

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Genomische Mutationen in hormonrefraktären Prostatakarzinomen am Beispiel von p53, BRAF und c-Kit.

Dissertation

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

vorgelegt von:

Heiko Albrecht

aus Hamburg

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 16.02.2012

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg**

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

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: Prof. Dr. M. Graefen

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Klinik und Pathologie des Prostatakarzinoms	1
1.2 p53	3
1.3 BRAF	6
1.4 c-Kit	8
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Gewebe	11
2.2 DNA-Extraktion	12
2.3 Polymerase-Kettenreaktion	14
2.4 Agarose-Gelelektrophorese	17
2.5 ExoSAP-IT	18
2.6 DNA-Sequenzierreaktion	19
2.7 Grundprinzip der Auswertung	20
3 Resultate	21
3.1 Technische Probleme	21
3.2 Resultate der Sequenzierung von p53	22
3.3 Resultate der Sequenzierung von BRAF	27
3.4 Resultate der Sequenzierung von c-Kit	27
3.5 Überblick	32
4 Diskussion	33
4.1 Mutationen von p53 im Prostatakarzinom	33
4.2 Die Rolle von p53-Mutationen bei der Entstehung eines hormonrefraktären Status	38

4.3 Mutationen von BRAF im Prostatakarzinom.....	40
4.4 Die Rolle von Sorafenib als Therapieoption im BRAF-mutierten Prostatakarzinom.....	43
4.5 Mutationen von c-Kit und Expression des c-Kit-Rezeptors im Prostatakarzinom.....	44
4.6 Die Rolle von Imatinib als Therapieoption im Prostatakarzinom.....	45
5 Zusammenfassung.....	47
6 Anhang.....	49
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	49
6.2 Abbildungen und Tabellen.....	51
6.3 Literaturverzeichnis.....	52
7 Danksagung.....	62
8 Eidesstattliche Versicherung.....	64

1. Einleitung

1.1 Klinik und Pathologie des Prostatakarzinoms

Allein in Deutschland erkrankten nach Schätzungen des Robert Koch-Instituts jedes Jahr rund 49.000 Männer am Prostatakarzinom [2]. Es macht etwa 20 % aller Krebsneuerkrankungen aus und zählt somit zu den häufigsten lebensbedrohlichen Tumorerkrankungen beim Mann in westlichen Gesellschaften [1,3]. Die jährliche Sterberate liegt im Durchschnitt bei 24 Todesfällen pro 100.000 Männern und steigt mit dem Alter stark an (siehe *Abbildung 1.1*) [3]. Jährlich sterben so in Deutschland circa 11.000 Männer an dieser Krebsart [3]. In der Todesursachenstatistik steht es, nach Lungen- und Kolonkarzinom, daher an dritter Stelle [4].

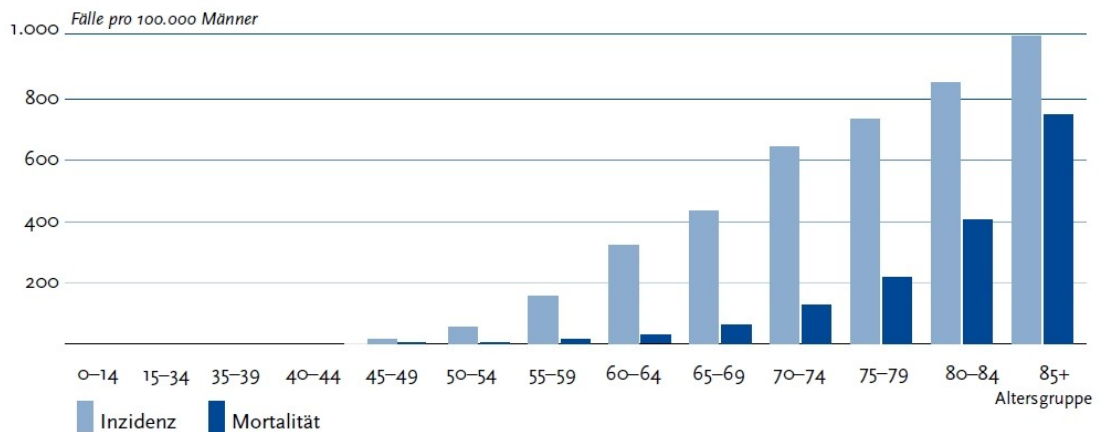


Abb. 1.1: Altersspezifische Inzidenz und Mortalität für Prostatakrebs in Deutschland 2002. Die Inzidenz gibt hierbei die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr und pro 100.000 männlicher Einwohner an. Bei der Mortalität handelt es sich um die Anzahl der jährlichen Todesfälle bezogen auf 100.000 männliche Einwohner.

Autopsiestudien haben gezeigt, dass sich bei circa 40 % aller Männer über 50 Jahren und bei annähernd 100 % aller Männer, die über 90 Jahre alt sind,

histologisch Prostatakarzinome nachweisen lassen [4]. Die meisten Prostatakarzinome werden demnach zu Lebzeiten der Patienten nicht entdeckt oder verlaufen klinisch blande.

Patienten mit einem diagnostizierten Prostatakarzinom stehen mit der perkutanen Strahlentherapie, der Brachytherapie sowie der radikalen Prostatektomie verschiedene Therapiemöglichkeiten zur Verfügung [5]. Durch letztgenannte Therapieform haben Patienten mit einem organbegrenzten Tumorstadium sogar eine Heilungswahrscheinlichkeit von circa 90 % [5]. Besonders bei Metastasenbildung, aber auch bei einem späteren Rezidiv, werden Patienten antiandrogen behandelt [6]. Dies ist möglich, da das Prostatakarzinom für Entwicklung, Wachstum und Differenzierung Androgene benötigt [84]. Hierfür bestehen verschiedene Strategien von der Orchiektomie bis zur medikamentösen androgenen Blockade über verschiedene Regelwege [4]. Diese antiandrogene Behandlung führt überwiegend zu einer dramatischen Tumorremission, allerdings kommt es bei den Patienten für gewöhnlich im Verlauf der Erkrankung zu einem Rezidiv. Der Tumor wird dabei hormonrefraktär und wächst nun auch trotz androgener Blockade weiter [7]. Weiterführende systemische Therapieformen stehen momentan kaum zur Verfügung, weshalb die hormonrefraktäre Krebsform auch die tödlichste Prostatakarzinomvariante darstellt [8].

Verschiedene Hinweise in der Literatur deuten darauf hin, dass sich hormonrefraktäre Tumore biologisch deutlich von hormonnaiven unterscheiden. Beispielsweise haben Studien gezeigt, dass hormonrefraktäre Prostatakarzinome mehr Chromosomenaberrationen aufweisen [8]. Auch eine vermehrte Expression von ErbB1 (epidermal growth factor receptor) und eine reduzierte Aktivität von PTEN (phosphatase and tensin homolog)

wurden bei der hormonrefraktären Karzinomform häufiger gefunden [10,11]. Zudem wurde bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen über eine gesteigerte Sensitivität des Androgenrezeptors, lokusweiten Chromatinumbau sowie eine erhöhte Aktivität der RNA-Polymerase mit daraus resultierender vermehrter spezifischer Genexpression berichtet [9].

1.2 p53

Das Tumorsuppressorgen p53 ist der vielleicht am besten bekannte Transkriptionsfaktor, dessen Funktionalität direkt mit der Pathogenese von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden kann [12]. Es handelt sich um ein aus 393 Aminosäuren bestehendes Phosphorprotein mit einer Molekülmasse von 53 kDa, welches unter physiologischen Bedingungen in geringer Konzentration im Zellkern vorhanden ist. Seine Halbwertszeit beträgt 20 Minuten [66]. Genetisch lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1), setzt es sich aus 11 Exons und den entsprechenden Introns zusammen und ist direkt an der Regulation von Apoptose und Zellproliferation beteiligt [12, 66]. So befindet sich am Ende der G₁-Phase vor Eintritt in die S-Phase ein Kontrollpunkt des Tumorsuppressors p53, an dem der Zellzyklus von im Genom geschädigten Zellen gestoppt werden kann (66). Außerdem ist p53 auch an einem weiteren Kontrollpunkt am Ende der G₂-Phase vor Eintritt in die Mitose beteiligt [67].

Der in jeder wachsenden Zelle vorhandene p53-Spiegel wird vor allem durch die Mdm2-Ubiquitin-Ligase kontrolliert, indem sie neu synthetisiertes p53 ubiquitiniert und somit zum Abbau durch das 26S-Proteasom freigibt. Diese Art der Markierung wird bei DNA-Schäden der Zelle durch eine Aktivierung

der Proteinkinasen ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM- and Rad3-related) oder DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) verhindert, da diese p53 phosphorylieren können. Phosphoryliertes p53 wird durch die Mdm2-Ubiquitin-Ligase nicht mehr als Substrat erkannt, was zu einem Anstieg des p53-Spiegels in der Zelle führt [64]. Als Folge kommt es zu einer vermehrten Synthetisierung von Transkriptionsfaktoren wie dem p21-Protein, welches wiederum an CDK 2, 4 und 6 bindet und so die Phosphorylierung von Substraten wie dem Rb105 hemmt. Dadurch bleibt der Rb105-E2F-DP1-Komplex intakt und die Zelle kann nicht von der G1- in die S-Phase übergehen. Somit wird der Zelle eine Gelegenheit verschafft, entstandene DNA-Schäden zu reparieren, bevor diese im Zuge der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden [64, 65]. Sollte eine Zellschädigung zu gravierend oder irreparabel sein, kann p53 über eine induzierte Expression des bax-Gens zudem die Apoptose der betroffenen Zelle einleiten [65]. Die Regulation und Wirkung von p53 ist in *Abbildung 1.2* [64] dargestellt.

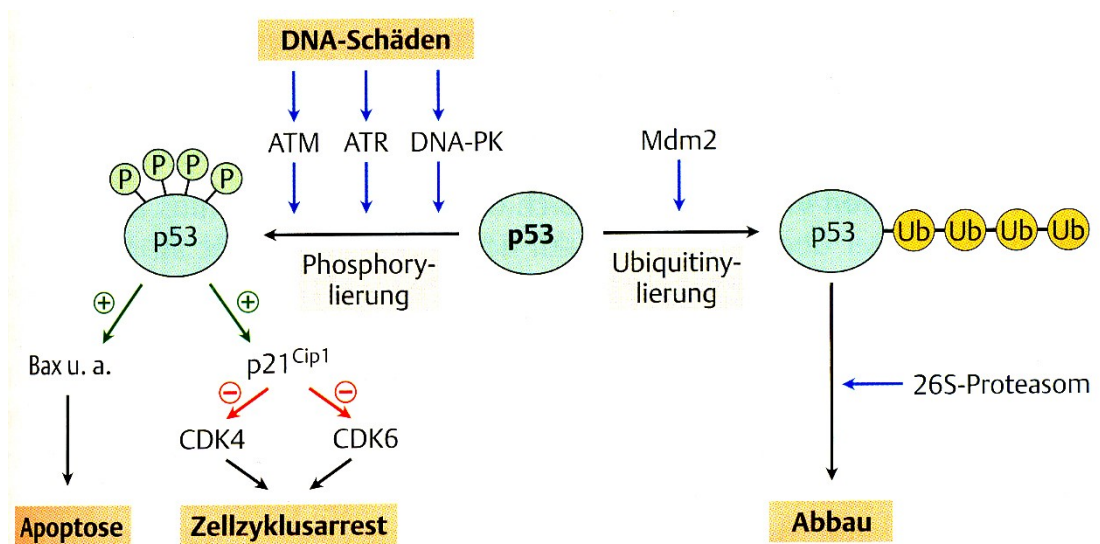


Abb. 1.2: Regulation und Wirkung von p53.

In der Literatur als „Wächter des Genoms“ beschrieben, ist p53 bei verschiedenen Tumorarten häufig inaktiviert. Dies geschieht oft durch Deletion eines Allels mit gleichzeitiger Mutation des anderen Allels [12, 13]. Mutiertes p53 findet sich in etwa 50 % aller menschlicher Tumore, was zur Folge hat, dass im Zellzyklus der Übergang in die S-Phase nicht mehr verhindert werden kann. Mutierte Zellen weisen zudem ein labileres Genom auf, wodurch andere Mutationen und chromosomale Störungen akkumulieren können [65].

Die Verteilung von verschiedenen Mutationen im p53-Gen unterscheidet sich von Tumorerkrankung zu Tumorerkrankung. Etwa 80 % der Mutationen verursachen hierbei einen Aminosäureaustausch mit daraus resultierender Veränderung der Halbwertszeit von p53 oder aber seiner Wechselwirkung mit anderen Proteinen [65]. Allgemein zeichnen sich p53-Mutationen durch ein schlechtes Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie aus, wohingegen Tumore mit normalem p53 sensitiv auf DNA-Schädigung durch Cytostatika reagieren [65]. Im Zellzyklus von ungeschädigten Zellen scheint p53 keine lebensnotwendige Funktion zu besitzen, entwickelten doch Mäuse, die auf Grund eines genetischen Defekts in ihren Zellen über kein funktionsfähiges p53 verfügten, zunächst keine Entwicklungsstörungen. Erst im späteren Verlauf entwickelten sie vermehrt unterschiedliche Tumore [68].

Die meisten funktionell relevanten p53-Mutationen führen zu der Produktion eines p53-Proteins, welches inaktiv ist und nur langsam abgebaut werden kann [14, 15]. Dies führt zu der paradoxen Situation, dass p53-inaktivierte Tumore sich immunhistochemisch durch eine vermehrte Nachweisbarkeit von (inaktivem) p53-Protein erkennen lassen. Aus diesem Grund wurde die Rolle von inaktiviertem p53 in verschiedenen Karzinomformen durch eine Vielzahl von immunhistochemischen Studien untersucht. Die Ergebnisse

mehrerer dieser Studien deuteten auf einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Ansammlung von p53 und einer schlechten klinischen Prognose hin, jedoch konnte dies durch andere Studien nicht bestätigt werden [23]. Die genaue Rolle von p53-Mutationen im Prostatakarzinom ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

1.3 BRAF

Trotz über 20-jähriger Forschung an der Familie der RAF-Proteine wurde die Isoform BRAF erst kürzlich als humanes Onkogen identifiziert [16]. Bei den RAF-Proteinen handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die als Teil einer durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine gesteuerten Signalkaskade mit RAS, einem kleinen G-Protein, interagieren [35]. Die Proteingröße von BRAF beträgt, durch verschiedenes Spleißen bedingt, 75 bis 100 kDa [69]. Im Allgemeinen beinhalten alle RAF-Proteine, einschließlich verschiedener BRAF-Isoformen, eine einheitliche Struktur mit drei spezifischen Regionen. Zwei Regionen (CR1 und CR2) befinden sich hierbei im N-Terminus und die dritte (CR3), für die Kinase-Domäne codierend, am C-Terminus [70].

Die Aktivierung von RAF erfolgt durch RAS, ein kleines G-Protein. In seiner aktivierten Form bindet RAS an die RAS-bindende-Domäne und eine weitere, cysteinreiche Domäne, die sich beide in der CR1-Region von RAF befinden [71]. Da RAS überwiegend an der Plasmamembran verankert ist, rekrutiert es RAF so zu dieser und stimuliert im Folgenden dessen Kinaseaktivität [72, 73]. Das aktivierte RAF stimuliert eine zweite Proteinkinase mit dem Namen MEK. Diese aktiviert daraufhin ERK/MAPK, die als eigentliche Effektorkinase über Beeinflussung der Transkription unter

anderem Genexpression, Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert [16, 17]. Die RAF-Signalkaskade ist in *Abbildung 1.3* [64] dargestellt.

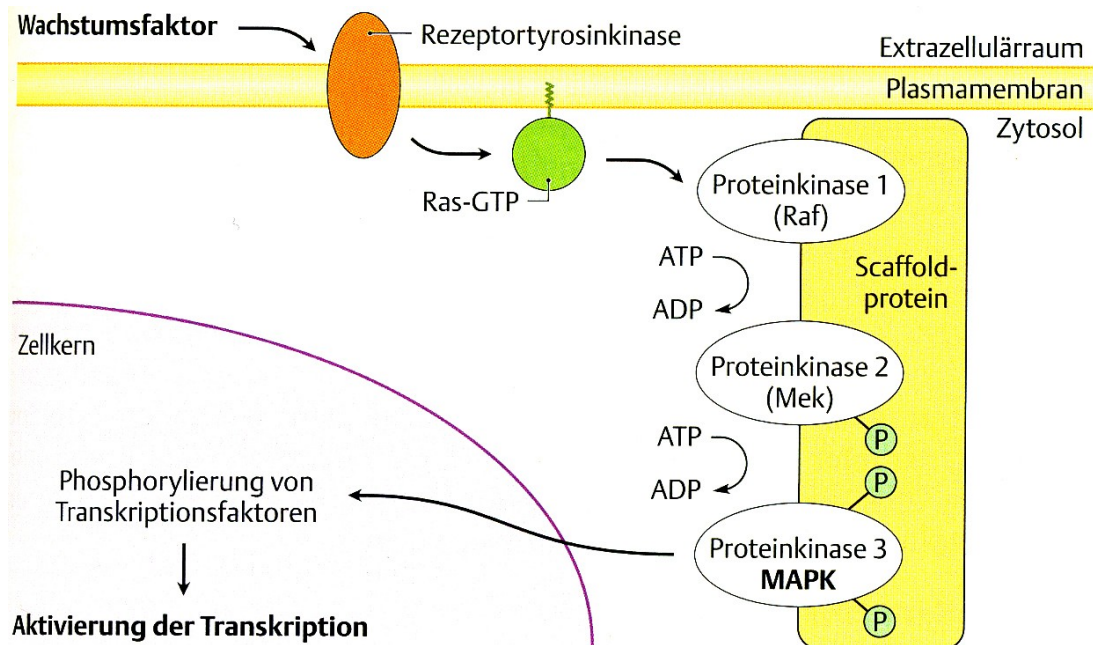


Abb. 1.3: Die Signalkaskade von RAF.

Diese Signalkaskade ist in 30 % aller Karzinome übermäßig aktiviert [36]. Zudem haben Studien gezeigt, dass die Proteinkinase BRAF in etwa 7 % der menschlichen Karzinome mutiert ist, was ihre Bedeutung an der Karzinogenese noch einmal unterstreicht [18]. Die beschriebenen Mutationen wirken sich in den meisten Fällen aktivierend aus, jedoch gibt es überraschenderweise auch Fälle mit reduzierter Kinaseaktivität [18].

In über 80 % der Fälle von BRAF-Mutationen an der Kinasedomäne konnte eine Basensubstitution in Exon 15 am Codon 600 (V600E) beobachtet werden. Als Folge nimmt die Kinaseaktivität von BRAF im Vergleich zum Wildtyp um ungefähr das 500-Fache zu, wodurch ERK stimuliert und die Proliferation angestoßen wird. Studien über Tumore mit V600E BRAF-

Mutation sprechen zudem sogar von „oncogene addiction“, was bedeutet, dass der Erhalt und die Proliferation des Tumors von dem Fortbestehen der Mutation abhängig bleibt [89, 90]. Aus diesem Grund wird an der Entwicklung von Medikamenten geforscht, die BRAF und seine weiteren Effektoren inhibieren [91].

Die höchste Inzidenz von BRAF-Mutationen findet sich in malignen Melanomen (27 % - 70 %), Schilddrüsenkarzinomen vom papillären Typ (36 % - 53 %), kolorektalen Karzinomen (5 % - 22 %) sowie serösen Ovarialkarzinomen (30 %). Zudem gibt es eine Vielzahl von weiteren Karzinomformen, die eine niedrige Mutationsrate aufweisen [16]. Bezüglich des Prostatakarzinoms wurde erst kürzlich in einem Kollektiv von 204 asiatischen Karzinomen über eine BRAF-Mutationsfrequenz von 10 % berichtet [26]. Diese Befunde wurden von zwei weiteren Autoren, welche nicht-asiatische Primärtumore untersuchten, jedoch nicht bestätigt [92, 93]. Für das hormonrefraktäre Prostatakarzinom liegen diesbezüglich bisher keine Untersuchungen vor, das Bestehen von BRAF-Mutationen könnte allerdings neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Mutationen von BRAF an der Entwicklung der Androgenunabhängigkeit beteiligt sein könnten [85].

1.4 c-Kit

Das Protoonkogen c-Kit codiert für eine transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase mit Expression sowohl auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, als auch auf anderen Gewebearten [21]. Es hat eine Größe von 145 kDa und ist auf Chromosom 4 des Menschen lokalisiert [75]. Strukturell sind von fünf immunglobulinähnlichen, extrazellulären Domänen

die äußeren drei für die Bindung des Liganden SCF (stem cell factor) verantwortlich [76]. Durch Bindung von SCF kommt es zur Dimerisierung des c-Kit-Rezeptors, gefolgt von ansteigender Autophosphorylierung und Aktivierung des c-Kit-Signalkomplexes. Im Folgenden werden so weitere intrazelluläre Kaskaden aktiviert und es wird direkt Einfluss auf Transkription, Proliferation sowie Differenzierung der Zelle genommen [37-39]. Durch Mutationen im c-Kit-Gen kann dieser Mechanismus von seinem Liganden entkoppelt werden. Es kommt zur SCF-unabhängigen, dauerhaften Aktivierung des c-Kit-Rezeptors [40, 41]. Dieser Zusammenhang wurde erstmals in einer Zelllinie von humaner Mastzelleukämie beobachtet [43].

C-Kit wird heutzutage mit verschiedenen Krebsformen in Verbindung gebracht [19, 21]. So zeigt sich beispielsweise in 95 % aller Fälle von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eine Expression des c-Kit-Rezeptors (CD117-Positivität) [19]. Bei einem Großteil dieser Tumore lassen sich wiederum auch gain-of-function-Mutationen im c-Kit-Gen nachweisen [42]. Auch für das Prostatakarzinom wurde in mehreren Studien eine Expression des c-Kit-Rezeptors beschrieben [29-31]. Ob diese Tumore auch Kit-Mutation aufweisen, ist bisher nicht geklärt. Dies wäre jedoch von potentieller therapeutischer Relevanz, hat sich sich doch in den letzten Jahren mit Imatinib (Gleevec) eine Therapiemöglichkeit bei gastrointestinalen Stromatumoren mit Mutation des c-Kit-Rezeptors eröffnet [20]. Dieses Medikament zur Blockade spezifischer Tyrosinkinase ließe sich möglicherweise auch auf andere Tumorarten erfolgreich anwenden, sofern diese durch eine Kit-Mutation bedingt wären.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Ein verbessertes Verständnis der dem Prostatakarzinom zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen könnte neue Therapieoptionen eröffnen. Die Häufigkeit von immunhistochemisch nachgewiesenen p53-Positivitäten variiert in unbehandelten Tumoren von 4 - 61 % [23]. Einiges deutet darauf hin, dass p53 Veränderungen bei hormonrefraktären Karzinomen häufiger vorkommen als bei hormonnaiven. Diese Daten sind auf Grund der hohen Schwankungen der Angaben in beiden Gruppen allerdings unsicher. Eine vermehrte Häufigkeit von p53-Alterationen in hormonrefraktären Prostatakarzinomen wäre insgesamt plausibel, da p53-Alterationen zu einer erhöhten genetischen Instabilität führen könnten und somit als (Teil-)Ursache für die bei diesen Tumoren häufiger zu findenden chromosomalen Aberrationen in Frage kommen würden [96, 97].

Bereits im Vorfeld wurden in den Laboren der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) hormonnaive Prostatakarzinome auf p53-Mutationen durch DNA-Sequenzanalyse untersucht. Um zu ergründen, ob hormonrefraktäre Karzinome tatsächlich häufiger p53-Mutationen aufweisen als hormonnaive, wurden nun mit der gleichen Methode 43 hormonrefraktäre Prostatakarzinome einer genetischen Analyse unterzogen. Darüber hinaus wurde im selben Kollektiv von hormonrefraktären Tumoren auch nach DNA-Sequenzveränderungen der Gene c-Kit und BRAF gesucht, um zu explorieren, ob auch diese, potentiell therapielevanten Mutationen, bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen vermehrt auftreten.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebe

Für diese Studie wurden 43 formalin-fixierte Proben von hormonrefraktären Prostatakarzinomen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendet. Es handelt sich größtenteils um mittelgradig bis schlecht differenzierte Tumore (siehe *Tabelle 2.1*), die von 1999 bis 2007 durch palliative transurethrale Resektion gewonnen wurden. Für alle Patienten wurde das Vorliegen eines androgenunabhängigen Karzinoms im Rahmen einer vorangegangenen Doktorarbeit gesichert (Dissertation vom Michael Brüchmann – Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Die hormonrefraktäre Situation wurde für den Zweck dieser Studie durch steigende PSA-Werte oder Progression des Tumors unter einer antiandrogenen Therapie definiert. Dabei mussten mindestens drei aufeinander folgende PSA-Werte ansteigen.

Aus jedem Paraffinblock wurden drei Stenzen mit tumorhaltigem Gewebe entnommen und diese im Folgenden weiterverarbeitet.

Tab. 2.1: Gleason-Score der verwendeten Prostatakarzinomproben.

Probe	Gleason-Score	Probe	Gleason-Score
1	4+5=9	23	4+3=7
2	4+5=9	24	4+5=9
3	5+4=9	25	5+4=9
4	5+4=9	26	4+5=9
5	4+4=8	27	3+4=7
6	5+4=9	28	5+4=9
7	4+4=8	29	4+5=9
8	4+5=9	30	4+5=9
9	4+5=9	31	4+5=9
10	4+5=9	32	4+5=9
11	4+5=9	33	4+5=9
12	4+3=7	34	4+5=9
13	4+5=9	35	4+4=8
14	4+5=9	36	4+5=9
15	4+5=9	37	5+4=9
16	4+5=9	38	4+5=9
17	5+5=10	39	4+5=9
18	4+5=9	40	4+5=9
19	5+5=10	41	3+4=7
20	4+5=9	42	4+5=9
21	4+5=9	43	5+5=10
22	4+4=8		

2.2 DNA-Extraktion

Bei der DNA-Extraktion wurde die DNA der Tumorzellen durch proteolytische Spaltung aus den Zellkernen freigesetzt und anschließend isoliert. Dies war notwendig, um sie bei der Polymerase-Kettenreaktion optimal einsetzen zu können. Es wurde hierfür das QIAamp DNA Mini Kit (*Qiagen*) verwendet.

Vorgang:

Zu Beginn wurden 500 µl Xylol-Isomerengemisch (*Riedel-de Haen*) auf die Stenzen gegeben und diese während der nächsten fünf Minuten mehrmals in kurzen Intervallen mit dem Reax 2000 (*Heidolph*) gevortext. Als nächstes wurden die Proben eine Minute lang bei 13.000 U/Min mit der Zentrifuge

5415D (*Eppendorf*) zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Der komplette Xylolschritt wurde sodann wiederholt. Nun wurden 600 µl Ethanol (*J.T. Baker*) auf die Proben gegeben, auch diese während der nächsten fünf Minuten in regelmäßigen Intervallen gevortext, eine Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert und der Überstand erneut abgezogen. Auch der komplette Ethanolsschritt wurde sodann wiederholt. Folgend wurden die Proben luftgetrocknet. Hinterher wurden 90 µl Buffer ATL - Tissue lysis buffer (*Qiagen*) auf die Proben gegeben, diese mehrmals in kurzen Intervallen gevortext und im Wasserbad (*GFL*) auf 56°C erwärmt. Anknüpfend wurden 10 µl Proteinase K (*Qiagen*) zugegeben und die Proben bei 56°C im Wasserbad für 15 Stunden inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden noch einmal 5 µl Proteinase K zugeben, für eine weitere Stunde bei 56°C inkubiert und danach für eine Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert. Nachfolgend wurden 100 µl Buffer AL – Lysis buffer (*Qiagen*) zugegeben, kurz gevortext und bei Ausflockung der Proben wurden diese bei 70°C im Thermomixer Comfort (*Eppendorf*) erwärmt, bis die Lösung wieder klar war. Nun wurden 100 µl Ethanol zugeben, wieder kurz gevortext und auf 10°C abgekühlt. Der Inhalt wurde anschließend vollständig auf die QIAamp Mini Spin Column (*Qiagen*), im Folgenden als Säule bezeichnet, überführt, eine Minute lang bei 8.000 U/min zentrifugiert und die Säule dann auf ein neues Sammelröhrchen 2 ml (*Qiagen*) gesteckt. Als nächstes wurden 500 µl Buffer AW1 – Wash Buffer auf die Säule geben, eine Minute bei 8.000 U/min zentrifugiert und die Säule erneut auf ein neues Sammelröhrchen 2 ml gesteckt. Es wurden nun 500 µl AW2 – Wash buffer 2 (*Qiagen*) auf die Säule gegeben, wieder eine Minute bei 8.000 U/min zentrifugiert und dann noch einmal die Säule auf ein neues Sammelröhrchen 2 ml gesteckt. Folgend wurden die Proben kurz trockenzentrifugiert, die Säule in ein Reaktionsgefäß 1,5 ml (*Sarstedt*) gesteckt, 15 µl Wasser auf die Säule gegeben und sofort bei 13.000 U/min

zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein zweites Reaktionsgefäß 1,5 ml gesteckt. Schließlich wurden 50 µl destilliertes Wasser auf die Proben gegeben, diese für fünf Minuten stehen gelassen, eine Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert, die Säule in ein trockenes Sammelröhrchen gesteckt und noch einmal 20 µl destilliertes Wasser auf die Säulen geben, damit diese nicht austrocknen. Die DNA-Konzentration aus beiden Reaktionsgefäßen 1,5 ml wurde abschließend auf dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (*peqLab*) gemessen und für die weitere Verarbeitung mit destilliertem, autoklaviertem Wasser auf eine Konzentration von 20 µg/µl verdünnt.

2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Ketteneaktion (PCR) wurde benötigt, um die DNA der zu untersuchenden Exons für die spätere Sequenzierung zu vervielfältigen. Auf Grund der durch die Paraffinbehandlung bedingten, starken Fragmentierung der extrahierten DNA wurde eine erhöhte Anzahl von 60 Zyklen für die Polymerase-Kettenreaktion gewählt. Zudem wurden Primer verwendet, die eine möglichst geringe Größe der erstellten Produkte garantieren und somit trotz fragmentierter Ausgangs-DNA für bestmögliche Ergebnisse der PCR sorgten.

Vorgang:

Als erstes wurde eine dNTP-Arbeitslösung (2,5 µmol/l) pipettiert, welche sich aus 920 µl autoklaviertem Wasser, 20 µl dATP (100 µmol/l, *Promega*), 20 µl dCTP (100 µmol/l, *Promega*), 20 µl dGTP (100 µmol/l, *Promega*) und 20 µl dTTP (100 µmol/l, *Promega*) zusammensetzt. Danach wurden 190 µl autoklaviertes Wasser mit 5 µl des gewünschten Forward-Primers

(100 $\mu\text{mol/l}$, *MWG*) und 5 μl des gewünschten Reverse-Primers (100 $\mu\text{mol/l}$, *MWG*) vermischt. Es entstand eine Primer-Arbeitslösung (2,5 $\mu\text{mol/l}$).

Folgende Primer wurden hierfür verwendet:

p53 Exon 5:

Forward: 5'- TGC TTT ATC TGT TCA CTT GTG CCC- 3'

Reverse: 5'- GCA ACC AGC CCT GTC GTC TC- 3'

p53 Exon 6:

Forward: 5'- TCC CCA GGC CTC TGA TTC CT- 3'

Reverse: 5'- CAC TGA CAA CCA CCC TTA ACC- 3'

p53 Exon 7:

Forward: 5'- CTG CTT GCC ACA GGT CTC- 3'

Reverse: 5'- AAA TCG GTA AGA GGT GGG CC- 3'

p53 Exon 8:

Forward: 5'- CTG ATT TCC TTA CTG CCT CTT GC- 3'

Reverse: 5'- TCT CCT CCA CCG CTT CTT GTC- 3'

BRAF Exon 11

Forward: 5'- TCC CTC TCA GGC ATA AGG TAA- 3'

Reverse: 5'- CGA ACA GTG AAT ATT TCC TTT GAT- 3'

BRAF Exon 15

Forward: 5'- TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA- 3'

Reverse: 5'- GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A- 3'

c-Kit Exon 9

Forward: 5' - TCA CTC ACT AGG TCA CCA AAG TG- 3'

Reverse: 5' - GCA GTA CAG AAG CAG AGC ATC TA- 3'

c-Kit Exon 11

Forward: 5' - CCA GAG TGC TCT AAT GAC TG- 3'

Reverse: 5' - AGC CCC TGT TTC ATA CTG AC- 3'

c-Kit Exon 13

Forward: 5' - GTC TGA CAT CAG TTT GCC AG- 3'

Reverse: 5' - AAA GGC AGC TTG GAC ACG GCT TTA- 3'

Nun wurde in einem speziellen Raum (no template) ein Mastermix erstellt. Dieser bestand pro PCR-Ansatz aus 17,3 µl autoklaviertem Wasser, 2,5 µl 10x PCR Buffer (*Applied Biosystems*), 2 µl dNTP-Arbeitslösung, 1 µl Primer-Arbeitslösung des gewünschten Primers, und 0,7 µl AmpliTaq Gold (*Applied Biosystems*). Folgend wurde je 23 µl Mastermix in ein Reaktionsgefäß eines Multiply -µ Strip Pro 8-strip (*Sarstedt*) pipetiert. Erst außerhalb des no-template Raumes wurde nun je 2 µl der gewünschten, zuvor extrahierte DNA zugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 25 µl pro PCR-Gefäß entstand. Zudem wurden aus jedem Mastermix auch zwei Negativkontrollen erstellt, welchen keine DNA zugegeben wurde. Dies diente zur Aufdeckung eventueller Kontaminationen des PCR-Ansatzes durch unerwünschte DNA-Spuren.

Die nun folgende Cycle-Sequencing-Reaktion im PTC 100 Peltier Thermal Cycler (*MJ Research*) verlief mit folgenden Programmen:

Für p53:

- 10 Minuten bei 95°C
- 60 Zyklen à:
 - 15 Sekunden bei 95°C
 - 10 Sekunden bei 58°C
 - 20 Sekunden bei 72°C
- 7 Minuten bei 72°C

Für BRAF und c-Kit:

- 10 Minuten bei 95°C
- 60 Zyklen à:
 - 15 Sekunden bei 95°C
 - 10 Sekunden bei 54°C
 - 20 Sekunden bei 72°C
- 7min bei 72°C

2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Bestimmung und quantitativen Abschätzung des aus einer PCR entstandenen Produkts. Die DNA-Fragmente, in diesem Fall PCR-Produkte aus den vorherigen Arbeitsschritten, wurden entsprechend ihrer Größe in einem Gel aufgetrennt. Hierbei ist die elektrophoretische Mobilität umgekehrt proportional zur molaren Masse der Nucleinsäuren. Die einzelnen DNA-Banden konnten zudem durch aromatische Kationen wie z.B. Ethidiumbromid angefärbt und somit sichtbar gemacht werden [22].

Vorgang:

Zuerst wurden 100 ml eines Gemischs aus Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-

Puffer) und 1,4 % Agarose Electrophoresis Grade (*Invitrogen*) in einer Mikrowelle (*Elektrolux*) aufgekocht. Folgend wurde 5 µl Ethidiumbromid (*Sigma*) hinzupipettiert und das Resultat in eine Form gegossen. Durch Abkühlen entstand ein Agarosegel. Anschließend wurde das Agarosegel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Wide Mini Sub Cell (*BioRad*) gelegt und je 7 µl PCR-Produkt mit 1 µl Ladepuffer aufgetragen. Zusätzlich wurde im Sichtfeld ein Markergemisch bestehend aus 1 µl 50 Bp DNA Ladder (0,5 ug/µl; *Fermentas GeneRuler*), 1 µl Ladepuffer und 6 µl autoklaviertem Wasser auf das Agarosegel pipettiert. Als nächstes wurde ein Standard Power Pack P25 (*Biometra*) angeschlossen und folgende Spannungen angelegt:

- 10 Minuten bei 50 Volt
- 20 Minuten bei 100 Volt

Abschließend wurde das Agarosegel mit der DeVision DBox (*Decon*) fotografiert und mit dem Programm DeVision G ausgewertet.

2.5 ExoSAP-IT

Die Verwendung von ExoSAP-IT (*usb Corporation*) ist zur Aufbereitung des PCR-Produktes notwendig, da es einzelsträngige Primer, DNA, sowie dNTPs entfernt, die die spätere Sequenzierreaktion stören könnten.

Vorgang:

Das für die spätere Sequenzierung benötigte Volumen des PCR-Produktes wurde aufgrund eines Vergleiches der Bandenintensitäten in der Agarosegelelektrophorese ermittelt. Bei vergleichbaren Bandenintensitäten zwischen Marker und Probe wurden 2-3 µl PCR-Produkt (entspricht 10 bis

20 ng für Fragmente bis 300 BP Länge) für die Sequenzierung eingesetzt. Das benötigte Volumen wurde mit 8 µl Wasser verdünnt. Danach wurden 4 µl 5X Sequencing Buffer (*Applied Biosystems*) und 0,5 µl ExoSAP-IT (*USB Corporation*) hinzugegeben. Die vorbereiteten Ansätze reagierten im PCR Gerät 30 Minuten lang bei 37°C. Es folgte für 15 Minuten die Deaktivierung der Exosapenzyme bei 80°C.

2.6 DNA-Sequenzierreaktion

Bei dem verwendeten Verfahren handelt es sich um eine automatisierte Form der enzymatischen Kettenabbruchmethode zur DNA-Sequenzierung nach Frederick Sanger [74]. Es wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma *Applied Biosystems* verwendet.

Vorgang:

Zuerst wurde aus autoklaviertem Wasser und dem gewünschten Forward- oder Reverse-Primer eine Primer-Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10 µmol/l pipettiert. Die benutzten Primersequenzen entsprachen hierbei denen, die auch während der PCR verwendet wurden. Anschließend wurden 1 µl der Primer Arbeitslösung, 1 µl BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und 2 µl 5X Sequencing Buffer (*Applied Biosystems*) hinzupipettiert. Die Cycle-Sequencing-Reaktion im PTC 100 Peltier Thermal Cycler (*MJ Research*) verlief mit folgendem Programm:

- 5 Minuten bei 95°C
- 35 Zyklen à:
 - 10 Sekunden bei 95°C
 - 5 Sekunden bei 50°C
 - 2 Minuten bei 60°C

Nach der Cycle-Sequencing-Reaktion wurden die Proben gefällt. Dies geschah durch die Zugabe von 17 µl 3M Natriumacetat, 170 µl destilliertem Wasser und 500 µl Ethanol bei anschließender 20-minütiger Zentrifugation bei 4°C (Zentrifuge 5804R; *Eppendorf*). Der Überstand wurde abgesaugt, die Pelets getrocknet, mit 35 µl HiDi Foramide (*Applied Biosystems*) aufgenommen und im 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) sequenziert.

2.7 Grundprinzip der Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Sequencing Analysis 5.1.1. (*Applied Biosystems*).

Vorgang:

Die Richtigkeit der Sequenzen wurde zunächst mit Blast Search in der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) überprüft. Durch diesen Vergleich wurde die zu untersuchende Sequenz automatisch mit einer Wildtyp-Sequenz verglichen, um eventuelle Basenaustausche aufzudecken. Anschließend wurde die Sequenz in einer manuellen Auswertung auf Doppelpeaks und sonstige Aberrationen untersucht. Eine gefundene Mutation galt erst dann als bestätigt, wenn sie sich sowohl forward als auch reverse nachweisen ließ. Zudem musste die Mutation in mindestens zwei voneinander unabhängigen PCRs derselben Ausgangs-DNA vorliegen.

3. Resultate

3.1 Technische Probleme

Von insgesamt 43 untersuchten Proben ließen sich 42 sequenzieren. In einem Fall erwies sich die DNA als nicht amplifizierbar, möglicherweise weil sie sich durch die routinemäßige Formalinfixierung in einem zu stark fragmentiertem Zustand befand. Die extrahierte DNA der übrigen 42 Gewebeproben konnte für alle Exons der untersuchten Gene problemlos amplifiziert (*Abbildung 3.1*) und sequenziert werden.

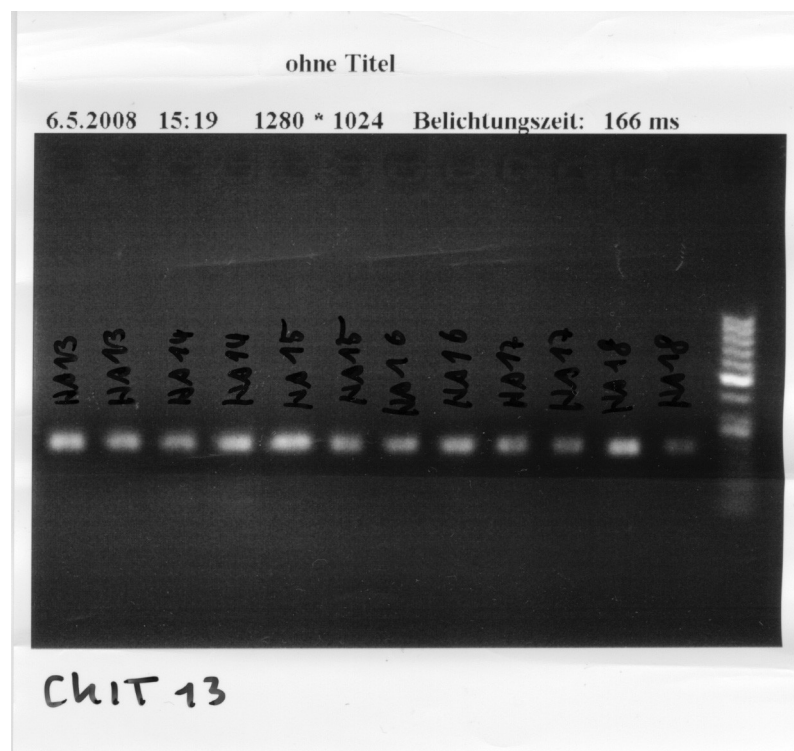


Abb.3.1: Agarosegelelektrophorese von c-Kit Exon 13.

3.2 Resultate der Sequenzierung von p53

Unter den 42 untersuchbaren Tumoren fanden sich elf p53-mutierte Proben, was einer Mutationsfrequenz von 26,2 % entspricht (siehe *Abbildung 3.2*). Im Kollektiv dieser elf alterierten Karzinome konnten insgesamt 13 Mutationen nachgewiesen werden. In einem Fall enthielt ein Karzinom Mutationen in zwei verschiedenen Exons, eine der beiden Alterationen erwies sich allerdings als stumm. Bei einer anderen Probe lagen zwei Mutationen innerhalb desselben Exons vor, wobei es sich auch hier bei einer der beiden um eine stumme Mutationen handelt. (Vergleich *Abbildung 3.4* und *Abbildung 3.5*). Stumme Mutationen führen bei der Translation zu keinem Aminosäureaustausch und sind somit funktionell nicht relevant.

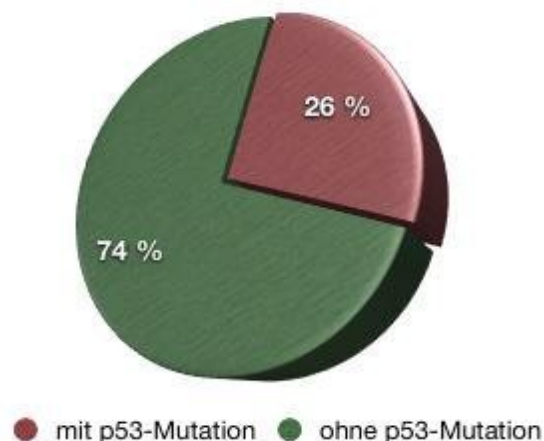


Abb. 3.2: Prozentualer Anteil der in p53 mutierten Proben.

Fast alle gefundenen Alterationen stellten Punktmutationen dar, die zum Austausch einer einzelnen Base führten. Gesondert zu erwähnen sind zudem eine Mutation in Exon 6, bei der es zu einer Insertion der Base Cytosin an Position 759 kam (c759C), sowie die Duplizierung der Codons

275 und 276 (V275_C276dup) in Exon 8 einer weiteren Probe. Die Art sämtlicher gefundener Mutationen ist in *Tabelle 3.1* dargestellt.

Tab. 3.1: Aufzählung der gefundenen p53-Mutationen.

Probe	p53-5	p53-6	p53-7	p53-8
1	-	-	-	R274C
2	-	-	-	-
3	-	L189L, L195I	-	-
4	P178L	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	V275_C276dup
8	-	R214Stop	-	-
9	-	c759 ins C	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	G267T
20	- nicht Auswertbar -			
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	N240D	D282D
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	Y235C	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	V198G	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	-	-	-	-
42	-	-	-	P279T
43	-	-	-	-

Unter Fokussierung auf die funktionell relevanten Mutationen im untersuchten Kollektiv, dominierten Exon 8-Mutationen sowie Mutationen in Exon 6 mit jeweils vier mutierten Tumoren. Exon 5- und Exon 7-Mutationen kamen hingegen nur in je einem bis zwei Fällen vor. Die genaue Häufigkeitsverteilung der betroffenen Exons ist *Abbildung 3.3* zu entnehmen.

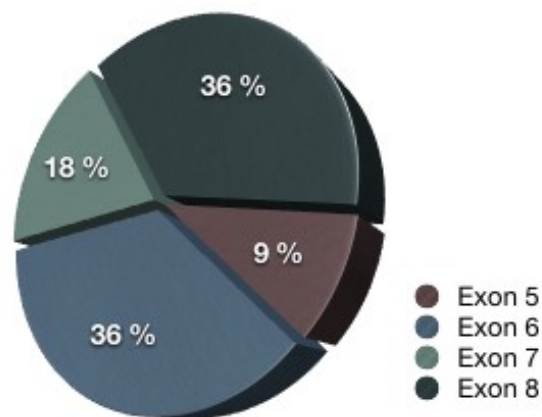


Abb. 3.3: Zugehörigkeit der elf funktionell relevanten p53-Mutationen zu den entsprechenden Exons.

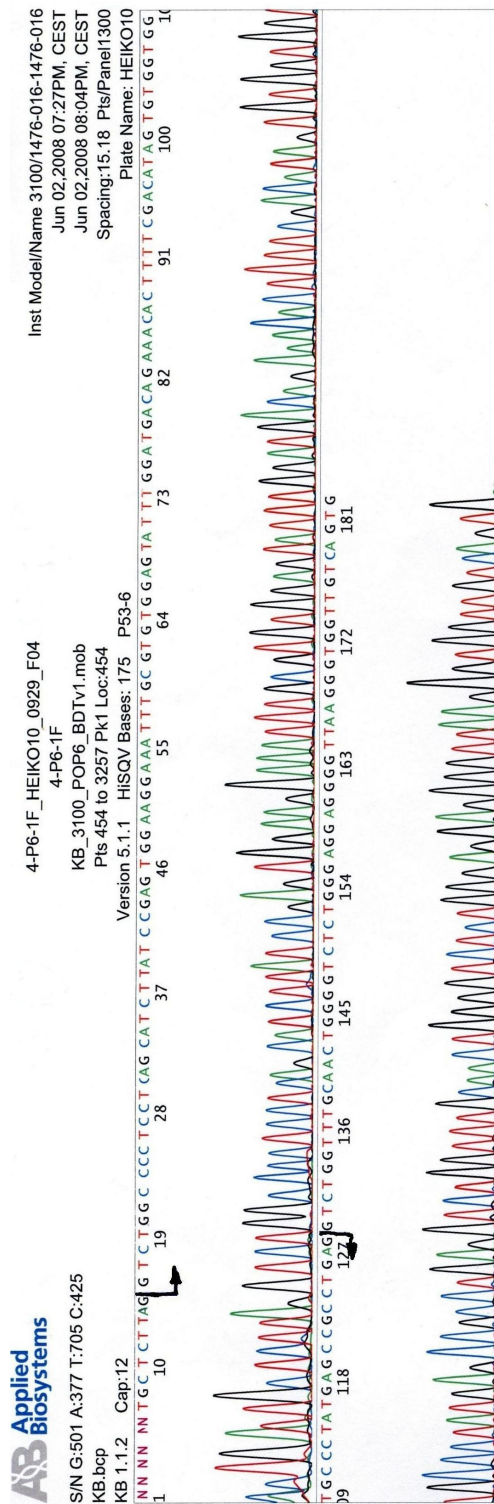


Abb.3.4: Wildtypsequenz von p53 Exon 6.

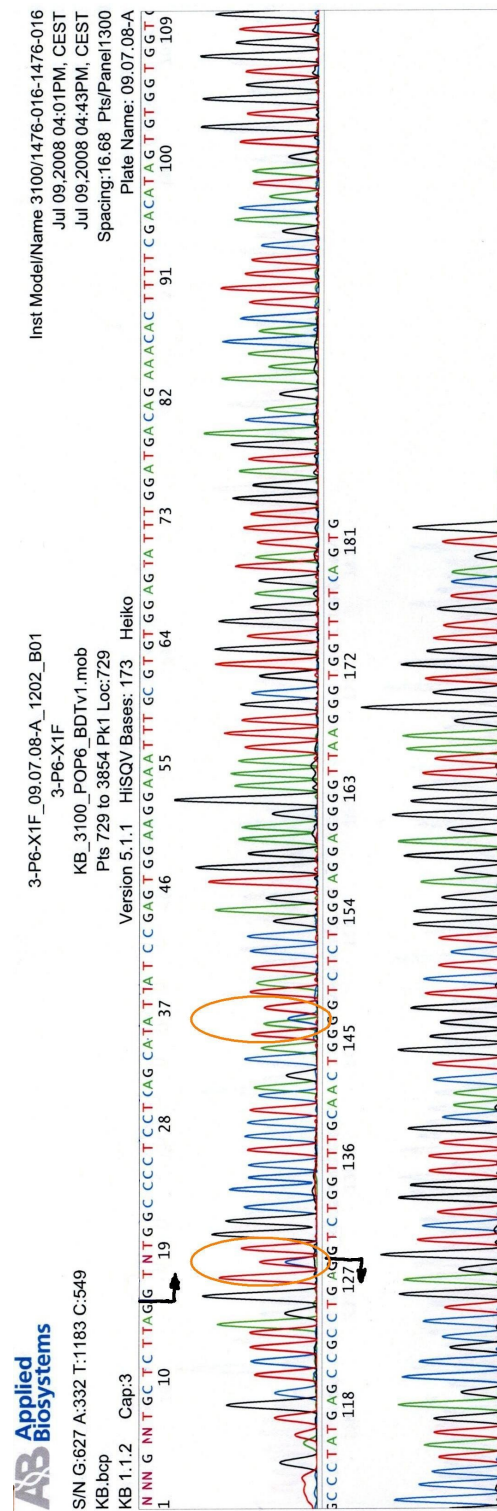


Abb.3.5: Mutationen L189L und L195I in p53 Exon 6. (Mutierte Bereiche orange markiert).

3.3 Resultate der Sequenzierung von BRAF

BRAF-Mutationen in den Exons 11 und 15 fanden sich in keinem der 42 untersuchten hormonrefraktären Prostatakarzinome.

3.4 Resultate der Sequenzierung von c-Kit

Zwei von 42 Tumoren (4,8 %) wiesen Veränderungen der DNA-Sequenz im c-Kit-Gen auf (*Abbildung 3.6*). Beide Alterationen erwiesen sich als Punktmutationen und lagen im Exon 9 (*Abbildungen 3.7, 3.8 und 3.9*).

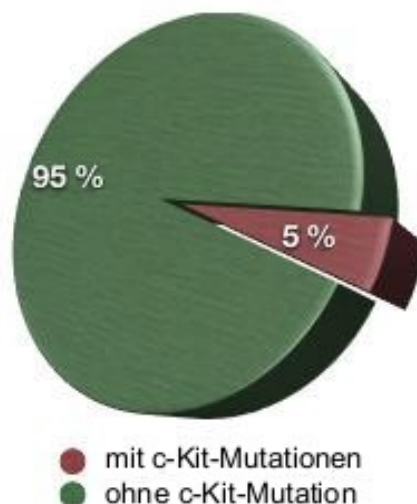


Abb. 3.6: Prozentualer Anteil der in c-Kit alterierten Proben.

Eine der beiden Mutationen (T461T) führte nicht zu einem Aminosäurenaustausch. Die Untersuchung von Normalgewebe ergab im Fall dieser stummen Mutation keine Aberration im Normalgewebe, so dass angenommen werden muss, dass diese Mutation tatsächlich spontan im Tumorgewebe entstanden ist. Bei dem anderen mutierten Tumor (D496N)

kam es zu einem Aminosäurenaustausch, es handelte sich um eine bisher nicht bekannte Kit-Mutation. Der entsprechende Tumor zeigte immunhistochemisch keine Expression des c-Kit-Rezeptors. Im Normalgewebe ließ sich hier die gleiche Mutation wie auch schon im Tumor nachweisen.

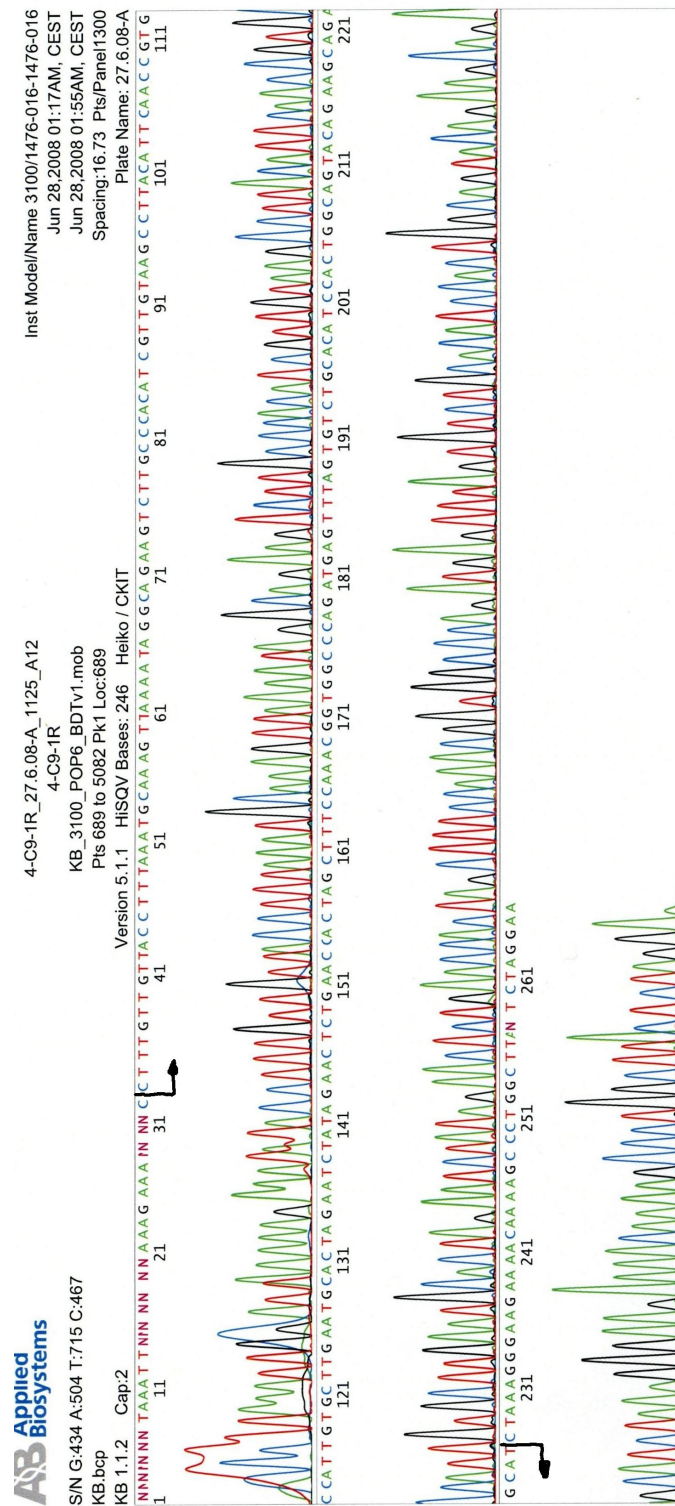


Abb. 3.7: Wildtypsequenz von c-Kit Exon 9.

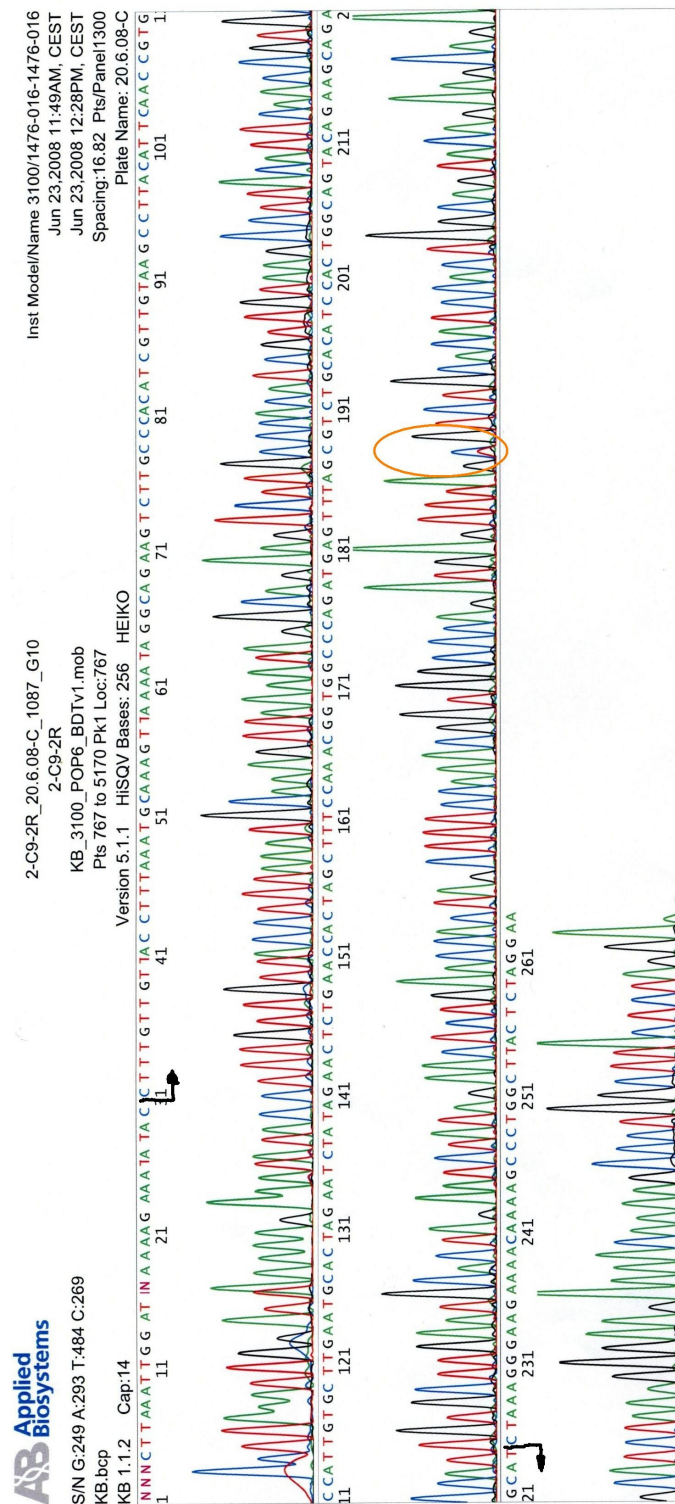


Abb. 3.8: Mutation T461T in c-Kit Exon 9. (Mutierter Bereich orange markiert).

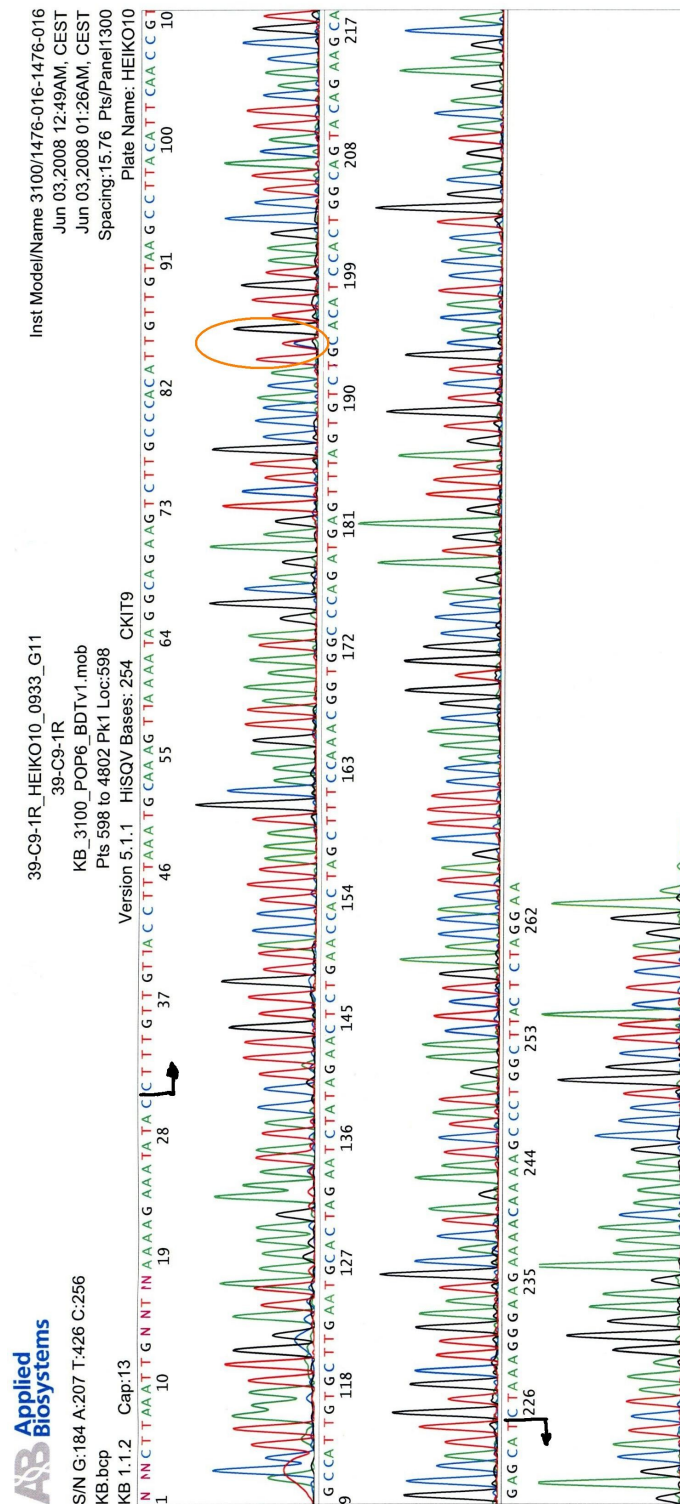


Abb. 3.9: Mutation D496N in c-Kit Exon 9. (Mutierter Bereich orange markiert).

Alle nachgewiesenen Mutationen im Zusammenhang zueinander sind *Tabelle 3.2* zu entnehmen.

[illegible]

4. Diskussion

4.1 Mutationen von p53 im Prostatakarzinom

Die Angaben der Literatur zur Häufigkeit von mittels Immunhistochemie (IHC) nachgewiesener, vermehrter p53-Expression variieren beim Prostatakarzinom sehr stark [23]. So konnten Bauer et al. bei 85 von 139 Patienten (61 %) mit einem Prostatakarzinom eine erhöhte Expression von p53 nachweisen [94]. Zellweger et al. wiesen nur in 4 % der 181 untersuchten Prostatakarzinome eine Überexpression von p53 nach [95]. Diese Varianz ist wahrscheinlich auf Probleme des Verfahrens der IHC zurückzuführen. Es erstaunt allerdings, dass sich durch Sequenzierung gewonnene Daten zu p53-Mutationshäufigkeiten ähnlich stark von Studie zu Studie unterscheiden. Publikationen mit Angabe der Häufigkeit von p53-Mutationen sind in *Tabelle 4.1* [44-60] zusammengefasst. Aussagen über der Zusammensetzung der Kollektive sind nicht immer vorhanden.

In nicht näher definierten Kollektiven von Prostatkarzinomen variieren die Mutationshäufigkeiten von p53 besonders stark. So berichten Shi et al. bei 98 Primärtumoren, analysiert durch „modified yeast functional assay“ und anschließende Sequenzierung, von 44,9 % mutierten Proben, während in einer Studie von Kunimi et al. nur 5,6 % der sequenzierten Prostatakarzinome Mutationen aufwiesen [47, 60]. Im Mittelfeld liegen Studien wie die von Schlechte et al. mit 26,2 % Mutationshäufigkeit bei 103 Prostatakarzinomen, Kubota et al. mit 19 % mutierten Proben und Incognito et al., die bei 58 Patienten 14 % Mutationshäufigkeit in den Exons 5-9 angeben [51, 53, 54]. Bei vorselektionierten Kollektiven verhält sich die Häufigkeit von p53-Mutationen in Prostatakarzinomen wie folgt: Rakozzy et al.

beschreiben bei immunhistochemisch p53-positiven Karzinomen eine Mutationshäufigkeit von 50 % [45]. Eine noch höhere Tendenz wird durch Griewe et al. beschrieben, in deren Studie 69 % der immunhistochemisch positiven Proben mutiert waren [46]. In derselben Studie wiesen immunhistochemisch p53-negative Tumore eine Mutationshäufigkeit von immerhin 22 % auf. In frühen Prostatakarzinomen kommen laut Literaturrecherche durch Downing et al. zu einem Drittel der Fälle Mutationen vor [50]. In einer Studie von Mühlbauer et al., bei der 84 % der untersuchten Tumore einen Gleason-Score von sieben oder höher aufwiesen, waren 12 % der Proben mutiert [55]. Durch Watanabe et al. untersuchte Prostatakarzinome eines späten Stadiums mit weitläufiger Metastasenbildung wiesen mit 31 % eine ähnliche Mutationshäufigkeit auf [48]. Hormonrefraktäre Prostatakarzinome zeichnen sich in einer Studie von Berner et al. durch elf von 50 (22 %) mutierte Proben aus [52].

Die auffallend hohe Diskrepanz der Mutationshäufigkeiten von Studie zu Studie könnte durch mehrere Faktoren begründet sein. Ein Aspekt ist hierbei sicherlich die Auswahl des untersuchten Kollektivs. So ist zu erwarten, dass sich in Kollektiven mit einer höheren Anzahl von Tumoren fortgeschrittenen Stadiums auch vermehrt Aberrationen nachweisen lassen [96]. Auch ist davon auszugehen, dass einige Ergebnisse durch technische Probleme, sowie die Auswahl der Methode und des Protokolls begründet sind. Auffallend ist, dass die meisten Studien eine gefundene Mutation nicht durch eine Sequenzierreaktion aus einem neuen PCR-Reaktionsansatz derselben Ausgangs-DNA validierten. Unter Berücksichtigung der bestehenden Fehlerrate von DNA-Polymerasen wäre so denkbar, dass einige der gefundenen Mutationen in Wirklichkeit nur auf Polymerasefehlern während der anfänglichen Replikationszyklen der Polymerase-Kettenreaktion beruhen. Einige Studien untersuchten zudem ausschließlich Exon 5-8 von p53, andere

zusätzlich auch Exon 4. Da jedoch nur ein geringer Anteil der p53-Mutationen in Exon 4 liegt, erklärt dieser methodische Unterschied die Diskrepanz zwischen den Studien nicht. Die untersuchten Exons der berücksichtigten Studien sowie die Mutationsfrequenz von Exon 4 sind *Tabelle 4.1* zu entnehmen.

Tab. 4.1: Mutationshäufigkeiten von p53 in Prostatakarzinomen in der Literatur.

Autor	Untersuchte Proben	Untersuchte Exons, verwendete Methoden	Positiver Befund wurde durch neuen Reaktionsansatz validiert	Mutationsrate Exon 4	Mutationsrate Gesamt
Gumerlock et al., 1997	19 Prostatakarzinome (14 mit vorheriger RT-PCR-SSCP Auffälligkeit)	Exon 4-10, SSCP	ja	0,00%	78,90%
Griewe et al., 2003	16 IHC p53-positive Prostatakarzinome nach radikaler Ektomie	Exon 5-8, SSCP und Sequenzierung	teilweise	-	69,00%
Rakozy et al., 1999	10 IHC p53-positive Prostatakarzinome	Exon 4-9, SSCP und Sequenzierung	nein	10,00%	50,00%
Shi et al., 2004	98 primäre Prostatakarzinome	Exon 5-8, Modified yeast functional assay und Sequenzierung	Untersuchung von mindestens drei positiven yeast Kolonien	-	44,90%
Watanabe et al., 1994	13 Prostatakarzinome in einem späten Stadium	Exon 1-11, SSCP und Sequenzierung	nein	7,90%	31,00%
Shi et al., 2002	10 Prostatakarzinome	Exon 5-8, Modified yeast assay, SSCP und Sequenzierung	nein	-	30,00%
Downing et al., 2003	Frühe Prostatakarzinome	Unethliche Exons, Literaturrecherche	-	-	30,00%
Schlechte et al., 1998	103 Prostatakarzinome	Exon 5-8, TGGE und Sequenzierung	nein	-	26,20%
Griewe et al., 2003	18 IHC p53-negative Prostatakarzinome nach radikaler Ektomie	Exon 5-8, SSCP und Sequenzierung	teilweise	-	22,00%
Berner et al., 1995	50 hormonrefraktäre Prostatakarzinome	Exon 5-8, IHC, CDGE und Sequenzierung	nein	-	22,00%
Kubota et al., 1995	21 Prostatakarzinome	Exon 1-11, SSCP und Sequenzierung	nein	4,80%	19,00%
Incognito et al., 2000	58 Prostatakarzinome	Exon 5-9, SSCP und Sequenzierung	nein	-	14,00%
Mühlbauer et al., 2003	25 Prostatakarzinome, 84% Gleasonscore 7+	Exon 1-11, p53GeneChip und Sequenzierung	nein	0,00%	12,00%
Brooks et al., 1996	10 Prostatakarzinome mit Allelverlust von Chromosom 17p und/oder dem p53-Gen	Exon 5-9, Sequenzierung	nein	-	10,00%
Effert et al., 1993	10 Prostatakarzinome (Gleasonscore 2-10)	Exon 4-9, SSCP und Sequenzierung	nein	0,00%	10,00%
Dinjens et al., 1994	20 Prostatakarzinome	Exon 5-8, SSCP und Sequenzierung	nein	-	10,00%
Berner et al., 1995	34 hormonnaive Prostatakarzinome	Exon 5-8, IHC, CDGE und Sequenzierung	nein	-	9,00%
Massenkeil et al., 1994	38 Prostatakarzinome	Exon 5-8, SSCP und Sequenzierung	nein	-	8,00%
Kunimi et al., 1996	18 unbehandelte Prostatakarzinome	Exon 4-10, Sequenzierung	nein	0,00%	5,60%

Abkürzungen: SSCP - single strand conformation polymorphism; TGGE - temperature gradient gel electrophoresis; IHC - Immunhistochemie; CDGE - constant denaturant gel electrophoresis.

Auch in den Laboren der Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf wurden bereits zuvor Prostatakarzinome auf p53-Mutationen untersucht. Genau wie in unserer Studie wurde auch hier ein positiver Befund jedes Mal durch eine erneute PCR mit anschließender Sequenzierung validiert. Dies ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

In 29 von 63 (46 %) der sequenzierten hormonnaiven Tumore konnten p53-Mutationen festgestellt werden. Jene analysierten Proben gehörten allerdings bereits zu einem vorselektionierten Kollektiv. Sie zählten aus einer zufälligen Auswahl von 2514 Prostatakarzinomen zu den 2,5 %, die sich immunhistochemisch durch p53-Positivität auszeichneten. Eine Mutationsanalyse von 63 p53-negativen high-grade Tumoren ergab vier mutierte Proben (6,4 %) [23]. Diese Ergebnisse wurden in *Tabelle 4.2* den Erkenntnissen unserer Studie gegenübergestellt.

Tab. 4.2: Mutationshäufigkeit von p53 in Prostatakarzinomen aus dem UKE.

Untersuchte Proben	Verfahren	Mutationshäufigkeit
63 p53-positive Prostatakarzinome	Sequenzierung	46,00%
63 p53-negative High Grade Prostatakarzinome	Sequenzierung	6,40%
42 Hormonrefraktäre Prostatakarzinome	Sequenzierung	26,20%

Um nun die in dieser Studie behandelte Mutationshäufigkeit von hormonrefraktären Prostatakarzinomen mit der Mutationshäufigkeit der vorangegangenen Untersuchung aus Eppendorf zu vergleichen, muss man rechnerisch die Anzahl mutierter Proben aus dem Gesamtkollektiv von 2514 Prostatakarzinomen ermitteln. Wenn 2,5 % des Gesamtkollektivs p53-positiv sind, und sich diese durch Mutationen in 46 % der Fälle auszeichnen, so beträgt die gesamte Mutationshäufigkeit näherungsweise 1,15 % (2,5 % multipliziert mit 0,46). Dieser Wert müsste nun noch mit dem Anteil von p53-

negativen und dennoch mutierten Prostatakarzinomen verrechnet werden. Da mit unseren Verfahren bei high-grade Karzinomen dieser Wert bei 6,4 % lag, kann bei vorsichtiger Schätzung davon ausgegangen werden, dass zwischen 1,15 % und 6,4 % aller unbehandelter Primärtumore der Prostata p53-Mutationen aufweisen. Damit ergibt sich mit Sicherheit ein signifikanter Anstieg von p53-Mutationen in unserem, zu 26,2 % mutierten, hormonrefraktären Kollektiv.

Bereits vorausgegangene Studien berichteten ebenfalls von einem Anstieg der Häufigkeit von p53-Mutationen in hormonrefraktären Prostatakarzinomen im Vergleich zu hormonnaiven. So wiesen Berner et al. bereits 1995 bei 19 von 50 (38 %) hormonrefraktären, und nur bei sechs von 34 (18 %) hormonnaiven Prostatkarzinomen eine Anhäufung von p53-Protein nach [52]. Diese p53-positiven Karzinome wurden im Verlauf der Studie sequenziert. Von den hormonrefraktären Proben zeigten sich nun in elf der ursprünglich 50 Fälle (22 %) p53-Mutationen, wohingegen nur drei der anfänglich 34 (9 %) hormonnaiven Karzinome mutiert waren. Somit kommen diese Zahlen den unseren relativ nahe.

4.2 Die Rolle von p53-Mutationen bei der Entstehung eines hormonrefraktären Status

Obwohl sich ein hormonrefraktäres Prostatakarzinom im Hinblick auf verbleibende Therapieoptionen deutlich von einem hormonnaiven Prostatakarzinom unterscheidet, ist die eigentliche Entstehung des hormonrefraktären Status bisher nicht ausreichend geklärt. Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass hormonrefraktäre Prostatakarzinome häufiger

p53-Mutationen aufweisen als hormonnaive. Nun stellt sich die Frage, ob nicht gerade erst das Erwerben einer p53-Mutation zu der Entstehung eines hormonrefraktären Status führt.

Bei einigen Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom konnte ein mutierter Androgenrezeptor identifiziert werden, der in seiner steroidal Bindungscharakteristik sowie der Antwort auf Antiandrogene verändert reagiert [77, 78]. Für die Rolle von p53-Mutationen bei der Entstehung dieses veränderten Rezeptors kommen im wesentlichen zwei Thesen in Frage.

Zum einen könnte eine Mutation die Funktion von p53 als Tumorsuppressorgen vermindern oder aufheben (loss-of-function) und somit zur fehlenden Hormonsensitivität führen. Schon Gingrich et al. zeigten im Mausmodell, dass p53-inaktivierte Prostatakarzinome einen hormonrefraktären Status entwickelten [79]. Zu einer ähnlichen Erkenntnis kam auch eine andere Studie, in der eine Reduzierung von Wildtyp-p53 zur Ausprägung von Androgenunabhängigkeit in einer menschlichen Prostatakarzinomzelllinie führte [80].

Zum anderen können p53-Mutationen auch zu dem Erwerb einer neuen führen. In diesem Fall spricht man von einer Gain-of-function-Mutation (GOF-Mutation). Der Zusammenhang des mutierten Androgenrezeptors mit p53-GOF-Mutationen wurde in einer Studie von Nesslinger et al. behandelt [24]. Es zeigte sich, dass Zelllinien von Prostatakarzinomen mit GOF-Mutationen der p53-Allele vom Typ G245S, R248W, R273H und R273C auch unter androgenserschöpften Umständen die Fähigkeit behielten zu wachsen. Weitere Forschungen an Gain-of-function-Mutationen in Prostatakarzinomzelllinien im Zusammenhang mit Androgenunabhängigkeit wurden durch Tepper et al. durchgeführt. Die Forschung ergab, dass unterschiedliche p53-GOF-Mutationen über gemeinsame Gene wirken, die sich in ihrer Expression sowohl positiv als auch negativ beeinflussen lassen [25]. Auch schon in

anderen Tumorarten wurde, bedingt durch GOF-Mutationen, ein erhöhtes Tumorentwicklungspotential nachgewiesen und ein Hochregulieren von Genen beobachtet, die für die Zellproliferation zuständig sind [81-83].

Die Berücksichtigung dieser Studien sowie der im Vergleich zu hormonnaiven Prostatakarzinomen aufgezeigten, erhöhten p53-Mutationsfrequenz der hormonrefraktären Form bekräftigt die Annahme, dass auch spontan entstandene p53-Mutationen zu der Entstehung eines hormonrefraktären Status von Prostatakarzinompatienten beitragen könnten.

4.3 Mutationen von BRAF im Prostatakarzinom

In keinem der 42 von uns untersuchten hormonrefraktären Prostatakarzinome fand sich eine BRAF-Mutation. Dieses Resultat ist unerwartet, berichteten doch Cho et al. in einer Studie mit 206 koreanischen Prostatakarzinomen von mehr als 10 % BRAF-Mutationen in Codon 600. Hierbei waren 21 von 206 (10,2 %) Karzinomen mutiert [26]. Bei Anwendung eines Chi-Quadrat-Tests sind die Unterschiede zwischen unserem Kollektiv (0/42) und dem koreanischen Kollektiv (21/206) hoch signifikant ($p=0,00142$).

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass Cho et al. Prostatakarzinome aus einem frühen Stadium verwendeten, welche sich wesentlich von hormonrefraktären Karzinomen unterscheiden [26]. Die Prostatakarzinome in unserer Studie wiesen größtenteils einen höheren Gleason-Score, ein höheres PSA-Level, sowie ein fortgeschrittenes Tumorstadium auf. Zudem war das untersuchte Patientenkollektiv, im Unterschied zu unsere Studie mit westlichem Patientenmaterial, von koreanischer Herkunft. Auch wiesen bereits andere Untersuchungen früher Prostatakarzinome keine Mutationen

von BRAF auf. In der Studie von Liu et al. zeigte keines der 93 unbehandelten Prostatakarzinome BRAF-Mutationen, das gleiche gilt auch für Cohen et al., die 17 Prostatakarzinome untersuchten [92, 93]. Trotzdem eröffnet die beschriebene Diskrepanz von Mutationshäufigkeiten zwei interessante Erklärungsmöglichkeiten:

Es wäre einerseits denkbar, dass koreanische Prostatakarzinome, die sich in ihrer Prävalenz ohnehin deutlich von westlichen Prostatakarzinomen unterscheiden, über andere molekulare Regelsysteme entstehen. Im Gegensatz zu der Studie von Cho et al., wurde in unsere Studie und auch in den zuvor genannten Studien von Liu et al. und Choen et al. kaukasisches Patientenmaterial verwendet [26, 92, 93]. Schon beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom wird eine aktivierende Mutation des epidermalen Wachstumsfaktors im asiatischen Patientenkollektiv häufiger beobachtet, als bei US-amerikanischen Patienten [87]. Ethnisch bedingte, molekulare Unterschiede könnten möglicherweise auch im Prostatakarzinom bestehen. So könnte eine Alteration von BRAF möglicherweise zwar die Genese eines koreanischen Prostatakarzinoms begünstigen und somit die gefundenen Mutationen von Cho et al. in Codon 600 erklären, bei der Entwicklung eines westlichen Karzinoms hingegen aber keine Rolle spielen [26].

Andererseits wäre es vorstellbar, dass BRAF-Mutationen nur in der Entwicklung von frühen Prostatakarzinomen mitwirken. So könnte der Erhalt des Tumors, sowie die Progression zu einem höheren Tumorstadium einschließlich Androgenunabhängigkeit entkoppelt von der BRAF-Signalkaskade ablaufen. Jeong et al. konnten beispielsweise im Mausmodell zeigen, dass eine Mutation von BRAF V600E über eine Aktivierung der MAP-Kinase-Aktivität zu der Entwicklung von schnellwachsenden Adenokarzinomen der Prostata führte [86]. Desweiteren führte die genetische

Tilgung der Mutation in diesen Karzinomen zu keiner Tumorregression, was dafür spricht, dass BRAF V600E zwar die Entwicklung eines Prostatakarzinoms induzieren kann, jedoch für seinen Erhalt nicht obligat ist. Theoretisch wäre es daher denkbar, dass BRAF-positive Klone während der Progression zum hormonrefraktären Status durch andere Zellklone verdrängt werden, was ebenfalls das Fehlen von BRAF-Mutationen in unserem hormonrefraktären Kollektiv von Prostatakarzinomen erklären würde.

Technische Probleme bei der Mutationsanalyse kommen als Erklärung für die unterschiedlichen Befunde in unserer und der Studie von Cho et al. theoretisch ebenfalls in Frage [26]. Eine Möglichkeit für falsch-negative Mutationsanalysen in unserem Kollektiv wäre hierbei eine Verdünnung der Tumor-DNA durch Normalgewebe-DNA. Die hohe Häufigkeit von p53-Mutationen in unseren 42 Proben spricht aber gegen eine derartige Möglichkeit, da auch die Analyse dieser Mutationen sonst von einer möglichen Verdünnung betroffen sein müsste. Hinsichtlich der koreanische Studie gibt es einen technischen Aspekt zur Interpretierung der Ergebnisse, der zu thematisieren wäre. Wie schon zuvor erwähnt, ist die Mutation V600E die häufigste und relevanteste BRAF-Mutation, die im Zusammenhang zur Onkogenese steht [89, 90]. Die gefundenen BRAF-Mutationen von Cho et al. sind jedoch größtenteils eher unübliche Mutationen desselben Codons wie V600A oder V600M, die durch eine Transition verursacht wurden [26]. Da Transitionen durch Formalinfixierung bedingt sein können, wäre es möglich, dass ein Teil der in der Studie von Cho et al. gefundenen Mutationen tatsächlich technische Artefakte darstellen [88, 26]. In diesem Fall betrüge die wahrhaftige Mutationsfrequenz nur 1 % bezogen auf zwei gefundene V600E-BRAF-Mutationen in 206 Karzinomen.

Folglich wäre es denkbar, dass unser Kollektiv, sowie die Kollektive der anderen Studien ohne BRAF-Mutationen, zu klein sind, um diesen geringen Anteil von BRAF-Mutationen festzustellen.

4.4 Die Rolle von Sorafenib als Therapieoption im BRAF-mutierten Prostatakarzinom

Das Vorliegen von BRAF-Mutationen in der Studie von Cho et al. ist insofern von Bedeutung, als beispielsweise mit Sorafenib ein Medikament zur Verfügung steht, dass potenziell bei BRAF-mutierten Karzinomen zum Einsatz kommen könnte [26]. Gerade bezogen auf hormonrefraktäre Prostatakarzinome, bei denen nur wenige weitere therapeutische Optionen bestehen, wäre das Vorliegen von BRAF-Mutationen so besonders bedeutsam. Bei Sorafenib handelt es sich um einen oralen Proteinkinaseinhibitor, der sich durch antiproliferative sowie antiangiogene Wirkung auszeichnet und beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom bereits indiziert ist [61]. Seine Wirksamkeit wurde auch im Zusammenhang mit BRAF-Mutationen untersucht. So wurde beim Schilddrüsenkarzinom vom papillären Typ mit BRAF-Mutation im Mausmodell ein mit der Kontrollgruppe um 53 %-54 % reduziertes Wachstum der Tumorzellen durch die orale Gabe von Sorafenib (80 mg/kg/d) nachgewiesen [27]. Auch bei malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST), die sich durch BRAF-Expression auszeichneten, wurde durch Ambrosini et al. bereits unter Einsatz von nanomolaren Sorafenibkonzentrationen eine Wachstumsminde- rung aufgezeigt [28]

Die Ergebnisse unserer Mutationsanalyse von hormonrefraktären Prostatakarzinomen, sowie die Resultate weitere Studien mit früheren, hormonsensitiven, kaukasischen Patientenkollektiven, zeigten keine einzige Mutation von BRAF [92, 93]. Dies spricht, zumindest bei kaukasischen Prostatakarzinomen, stark gegen eine Therapieoption durch Sorafenib.

4.5 Mutationen von c-Kit und Expression des c-Kit-Rezeptors im Prostatakarzinom

Zwar wurden bisher Analysen zu Kit-Mutationen in Prostatakarzinomen nicht beschrieben, wohl aber gibt es Berichte über die Expression des c-Kit-Rezeptors. So berichteten Simak et al. von 2 % c-Kit-Protein-Expression (einer von 46 Tumoren) in malignen Epithelzellen von Prostatakarzinomen [31]. Eine weitere Studie von Di Lorenzo et al. beschreibt sogar bei 26 von 94 (27,7 %) Prostatakarzinomen mit einem Gleason-Score größer sieben eine epitheliale Expression des c-Kit-Rezeptors [30]. Zudem zeichnen sich hormonrefraktäre Prostatakarzinome in einer Studie mit 51 Patienten von Ohlmann et al. durch Expression des c-Kit-Proteins in 25 % der Fälle aus [29]. Die Ergebnisse dieser Studien eröffnen die Möglichkeit, dass die Expression des c-Kit-Rezeptors zu der Entstehung oder aber der Progression von Prostatakarzinomen beitragen könnten. Fraglich ist jedoch, ob die aufgezeigte Expression eventuell in einer imatinibsensitiven Mutation des c-Kit-Genes begründet liegt, oder aber durch andere Faktoren mit beeinflusst wird.

Tatsächlich fanden sich unter unseren 42 fortgeschrittenen Prostatakarzinomen zwei eindeutige Mutationen im c-Kit Exon 9. Weitere Untersuchungen des sequenzierten Gewebes ergaben jedoch keine

Hinweise auf eine funktionelle Relevanz dieser Mutationen. Eine Mutation schien zwar spontan im Tumor entstanden zu sein, da sie sich im Normalgewebe des Patienten nicht nachweisen ließ, jedoch erwies sie sich als stumm. Das bedeutet, dass die durch die Mutation veränderte Basenabfolge der DNA nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz nach der Translation führt und somit das entstehende Protein nicht verändert. Bei dem anderen mutierten Tumor entspricht die gefundene Kit-Mutation nicht den imatinibresistenten bekannten Mutationen beim gastrointestinalen Stromatumor. Auch zeigte das entsprechende Karzinom immunhistochemisch keinerlei Expression des c-Kit-Rezeptors. Zudem kommt die gleiche Mutation auch im Normalgewebe des Patienten vor, was für das Vorliegen einer somatischen Mutation spricht. Inwiefern diese Mutation die weitere Funktionalität des c-Kit-Proteins beeinflusst ist nicht ersichtlich, jedoch scheint das nicht mutierte c-Kit-Allel ausreichend, um die Aufgaben des c-Kit-Rezeptor während der Embryogenese bei Gametogenese und Hämatopoese zu gewährleisten [63]. Anderenfalls wäre eine lebensfähige Entwicklung während der Schwangerschaft wahrscheinlich nicht möglich gewesen.

Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse scheinen, zumindest in hormonrefraktären Prostatakarzinomen, Mutationen von c-Kit nur sehr selten vorzukommen.

4.6 Die Rolle von Imatinib als Therapieoption im Prostatakarzinom

Die c-Kit-Mutationsanalyse wurde in unserem Projekt mit eingeschlossen, weil die therapeutische Wirkung von Imatinib in verschiedenen Studien am

Prostatakarzinom untersucht wird [33]. Imatinib ist ein Wirkstoff, der spezifische Tyrosinkinasen inhibiert und so schon bei der Behandlung von chronisch myelischen Leukämien zum Einsatz kommt [62]. Auch bei der Therapie von gastrointestinalen Stromatumoren, einer Tumorart, die sich sowohl durch eine hohe Expression des c-Kit-Rezeptors, als auch eine hohe Mutationsrate von c-Kit auszeichnet, kommt diesem Medikament durch seine hohe Wirksamkeit eine herausragende Bedeutung zu [32]. So gibt es zumindest Berichte über ansatzweises Ansprechen von Prostatakarzinomen auf Imatinib. In einer Studie von Bajaj et al. wurden beispielsweise 27 Patienten mit einem hormonrefraktären Prostatakarzinom ein Jahr lang, zweimal täglich, mit 400 mg Imatinibmesilat behandelt [34]. Bei immerhin 18,5 % der Patienten erwies sich der PSA-Wert während der Behandlungszeit als stabil.

Da jedoch die 42 durch uns untersuchten Tumore keine funktionell relevanten c-Kit-Mutationen enthielten, findet sich in unserer Studie keine Erklärung für das gelegentliche Ansprechen von hormonrefraktären Prostatakarzinomen auf Imatinib.

Daten aus dieser Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

J. Köllermann, H. Albrecht, T. Schlomm, H. Huland, M. Graefen, C. Bokemeyer, R. Simon, G. Sauter, W. Wilczak.

Activating BRAF gene mutations are uncommon in hormone refractory prostate cancer in Caucasian patients.

Oncology Letters. 2010; 1 (4): 729-732.

5. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom zählt zu den häufigsten lebensbedrohlichen Tumorerkrankungen beim Mann in westlichen Gesellschaften. Die kurative Vorgehensweise beinhaltet vor allem bei Tumoren im fortgeschrittenen Stadium häufig eine antiandrogene Behandlung. Zwar führt diese überwiegend zu einer dramatischen Tumorremission, jedoch kommt es im Krankheitsverlauf vielfach zum Auftreten eines hormonrefraktären Rezidivs. Die weitere Therapie gestaltet sich dann in der Regel problematisch. Um die Pathogenese von hormonrefraktären Prostatakarzinomen besser zu verstehen, wurden in dieser Studie das Tumorsuppressorgen p53, das Onkogen BRAF sowie das Protoonkogen c-Kit einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Bereits im Vorfeld bestanden Hinweise darauf, dass p53-Mutationen in hormonrefraktären Prostatakarzinomen häufiger vorkommen als in der naiven Form. Eine Zuordnung von Mutationen in BRAF, oder c-Kit zum Prostatakarzinom wäre insofern interessant, als mit Sorafenib und Imatinib bereits spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren zur Verfügung stehen, die dann als Behandlungsoptionen für bestimmte Prostatakarzinompatienten in Frage kämen.

Zu diesem Zweck wurden Gewebe der Primärtumore von insgesamt 42 Patienten mit hormonrefraktären Prostatakarzinomen per Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Anschließend wurden die Exons p53-5 bis 8, BRAF-11 und 15, sowie c-Kit-9, 11 und 13 mit der automatisierten Form der enzymatischen Kettenabbruchmethode zur DNA-Sequenzierung nach Frederick Sanger sequenziert.

Die Untersuchung ergab in 26,2 % der Fälle Mutationen im p53-Gen. Hierbei dominierten Aberrationen in Exon 6 und Exon 8. BRAF-Mutationen fanden

sich in keinem der untersuchten Tumore. Die Analyse von c-Kit offenbarte zwei mutierte Proben (4,8 %). Beide befanden sich in Exon 9, stellten sich jedoch nach weiterer Analyse nicht als funktionell relevant heraus.

Verglichen mit einer früheren Studie aus dem Universitätsklinikum Eppendorf, bei der eine zufällige Auswahl von Prostatakarzinomen verwendet wurde, ergab sich ein signifikanter Anstieg von p53-Mutationen in unserem hormonrefraktären Kollektiv. Dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, dass spontan entstandene p53-Mutationen zu der Bildung eines hormonrefraktären Status von Prostatakarzinompatienten beitragen können. Das gänzliche Fehlen von BRAF-Mutationen in unserer Studie ist unerwartet, da eine koreanische Untersuchung 10,2 % Mutationshäufigkeit in Codon 600 von frühen Prostatakarzinomen beschreibt. Als Erklärung kommt hierfür eine mangelnde Kompatibilität von BRAF-Mutationen in Zusammenhang mit einem hormonrefraktären Status in Frage. Auch denkbar wäre, dass koreanische Prostatakarzinome durch andere molekulare Regelmechanismen entstehen als westliche und daher auch andere Mutationshäufigkeiten aufweisen. Eine therapeutische Verwendung von Sorafenib oder Imatinib beim hormonrefraktären Prostatakarzinom scheint bezogen auf die Ergebnisse unsere Studie, mit dem fehlenden Nachweis von funktionell relevanten Mutationen von BRAF oder c-Kit, als unwahrscheinlich.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM- and Rad3-related
CDGE	constant denaturant gel electrophoresis
CDK	cyclin-dependent kinases
d	day
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ErbB1	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
G1-Phase	Präsynthesephase
G2-Phase	Postsynthesephase
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GOF	gain of function
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
l	Liter
MAPK	mitogen-activated protein kinases
Mdm2	murine double minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidentumor
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

μmol	Mikromol
ng	Nanogramm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	Proteinkinase
PSA	prostataspezifisches Antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RNA	Ribonukleinsäure
S-Phase	Synthesephase
SCF	stem cell factor
SSCP	single strand conformation polymorphism
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGGE	temperaure gradient gel electrophoresis
U/min	Umdrehungen pro Minute
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf

6.2 Abbildungen und Tabellen

<i>Abbildung 1.1:</i> Alterspezifische Inzidenz und Mortalität für Prostatakrebs in Deutschland 2002.....	3
<i>Abbildung 1.2:</i> Regulation und Wirkung von p53.....	6
<i>Abbildung 1.3:</i> Die Signalkaskade von RAF.....	9
<i>Abbildung 3.1:</i> Agarosegelelektrophorese von c-Kit Exon 13.....	23
<i>Abbildung 3.2:</i> Prozentualer Anteil der in p53 mutierten Proben.....	24
<i>Abbildung 3.3:</i> Zugehörigkeit der elf funktionell relevanten p53-Mutationen zu den entsprechenden Exons.....	26
<i>Abbildung 3.4:</i> Wildtypsequenz von p53 Exon 6.....	27
<i>Abbildung 3.5:</i> Mutationen L189L und L195I in p53 Exon 6.....	28
<i>Abbildung 3.6:</i> Prozentualer Anteil der in c-Kit alterierten Proben.....	29
<i>Abbildung 3.7:</i> Wildtypsequenz von c-Kit Exon 9.....	31
<i>Abbildung 3.8:</i> Mutation T461T in c-Kit Exon 9.....	32
<i>Abbildung 3.9:</i> Mutation D496N in c-Kit Exon 9.....	33
 <i>Tabelle 2.1:</i> Gleason-Score der verwendeten Prostatakarzinomproben.....	14
<i>Tabelle 3.1:</i> Aufzählung der gefundenen p53-Mutationen.....	25
<i>Tabelle 3.2:</i> Aufzählung der gefundenen Mutationen im Zusammenhang zueinander.....	34
<i>Tabelle 4.1:</i> Mutationshäufigkeiten von p53 in Prostatakarzinomen in der Literatur.....	38
<i>Tabelle 4.2:</i> Mutationshäufigkeit von p53 in Prostatakarzinomen aus dem UKE.....	39

6.3 Literaturverzeichnis

- (1) Reske SN.
Nuclear imaging of prostate cancer: current status.
Urologe A. 2007 Nov;46(11):1485-99.
- (2) Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI
(2006) Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Auflage, Saarbrücken.
- (3) Rohde, Katalinic, Wasem, Aidelburger.
Robert Koch Institut: Heft 36 Prostataerkrankungen - Gesundheitsberichterstattung
des Bundes (2007): 7-8.
- (4) Bühling, Lepenies, Witt.
Intensivkurs – Allgemeine und spezielle Pathologie.
3. Aufl. Elsevier GmbH, München (2004): 267-69.
- (5) Graefen, Markus; Huland, Hartwig; Pientka, Ludger; Miller, Kurt; Rübben, Herbert.
Serie Prostatakarzinom: Indikation zur kurativen Therapie des Prostatakarzinoms
Stellenwert von Nomogrammen in der Prognoseabschätzung und Therapieberatung.
Dtsch Arztebl 2004; 101: A 2619–2622 [Heft 39].
- (6) Metastasiertes Prostatakarzinom: Abarelix beschleunigt Hormonentzug.
Dtsch Arztebl 2008; 105(13): A-691.
- (7) Jin RJ, Lho , Conelly L, Wang Y, Yu X, Saint Jean L, Case TC, Ellwood-Yen K,
Sawyers CL, Bhowmick NA, Blackwell TS, Yull FE, Matusik RJ.
The nuclear factor-kappaB pathway controls the progression of prostate cancer to
androgen-independent growth.
Cancer Res. 2008 Aug 15;68(16):6762-9.
- (8) Mehra R, Tomlins SA, Yu J, Cao X, Wang L, Menon A, Rubin MA, Pienta KJ, Shah
RB, Chinnaiyan AM.
Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent
metastatic prostate cancer.
Cancer Res. 2008 May 15;68(10):3584-90.
- (9) Jia L, Shen HC, Wantroba M, Khalid O, Liang G, Wang Q, Gentzsch E, Pinski JK,
Stanczyk FZ, Jones PA, Coetzee GA.
Locus-wide chromatin remodeling and enhanced androgen receptor-mediated
transcription in recurrent prostate tumor cells.
Mol Cell Biol. 2006 Oct;26(19):7331-41.
- (10) Shah RB, Ghosh D, Elder JT.
Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer
progression: correlation with androgen independence.
Prostate. 2006 Sep 15;66(13):1437-44.

-
- (11) Bertram J, Peacock JW, Fazli L, Mui AL, Chung SW, Cox ME, Monia B, Gleave ME, Ong CJ.
Loss of PTEN is associated with progression to androgen independence.
Prostate. 2006 Jun 15;66(9):895-902.
- (12) Jung HY, Whang YM, Sung JS, Shin HD, Park BL, Kim JS, Shin SW, Seo HY, Seo JH, Kim YH.
Association study of TP53 polymorphisms with lung cancer in a Korean population.
J Hum Genet. 2008;53(6):508-14.
- (13) Malcikova J, Smardova J, Pekova S, Cejkova S, Kotaskova J, Tichy B, Francova H, Doubek M, Brychtova Y, Janek D, Pospisilova S, Mayer J, Dvorakova D, Trbusek M.
Identification of somatic hypermutations in the TP53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Mol Immunol. 2008 Mar;45(5):1525-9.
- (14) Yan W, Liu G, Scoumanne A, Chen X.
Suppression of inhibitor of differentiation 2, a target of mutant p53, is required for gain-of-function mutations.
Cancer Res. 2008 Aug 15;68(16):6789-96.
- (15) Baptiste-Okoh N, Barsotti AM, Prives C.
A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 12;105(6):1937-42.
- (16) Garnett MJ, Marais R.
Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene.
Cancer Cell. 2004 Oct;6(4):313-9.
- (17) Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF.
Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade.
Recent Prog Horm Res. 2001;56:127-55.
- (18) Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R.
Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization.
Mol Cell. 2005 Dec 22;20(6):963-9.
- (19) Cichoz-Lach H, Kasztelan-Szczerbińska B, Słomka M.
Gastrointestinal stromal tumors: epidemiology, clinical picture, diagnosis, prognosis and treatment.
Pol Arch Med Wewn. 2008 Apr;118(4):216-21.
- (20) Cristofanilli M, Morandi P, Krishnamurthy S, Reuben JM, Lee BN, Francis D, Booser DJ, Green MC, Arun BK, Puzstai L, Lopez A, Islam R, Valero V, Hortobagyi GN.
Imatinib mesylate (Gleevec(R)) in advanced breast cancer-expressing C-Kit or PDGFR- β : clinical activity and biological correlations.
Ann Oncol. 2008 Oct;19(10):1713-9.

- (21)Edling CE, Hallberg B.
c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase.
Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(11):1995-8.
- (22)Löffler, Petrides, Heinrich.
Biochemie & Pathobiochemie.
8. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg (2007): 165,247.
- (23)Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Köllermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A.
Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers.
Mod Pathol. 2008 Nov;21(11):1371-8.
- (24)Nesslinger NJ, Shi XB, deVere White RW.
Androgen-independent growth of LNCaP prostate cancer cells is mediated by gain-of-function mutant p53.
Cancer Res. 2003 May 1;63(9):2228-33.
- (25)Tepper CG, Gregg JP, Shi XB, Vinall RL, Baron CA, Ryan PE, Desprez PY, Kung HJ, deVere White RW.
Profiling of gene expression changes caused by p53 gain-of-function mutant alleles in prostate cancer cells.
Prostate. 2005 Dec 1;65(4):375-89.
- (26)Cho NY, Choi M, Kim BH, Cho YM, Moon KC, Kang GH.
BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma.
Int J Cancer. 2006 Oct 15;119(8):1858-62.
- (27)Henderson YC, Ahn SH, Kang Y, Clayman GL.
Sorafenib potentially inhibits papillary thyroid carcinomas harboring RET/PTC1 rearrangement.
Clin Cancer Res. 2008 Aug 1;14(15):4908-14.
- (28)Ambrosini G, Cheema HS, Seelman S, Teed A, Sambol EB, Singer S, Schwartz GK.
Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells.
Mol Cancer Ther. 2008 Apr;7(4):890-6.
- (29)Ohlmann CH, Markert E, Gerharz M, Pfister D, Dienes HP, Engelmann U, Heidenreich A.
Feasibility of targeted therapy based on immunohistochemical expression analysis in androgen-independent prostate cancer.
Urologe A. 2008 Sep;47(9):1218-23.
- (30)Di Lorenzo G, Autorino R, D'Armiento FP, Mignogna C, De Laurentiis M, De Sio M, D'Armiento M, Damiano R, Vecchio G, De Placido S.
Expression of proto-oncogene c-kit in high risk prostate cancer.
Eur J Surg Oncol. 2004 Nov;30(9):987-92.

- (31) Simak R, Capodieci P, Cohen DW, Fair WR, Scher H, Melamed J, Drobnjak M, Heston WD, Stix U, Steiner G, Cordon-Cardo C.
Expression of c-kit and kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues.
Histol Histopathol. 2000 Apr;15(2):365-74.
- (32) Croom KF, Perry CM.
Imatinib mesylate: in the treatment of gastrointestinal stromal tumours.
Drugs. 2003;63(5):513-22.
- (33) Masiello D, Mohi MG, McKnight NC, Smith B, Neel BG, Balk SP, Bubley GJ.
Combining an mTOR antagonist and receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of prostate cancer.
Cancer Biol Ther. 2007 Feb;6(2):195-201.
- (34) Bajaj GK, Zhang Z, Garrett-Mayer E, Drew R, Sinibaldi V, Pili R, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, DeWeese TL.
Phase II study of imatinib mesylate in patients with prostate cancer with evidence of biochemical relapse after definitive radical retropubic prostatectomy or radiotherapy.
Urology. 2007 Mar;69(3):526-31.
- (35) Robinson, M.J. and Cobb, M.H.
Mitogen-activated protein kinase pathways.
Curr. Opin. Cell Biol. 1997;9:180–186.
- (36) Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J. and Kohno, M.
Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors.
Oncogene 1999;18: 813–822.
- (37) Blechman JM, Lev S, Givol D, Yarden Y.
Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor.
Stem Cells 1993;11: 12–21.
- (38) Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T.
The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136.
Curr Biol 1998;8: 779–782.
- (39) Brunet A, Datta SR, Greenberg ME.
Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway.
Curr Opin Neurobiol 2001;11: 297–305.
- (40) Tian Q, Frierson HFJ, Krystal GW, et al.
Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors.
Am J Pathol 1999; 154: 1643 – 1647.
- (41) Longley BJJ, Metcalfe DD, Tharp M, et al.
Activating and dominant inactivating c-kit catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis.
Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 1609 – 1614.

- (42) Isozaki K, Hirota S.
Gain-of-Function Mutations of Receptor Tyrosine Kinases in Gastrointestinal Stromal Tumors.
Curr Genomics. 2006 Nov;7(8):469.
- (43) Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y, et al.
Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product.
J Clin Invest. 1993 Oct;92(4):1736-44.
- (44) Gumerlock PH, Chi SG, Shi XB, Voeller HJ, Jacobson JW, Gelmann EP, deVere White RW.
p53 abnormalities in primary prostate cancer: single-strand conformation polymorphism analysis of complementary DNA in comparison with genomic DNA. The Cooperative Prostate Network.
J Natl Cancer Inst. 1997 Jan 1;89(1):66-71.
- (45) Rakoczy C, Grignon DJ, Li Y, Gheiler E, Gururajanna B, Pontes JE, Sakr W, Wood DP Jr, Sarkar FH.
p53 gene alterations in prostate cancer after radiation failure and their association with clinical outcome: a molecular and immunohistochemical analysis.
Pathol Res Pract. 1999;195(3):129-35.
- (46) Griewe GL, Dean RC, Zhang W, Young D, Sesterhenn IA, Shanmugam N, McLeod DG, Moul JW, Srivastava S.
p53 Immunostaining guided laser capture microdissection (p53-LCM) defines the presence of p53 gene mutations in focal regions of primary prostate cancer positive for p53 protein.
Prostate Cancer Prostatic Dis. 2003;6(4):281-5.
- (47) Shi XB, Gandour-Edwards R, Beckett LA, Deitch AD, de Vere White RW.
A modified yeast assay used on archival samples of localized prostate cancer tissue improves the detection of p53 abnormalities and increases their predictive value.
BJU Int. 2004 Nov;94(7):996-1002.
- (48) Watanabe M, Ushijima T, Kakiuchi H, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J, Kotake T, Sugimura T, Nagao M.
p53 gene mutations in human prostate cancers in Japan: different mutation spectra between Japan and western countries.
Jpn J Cancer Res. 1994 Sep;85(9):904-10.
- (49) Shi XB, Di Mauro SM, Highshaw R, Deitch AD, Evans CP, Gumerlock PH, deVere White RW.
Application of a yeast assay to detect functional p53 mutations in archival prostate cancer tissue.
Cancer Biother Radiopharm. 2002 Dec;17(6):657-64.
- (50) Downing SR, Russell PJ, Jackson P.
Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer.
Can J Urol. 2003 Aug;10(4):1924-33.

- (51) Schlechte H, Lenk SV, Löning T, Schnorr D, Rudolph BD, Ditscherlein G, Loening SA.
p53 tumour suppressor gene mutations in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.
Eur Urol. 1998;34(5):433-40.
- (52) Berner A, Geitvik G, Karlsen F, Fosså SD, Nesland JM, Børresen AL.
TP53 mutations in prostatic cancer. Analysis of pre- and post-treatment archival formalin-fixed tumour tissue.
J Pathol. 1995 Jul;176(3):299-308.
- (53) Kubota Y, Shuin T, Uemura H, Fujinami K, Miyamoto H, Torigoe S, Dobashi Y, Kitamura H, Iwasaki Y, Danenberg K, et al.
Tumor suppressor gene p53 mutations in human prostate cancer.
Prostate. 1995 Jul;27(1):18-24.
- (54) Incognito LS, Cazares LH, Schellhammer PF, Kuban DA, Van Dyk EO, Moriarty RP, Wright GL Jr, Somers KD.
Overexpression of p53 in prostate carcinoma is associated with improved overall survival but not predictive of response to radiotherapy.
Int J Oncol. 2000 Oct;17(4):761-9.
- (55) Mühlbauer KR, Gröne HJ, Ernst T, Gröne E, Tschada R, Hergenhahn M, Hollstein M.
Analysis of human prostate cancers and cell lines for mutations in the TP53 and KLF6 tumour suppressor genes.
Br J Cancer. 2003 Aug 18;89(4):687-90.
- (56) Brooks JD, Bova GS, Ewing CM, Piantadosi S, Carter BS, Robinson JC, Epstein JI, Isaacs WB.
An uncertain role for p53 gene alterations in human prostate cancers.
Cancer Res. 1996 Aug 15;56(16):3814-22.
- (57) Effert PJ, McCoy RH, Walther PJ, Liu ET.
p53 gene alterations in human prostate carcinoma.
J Urol. 1993 Jul;150(1):257-61.
- (58) Dinjens WN, van der Weiden MM, Schroeder FH, Bosman FT, Trapman J.
Frequency and characterization of p53 mutations in primary and metastatic human prostate cancer.
Int J Cancer. 1994 Mar 1;56(5):630-3.
- (59) Massenkeil G, Oberhuber H, Hailemariam S, Sulser T, Diener PA, Bannwart F, Schäfer R, Schwarte-Waldhoff I.
P53 mutations and loss of heterozygosity on chromosomes 8p, 16q, 17p, and 18q are confined to advanced prostate cancer.
Anticancer Res. 1994 Nov-Dec;14(6B):2785-90.
- (60) Kunimi K, Amano T, Uchibayashi T.
Point mutation of the p53 gene is an infrequent event in untreated prostate cancer.
Cancer Detect Prev. 1996;20(3):218-22.

-
- (61) Karow T, Lang-Roth R.
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
16. Aufl., Pulheim (2008):1111.
- (62) Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ.
The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia.
Blood. 2005 Apr 1;105(7):2640-53.
- (63) Wypych, J., Bennett, L. G., Schwartz, M. G., Clogston, C. L., Lu, H. S., Broudy, V., Bartley, T. D., Parker, V. P., Langley, K. E.
Soluble kit receptor in human serum.
Blood 1995; 85: 66-73.
- (64) Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.
Biochemie.
2. Aufl. Thieme (2008):527, 561.
- (65) Löffler, Petrides, Heinrich.
Biochemie & Pathobiochemie.
8. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg (2007): 227, 1148-1150.
- (66) Levine AJ, Momand J, Finlay CA.
The p53 tumour suppressor gene.
Nature 1991; 351: 453-6.
- (67) Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B.
"Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage."
Science 1998 ; 282 : 1497-501.
- (68) Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A.
Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours.
Nature 1992; 356: 215-21.
- (69) Barnier, J.V., Papin, C., Eychène, A., Lecoq, O., and Calothy, G.
The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression.
J. Biol. Chem. 270 (1995), 23381-23389.
- (70) Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R.
The RAF proteins take centre stage.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 (2004), 875-885.
- (71) Wittinghofer, A., and Nassar, N.
How Ras-related proteins talk to their effectors.
Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 488-491.
- (72) Hancock, J. F.
Ras proteins: different signals from different locations.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (2003), 373-384.

- (73) Weber, C.K., Slupsky, J.R., Herrmann, C., Schuler, M., Rapp, U.R., and Block, C.
Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozyms.
Oncogene 19 (2000), 169–176.
- (74) Löffler, Petrides, Heinrich.
Biochemie & Pathobiochemie.
8. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg (2007): 170-172.
- (75) Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A.
Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand.
EMBO J. 1987 Nov;6(11):3341-51.
- (76) Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM.
Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile.
Blood. 1991 Sep 15;78(6):1403-12.
- (77) Taplin M. E., Bubley G. J., Ko Y. J., Small E. J., Upton M., Rajeshkumar B., Balk S. P.
Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist.
Cancer Res. 1999 Jun 1;59(11):2511-5.
- (78) Veldscholte J., Ris-Stalpers C., Kuiper G. G. J. M., Jenster G., Berrevoets C., Claassen E., van Rooij H. C. J., Trapman J., Brinkmann A. O., Mulder E.
A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990 Dec 14;173(2):534-40.
- (79) Gingrich J. R., Barrios R. J., Kattan M. W., Nahm H. S., Finegold M. J., Greenberg N. M.
Androgen-independent prostate cancer progression in the TRAMP model.
Cancer Res. 1997 Nov 1;57(21):4687-91.
- (80) Burchardt M., Burchardt T., Shabsigh A., Ghafar M., Chen M-W., Anastasiadis A., de la Taille A., Kiss A., Buttyan R.
Reduction of wild type p53 function confers a hormone resistant phenotype on LNCaP prostate cancer cells.
Prostate. 2001 Sep 15;48(4):225-30.
- (81) Dittmer D., Pati S., Zambetti G., Chu S., Teresky A. K., Moore M., Finlay C., Levine A. J.
Gain of function mutations in p53.
Nat Genet. 1993 May;4(1):42-6.
- (82) Shi X-B., Nesslinger N. J., Deitch A. D., Gumerlock P. H., deVere White R. W.
Complex functions of mutant p53 alleles from human prostate cancer.
Prostate. 2002 Apr 1;51(1):59-72.

-
- (83) van Oijen M. G. C. T., Slootweg P. J.
Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53.
Clin Cancer Res. 2000 Jun;6(6):2138-45.
- (84) Huggins C., Hodge C. V.
Studies on prostatic cancer: The effects of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate.
Cancer Res. 1941;1: 293-297.
- (85) Gao H, Ouyang X, Banach-Petrosky WA, Gerald WL, Shen MM, Abate-Shen C.
Combinatorial activities of Akt and B-Raf/Erk signaling in a mouse model of androgen-independent prostate cancer.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 26;103(39):14477-82.
- (86) Jeong JH, Wang Z, Guimaraes AS, Ouyang X, Figueiredo JL, Ding Z, Jiang S, Guney I, Kang GH, Shin E, Hahn WC, Loda MF, Abate-Shen C, Weissleder R, Chin L.
BRAF activation initiates but does not maintain invasive prostate adenocarcinoma.
PLoS One. 2008;3(12):e3949.
- (87) Riely GJ, Politi KA, Miller VA, et al.
Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer.
Clin Cancer Res. 2006;12:7232-7241.
- (88) Marchetti A, Felicioni L, Buttitta F.
Assessing EGFR mutations.
N Engl J Med. 2006 Feb 2;354(5):526-8.
- (89) Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, Yamagata S, Shimizu A, Taira K, Kawakami Y.
Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference.
Oncogene. 2004 Aug 12;23(36):6031-9.
- (90) Hoeflich KP, Gray DC, Eby MT, Tien JY, Wong L, Bower J, Gogineni A, Zha J, Cole MJ, Stern HM, Murray LJ, Davis DP, Seshagiri S.
Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models.
Cancer Res. 2006 Jan 15;66(2):999-1006.
- (91) Pratilas CA, Solit DB.
Therapeutic strategies for targeting BRAF in human cancer.
Rev Recent Clin Trials. 2007 May;2(2):121-34.
- (92) Liu T, Willmore-Payne C, Layfield LJ, Holden JA.
Lack of BRAF Activating Mutations in Prostate Adenocarcinoma: A Study of 93 Cases.
Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2009 Mar;17(2):121-5.

- (93)Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D.
BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma.
J Natl Cancer Inst. 2003;95:625–7.
- (94)Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi KF, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW.
p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy.
Clin Cancer Res. 1995 Nov;1(11):1295-300.
- (95)Zellweger T, Ninck C, Bloch M, Mirlacher M, Koivisto PA, Helin HJ, Mihatsch MJ, Gasser TC, Bubendorf L.
Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer.
Int J Cancer. 2005 Feb 10;113(4):619-28.
- (96)El Gammal AT, Brüchmann M, Zustin J, Isbarn H, Hellwinkel OJ, Köllermann J, Sauter G, Simon R, Wilczak W, Schwarz J, Bokemeyer C, Brümmendorf TH, Izbicki JR, Yekebas E, Fisch M, Huland H, Graefen M, Schlomm T.
Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer.
Clin Cancer Res. 2010 Jan 1;16(1):56-64.
- (97)Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP.
Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays.
Cancer Res. 1999 Feb 15;59(4):803-6.

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Bereitstellung des spannenden Themas, sowie die geduldige Unterstützung während der Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon und Herrn Dr. med. Jens Köllermann danke ich für die inhaltliche Unterstützung. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen.

Mein besonderer Dank gilt dem gesamten Team des Sequenzierlabors für die herzliche Arbeitsatmosphäre und technische Unterstützung. Insbesondere Frau Agata Blaszczyk-Wewer und Frau Gabriele Rieck standen mir mit ihrer Erfahrung und Hilfsbereitschaft immer zu Seite.

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben. Hier sind Freunde, Studienkollegen und vor allem meine Familie zu nennen, ohne deren Rückhalt ich sicherlich nicht so weit gekommen wäre. Meinem Vater danke ich zudem für das gewissenhafte Korrekturlesen und den guten Zuspruch in allen Lebenslagen.

8. 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.

Unterschrift: