mit einer Konzentration von 4 $\text{pm}/\mu\text{l}$ (je 2 $\text{pm}/\mu\text{l}$ Vorwärts- und Rückwärts-Primer).

Pipettierschema eines PCR-Standardansatzes:

Sigma REDTaq ReadyMix	12,5 μl
Nukleasefreies Wasser	4,25 μl
Primerlösung	6,25 μl
DNA ($c=50\text{ng}/\mu\text{l}$)	2 μl
Gesamtvolumen	25 μl

Tab.8: Standard PCR Ansatz

12,5 μl Sigma REDTaq ReadyMix enthalten:

0,75 Einheiten Taq-Polymerase
5 mM Tris-HCL Puffer
25 mM KCl
0,75 mM MgCl_2
0,1 mM dNTP mix (Desoxyribonukleotide)

Tab.9: Sigma REDTaq ReadyMix Bestandteile

Dieses Schema wurde bei allen Proben der kolorektalen Karzinome verwendet, für die extrahierten Proben der Studienpatienten hat sich der dreifache Ansatz aller Bestandteile bewährt.

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (IT1, Biometra) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	3 Minuten	95°C
35 Zyklen:		
1.Denaturierung:	45 Sekunden	95°C
2.Annealing:	30 Sekunden	55°C
3.Elongation:	90 Sekunden	72°C
Abschließende Elongation	10 Minuten	72°C

Tab.10: Thermocycler Protokoll

Die Proben wurden entweder nach Ende des Programms entnommen oder bei 4°C im Thermocycler aufbewahrt.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA ist aufgrund der enthaltenen Phosphatgruppen negativ geladen und wandert somit im elektrischen Feld zur Anode (Pluspol). Innerhalb einer Gelmatrix hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe des DNA-Fragments ab, kleinere DNA-Moleküle legen in der gleichen Zeit eine größere Strecke auf dem Weg zur Anode zurück als größere. Somit ist eine Auftrennung einer DNA-Lösung nach Fragmentgröße möglich. Die Gelelektrophorese wurde zur Erfolgs- und Qualitätskontrolle der PCR eingesetzt.

Für die zu erwartenden DNA-Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 1,5% gewählt. In einen Erlenmeyerkolben wurden 1,5 g Agarose eingewogen und mit 100 ml einfach konzentriertem TAE-Puffer aufgefüllt. Der Erlenmeyerkolben wurde im Mikrowellenherd solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Der Agaroselösung wurden dann 10 µl Ethidiumbromidlösung zugesetzt und vermischt. Danach wurde die Lösung blasenfrei in einen Elektrophorese-Schlitten gegossen und mit Kämmen für 10, 15 oder 30 Geltaschen bestückt. Nach ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur war die Agarose erkaltet und auspolymerisiert, so dass der Kamm, ohne die Taschen zu beschädigen, entnommen werden konnte. Der Elektrophorese-Schlitten mit dem erkalteten Gel wurde anschließend so in die Elektrophorese-Kammer eingebracht, dass die Taschen der negativen Elektrode (Kathode) zugewandt waren. Von jeder Probe wurden 10 µl in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. In eine Tasche jeder Probenreihe wurde eine 100bp DNA-Ladder als Längenstandard eingebracht, um die Länge der entstandenen Fragmente abschätzen zu können. Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt und 500 Milliampere für ca. 40 Minuten durchgeführt. Als Laufpuffer diente ein einfach konzentrierter TAE-Puffer, der durch Verdünnung mit destilliertem H₂O aus der 50 x TAE-Stammlösung entstand.

1000 ml der 50 x TAE-Stammlösung (Tris-Acetat-EDTA pH 8,3) wurden wie folgt hergestellt:

- 242 g Tris Base mit H₂O auf 800 ml auffüllen
- 44 ml Essigsäure
- 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Ethylendiamintetraessigsäure)
- Alles mischen, mit Essigsäure auf einen pH von 8,3 einstellen
- Abschließend mit H₂O auf 1000 ml auffüllen

Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid bindet an die DNA und kann durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=312$ nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Die so sichtbar gemachten DNA-Banden wurden dann mit dem Eagle Eye Kamera System fotografisch dokumentiert und das entstandene Bild am Thermoprinter ausgedruckt. Für die Proben, die im weiteren Verlauf noch sequenziert wurden, diente die Gelelektrophorese als Erfolgs- und Qualitätskontrolle.

Ob eine interne Tandemduplikation im FLT3-Gen vorhanden war, ließ sich direkt anhand der Gelelektrophorese erkennen, da im Falle einer Mutation das amplifizierte Segment länger als die Wildtypsequenz ist.

2.2.5 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte wurde mit dem SeqLab PCR Purification Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Ziel war es, nicht gebundene Primer, Enzyme und Salze zu entfernen, da diese die Sequenzierungsreaktion stören können. Das Prinzip dieser standardisierten Methode beruht auf dem Bindungsverhalten von DNA an einer Silicamembran bei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen. Im ersten Schritt wird die DNA zusammen mit einem Bindungspuffer auf die Silicamembran gebracht und inkubiert, hierbei bindet die DNA fest an die Membran. Der überschüssige Puffer wird durch Zentrifugation entfernt. Danach wird die Säule mit einem Waschpuffer überschichtet und die Säule zentrifugiert. Hierbei löst der Waschpuffer die störenden Bestandteile aus der Säule. Im letzten Schritt wird ein Elutionspuffer auf die Säule gegeben, während der Zentrifugation löst dieser die gebundene DNA. Im Eluat findet sich nun das gereinigte PCR-Produkt.

Mit dem verwendeten System können DNA-Fragmente einer Größe von 80bp bis 30kbp aufgereinigt werden.

2.2.6 DNA-Sequenzierung

Alle Proben wurden von der Firma Seqlab in Göttingen sequenziert. Die Sequenzierungen wurden mit dem Abi Prism Big Dye System durchgeführt, das auf der Kettenabbruchmethode durch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) basiert (Sanger, Nicklen et al. 1977). Für die Sequenzreaktionen wurden dieselben Primer wie für die PCR benutzt. Die PCR-Produkte wurden jeweils vorwärts und rückwärts sequenziert, um den Verlust der ersten Basen zu vermeiden, der bei Verwendung derselben Primer sonst entsteht. In einem 0,2-ml-Reaktionsgefäß wurde das gereinigte PCR-Produkt zusammen mit Vorwärts- oder Rückwärts-Primer an Seqlab versandt. Die Länge der vervielfältigten DNA-Abschnitte dividiert durch vier ergab die benötigte Mindestmenge an DNA in Nanogramm, dazu wurden 20 pmol Primer pipettiert und alles mit nukleasefreiem Wasser auf 7 µl aufgefüllt.

Bei Seqlab wurde der Big Dye Mix hinzugefügt. Dieser enthält ein Gemisch aus dNTPs, mit Farbstoffen markierte ddNTPs und die Taq-Polymerase.

In einem Thermocycler wurden die Proben dann erneut einem PCR-Protokoll unterzogen. Hierbei binden die Primer an die komplementäre DNA-Matrize und der DNA-Strang wird von der Taq-Polymerase verlängert, bis anstelle eines dNTPs ein ddNTP eingebaut wird. Durch die nun fehlende Hydroxygruppe am 3'-Ende kann der Strang nicht mehr verlängert werden. Der Einbau eines ddNTPs geschieht zufällig, so dass ein Gemisch aus verschiedenen langen DNA-Strängen entsteht. Das 5'-Ende ist dabei jeweils identisch und das 3'-Ende farbstoffmarkiert. Die Proben wurden dann in Kapillaren injiziert und zur Untersuchung in den Applied Biosystems ABI Prism 3700 DNA-Analyzer gebracht. Die farbstoffmarkierten Fragmente sind negativ geladen und wandern der Größe nach geordnet zur Anode, wobei die kleinsten Fragmente am schnellsten wandern. Erreichen die Fragmente das Detektionsfenster, werden sie von einem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt und die entstandenen Signale von einer Kamera aufgezeichnet.

Die dabei entstandenen farbigen Schemata, oder Elektropherogramme, wurden in elektronischer Form als .ab1 Dateien übermittelt und konnten mit der Unipro UGENE Software betrachtet werden. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte manuell.

3 Ergebnisse

Für die vorliegende Arbeit wurden 13 DNA-Proben von Probanden aus der SU14813-Studie und 30 DNA-Proben aus Kolonkarzinomen untersucht. Hierbei wurden jeweils sechs Exons des VEGF-Rezeptors 2 (Exon 15, 16, 21, 23, 24 und 26) sowie zwei Exons des FLT3-Rezeptors, welche die häufige ITD und D835-Mutation beherbergen, mittels PCR amplifiziert. Die Erfolgskontrolle der PCR erfolgte durch Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 1,5%igem Agarosegel. Anschließend wurden die Produkte bidirektional (5'-3' und 3'-5') sequenziert und mit der Wildtyp-Sequenz verglichen.

Für die Mutationsanalyse der Proben wurde genomische DNA aus dem Tumorgewebe benötigt. Im Falle der Patientenproben aus der SU14813-Phase-I-Studie wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebe von einem Pathologen beurteilt und anschließend aus dem vorhandenen Material genomische DNA extrahiert. Die DNA der Kolonkarzinomproben lag bereits extrahiert vor.

Die folgende Tabelle zeigt die Merkmale der untersuchten Studienpatienten auf.

Probe	Diagnose	Therapieansprechen	Dosis	Zyklen	OD260/ OD280*
E1	NNR Karzinom	SD später PD	150	2	2,16
E2	NSCLC	PR	100	6	2,06
E3	alveoläres Weichteilsarkom	SD (fast PR)	250	1	1,97
E4	NNR Karzinom	SD später PD	150	2	1,48
E5	Kolonkarzinom	PD	100	3	1,86
E6	Kolonkarzinom	SD	100	4	1,97
E7	Sarkom	PD	200	2	2
E8	Sarkom	PD	200	2	1,95
E9	NET, VHL-Syndrom	SD	150	18	1,87
E10	NSCLC	NA	150	2	2,15
E11	Kolonkarzinom	PD	150	3	2,2
E12	Nierenzellkarzinom	PR	250	1	1,74
E13	Nierenzellkarzinom	SD	100	2	1,89

Tab.5: Charakteristika der untersuchten Studienproben

SD = stable disease, PD = progressive disease, PR = partial remission, NA = not available

NNR = Nebennierenrinde, NSCLC = Non small cell lung cancer, NET = Neuroendokriner Tumor,

VHL = Von-Hippel-Lindau * Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm, gemessen mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer

Die Kolonkarzinome wurden gemäß der TNM-Klassifikation eingeteilt. Hierbei beschreibt T (Tumor) die Ausbreitung des Primärtumors, N (Nodus) den Zustand der regionalen Lymphknoten und M (Metastasen) das Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen. Da die Proben alle histopathologisch untersucht wurden, konnte hier die pTNM-Klassifikation verwandt werden, wobei die Kategorien beider Klassifikationen sich entsprechen.

In der unten anstehenden Tabelle sind alle relevanten Abkürzungen der pTNM-Klassifikation aufgeführt (Wittekind, Meyer et al. 2010).

T	Primärtumor
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor infiltriert die Submukosa

pT2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
pT3	Tumor infiltriert die Subserosa bzw. das nichtperitonealisierte parakolische bzw. pararektale Gewebe
pT4	Tumor infiltriert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt andere Organe
N	Regionale Lymphknoten (Beurteilung von mindestens 12 Lymphknoten)
pNx	Regionale LK können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionalen LK-Metastasen
pN1	Metastasen in 1-3 parakolischen bzw. pararektalen LK
pN2	Metastasen in 4 oder mehr parakolischen bzw. pararektalen LK
M	Fernmetastasen
pMx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen vorhanden
pM1	Fernmetastasen vorhanden (unter Angabe des betroffenen Organs)

Tab.11: pTNM Klassifikation der Kolonkarzinome

Die untenstehende Tabelle enthält Informationen zu den Kolonkarzinomproben.

Probe	Geschlecht	Alter	KRAS-Mutation	Her-2-Mut.	Tumorklassifikation	OD260/ OD280**
P1	w	71	n	n	pT2,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,92
P2	w	65	n	n	pT3,pN0,pMx,L0,V0,G2	2
P3	w	59	Exon 2 Typ G12C	*	pT3,pN0,pMx,L0,V0,G3	1,8
P4	m	75	n	*	pT4,pN2,pM1,L1,V0	1,77
P5	w	73	n	*	*	1,84
P6	w	91	n	n	pT3,pN1,pMx,L1,V0,G2	1,82
P7	m	70	Exon 2 Typ G12A	n	pT3,pN0,pM1,L0,V1,G2	1,93
P8	w	68	n	n	pT2,pN1,pMx,L1,V0,G2	1,86
P9	w	80	Exon 2 Typ G12D	*	pT4,pN2,pM1,L1,V1,G2	1,84
P10	w	70	n	n	pT2,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,94

P11	m	71	n	*	*	1,81
P12	m	65	Exon 2 Typ G13D	*	*	1,85
P13	m	68	n	n	pT3,pN1,pMx,L1,V0,G2	1,87
P14	m	70	n	*	*	1,89
P15	w	62	n	n	pT3,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,91
P16	m	74	Exon 2 Typ G12R	n	pT3,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,93
P17	w	51	n	n	pT4,pN2,pM1,L1,V1,G2,R1	1,9
P18	m	83	n	n	pT2,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,8
P19	m	66	n	*	pT4,pN0,pMx,G2	1,96
P20	m	82	Exon 2 Typ G12V	*	pT3,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,92
P21	m	83	Exon 2 Typ G12A	*	pT3,pN1,pM1,L1,V1,G2	2,01
P22	m	70	n	n	pT2,pN2,pMx,L1,V0,G2	1,9
P23	m	74	n	*	pT2,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,87
P24	w	58	n	*	pT1,pN0,L0,V0,G2,R0	1,85
P25	w	87	n	n	pT4,pN0,pMx,L0,V0,G3	1,89
P26	w	52	n	*	pT3,pN0,L0,V0,G2	1,79
P27	m	96	Exon 2 Typ G12D	n	pT3,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,81
P28	w	94	Exon 2 Typ G12A	n	pT3,pN0,pMx,L0,V0,G2	1,88
P29	m	72	n	n	*	1,8
P30	m	60	n	n	pT4,pN2,pM1,L1,V1,G2	1,86

Tab.12: Charakteristika der Kolonkarzinomproben

w=weiblich, m=männlich, n=negativ, *=Daten nicht verfügbar

** Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm, gemessen mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer

3.1 VEGF-Rezeptor 2 Exon 15

Das zu untersuchende Exon 15 des VEGF-Rezeptors 2 wurde von jeder DNA-Probe mittels PCR amplifiziert, gereinigt und bidirektional sequenziert.

Die Amplifikation ergab ein Produkt mit einer Länge von 320 Basenpaaren und folgender Sequenz:

```

CAAGATGAAGGGCAGCATTATATTTTCTAAATTTCCCTGAAAACTTCACAGAC
TACATCATCATAAATGAGAATGATCGTTTTCTTCTCTGTTAGGCATTGTATTGA
AGGATGGGAACCGGAACCTCACTATCCGCAGAGTGAGGAAGGAGGACGAAGG
CCTCTACACCTGCCAGGCATGCAGTGTTCTTGGCTGTGCAAAAGTGGAGGCAT
TTTTCATAATAGAAGGTCAGTGGGATAAAAAAAAAAATGTGGTACATATACACCATG
GAATGCTATGCAGCCGTAAAAAGGAATCTGATCATGTCCTTTGCAGCTGC
  
```

Blau hinterlegt sind die Primersequenzen dargestellt, die violett hinterlegte Sequenz entspricht dem Wildtyp des Exons 15 und gelb hinterlegt findet sich die Base an der bereits durch Antonescu *et al.* eine Mutation nachgewiesen werden konnte. Die Mutation tritt an Position 2452 in der mRNA auf und verändert das Basentriplett von GAT zu GTT. Dies entspricht einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Valin. (Antonescu, Yoshida et al. 2009)

Bis auf Probe P21 zeigten alle Sequenzierungen den Wildtyp, von den Proben E5, E10, E13, P1 und P2 konnte jedoch keine saubere Sequenz erzeugt werden.

In der untenstehenden Abbildung ist repräsentativ der Hotspot der oben genannten Mutation als Wildtyp-Sequenz aufgezeigt, keine der untersuchten Proben zeigte hier eine Mutation.

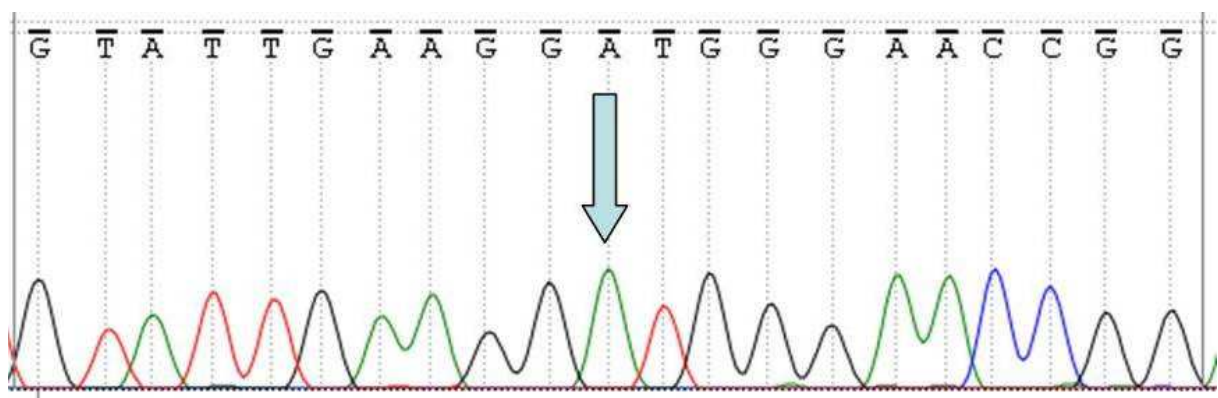


Abb.5: Basensequenz Wildtyp Exon 15

Die Probe P21 eines Kolonkarzinoms zeigte wiederholt eine Mutation, jedoch liegt diese im Intron zwischen Exon 15 und Exon 16 an Position 23710 im Gen.

Die folgende Abbildung zeigt die Mutation in der Vorwärts- sowie Rückwärtssequenzierung.

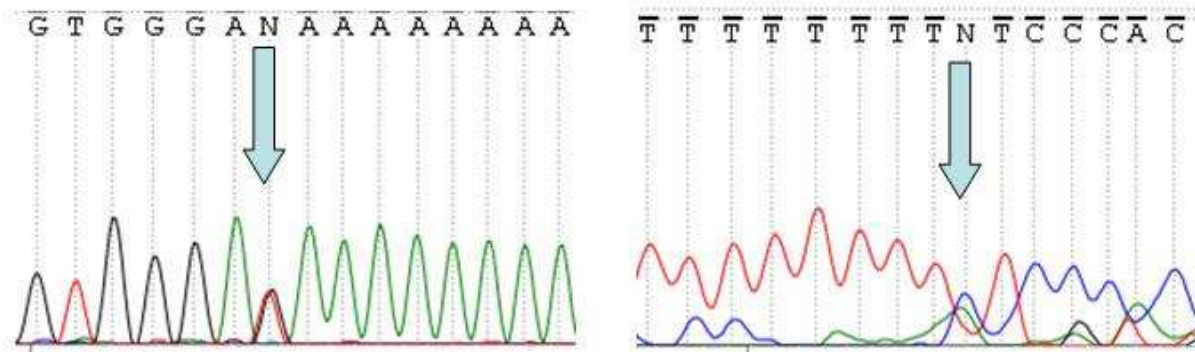


Abb.6: Basensequenz Probe P21 Exon 15

3.2 VEGF-Rezeptor 2 Exon 16

Das Exon 16 des VEGF-Rezeptors 2 wurde von jeder DNA-Probe untersucht. Durch PCR Amplifikation entstand ein Produkt mit einer Länge von 447 Basenpaaren. Dieses Produkt wurde anschließend gereinigt und bidirektional sequenziert. Folgende Sequenz wurde ermittelt und entspricht dem Wildtyp:

```

CCAGCCTGGAACATAGAAAGAAACCCTGTCTCTAAAAATAAATAAATAAATAAAT
AAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATTAAATTCAAAAAAGAATTCTGTAGACT
CCATTCAAGTTACGGGTGTGTAAGTGTGCTCTAGGATTTTTCCAAGTTGGTA
AGCTTGGGATTTTGCTTTAGTGCTAAAATTTGTCATCTTACAAACAAAAGTATA
AGTTTCCAAGTGTGATACTCATTCAATTGTGCTTTCCAGGTGCCAGGAAAAG
ACGAACTTGGAATCATTATTCTAGTAGGCAAGGCGGTGATTGCCATGTTCTTC
TGGCTACTTCTTGTCATCATCTACGGACCGTTAAGCGGGTAAAAATAAATTC
CCTTCTGCCCATGCACATTGGTTTTTCATGATTAATGAAAAC TGACTGGGGTTCTT
TGAGTTG
  
```

Blau hinterlegt sind die Primersequenzen dargestellt, die violett hinterlegte Sequenz entspricht dem Wildtyp des Exons 16 und gelb hinterlegt findet sich die Base an der bereits durch Antonescu *et al.* eine Mutation nachgewiesen werden konnte. Die Mutation tritt an Position 2614 in der mRNA auf und verändert das Basentriplett von ACG zu AGG. Dies entspricht einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Arginin. (Antonescu, Yoshida *et al.* 2009)

Alle Proben zeigten den Wildtyp, von den Proben E1-E6, E9-E13, P4, P5 und P14 konnte keine saubere Sequenz erzeugt werden.

In der untenstehenden Abbildung ist repräsentativ der Hotspot als Wildtyp-Sequenz aufgezeigt, alle untersuchten Proben zeigten diese Basenfolge.

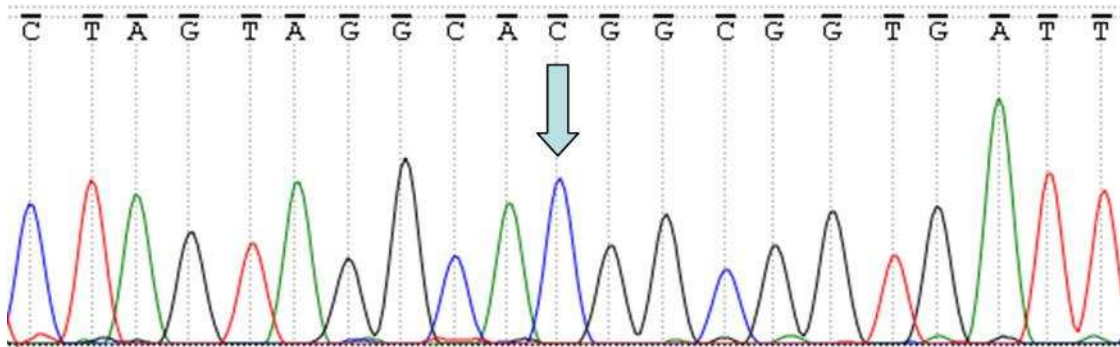


Abb. 7: Basensequenz Wildtyp Exon 16

3.3 VEGF-Rezeptor 2 Exon 21

Mittels PCR wurde Exon 21 des VEGF-Rezeptors 2 von jeder DNA-Probe amplifiziert, gereinigt und bidirektional sequenziert.

Sie Sequenzierung ergab ein Produkt mit einer Länge von 210 Basenpaaren. Das Produkt zeigte folgende, dem Wildtyp entsprechende, Sequenz:

```
GGAGTTTGTTCCTTTGCTTTTTTATAGACCAAAGGGGCACGATTCCGTCAA
GGGAAAGACTACGTTGGAGCAATCCCTGTGGATCTGAAACGGCGCTTGGACAG
CATCACCAGTAGCCAGAGCTCAGCCAGCTCTGGATTTGTGGAGGAGAAGTCCC
TCAGTGTAGTAGAAGAAGAGGAAGGTAAGTACTGGCTAGTGCTTCCTGCATGC
```

Blau hinterlegt sind die Primersequenzen dargestellt, die violett hinterlegte Sequenz entspricht dem Wildtyp des Exons 21 und gelb hinterlegt finden sich die Basen an denen bereits durch Ding *et al.* Mutationen nachgewiesen werden konnten. Die Mutationen treten an Position 3219 und 3253 in der mRNA auf und verändern die Basentriplets von GCC zu TCC bzw. AGT zu ACT. Dies entspricht einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Serin bzw. Serin zu Threonin. (Ding, Getz et al. 2008)

Alle Proben konnten sequenziert werden und zeigten, bis auf Probe P2, den Wildtyp. In den untenstehenden Abbildungen ist repräsentativ der jeweilige Hotspot als Wildtyp-Sequenz aufgezeigt. Alle Untersuchten wiesen an dieser Stelle die Wildtyp-Basenfolge auf.

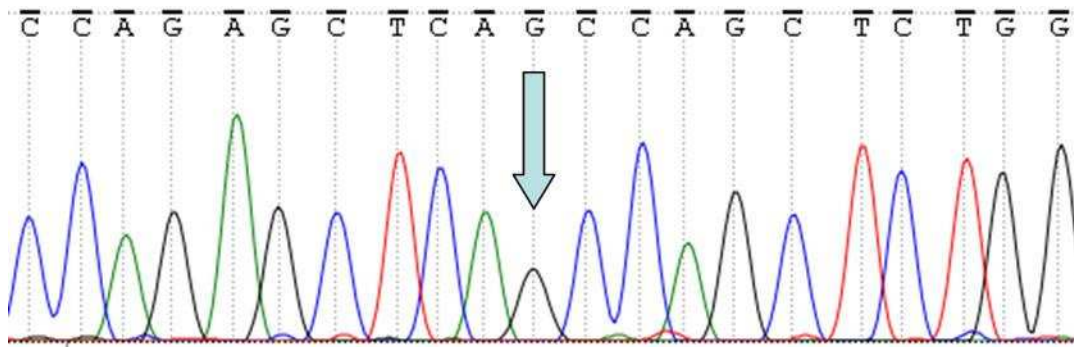


Abb.8: Basensequenz Wildtyp Exon 21 Position 3219

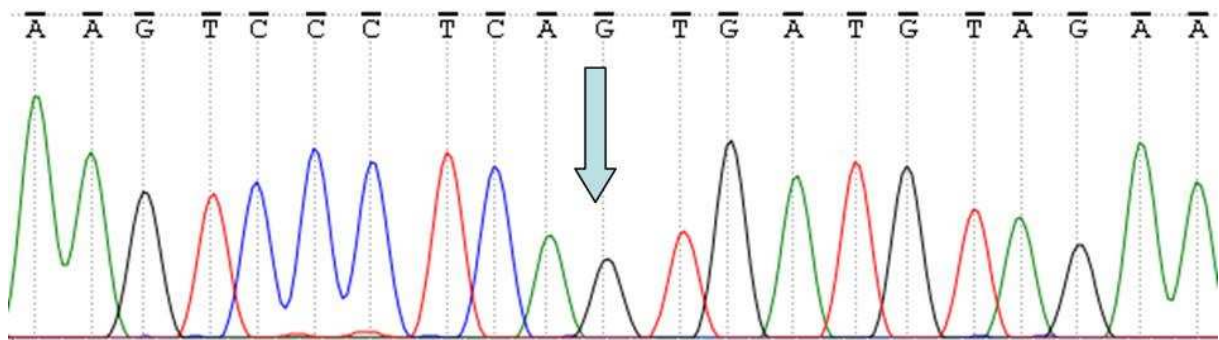


Abb.9: Basensequenz Wildtyp Exon 21 Position 3253

Die Probe P2 eines Kolonkarzinoms zeigte wiederholt eine Mutation, jedoch betrifft diese die dritte Base in einem Kodon und hat somit keinen Aminosäureaustausch zur Folge. Die folgende Abbildung zeigt die Mutation in der Vorwärts- sowie Rückwärtssequenzierung.

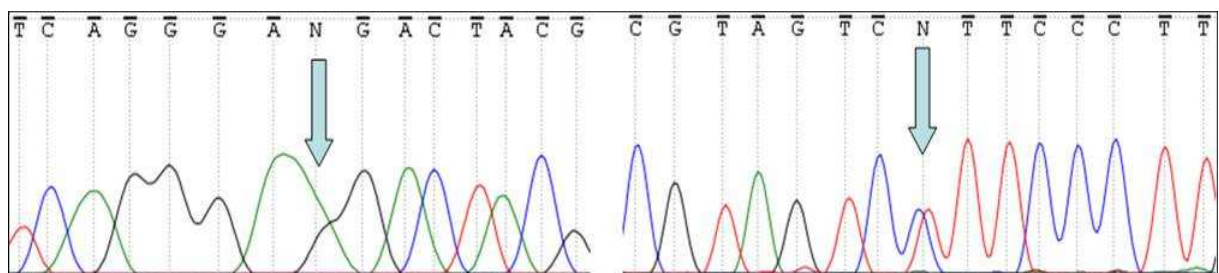


Abb.10: Basensequenz Probe P2 Exon 21

3.4 VEGF-Rezeptor 2 Exon 23

Das zu untersuchende Exon 23 des VEGF-Rezeptors 2 weist eine gewisse Sequenzhomologie zur FLT3-Mutation D835 auf. Jede DNA-Probe wurde mittels PCR amplifiziert, gereinigt und bidirektional sequenziert. Die Amplifikation ergab ein Produkt mit einer Länge von 309 Basenpaaren und folgender Sequenz:

```
TGGCTTTCTGATGTGGGATTTTTTTTTGATGCATGAGGTCACAACAGATGTGAAA
GAGATCAGCTGTGCCGAGACCTAATGCACACATGATTCTCTTTGCAGTGTATCC
ACAGGGACCTGGCGGCACGAAATATCCTCTTATCGGAGAAGAACGTGGTTAAA
ATCTGTGACTTTGGCTTGGCCCGGGATATTTATAAAGATCCAGATTATGTCAGA
AAAGGAGATGTAAGTTTCAAATATGAACCCAGTGCTTGGTTAAGTAACAGAATTA
AAACTCCTCGTAGAGAGCTTCAGGACCTGTGTTCAGGA
```

Blau hinterlegt sind die Primersequenzen dargestellt, die violett hinterlegte Sequenz entspricht dem Wildtyp des Exons 23. Von den Proben E1, E10 und E13 konnte keine saubere Sequenz erzeugt werden. In allen anderen untersuchten Proben konnte keine Mutation nachgewiesen werden, die Proben zeigten somit den oben beschriebenen Wildtyp.

3.5 VEGF-Rezeptor 2 Exon 24

Von jeder DNA-Probe wurde Exon 24 des VEGF-Rezeptors 2 untersucht. Hierzu wurde das unten aufgeführte Genfragment mittels PCR amplifiziert, gereinigt und bidirektional sequenziert. Das Amplifikat weist eine Länge von 304 Basenpaaren auf und entspricht dem Wildtyp. Im Folgenden ist die Basenfolge des Produktes dargestellt.

```
TTCAGGACCTGTGTTCAGGAACAGAGGAAGTTTTTTTCTTCAGATATTTGCTAAT
TTGGGTTCTGAATCCTTGTCTTCTACCCCTGTAGGCTCGCCTCCCTTTGAAATG
GATGGCCCCAGAAACAATTTTTGACAGAGTGACACAATCCAGAGTGACGTCTG
GTCTTTTGGTGTGTTTGTCTGTGGGAAATATTTTCCTTAGGTAAGTCATTTCTTTTT
GTCCTTCCATCCAGACTCCAAAGAGGAAGACAAAAGTTGTCTTTTCCTCTCCTG
TACTTCATGTCTATCAGGCAAACTTCTCGGA
```

Blau hinterlegt sind die Primersequenzen dargestellt, die violett hinterlegte Sequenz entspricht dem Wildtyp des Exons 24 und gelb hinterlegt findet sich die Base an der bereits durch Antonescu *et al.* eine Mutation nachgewiesen werden konnte. Die Mutation tritt an Position 3495 in der mRNA auf und verändert das Basentriplett von GCT zu ACT. Dies entspricht einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin. (Antonescu, Yoshida et al. 2009)

Von den Proben E1, E2, E13, P4 und P14 konnte keine saubere Sequenz erzeugt werden. Alle untersuchten Proben zeigten den Wildtyp.

In der untenstehenden Abbildung ist repräsentativ der Hotspot als Wildtyp-Sequenz aufgezeigt. In keiner Probe konnte eine Mutation nachgewiesen werden, somit zeigten alle untersuchten Proben diese Basenfolge.

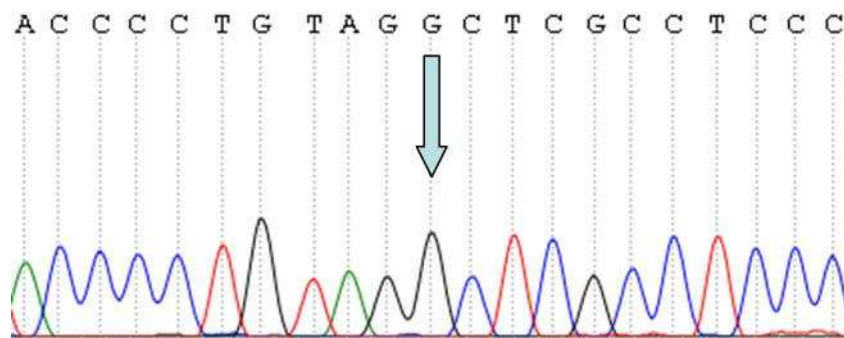


Abb.11: Basensequenz Wildtyp Exon 24

3.6 VEGF-Rezeptor 2 Exon 26

Die Amplifikation des Exons 26 des VEGF-Rezeptors 2 ergab ein Produkt mit einer Länge von 155 Basenpaaren. Das zu untersuchende Produkt wurde anschließend gereinigt und bidirektional sequenziert. Es zeigte sich folgende, dem Wildtyp entsprechende Sequenz:

```
TGAAATCAGTGTGTTTGGCTTCTCTAGGTACCAGACCATGCTGGACTGCTGGCACG
GGAGCCCAGTCAGAGACCCACGTTTTTCAGAGTTGGTGGAAACATTTGGGAAAT
CTCTTGCAAGCTAATGCTCAGCAGGTTTGTACCTCCATCCAAGAAGC
```

Blau hinterlegt sind die Primersequenzen dargestellt, die violett hinterlegte Sequenz entspricht dem Wildtyp des Exons 26 und gelb hinterlegt finden sich die Basen an

denen bereits durch Ding *et al.* Mutationen nachgewiesen werden konnten. Die Mutationen treten an Position 3720 und 3736 in der mRNA auf und verändern die Basentriplets von CTG zu ATG bzw. GGG zu GAG. Dies entspricht einem Aminosäureaustausch von Lysin zu Methionin bzw. Glycin zu Glutaminsäure. (Ding, Getz *et al.* 2008)

Die Sequenzierung gelang bei allen Proben. In keiner der untersuchten Proben konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Alle Proben zeigten den Wildtyp.

In der untenstehenden Abbildung ist repräsentativ der jeweilige Hotspot als Wildtyp-Sequenz aufgezeigt, alle untersuchten Proben zeigten diese Basenfolge.

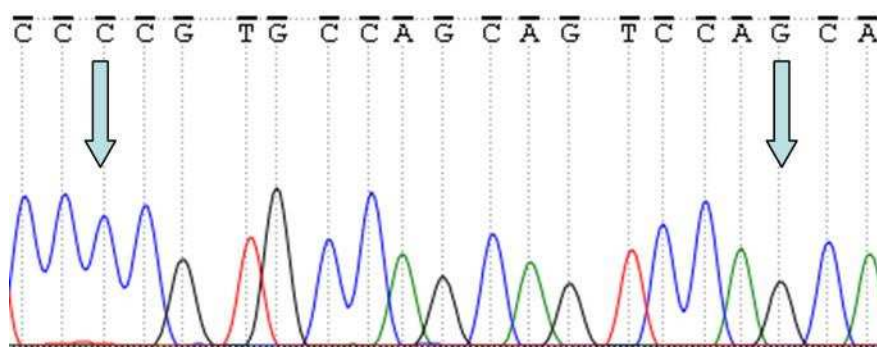


Abb.12: Basensequenz Wildtyp Exon 26

3.7 FLT3-Rezeptor Mutation D835

Der zu untersuchende Abschnitt des FLT3-Rezeptors wurde von jeder DNA-Probe mittels PCR amplifiziert, gereinigt und bidirektional sequenziert. Die Amplifikation ergab ein Produkt mit einer Länge von 114 Basenpaaren und folgender Sequenz:

```
CCGCCAGGAACGTGCTTGTACCCACGGGAAAGTGGTGAAGATATGTGACTTT
GGATTGGCTCGAGATATCATGAGTGATTCCAACATATGTTGTACGGGGCAATGTG
AGGCTGC
```

Blau hinterlegt sind die Primersequenzen dargestellt, die violett hinterlegte Sequenz entspricht dem Wildtyp der Sequenz und gelb hinterlegt finden sich die Basen an denen bereits durch Yamamoto *et al.* eine Mutation nachgewiesen werden konnte.

Die Mutation verändert das Basentriplett an Position 835 von GAT zu CAT, TAT oder GTT. Dies entspricht einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Histidin, Tyrosin oder Valin. (Yamamoto, Kiyoi et al. 2001; Griffith, Black et al. 2004)

Die Sequenzen aller Proben konnte sauber dargestellt werden und zeigten den Wildtyp.

In der untenstehenden Abbildung ist repräsentativ der jeweilige Hotspot als Wildtyp-Sequenz aufgezeigt. In keiner der untersuchten Proben konnte hier eine Veränderung der Basenfolge nachgewiesen werden.

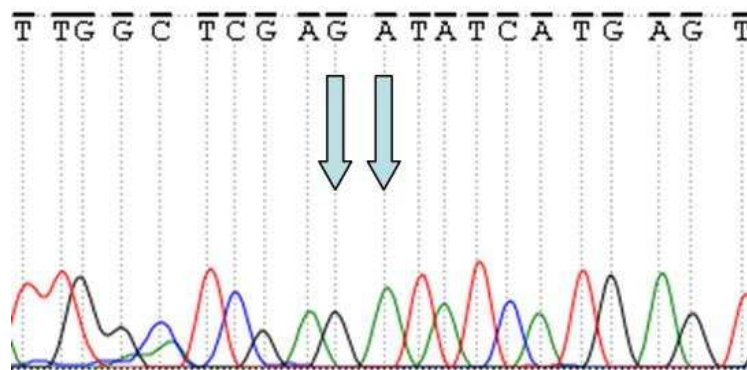


Abb.13: Basensequenz Wildtyp FLT3-Mutation D835

3.8 FLT3-Rezeptor interne Tandemduplikation

Ein Abschnitt im Gen des FLT3-Rezeptors, der die Tandemduplikation beherbergen kann, wurde amplifiziert. Die PCR-Produkte jeder DNA-Probe wurden anschließend gereinigt und bidirektional sequenziert. Das Produkt zeigt eine Länge von 328 Basenpaaren und folgende Sequenz entspricht dem Wildtyp:

```
CAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTACAGGTGACCGGCTCCTCAGAT
AATGAGTACTTCTACGTTGATTTAGAGAAATATGAATATGATCTCAAATGGGAGT
TTCCAAGAGAAAATTTAGAGTTTGGTAAGAATGGAATGTGCCAAATGTTTCTGCA
GCATTTCTTTTCCATTGGAAAATCTTTAAAATGCACGTACTCACCATTTGTCTTTG
CAGGGAAGGTACTAGGATCAGGTGCTTTTGGAAAAGTGATGAACGCAACAGCT
TATGGAATTAGCAAACAGGAGTCTCAATCCAGGTTGCCGTCAAATGCTGAAA
G
```

Blau hinterlegt sind die Primersequenzen dargestellt, die violett hinterlegte Sequenz entspricht dem Wildtyp der Sequenz. Die internen Tandemduplikationen können

durch Duplikation verschiedener Fragmente bis zu einer Länge von 400 Basenpaaren entstehen. Der Leserahmen wird dabei beibehalten. (Nakao, Yokota et al. 1996; Schnittger, Schoch et al. 2002)

Alle Proben wurden mittels Gelelektrophorese untersucht. Ein positiver Befund würde sich wie in Abb.13 gezeigt darstellen.

Folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese einer Probe mit interner Tandemduplikation und einer Probe die den Wildtyp aufweist.

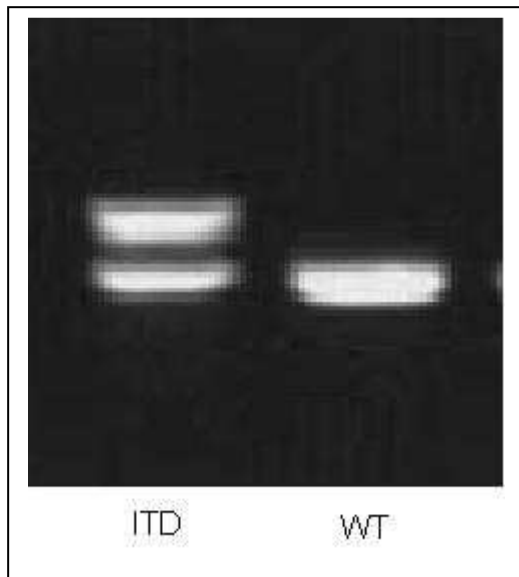


Abb. 14: Beispielhafte Gelelektrophorese

ITD: FLT3-interne Tandemduplikation

WT: FLT3-Wildtyp

Modifiziert nach Schnittger et al.

(Schnittger, Schoch et al. 2002)

Alle Proben wurden zusammen mit einem Längenstandard in einem 1,5%igem Agarosegel untersucht.

Folgende Abbildung zeigt die Gelelektrophorese der Proben P1 bis E30.

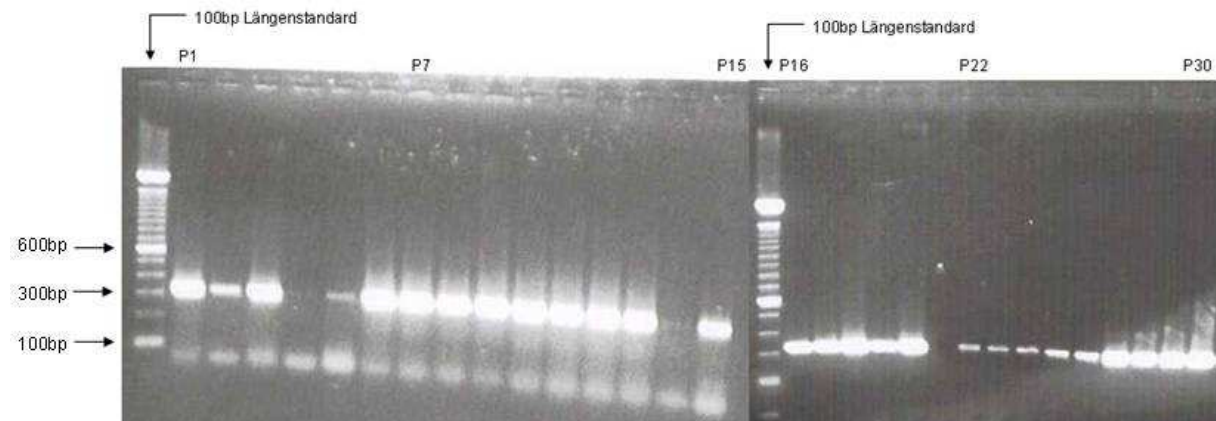


Abb. 15: Agarose-Gelelektrophorese der Proben P1-P30

Die untenstehende Abbildung zeigt die Gelelektrophorese der Proben E1-13.

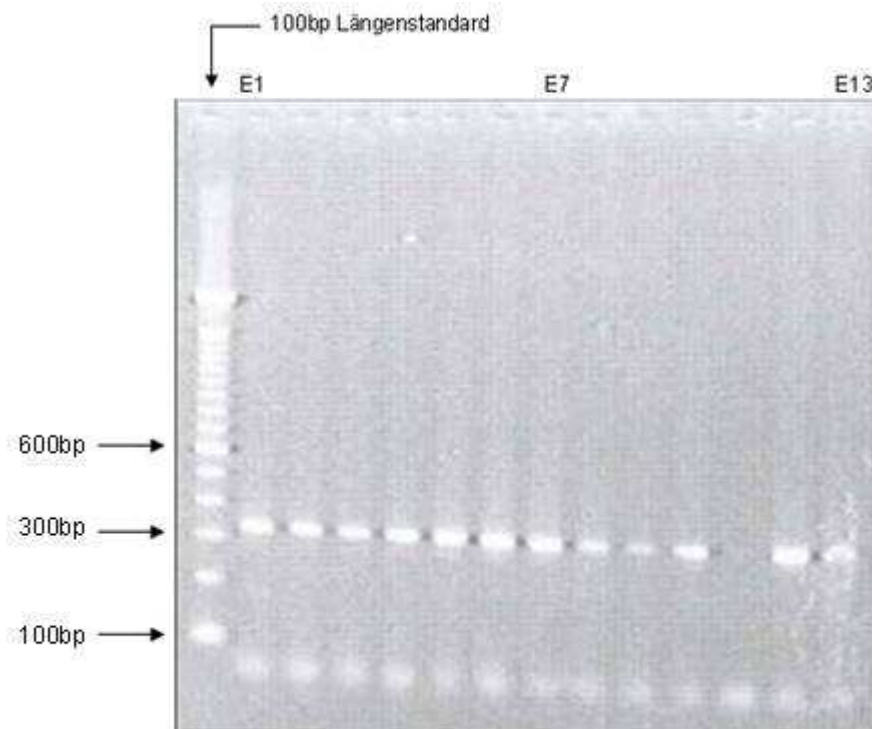


Abb. 16: Agarose-Gelelektrophorese der Proben E1-13

Von den Proben P4, P14, P21 und E11 ließ sich keine klar abgrenzbare Bande in der Gelelektrophorese darstellen. Alle anderen untersuchten Proben zeigten eine Bande, die der erwarteten Größe des Produktes (328bp) entspricht. Eine Doppelbande konnte bei keiner der untersuchten Proben beobachtet werden und somit ließ sich keine interne Tandemduplikation im Gen des FLT3-Rezeptors nachweisen.

4 Diskussion

Rezeptortyrosinkinasen sind zentrale Vermittler des zellulären Wachstums, der Zellteilung und des Überlebens von Zellen (Ullrich and Schlessinger 1990; Blume-Jensen and Hunter 2001). In der Pathogenese vieler Erkrankungen sind Rezeptortyrosinkinasen häufig involviert. Etwas mehr als die Hälfte aller bekannten RTKs wurden wiederholt mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Blume-Jensen and Hunter 2001).

RTKs werden auch in Tumorzellen exprimiert und treiben dort, vor allem durch Überexpression und aktivierende Mutationen, Tumorwachstum und Metastasierung voran (Hanahan and Weinberg 2000; Blume-Jensen and Hunter 2001). Deshalb bietet die Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen vielversprechende Therapieansätze (Patyna, Laird et al. 2006).

Sunitinib und SU14813 sind zwei Multityrosinkinase-Inhibitoren, die neben anderen Rezeptortyrosinkinasen wie FLT3 und PDGFR, vor allem den VEGF-Rezeptor 2 inhibieren (Patyna, Laird et al. 2006). SU14813 ist ein neuer Multityrosinkinase-Inhibitor mit vertretbarem Nebenwirkungsprofil und beachtlicher klinischer Wirkung (Fiedler, Giaccone et al. 2010). Einige Mutationen, in den für Rezeptortyrosinkinasen kodierenden Genen, können sich erheblich auf den Therapieerfolg auswirken. So ist bekannt, dass leukämische Zellen, welche die BCR-ABL-Mutation tragen, durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib gehemmt oder in die Apoptose gezwungen werden können. Wohingegen das Medikament andere Zellen ohne diese Mutationen nur marginal schädigt (Druker, Tamura et al. 1996). Einige weitere Mutationen beeinflussen auch die Wirksamkeit von Sunitinib und SU14813. Die interne Tandemduplikation (ITD) und die Punktmutation an der Aminosäureposition D835 stellen die häufigsten der Mutationen in akuten myeloischen Leukämien dar (Yokota, Kiyoi et al. 1997; Yamamoto, Kiyoi et al. 2001). Das Wachstum leukämischer Zellen der akuten myeloischen Leukämie lässt sich *in vitro* durch Sunitinib stärker hemmen, wenn diese typische Mutationen tragen (Ikezoe, Nishioka et al. 2006).

In ähnlicher Weise konnten Patyna *et al.* zeigen, dass FLT3-ITD-Mutation tragende Zellen sich durch SU14813 stärker inhibieren lassen als Zellen des Wildtyps (Patyna, Laird et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden Tumorproben aus Patienten, welche mit SU14813 behandelt wurden und zufällig ausgewählte Kolonkarzinomproben auf Mutationen im VEGF-Rezeptor 2, auch KDR (kinase insert domain rezeptor) genannt, und dem FLT-3-Rezeptor geprüft. Hierbei wurden jeweils spezifische Exons beider Gene untersucht. Diese Gen-Abschnitte zeigten bereits in verschiedenen anderen Untersuchungen Mutationen (Ding, Getz et al. 2008; Antonescu, Yoshida et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen Therapieerfolg mit SU14813 und Mutationen im VEGFR-2 sowie FLT-3-Rezeptor erörtert. Weiterhin wurden Kolonkarzinomproben auf das Vorhandensein von Mutationen in den oben genannten Genen untersucht.

Ding *et al.* untersuchten 188 Adenokarzinome der Lunge, wobei die Proben jeweils mindestens 70% Tumorgehalt aufweisen mussten. Es wurde eine whole-genome-amplification mittels QIAGEN REPLI-g durchgeführt. Dabei wurden in zwei Exons Punktmutationen im VEGFR-2-Gen entdeckt.

In Exon 21 führten diese Mutationen an Basenposition 3252 bzw. 3219 zu einem Aminosäureaustausch von Serin nach Threonin bzw. von Alanin nach Serin (Ding, Getz et al. 2008).

Exon 21 konnte bei allen in dieser Arbeit untersuchten Proben sequenziert werden, keine der Proben zeigte die oben genannten Mutationen. In einer Probe ließ sich eine Mutation in Exon 21 nachweisen, jedoch betraf diese die dritte Base eines Kodons und hatte somit keinen Aminosäureaustausch zur Folge. Alle anderen untersuchten Proben wiesen den Wildtyp auf.

In Exon 26 bedingten die Mutationen an Basenposition 3736 bzw. 3720 einen Aminosäureaustausch von Glycin nach Glutamat bzw. von Leucin nach Methionin (Ding, Getz et al. 2008). Alle untersuchten Proben konnten erfolgreich sequenziert werden und zeigten weder die bekannten, noch andere relevante Mutationen.

In der von Antonescu *et al.* durchgeführten Untersuchung wurden ebenfalls Mutationen im VEGFR-2-Gen entdeckt. Hierbei wurde DNA aus 39 Angiosarkomen sequenziert, in vier verschiedenen Proben zeigten sich drei verschiedene Mutationen. Zwei dieser Mutationen wurden außerdem in Vektoren kloniert. An den somit transfizierten COS-7-Zellen ließ sich dadurch eine Autophosphorylierung des VEGFR-2 auch ohne rhVEGF Stimulation nachweisen, welche beim Wildtyp nicht

vorhanden war. Diese Autoaktivierung der beiden mutierten Isoformen konnte durch Sunitinib aufgehoben werden (Antonescu, Yoshida et al. 2009)

Eine Punktmutation im Exon 15 an Basenposition 2452 führte zu einer Veränderung der Aminosäuren von Aspartat nach Valin. Von den von uns untersuchten Tumorproben konnte nicht in jedem Fall eine saubere Sequenz erzeugt werden.

In den erfolgreichen Sequenzierungen zeigten alle Proben, bis auf eine, den Wildtyp. Die gefundene Mutation in Probe P21 liegt im Intron zwischen Exon 15 und Exon 16 und hat höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Expression oder Aktivität des VEGFR-2.

Eine weitere von Antonescu *et al.* entdeckte Mutation befand sich im Exon 16 an Basenposition 2614. Anstelle der durch den Wildtyp kodierten Aminosäure Threonin wurde Arginin eingebaut.

In der dritten bekannten Veränderung im Exon 24 fand sich eine Punktmutation an Basenposition 1065, daraus ergab sich eine Veränderung der Aminosäuren von Alanin nach Threonin (Antonescu, Yoshida et al. 2009)

Alle von uns erfolgreich sequenzierten Proben wiesen in Exon 16 und Exon 24 keine Veränderungen vom Wildtyp auf.

Aus zahlreichen Untersuchungen sind genetische Alterationen im FLT3-Rezeptor bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie bekannt. Die beiden häufigsten sind hierbei die interne Tandemduplikation (ITD) und die Punktmutation an Position D835 (Nakao, Yokota et al. 1996; Yamamoto, Kiyoi et al. 2001). Das Vorhandensein einer oder beider dieser Mutationen führt zu Autophosphorylierung des Rezeptors und damit zu liganden-unabhängigem Zellwachstum (Kiyoi, Towatari et al. 1998; Hayakawa, Towatari et al. 2000; Tse, Mukherjee et al. 2000; Abu-Duhier, Goodeve et al. 2001; Yamamoto, Kiyoi et al. 2001).

Die erstmals von Nakao *et al.* beschriebene ITD findet sich in 20-25% der AML Patienten (Nakao, Yokota et al. 1996), während sich die aktivierenden Punktmutationen bei 7-10% nachweisen lassen. Von der Punktmutation am häufigsten betroffen ist hierbei die Asparaginsäure an Position 835.

Die Gelelektrophorese, der von uns untersuchten Proben, ließ keine typische Doppelbande erkennen, somit konnte keine FLT3-ITD nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Proben auf die Mutation an Position D835 und dem durch Sequenzhomologien verwandten Exon 23 des VEGFR-2 Gens fand sich jeweils der

Wildtyp. Weder die vorbeschriebenen, noch andere relevante Mutationen konnten ermittelt werden.

Da das zu untersuchende Material häufig knapp bemessen war, wurde von jedem Paraffinblock nur ein Schnitt histologisch beurteilt und teilweise senkrechte Tumorstanzen entnommen. So stand nur wenig Material zur Verfügung, in dem unter Umständen das Normalgewebe, also der Wildtyp dominiert, womit falsch negative Ergebnisse bei der Sequenzierung möglich wären.

Einige der Proben konnten nicht adäquat sequenziert werden. Das Alter der jeweiligen Proben könnte hierbei Einfluss genommen haben. Zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion waren die formalinfixierten Paraffinblöcke 5 bis 15 Jahre alt. Verschiedenste Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei der Fixierung durch Formalin zu DNA-Denaturierung kommen kann. Vor allem an AT-lastigen Bereichen wird der Doppelstrang destabilisiert und bietet Schwachpunkte für weitere chemische Interaktionen (Tokuda, Nakamura et al. 1990; Srinivasan, Sedmak et al. 2002).

Williams *et al.* konnten zeigen, dass etwa eine Mutation pro 500 Basen in formalinfixiertem Material auftreten kann. Diese Frequenz von Artefakten übersteigt die Fehlerrate der Taq-DNA-Polymerase. Diese Artefakte könnten direkte Folge der Schädigung durch Formalin sein oder aus der Quervernetzung von Cytosin-Nukleotiden resultieren, wobei die Taq-DNA-Polymerase diese Nukleotide dann nicht mehr erkennt (Williams, Ponten et al. 1999). Diese Phänomene könnten die zufällig gefundenen Mutationen erklären, aber auch der Grund dafür sein, dass sich von manchen Proben keine Sequenz erzeugen ließ.

Somit kann das unterschiedliche Therapieansprechen der untersuchten Patienten aus der SU14813 Studie (siehe Tabelle 5 unten) nicht anhand von Mutationen in den von uns untersuchten Gen-Abschnitten erklärt werden.

Probe	Diagnose	Therapieansprechen	Dosis	Zyklen	OD260/ OD280*
E1	NNR Karzinom	SD später PD	150	2	2,16
E2	NSCLC	PR	100	6	2,06
E3	alveoläres Weichteilsarkom	SD (fast PR)	250	1	1,97
E4	NNR Karzinom	SD später PD	150	2	1,48
E5	Kolonkarzinom	PD	100	3	1,86
E6	Kolonkarzinom	SD	100	4	1,97
E7	Sarkom	PD	200	2	2
E8	Sarkom	PD	200	2	1,95
E9	NET, VHL-Syndrom	SD	150	18	1,87
E10	NSCLC	NA	150	2	2,15
E11	Kolonkarzinom	PD	150	3	2,2
E12	Nierenzellkarzinom	PR	250	1	1,74
E13	Nierenzellkarzinom	SD	100	2	1,89

Tab.5: Charakteristika der untersuchten Studienproben

SD = stable disease, PD = progressive disease, PR = partial remission, NA = not available

NNR = Nebennierenrinde, NSCLC = Non small cell lung cancer, NET = Neuroendokriner Tumor,

VHL = Von-Hippel-Lindau * Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm, gemessen mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer

Anhand von Tabelle 5 lässt sich weiterhin erkennen, dass in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich Patienten untersucht wurden die meist nur über wenige Zyklen und mit geringem Erfolg behandelt wurden. Einige der Patienten aus der SU14813 Studie zeigten jedoch ein gutes Therapieansprechen über einen längeren Zeitraum (Fiedler, Giaccone et al. 2010). Folglich besteht die Chance, dass im Tumormaterial von Patienten die länger behandelt wurden und darauf gut ansprachen, eher Mutationen zu finden sind die den Behandlungserfolg erklären könnten. Die Untersuchung des Tumormaterials dieser Patienten war jedoch aus verschiedensten Gründen nicht möglich.

Auch in den sequenzierten Proben aus Kolonkarzinomen konnte keine der beschriebenen Mutationen nachgewiesen werden. Da sich jedoch einige der Mutationen bereits als sensibel auf die Behandlung mit Sunitinib bzw. SU14813 gezeigt haben, könnten diese genetischen Veränderungen Einfluss auf die jüngsten Studien haben. Bei den aktuellen Untersuchungen wird die klinische Wirksamkeit von Sunitinib in Kombination mit FOLFIRI oder SU14813 in Kombination mit Docetaxel bei der Behandlung des Kolonkarzinoms und anderer solider Tumoren überprüft (de Jonge, Dumez et al. 2011; Starling, Vazquez-Mazon et al. 2011).

Dies schließt jedoch die Wirkung von SU14813 bei autoaktivierten Mutanten nicht aus, wie bereits anhand der FLT3-ITD und den von Antonescu *et al.* gefundenen Mutation gezeigt wurde (Patyna, Laird et al. 2006; Antonescu, Yoshida et al. 2009). Aufgrund des ähnlichen Wirkspektrums der beiden Multityrosinkinase-Inhibitoren lässt sich außerdem vermuten dass SU14813, ebenso wie Sunitinib, die von Antonescu *et al.* beschriebenen mutierten Isoformen des VEGFR-2 wirksam hemmen kann (Antonescu, Yoshida et al. 2009).

Obwohl die in dieser Arbeit untersuchten Proben keine Mutationen aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass autoaktivierende Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen großen Einfluss auf die klinische Wirksamkeit von Multityrosinkinase-Inhibitoren haben. Die Häufigkeit und Auswirkung solcher genetischer Veränderungen könnte Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Tumorproben auf das Vorhandensein von Mutationen im VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2) sowie im FMS-like tyrosine kinase 3 Rezeptor (FLT3-Rezeptor) untersucht. Ziel der Arbeit war es einen Zusammenhang herzustellen, zwischen Mutationen in den genannten Genen und dem Therapieerfolg durch Multityrosinkinase-Inhibitoren. Von den 43 untersuchten Proben stammten 13 von Patienten die im Rahmen einer Phase I Studie mit dem neuartigen Multityrosinkinase-Inhibitor SU14813 behandelt wurden und nach RECIST-Kriterien unterschiedlich gut auf das Medikament ansprachen. Die restlichen 30 Proben entstammten zufällig ausgewählten Kolonkarzinomen.

Hierzu wurde zunächst DNA aus den zu untersuchenden Proben extrahiert um ausgewählte Exons mittels Polymerase-Kettenreaktion zu vervielfältigen. Die zu untersuchenden Exons wurden anschließend sequenziert oder mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Lediglich in zwei Proben konnte im VEGFR-2 Gen eine Punktmutation nachgewiesen werden. Eine der Mutationen lag im Intron Bereich zwischen zwei Exons und die andere betraf die dritte Base eines Kodons. Beide Mutationen führen zu keinem Aminosäureaustausch und sind damit funktionell nicht relevant. Das unterschiedliche Therapieansprechen der Studienpatienten auf den Multityrosinkinase-Inhibitoren SU14813 lässt sich demnach nicht durch Mutationen in den untersuchten Genen zurückführen.

6 Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F. M., A. C. Goodeve, et al. (2001). "Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia." *Br J Haematol* **113**(4): 983-988.
- Antonescu, C. R., A. Yoshida, et al. (2009). "KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors." *Cancer Res* **69**(18): 7175-7179.
- Bellomo, D., J. P. Headrick, et al. (2000). "Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia." *Circ Res* **86**(2): E29-35.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." *Nature* **411**(6835): 355-365.
- Casali, P. G., L. Jost, et al. (2008). "Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* **19** Suppl 2: ii35-38.
- Chow, L. Q. and S. G. Eckhardt (2007). "Sunitinib: from rational design to clinical efficacy." *J Clin Oncol* **25**(7): 884-896.
- de Jonge, M. J., H. Dumez, et al. (2011). "Phase I safety and pharmacokinetic study of SU-014813 in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumours." *Eur J Cancer*.
- Debiec-Rychter, M., R. Sciot, et al. (2006). "KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours." *Eur J Cancer* **42**(8): 1093-1103.
- Ding, L., G. Getz, et al. (2008). "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma." *Nature* **455**(7216): 1069-1075.
- Druker, B. J., S. Tamura, et al. (1996). "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells." *Nat Med* **2**(5): 561-566.
- Eskens, F. A. and J. Verweij (2006). "The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) targeting angiogenesis inhibitors; a review." *Eur J Cancer* **42**(18): 3127-3139.
- Faivre, S., C. Delbaldo, et al. (2006). "Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer." *J Clin Oncol* **24**(1): 25-35.
- Faivre, S., G. Demetri, et al. (2007). "Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development." *Nat Rev Drug Discov* **6**(9): 734-745.
- Fiedler, W., G. Giaccone, et al. (2010). "Phase I trial of SU14813 in patients with advanced solid malignancies." *Ann Oncol*.
- Fukuoka, M., S. Yano, et al. (2003). "Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]." *J Clin Oncol* **21**(12): 2237-2246.
- Gotink, K. J. and H. M. Verheul (2010). "Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?" *Angiogenesis* **13**(1): 1-14.
- Griffith, J., J. Black, et al. (2004). "The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain." *Mol Cell* **13**(2): 169-178.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanks, S. K., A. M. Quinn, et al. (1988). "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." *Science* **241**(4861): 42-52.

- Hayakawa, F., M. Towatari, et al. (2000). "Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines." *Oncogene* **19**(5): 624-631.
- Heldin, C. H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." *Cell* **80**(2): 213-223.
- Hunter, T. (1991). "Protein kinase classification." *Methods Enzymol* **200**: 3-37.
- Huse, M. and J. Kuriyan (2002). "The conformational plasticity of protein kinases." *Cell* **109**(3): 275-282.
- Ikezoe, T., C. Nishioka, et al. (2006). "The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling." *Mol Cancer Ther* **5**(10): 2522-2530.
- Imai, K. and A. Takaoka (2006). "Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(9): 714-727.
- Irusta, P. M., Y. Luo, et al. (2002). "Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor." *J Biol Chem* **277**(41): 38627-38634.
- Izzedine, H., I. Buhaescu, et al. (2007). "Sunitinib malate." *Cancer Chemother Pharmacol* **60**(3): 357-364.
- Jeltsch, M., A. Kaipainen, et al. (1997). "Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice." *Science* **276**(5317): 1423-1425.
- Kiyoi, H., M. Towatari, et al. (1998). "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product." *Leukemia* **12**(9): 1333-1337.
- Kolibaba, K. S. and B. J. Druker (1997). "Protein tyrosine kinases and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1333**(3): F217-248.
- Kris, M. G., R. B. Natale, et al. (2003). "Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial." *JAMA* **290**(16): 2149-2158.
- Lievre, A., H. Blons, et al. (2010). "Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer." *Oncogene*.
- Lohela, M., A. Saaristo, et al. (2003). "Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies." *Thromb Haemost* **90**(2): 167-184.
- Lyman, S. D., L. James, et al. (1993). "Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells." *Cell* **75**(6): 1157-1167.
- Lynch, T. J., D. W. Bell, et al. (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib." *N Engl J Med* **350**(21): 2129-2139.
- Mendel, D. B., A. D. Laird, et al. (2003). "In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship." *Clin Cancer Res* **9**(1): 327-337.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Nagy, J. A., E. Vasile, et al. (2002). "VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**: 227-237.
- Nakao, M., S. Yokota, et al. (1996). "Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia." *Leukemia* **10**(12): 1911-1918.

- Oken, M. M., R. H. Creech, et al. (1982). "Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group." Am J Clin Oncol **5**(6): 649-655.
- Paez, J. G., P. A. Janne, et al. (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." Science **304**(5676): 1497-1500.
- Pao, W., V. Miller, et al. (2004). "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13306-13311.
- Patyna, S., A. D. Laird, et al. (2006). "SU14813: a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity." Mol Cancer Ther **5**(7): 1774-1782.
- Querings, S., J. Altmuller, et al. (2011). "Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens." PLoS One **6**(5): e19601.
- Ray, R. J., C. J. Paige, et al. (1996). "Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7." Eur J Immunol **26**(7): 1504-1510.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, et al. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." Oncogene **19**(49): 5548-5557.
- Rosnet, O., C. Schiff, et al. (1993). "Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells." Blood **82**(4): 1110-1119.
- Rusten, L. S., S. D. Lyman, et al. (1996). "The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro." Blood **87**(4): 1317-1325.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Savage, D. G. and K. H. Antman (2002). "Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy." N Engl J Med **346**(9): 683-693.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-225.
- Schnittger, S., C. Schoch, et al. (2002). "Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease." Blood **100**(1): 59-66.
- Senger, D. R., S. J. Galli, et al. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**(4587): 983-985.
- Shewchuk, L. M., A. M. Hassell, et al. (2000). "Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail." Structure **8**(11): 1105-1113.
- Shibuya, M. (2001). "Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1)." Int J Biochem Cell Biol **33**(4): 409-420.
- Srinivasan, M., D. Sedmak, et al. (2002). "Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids." Am J Pathol **161**(6): 1961-1971.
- Starling, N., F. Vazquez-Mazon, et al. (2011). "A phase I study of sunitinib in combination with FOLFIRI in patients with untreated metastatic colorectal cancer." Ann Oncol.
- Sun, L., C. Liang, et al. (2003). "Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase." J Med Chem **46**(7): 1116-1119.

- Takahashi, H. and M. Shibuya (2005). "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions." *Clin Sci (Lond)* **109**(3): 227-241.
- Therasse, P., S. G. Arbuck, et al. (2000). "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada." *J Natl Cancer Inst* **92**(3): 205-216.
- Tokuda, Y., T. Nakamura, et al. (1990). "Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde." *J Clin Pathol* **43**(9): 748-751.
- Tse, K. F., G. Mukherjee, et al. (2000). "Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation." *Leukemia* **14**(10): 1766-1776.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." *Cell* **61**(2): 203-212.
- Veikkola, T., L. Jussila, et al. (2001). "Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice." *EMBO J* **20**(6): 1223-1231.
- Vincenti, V., C. Cassano, et al. (1996). "Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3." *Circulation* **93**(8): 1493-1495.
- Williams, C., F. Ponten, et al. (1999). "A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens." *Am J Pathol* **155**(5): 1467-1471.
- Wittekind, C., H.-J. Meyer, et al. (2010). *TNM : Klassifikation maligner Tumoren*. Weinheim, Wiley-Blackwell.
- Wybenga-Groot, L. E., B. Baskin, et al. (2001). "Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region." *Cell* **106**(6): 745-757.
- Yamamoto, Y., H. Kiyoi, et al. (2001). "Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies." *Blood* **97**(8): 2434-2439.
- Yokota, S., H. Kiyoi, et al. (1997). "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines." *Leukemia* **11**(10): 1605-1609.
- Zhang, J., P. L. Yang, et al. (2009). "Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors." *Nat Rev Cancer* **9**(1): 28-39.
- Zwick, E., J. Bange, et al. (2001). "Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies." *Endocr Relat Cancer* **8**(3): 161-173.

7 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Fiedler für die Überlassung dieses interessanten Themas, die stetige Unterstützung und freundliche Betreuung danken. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Bokemeyer für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Abteilung durchzuführen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Angiogenese und allen beteiligten Mitarbeitern im Campus Forschung möchte ich für die stetige Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Wellbrock für ihre Geduld beim vermitteln von Labortechniken, ihre kompetente Betreuung und ihre großartige Unterstützung bei jeglichen Problemen. Auch für das Korrekturlesen und den Beistand bei fachlichen Fragen möchte ich ihr meinen großen Dank aussprechen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Simon und Frau Burkhardt für die engagierte und angenehme Zusammenarbeit im Institut für Pathologie bedanken. Frau Hinsch und allen involvierten Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danke ich für die Beurteilung und Verarbeitung der pathologischen Schnitte, sowie für die Geduld und Zeit die ich beanspruchen durfte.

Darüber hinaus möchte ich den Mitgliedern der Prüfungskommission für die Begutachtung der Arbeit danken.

Ein letzter Dank gilt meiner Familie und allen die ich noch dazu zähle für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Geduld die ich jederzeit in Anspruch nehmen konnte.

8 Lebenslauf

In der elektronischen Version dieser Dissertation wurde aus Datenschutzgründen auf den Lebenslauf verzichtet.

9 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Hamburg, den 18.08.2011

Jan Pfränger