

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Anleitung von PD Dr. Ronald Simon

Untersuchungen von KRAS Amplifikationen in unterschiedlichen Tumorgewebetypen auf Basis eines Tumor Multi Array`s

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Birco Schwalbe

Hamburg 2011

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.06.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. K. Kutsche

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

1	Einleitung	4
1.1	Krebsinzidenz in Deutschland.....	4
1.2	Karzinogenese	7
1.3	Therapiemöglichkeiten bei Krebs	8
1.4	Rezeptor Thyrosinkinase.....	9
1.5	Die EGF-Rezeptor Familie.....	10
1.6	Die Ras Genfamilie	13
1.6.1	KRAS	13
1.7	Genamplifikation.....	15
1.8	FISH	17
1.7	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Untersuchungsmaterial.....	20
2.2	FISH	21
2.2.1	Auswahl und Anzucht von BAC Klonen.....	23
2.2.2	DNA-Extraktion	24
2.2.3	Sondenmarkierung	25
2.2.4	Hybridisierung.....	26
2.2.5	Fluoreszenz-Detektion	29
2.3	Auswertung	30
2.4	Statistik.....	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Auswertung eines Tissue Microarray	31
3.1.1	High Level Amplifikationen auf den Tissue Microarray	33
3.2	Untersuchung von Tumorentitäten ohne KRAS Amplifikation	35
3.3	Vergleich KRAS Amplifikation PECA versus ADCA	36
4	Diskussion.....	39

5	Zusammenfassung.....	49
6	Abkürzungsverzeichnis.....	50
7	Literaturverzeichnis	52
8	Danksagungen.....	62
9	Lebenslauf.....	63
10	Eidesstattliche Erklärung	65

Einleitung

1.1 Krebsinzidenz in Deutschland

Krebserkrankungen insgesamt stellen nach den Herz- Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. 2007 starben in Deutschland laut statistischem Bundesamt 217289 Menschen an den Folgen einer bösartigen Neubildung. Unter den 10 häufigsten Todesursachen in Deutschland befindet sich bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge auf Platz 4, gefolgt von bösartigen Neubildungen des Dickdarms und der Mamma auf den Plätzen 9 und 10 (Tab. 1).

ICD-10 Pos.-Nr.	Todesursache	Gestorbene	
		Anzahl	Anteil in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	76 915	9,3
I21	Akuter Myokardinfarkt	57 788	7,0
I50	Herzinsuffizienz	49 970	6,0
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	41 495	5,0
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	26 911	3,3
J44	Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	21 716	2,6
J18	Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	21 079	2,5
I11	Hypertensive Herzkrankheit	18 553	2,2
C18	Bösartige Neubildung des Dickdarms	18 072	2,2
C50	Bösartige Neubildung der Mamma	17 029	2,1

Tab. 1: Häufigste Todesursachen in Deutschland 2007

Die Tabelle zeigt die 10 häufigsten Todesursachen in Deutschland 2007 nach der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) bereitgestellt online vom Statistischen Bundesamt 2007

Spezifiziert nach Geschlechtern sind die fünf häufigsten zum Tode führenden bösartigen Neubildungen 2007 in Deutschland laut statistischem Bundesamt weitgehend identisch gewesen: Bei Männern waren Lungen- und Bronchialkarzinome die häufigsten zum Tode führenden bösartige Neubildung, gefolgt von Dick- und Enddarmkarzinomen. Die Plätze drei bis fünf nahmen in absteigender Reihenfolge Prostata-; Pankreas-; und auf Platz fünf Magenkarzinome ein.

Bei Frauen sind die Mammakarzinome weiterhin die häufigste Todesursache infolge einer bösartigen Neubildung, gefolgt vom Lungen- und Bronchialkarzinomen. Den dritten Platz nehmen bei Frauen Dick und Enddarmkarzinome, gefolgt von Ovarialkarzinomen auf Platz vier und Pankreaskarzinomen auf Platz fünf ein (www.dkfz.de).

Während bei den Männern seit 1990 die Anzahl der Sterbefälle bei allen fünf Krebsarten sinkt, steigt die Anzahl der weiblichen Sterbefälle bei Lungen- und Bronchialkarzinomen, sowie bei Pankreaskarzinomen weiter an (Abb. 1).

Während die Mortalität an Krankheiten des Herz- Kreislaufsystems aufgrund wachsender medizinischer Kenntnisse in den letzten 40 Jahren stark rückläufig ist, geht die Mortalität an Krebserkrankungen nur langsam zurück. Sollte sich dieses nicht ändern, dann wird innerhalb der nächsten 20 Jahre Krebs zur häufigsten Todesursache in Deutschland werden.

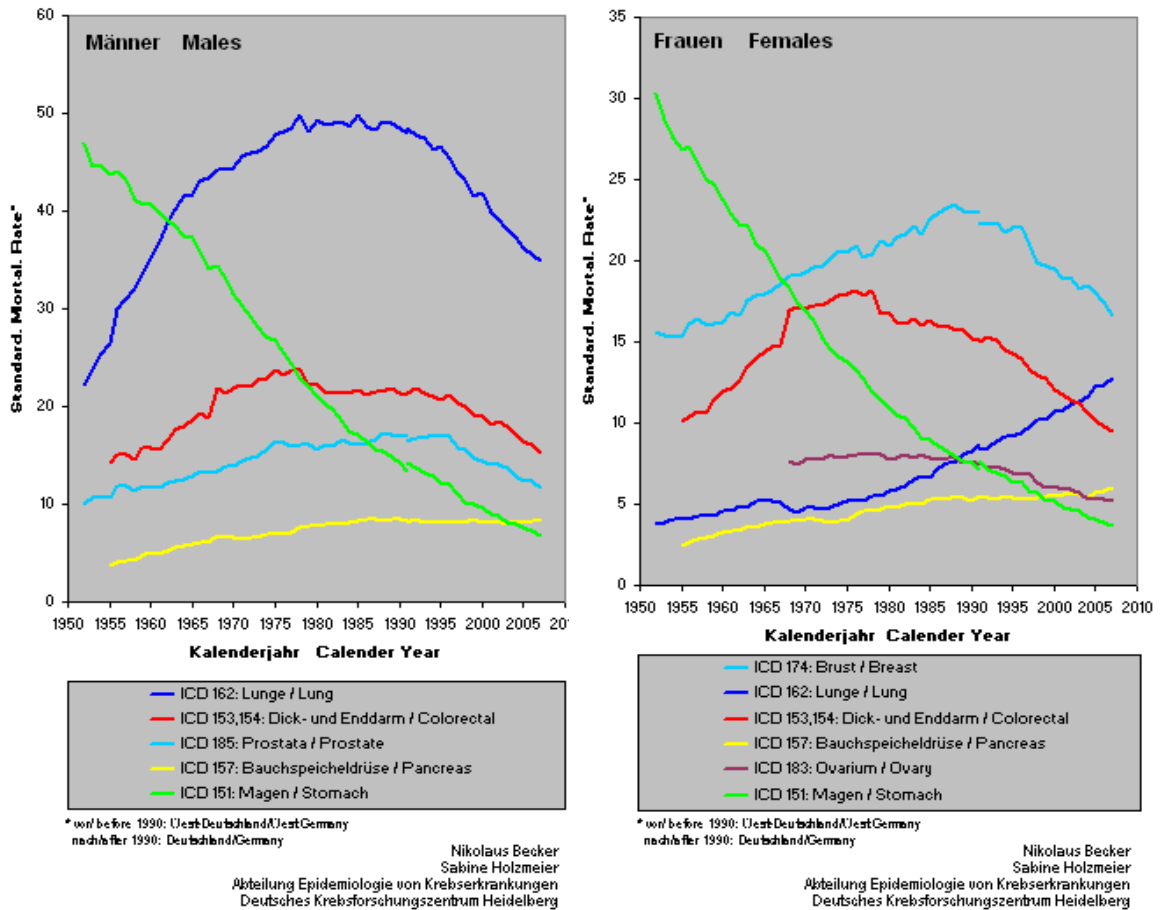


Abb. 1: Die am häufigsten zum Tode führenden Krebsarten 2007

Die Graphik zeigt die 5 (Männer) beziehungsweise 6 (Frauen) am häufigsten zum Tode führenden Krebstypen über einen Zeitraum von 50 Jahren. Ersichtlich ist, dass die Mortalität bei Männern seit 1990 für alle 5 Krebstypen rückläufig ist. Dahingegen steigt bei Frauen die Mortalität von Pankreas- sowie Lungen- und Bronchialkarzinomen weiter an. Abbildungen übernommen von (www.dkfz.de)

1.2 Karzinogenese

Als Karzinogenese bezeichnet man die Entstehung und Entwicklung von Krebs. Hierbei ist zu beachten, dass Krebs zu den multifaktoriellen Krankheiten gehört, d.h. mehrere Faktoren beeinflussen die Entstehung und Entwicklung eines Tumors. Einige dieser Risikofaktoren lassen sich beeinflussen wie z.B. Stress, Ernährung oder der Kontakt mit kanzerogenen Substanzen wie Benzol, UV-Licht und Nicotin. Andere Risikofaktoren sind hingegen nicht beeinflussbar z.B. die hohe Lebenserwartung sowie eine genetische Prädisposition. Auf der zellulären Ebene steht am Anfang einer Krebserkrankung immer eine einzige Körperzelle, bei der aufgrund von Mutationen die Regulation des Zellzyklus ausgefallen ist. Es kommt dadurch zu einem dysregulierten, ungehemmten Wachstum dieser Körperzelle. Hierbei beeinflussen vor allem zwei Gruppen von Genen diesen Vorgang. Die erste Gruppe sind die Tumorsuppressorgene. Diese Gene sollen eigentlich die Entstehung von Tumoren unterbinden, indem sie den Zellzyklus überwachen und anhalten können sobald bei der Vervielfältigung des genetischen Materials schädliche Mutationen auftreten. Sind allerdings beide Allele eines Tumorsuppressorgens so mutiert, dass sie ihre regulatorische Funktion verlieren, dann können auftretende Mutationen während der Replikation die Zelle veranlassen sich unkontrolliert zu teilen. Die zweite Gruppe sind die Onkogene. Sie entwickeln sich aus normalen zellulären Genen (c-Protoonkogene) durch Mutationen, welche teilweise durch den Kontakt mit Risikofaktoren ausgelöst werden. Die so mutierten Onkogene können durch ihre Aktivität oder ihre alleinige Anwesenheit zur malignen Transformation von Zellen führen. Protoonkogene kodieren bestimmte regulatorisch wirkende Proteine der Zelle. Zu diesen Proteinen zählen Zellzyklus regulierende Proteine, Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren und Proteine die Wachstumssignale weiterleiten, Transkriptionsfaktoren oder anti-apoptotisch wirkende Proteine.

Sie können durch verschiedene Mechanismen aktiviert und somit zu Onkogenen mutieren z.B. durch Punktmutationen (z.B. H-ras), durch Translokation (z.B. bcr/abl) oder durch Vervielfachung des Gens (Amplifikation, z.B. ErbB2).

In Folgenden werden wir uns eingehender mit dem Onkogen KRAS beschäftigen.

1.3 Therapiemöglichkeiten bei Krebs

Allgemein werden Tumorerkrankungen entweder durch operative, chemotherapeutische oder strahlentherapeutische Verfahren behandelt. Da nicht alle Tumore gleichermaßen auf dieselben Therapien ansprechen, wird in der Regel je nach Tumortyp und Tumorstadium eine geeignete Kombination aus diesen drei Methoden verwendet. Dadurch soll entweder einen kurativen Erfolg, oder aber eine möglichst große Regression des Tumors erzielt werden. Nachteilhaft bei diesen Therapien ist allerdings, dass bei allen drei Methoden nicht nur Tumorzellen, sondern auch gesunde Körperzellen in einem hohen Maß geschädigt werden. Hieraus resultieren verschiedene, teilweise schwere Nebenwirkungen, mit denen Patienten während und nach diesen Therapien zu kämpfen haben.

Eine neuere Form von Therapie soll diese Nebenwirkungen der drei Standardverfahren vermindern und gleichzeitig Tumorzellen gezielter und besser vom normalen Körperzellen unterscheiden und vernichten können. Diese Therapieform nennt man heute Target-orientierte Therapie. Hierbei macht man sich bestimmte molekulare Strukturen der Tumorzellen zunutze, welche auf gesunden Zellen entweder fehlen oder aber in veränderter Form vorliegen. Gegen diese "Targets" richtet sich dann die Therapie. Eine ganze Reihe von Substanzen, welche sich gegen die unterschiedlichsten Targets richten sind mittlerweile entwickelt worden. Da gibt es gegen Rezeptoren gerichtete Antikörper und Rezeptorantagonisten, inhibitorisch wirkende kleine Moleküle, Ligand-Toxin-Konjugate oder Antisense-Moleküle. Der monoklonale humanisierte Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) beispielsweise bindet spezifisch an die extrazelluläre Domäne des Wachstumsfaktorrezeptors ErbB2 und kann auf diese Weise die Proliferation von Tumoren hemmen, die diesen Rezeptor vermehrt exprimieren [1]. Der monoklonale Antikörper Cetuximab ist selektiv gegen den EGF-Rezeptor gerichtet und soll neben der Inhibition der nachfolgenden Signaltransduktion die Fähigkeit haben die tumoreigenen Reparaturmechanismen zu unterbinden. Die Substanz Imatinib (Glivec®), ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der spezifisch die bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) durch Translokation entstehende bcr/abl-Kinase hemmt [2].

Diese neuen Therapien machen allerdings auch neue diagnostische Verfahren notwendig. Die molekulare Analyse der Tumorzellen wird für die Charakterisierung des Tumors unerlässlich. Auf ihrer Basis wird die Entscheidung jener in der Therapie verwendeten

Substanzen getroffen. Zur molekularen Analyse eignen sich verschiedene Verfahren wie z.B. die Methoden der Immunhistochemie oder der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

1.4 Rezeptor-Thyrosin- Kinasen

Die Gruppe der Rezeptor-Thyrosin-Kinasen (RTK) gehören zum sensorisch kommunikativen System einer Körperzelle. Mit ihrer Hilfe kann die Zelle bestimmte extrazelluläre Signale richtig interpretieren und von der Zelloberfläche in den Zellkern weiterleiten, wo ein spezifischer Prozess in Gang gesetzt wird. Die bisher bekannten 58 RTKs sind in 20 Untergruppen eingeteilt. Sie sind in vielen Tumortypen überexprimiert und können zu einem unkontrollierten Wachstum des Tumors führen [3]. Dieses macht die RTKs interessant für eine Target-orientierte Therapie. Im Folgenden werden wir einige Gruppen von RTKs näher betrachten.

1.5 Die EGF-Rezeptor Familie

Die ErbB-Proteine bilden die Klasse I der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Beim Menschen besteht dieses System aus vier strukturell und funktionell nahe verwandten Rezeptoren und mehreren Liganden. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, auch ErbB1 oder HER 1) ist der erste Rezeptor und fungiert als Namensgeber dieser Gruppe. Des Weiteren folgen ErbB2/neu/Her2, ErbB3/Her3 und ErbB4/Her4. Alle sind strukturell aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranären Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne mit Tyrosin-Kinase-Aktivität aufgebaut. Als Liganden werden Peptide verwendet, die mit dem Epidermalen- Wachstumsfaktor (EGF) verwandt sind. Sie lassen sich aufgrund ihres spezifischen Bindungsverhaltens bisher ebenfalls in vier Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bindet nur an EGFR, die zweite Gruppe an EGFR und ErbB4, die dritte Gruppe an ErbB3 und ErbB4 und die vierte Gruppe nur an ErbB4 (Abb.3) [4]. Ein an ErbB2 bindender Ligand konnte bisher nicht gefunden werden [5]. Die Bindung eines Liganden an einen passenden Rezeptor führt zur Bildung von Rezeptordimeren. Es kommt dabei sowohl zur Formation von Homodimeren (z.B. EGFR+EGFR) als auch von Heterodimeren (z.B. EGFR+ErbB3). Vier verschiedene Homodimere und sechs verschiedene Heterodimere können entstehen. Die Identität des geformten Dimers entscheidet darüber, welche zytoplasmatischen Signalmoleküle sich anlagern können und welcher weitere Signalweg in Gang gesetzt wird. So wird durch HER3 Heterodimere, über die Transkriptionsfaktoren fos, jun und myc, der AKT-Signalweg aktiviert [6], während HER1/HER2 Hetero- oder Homodimere, über Shc und Ras, den Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAP-Kinase) Signalweg aktivieren. Auf beiden Wegen wird ein Wachstumssignal durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungskaskaden durch das Zytoplasma bis in den Zellkern weitergeleitet. Die auf diesem Wege durchlaufenen Interaktionen zwischen den einzelnen Signalwegen sind sehr komplex und bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Letztlich führen aber alle zu Zellwachstum und Zellentwicklung durch die Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren und nehmen somit eine zentrale Rolle beim Wachstum des Menschen ein.

Wir befassen uns in diesem Zusammenhang genauer mit dem EGF-Rezeptor. Er ist in einer Vielzahl menschlicher Tumoren in veränderter Form anzutreffen und weist damit ein hohes onkologisches Potential auf. EGF-Rezeptoren können in Zellen, physiologisch oder

aufgrund einer Genamplifikation, überexprimiert oder mutiert vorkommen. Besonders häufig findet sich eine erhöhte EGFR Expression in Tumoren in Hirn, Nieren, Lungen, Harnwegen, Prostata, Gastrointestinal und in Schilddrüsen [7-13]. Des Weiteren konnte für einige dieser Karzinome ein Zusammenhang zwischen EGFR-Überexpression und vermeintlich schlechteren Prognose aufgezeigt werden [14,15].

EGF-Rezeptor Genamplifikationen oder zumindest eine erhöhte Genkopiezahl als Ursache für die Expression ist seltener, und wurden bisher z.B. bei ~50 % der Hirntumoren (Glioblastoma) [7], ~6 % der Lungenkarzinomen (NSCLC) [8], ~4 % der Kolon- [11], 79% der Haut- (maligne Melanome) [12], ~16 % der Brust- [9], >20 % der Knochen- [10] und 61% der Schilddrüsentumoren (anaplastisches Thyroidkarzinom) gefunden. Als letztes können auch Mutationen in der intrazellulären ATP-Bindungsdomäne des EGF-Rezeptors zu einer permanenten, ligandenunabhängigen onkogenen Aktivierung führen (Abb.3). Solche Mutationen werden vor allem in Lungen- (19,6%, [16]) und Hals-Kopf-Tumoren (1.57%, [17]) gefunden.

Im Folgenden wird die für die Aktivierung des Map-Kinase Wegs bedeutende Ras – Genfamilie, auf ihre onkologisches Bedeutung bei verschiedenen Tumoren hin, detaillierter untersucht.

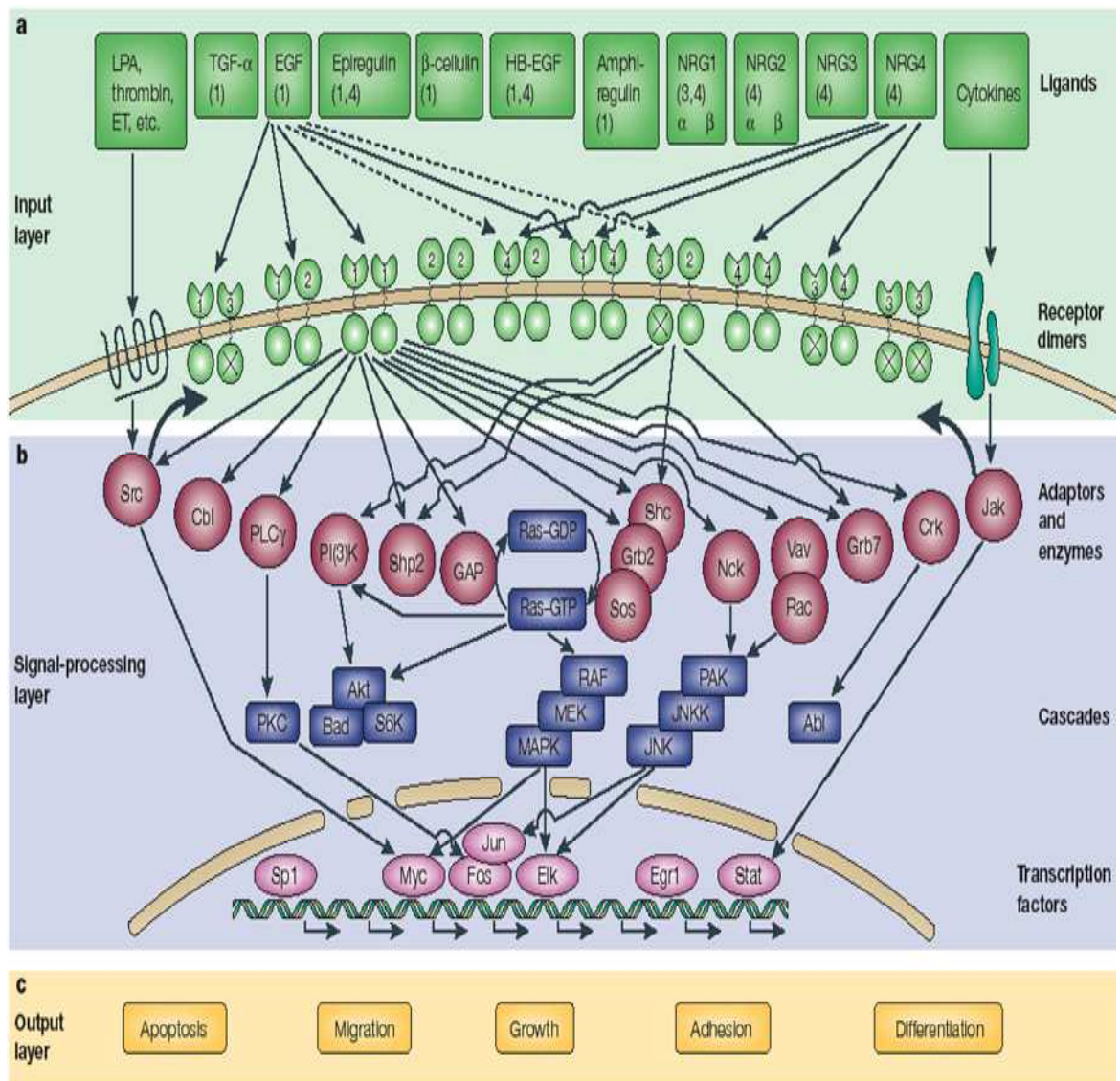


Abb. 2: EGF-Rezeptorfamilie und Ihre Wirkung auf die Zelle über bestimmte Signalkaskaden

Die Abbildung zeigt die EGF-Rezeptoren und ihre Liganden. Sie ist in 3 Bereiche A-C gegliedert. A zeigt einzelne Liganden, welche mit einer oder mehreren der 10 möglichen Dimeren Rezeptorkombinationen der Zelle interagieren können. Die Zahlen an den Rezeptoren stehen für ErbB1-4. B: zeigt den Zusammenhang von Enzyme, intrazellulären Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren welche durch eine Rezeptor-Liganden Interaktion ausgelöst werden können. Detailliert dargestellt sind die Kaskaden ausgehend vom ErbB1- Homodimer Rezeptor und vom ErbB2-ErbB3 Heterodimer Rezeptor. Beide Rezeptoren können auf RAS wirken. C: zeigt die möglichen Auswirkungen auf die Zelle. Abbildung übernommen von Yarden, et al 2001 [18].

1.6 Die Ras Genfamilie

Die Ras Genfamilie kodiert für Proteine mit GTPase- Aktivität. Diese beeinflussen das Zellwachstum und spielen somit in der Tumorgenese eine wichtige Rolle.

Diese Proteine sind auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert und über eine Lipidverbindung damit assoziiert. Sie wechseln zwischen einem aktivem und einem inaktivem Zustand. Im aktiven Zustand sind die Proteine an GTP und im inaktiven an GDP gebunden. Aktiviert werden sie von einem Guanin Austausch Faktor (GEF), der GDP gegen GTP austauscht. Inaktiviert von einem GTPase aktivierenden Protein (GAP), welches GTP zu GDP reduziert.

In der Tumorgenese wird die Ras Daueraktivierung durch eine Punktmutation (G-T Transversion) in den Kodons 12, 13 und 61 ausgelöst. In Folge dessen wird durch eine Assoziation von Ras mit dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), bei einer erhöhten Ras Expression VEGF, welches die angiogenetischen Prozesse der Zelle steuert, mit hoch reguliert. Diese Assoziation resultiert in einem andauernden Wachstumssignal auf die Zelle, welches diese veranlasst sich ohne Pause zu teilen und neue Gefäßverbindungen zu erstellen [19]. Ras Punktmutationen können in allen Tumorstadien auftreten [20].

Von den drei bekannten Mitgliedern der Genfamilie HRAS, KRAS und NRAS treten Punktmutationen in über 90% der Fälle bei KRAS auf. Somit ist die Rolle von KRAS in der Tumorgenese hervor zu heben.

1.6.1 KRAS

KRAS ist Bestandteil des EGFR –Signaltransduktionsweges der das Zellwachstum steuert. Im EGFR-Signaltransduktionsweg aktiviert der EGF-Rezeptor nach spezifischer Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors EGF (engl.: epidermal growth factor) und anschließender Dimerisierung zweier EGFR-Moleküle über die nun aktive Tyrosinkinase Domäne das Protein GRB2. Dieses gibt nun das Signal an SOS weiter, welches wiederum KRAS aktiviert. KRAS bindet nun RAF welches dabei aktiviert wird. Anschließend aktiviert RAF-Kinase durch Phosphorylierung weitere Kinasen (MEK,

MAPK) und dadurch DNA-bindende Transkriptionsfaktoren. Diese translozieren schließlich das Wachstumssignal in den Zellkern und die Transkription der Zielgene des EGF-Signalweges wird initiiert (Abb. 3).

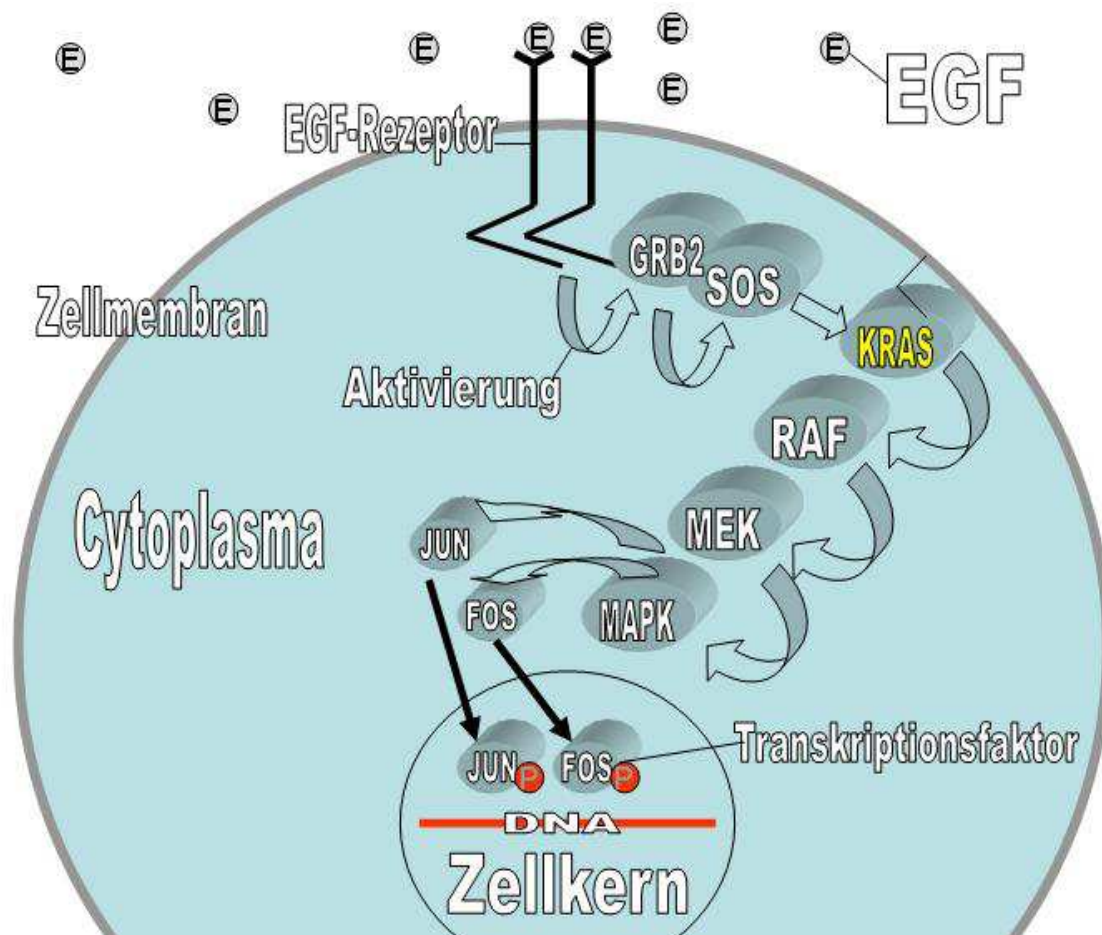


Abb. 3: EGF-Rezeptor Signalwege in der Zelle

Die Abbildung zeigt den EGF-Rezeptor sowie weitere Rezeptor Tyrosin Kinasen mit ihren Signalwegen und deren unterschiedlichen Auswirkungen auf die Zelle. Abbildung übernommen von Albuschat, R. 2003 [21].

In 30 % aller untersuchten Adenokarzinome sowie 5% aller Plattenepithelkarzinome der Lunge konnte eine KRAS Mutation auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 nachgewiesen werden [22,23]. Der Nachweis von KRAS Punktmutationen gilt heute als Faktor für eine schlechtere Prognose, da viele therapeutische Maßnahmen dadurch nicht greifen können [24].

1.7 Genamplifikation

Der Begriff Genamplifikation bezeichnet die Vervielfachung einer DNA-Sequenz, wie zum Beispiel eines Gens. Das führt dazu, dass ein kleiner Sequenzanteil des Genoms nicht mehr zweifach (mütterliches und väterliches Allel), sondern mehrfach vorliegt. Die so amplifizierte DNA wird Amplikon genannt. Genamplifikationen treten häufig in Tumorzellen auf. In humanen Tumoren betreffen Genamplifikationen in den meisten Fällen Proto-Onkogene, die durch eine Amplifikation aktiviert werden können. Die Amplifikation eines Onkogens ist im Allgemeinen nicht auf einen Tumortyp beschränkt, sondern tritt in diversen Tumor- Gewebetypen unterschiedlich häufig auf. So werden HER2 Amplifikationen z.B. nicht nur in Mamakarzinom und dessen Metastasen (20%) gefunden [25], sondern kommen z.B. in Ovarialkarzinom (16%), Magenkarzinom (16%), Adenokarzinom Ösophagus (15%), Kolonkarzinom (14%), Lungenkarzinom (4%) und Prostatakarzinom (2%) vor [26, 27, 28].

Genamplifikationen stellen einen Mechanismus dar, über den Zelllinien Resistenzen erwerben können. Zelllinien, die schrittweise immer höheren Konzentrationen zytotoxischer Substanzen ausgesetzt wurden, besitzen oft eine erhöhte Anzahl an Kopien des Gens, dessen Genprodukt der Substanz als Zielstruktur dient.

Die Dihydrofolatreduktase (DHFR) wird z.B. spezifisch und kompetitiv durch Methotrexate (MTX) gehemmt. Im Gegenzug entwickeln Zellen eine Resistenz gegen MTX, indem sie die Anzahl des DHFR-Gens und damit die Anzahl der DHFR Enzyme erhöhen. Somit ist MTX nicht mehr in der Lage alle DHFR Enzyme auszuschalten [29].

Amplifizierte DNA kann in verschiedenen Formen vorliegen wie z.B. in Form von extrachromosomalen „Double-minute“ Chromosomen (DMs) oder als intra-chromosomale „homogeneously staining regions“.

Bei den „Double minutes“ handelt es sich um paarweise vorliegende, zirkuläre Chromatinfragmente, die die amplifizierte Sequenz enthalten. Sie replizieren sich unabhängig von den Chromosomen. Die Sequenzlänge reicht von ca. 250 Kb bis zu 7 Mb. Damit liegt ihre Größe an der Grenze des Auflösungsvermögens eines Lichtmikroskopes. Sie werden bei der Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen verteilt, da sie keine

Zentromeren besitzen. Somit variiert ihre Anzahl pro Zelle und kann teilweise bis zu 100 Kopien betragen [30].

Eine Theorie zur Entstehung der DMs geht von DNA-Schäden aus, die zur Deletion eines Chromosomenstücks führen. Das deletierte Stück besteht als azentrisches Fragment fort und kann unter besonderen Umständen in DMs zerfallen [31].

Bei den „homogeneously staining regions“ handelt es sich um Regionen innerhalb der Chromosomen, die nach Färbung kein für Chromosomen typisches Bandenmuster (G-Banden, R-Banden) zeigen, sondern einheitlich gefärbt sind. Sie enthalten zahlreiche nebeneinanderliegende Kopien einer DNA-Sequenz. Eine Theorie zur Entstehung der HSR bietet das „breakage-fusion-bridge“ Modell. Auch dieses Modell geht von DNA-Strangbrüchen aus. Solche Brüche treten an besonders instabilen Stellen („common fragile sites“, CFS) des Genoms gehäuft auf [32].

Wenn ein Chromosom, das durch einen Strangbruch ein Telomer verloren hat, die Replikation durchläuft, liegen zwei gleiche Enden ohne Telomer vor. Diese können fusionieren, an der Fusionsstelle treffen die Sequenzen dann spiegelbildlich aufeinander. Die fusionierten Chromosomen werden im Laufe der Zellteilung durch den Spindelapparat auseinander gezogen, dadurch kommt es erneut zum Bruch. Bricht die DNA nun etwas neben der Fusionsstelle so fehlt einer Tochterzelle ein Stück DNA, während die andere zwei Kopien desselben Stücks enthält. Es liegt wieder ein Ende ohne Telomer vor, derselbe Prozess kann wieder durchlaufen werden. In n Zellteilungen kann eine Zelle auf diese Weise $2n$ Kopien einer Sequenz erhalten [32; 33].

1.8 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH), kann DNA, über die Detektion unterschiedlicher Fluoreszenzen nachgewiesen werden. Die FISH stellt somit eine nichtradioaktive Erweiterung der Ende der 60iger Jahre entwickelten *in situ* Hybridisierung dar [34,35]. Sie wurde Anfang der 80iger Jahre entwickelt [36-38] und seit dem kontinuierlich verbessert. Durch die FISH wird die Detektion von spezifischen DNA und RNA Sequenzen (chromosomale Loci) in Meta- und Interphasenkerne ermöglicht [39].

Im Detail werden markierte (DNA-) Sonde verwendet, welche im Zellkern spezifisch an den gesuchten Gen-locus binden. Diese werden mittels PCR hergestellt und während der FISH auf das Zielgewebe hybridisiert. Durch Detektion mit Fluoreszenzfarbstoff und Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht die FISH eine Bestimmung der Kopienzahl dieser Loci. Damit lassen sich Aussagen über Deletionen und Amplifikationen bestimmter Gen-Sequenzen treffen. Aus diesem Grund findet die FISH-Methode heute weitreichend Einsatz in verschiedenen Gebieten wie z.B.

- 1) physikalische Karten von Chromosomen erstellen
- 2) Chromosomenstrukturen oder deren Abweichung analysieren
- 3) Struktur, Funktion und Evolution von Chromosomen und Genomen untersuchen
- 4) die räumliche und zeitliche Expression von Genen bestimmen
- 5) Virale Sequenzen und Bakterien in Geweben identifizieren und charakterisieren
- 6) Geschlechtsbestimmungen vornehmen
- 7) die Genkopiezahl bestimmen
- 8) transformierende Sequenzen und Onkogene lokalisieren

Bei der Lokalisation von Gen-loci spielt vor allem das Auflösungsvermögen der Methode eine entscheidende Rolle. Dieses wird durch die Größe der eingesetzten Sonden bestimmt. Bei unseren Untersuchungen wurden Sonden mit einer Größe von ca. 150 kb verwendet.

Heute kann die FISH an verschiedenen fixierten oder unfixierten Einzelzellschnitten durchgeführt werden. Am Schnittpräparat lassen sich, auf einem Objektträger, Untersuchung zytogenetischer Veränderungen auf Einzelzellebene, in einem morphologisch erhaltenen Gewebeverband [40] durchführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FISH zur Analyse eines Tissue Microarray Arrays (TMA) am Paraffinschnitt verwendet.

1.9 Ziel der Arbeit

In einer vorhergehenden Dissertation (Antje Krohn) wurden Zelllinien und Primärtumoren verschiedener humaner Tumortypen mittels array-Komparativer Genomischer Hybridisierung (aCGH) auf DNA- Kopiezahlveränderungen untersucht. Im Zuge dieser Analysen wurden häufig Amplifikationen auf Chromosom 12p11.1 detektiert. Chromosom 12p11.1 enthält ein Amplikon, welches unter anderem für das bekannte Protoonkogen KRAS kodiert. In einer weiteren Dissertation am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, konnte in diesem Zusammenhang aufgezeigt werden, dass bei Lungenkarzinomen eine Veränderung der DNA- Kopiezahl in diesem Bereich auftritt [41].

In dieser Arbeit werden eine große Anzahl Tumore verschiedener Ursprungsorgane auf eine mögliche KRAS- Amplifikation hin untersucht, um die Prävalenz von KRAS- Amplifikationen in humanen Tumoren zu bestimmen. Zur Detektion einer möglichen KRAS-Amplifikation wurde die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) auf einem Tissue Microarray (TMA, Gewebearray) durchgeführt.

Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Für die Auswertung dieser Arbeit wurden in einem Gewebe-mikroarray-Format (Tissue Microarray, TMA) 4896 Gewebeproben unterschiedlicher humaner Tumortypen zu einem Multi Tumor Array zusammengefügt [42]. Die hierfür verwendeten Gewebeproben sind formalinfixierte (4% gepufferte wässrige Lösung), in Paraffin eingebettete Tumorgewebe und entstammen dem Archiv des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Hamburg (UKE). Alle Objektträger sämtlicher Tumoren des Instituts wurden von zwei Pathologen überprüft, um den jeweiligen histologischen Tumortyp zu verifizieren. Da es sich bei den verwendeten Gewebeschnitten um Tumorgewebe handelt, wurde der TMA als Multi-Tumor Array (MTA) bezeichnet. Der verwendete MTA ist der vierte in Hamburg erstellte Multi-Tumor Array und wird deshalb als Multi-Tumor Array 4 (MTA 4) bezeichnet. Durch Anwendung der FISH wurden die 4896 sich auf dem MTA4 befindenden Tumorgewebe Proben auf eine KRAS Amplifikation hin untersucht. Ein Beispiel für einen Hematoxylin-Eosin- gefärbten Gewebespot ist in Abbildung 4 gezeigt. Eine Übersicht über die Arrayzusammensetzung sowie seine Aufteilung wird im Anhang dargestellt.

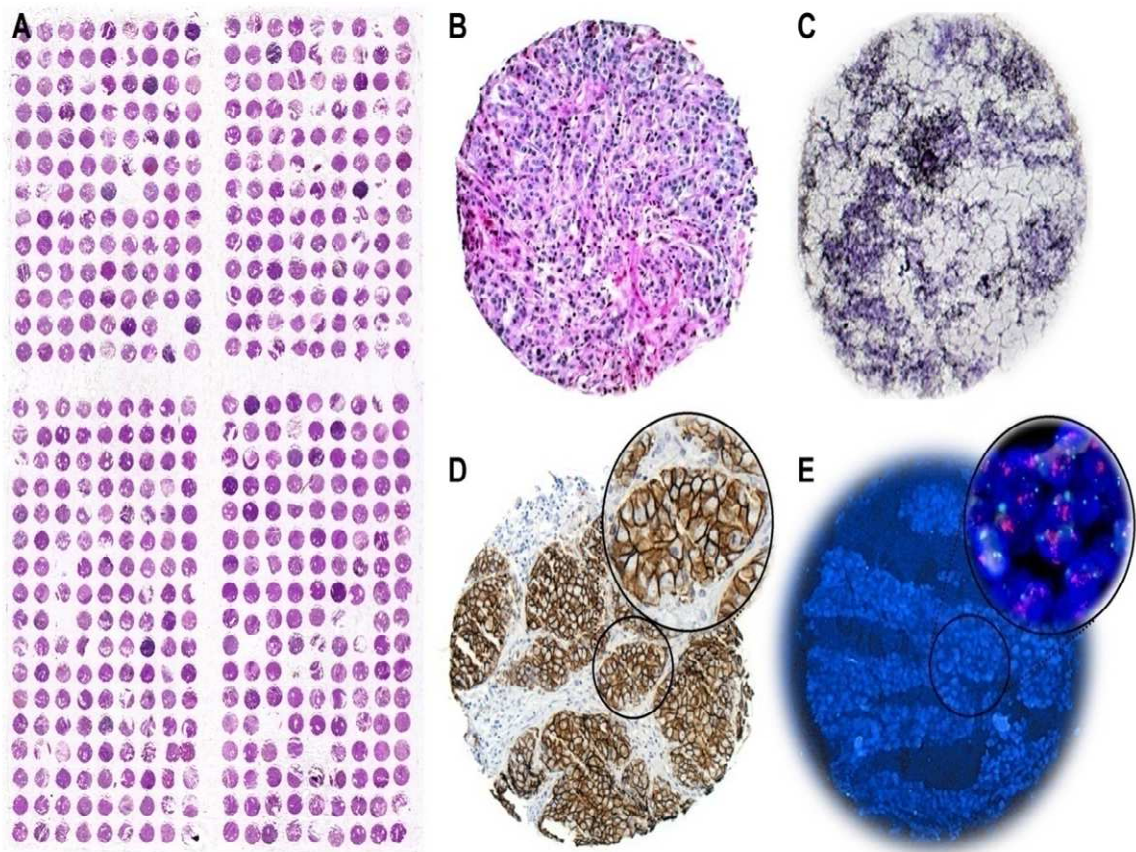


Abb. 4: Gewebemikroarray.

Am TMA können genau dieselben Analysen durchgeführt werden wie an konventionellen Großschnitten. A) HE-gefärbter (HE: Hematoxylin-Eosin) Schnitt eines TMA, ca. 3cm X 4 cm. B) Vergrößerung eines Gewebespots. Originalgröße: 0,6 mm Durchmesser. Beispiele für molekulare Analysen an TMA-Spots: C) RNA-in-situ Hybridisierung D) Immun-histochemie, E) FISH-Analyse.

2.2 FISH

Für die zweifarbige FISH-Analyse (KRAS-Signal: grün, Zentromer12-Signal: orange) wurden 4µm dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Dies geschah gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment-Reagent-Kit“ (Vysis, DownersGrove, IL). Zur Hybridisierung wurde eine selbst hergestellte digoxigenierte BAC-Sonde (12p12.1; BAC RP11-707G18, RZPD, Deutschland), welche das KRAS-Gen umfasst, eingesetzt. Als Referenz wurde eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosom 12 (Spectrum orange, Vysis) eingesetzt. Die Markierung der selbst hergestellten DNA-Sonde mittels Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte wurde mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ (Roche) durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte und Laborprotokolle zur Durchführung der FISH aufgeführt. Diese umfassen:

- 1) pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung
- 2) DNA-Extraktion aus der E.coli-Kultur
- 3) DNA-Markierung mittels Nick-Translation
- 4) Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte
- 5) Hybridisierung
- 6) Waschen
- 7) Detektion

2.2.1 Auswahl und Anzucht von BAC Klonen

Verwendete Materialien

- pBAC-E.coli-Klon, RZPD-Nr.: RP11-707G18 (stab-stock-Kultur)
- Kulturmedium: 25g Luria-Broth-Base (25g/7l dH₂O); autoklaviert
- Antibiotikum: Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol abs.)

Laborprotokoll: pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung

- 1) 10ml Medium in einen 100ml Erlenmeyerkolben füllen
- 2) Zugabe von 30µl Chloramphenicol
- 3) Mit abgeflammer Pinzette einen autoklavierten Zahnstocher fassen und einen Abstrich aus der stab-stock-Kultur machen
- 4) Animpfen des Mediums durch Zugabe des Zahnstochers
- 5) Inkubation der angeimpften Kultur bei Raumtemperatur und 200rpm im Schüttelinkubator für 2 Tage
- 6) Überimpfen von 10µl der trüb gewordenen Kultur in einen mit 10ml Medium und 30µl Chloramphenicol versetzten 100ml-Erlenmeyerkolben mittels Pipette
- 7) Inkubation der angeimpften Kultur bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator über Nacht
- 8) DNA-Extraktion

2.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus einer pBAC-E.coli-Flüssigkultur mit Hilfe des „QIAprep Spin MiniprepKit“ von Qiagen nach leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die „QIAprepspin Säulen“ waren im Extraktions-Kit enthalten.

Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus einer pBAC-E.coli-Klon-Flüssigkultur

- 1) 3ml (2ml + 1ml) der Flüssigkultur im 2ml-Tube in einer Tischzentrifuge (~17.900 x g) für 90sec bei 13.000rpm pelletieren
- 2) Pellet in 250µl Puffer P1 vollständig resuspendieren
- 3) Zugabe von 250µl Puffer P2 und vorsichtiges Mischen durch 4-6 maliges invertieren (nicht länger als 5min mit dem folgenden Schritt warten)
- 4) Zugabe von 350µl Puffer N3 und sofortiges, vorsichtiges Mischen durch 4-6 maliges invertieren
- 5) 10 min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 6) Überstand in eine „QIAprepspin Säule“ überführen
- 7) 1 min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 8) Durchfluß verwerfen
- 9) „QIAprepspin Säule“ mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 10) Durchfluß verwerfen
- 11) „QIAprepspin Säule“ erneut mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 12) Durchfluß verwerfen
- 13) „QIAprepspin Säule“ erneut 1min bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- 14) Durchfluß verwerfen; „QIAprepspin Säule“ in ein 1,5ml-Tube setzen
- 15) „QIAprepspin Säule“ mit 50µl auf 70°C erwärmten Puffer EB beladen
- 16) 1min bei Raumtemperatur inkubieren
- 17) 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 18) Säule entfernen und Quantifizierung der DNA im Nanodrop und Aufbewahrung im 1,5ml-Tube bei 4°C

2.2.3 Sondenmarkierung

Die Nick-Translation ist eine Methode zum gleichmäßigen Einbau markierter Nukleotide in den DNA-Doppelstrang, wobei die DNA gleichzeitig auf die optimale Fragmentlänge zur Hybridisierung eingestellt wird. Diese kann durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert werden.

Die Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt, wobei eine Mindestmenge von 1µg DNA zu einem Ansatz von 50µl gegeben wurde. Das Protokoll des Kits wurde modifiziert. Das zulässige Höchstvolumen an pBAC-DNA-Lösung von 38µl wurde als Standardvolumen gewählt (entsprechend ca. 1,5 bis 2,5µg DNA). Außerdem wurde nach Ablauf der Standardinkubationszeit ein weiteres Mal Pol I-/DNase-Enzym-Mix zugegeben und weiter inkubiert.

Verwendete Materialien

- Nick Translation System (Invitrogen)
- Digoxigenin 11-dUTP (Roche)
- Polymerase I (Invitrogen)
-

Pipettieransatz im 0,5ml-Tube

dNTP-Mix ohne dTTP	5µl
Digoxigenin 11-dUTP	1µl
pBAC-DNA-Lösung	38µl
Pol I-/ DNase Enzym Mix	5µl
DNA Polymerase I	1µl
<hr/>	
Ansatzmenge	50µl

Laborprotokoll: DNA-Markierung mittels Nick-Translation

- 1) Ansatz gut durchmischen und danach herunterzentrifugieren
- 2) Inkubation für 90min bei 15°C im Thermocycler
- 3) Zugabe von weiteren 5µl Pol I-/ DNase Enzym Mix; mit der Pipette durchmischen
- 4) Inkubation für 15min bei 15°C im Thermocycler
- 5) Zugabe von 5µl Stop Buffer
- 6) Durchmischen (auf dem Vortex) und danach zentrifugieren
- 7) Lagerung bei 4°C

2.2.4 Hybridisierung

Die TMA-Schnitte wurden vor der Hybridisierung gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis) behandelt.

Verwendete Materialien

- Destilliertes Wasser (dH₂O)
- Ethanol (70% / 80% / 96%)
- VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL) (Vysis)
- Xylol

Laborprotokoll: Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

- 1) TMA-Schnitte 3×10min ins Xylol stellen
- 2) TMA-Schnitte 2×5min in Ethanol (96%) stellen
- 3) TMA-Schnitte 3min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen
- 4) TMA-Schnitte 15min in 80°C warmer Pretreatmentlösung (Wasserbad) inkubieren
- 5) TMA-Schnitte 2min in dH₂O waschen
- 6) TMA-Schnitte 150min in 37°C warmer Proteaselösung (Wasserbad) inkubieren
- 7) TMA-Schnitte 2min in dH₂O waschen
- 8) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (70%) stellen
- 9) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (80%) stellen
- 10) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (96%) stellen
- 11) TMA-Schnitte 3min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

Die Hybridisierung wurde mit einer selbst hergestellten genspezifischen Sonde (12p12.1, RZPD Nr.: RP11-707G18) und einer kommerziellen Sonde als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 12 (Spectrum orange, Vysis) eingesetzt. Die kommerzielle Sonde wurde nicht in dem mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt. Beide Sonden wurden gemeinsam in einem Gemisch mit humaner Cot-DNA (zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen / repetetiver Sequenzen) und einem Hybridisierungsmix (Master-Mix 1.0) auf die TMA-Schnitte gegeben, mit diesen für 10min bei 72°C co-denaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert. Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (Vysis) durchgeführt.

Verwendete Materialien

- 20×SSC
- Cot-DNA
- Dextransulfat
- Formamid (deionisiert)

Laborprotokoll: Herstellen des Basis-Hybridisierungsmix

- 1) 5ml deionisiertes Formamid, 1,5ml 20×SSC und 1g Dextransulfat in ein kleines Becherglas geben
- 2) bei 60°C auf dem Heizrührer rühren, bis sich das Dextransulfat gelöst hat
- 3) Suspension mit HCl auf pH7 einstellen
- 4) mit dH₂O auf 7ml auffüllen
- 5) bei 4°C aufbewahren

Hybridisierungsmix (Master-mix 1.0)

Basis-Hybridisierungsmix	14µl
Cot-DNA	2µl
Sonden-DNA	4µl
<hr/>	
Ansatz	20µl

Laborprotokoll: Hybridisierung

- 1) Hybridisierungsmix auf den TMA geben
- 2) Eindeckeln mit einem 24×32mm Deckgläschen
- 3) mit Rubbervarnis versiegeln
- 4) bei 72°C für 10min im Hybrite denaturieren und dann über Nacht bei 37°C im Hybrite inkubieren

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

Verwendete Materialien

- 2×SSC
- dH₂O
- NP40

Laborprotokoll: Waschen

- 1) TMA-Schnitte aus dem Hybrite nehmen und Rubbervement und Deckgläschen entfernen
- 2) Schnitte in Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) bei Raumtemperatur stellen
- 3) Schnitte 2min bei 72°C im Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) waschen
- 4) Schnitte kurz in dH₂O waschen
- 5) Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

2.2.5 Fluoreszenz-Detektion

Um möglichst deutliche Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden die Digoxigeninreste der selbsthergestellten Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiärantikörper fluoreszenzgekoppelt war. Hierzu wurde „Enhancer Detection Kit“ von Roche eingesetzt. Nach der Detektion wurden die Schnitte wieder im Dunkeln luftgetrocknet und dann mit DAPI [Vectashield Mounting Medium für Fluoreszenz mit DAPI; H-1200 (Vector)] und einem 24×32mm Deckgläschen ein gedeckelt.

2.3 Auswertung

Um eine schnelle Evaluierung des Arrays zu gewährleisten, wurde die Ratio KRAS-Signale / Zentromer12-Signale in den einzelnen Krebszellen für jede Gewebeprobe zunächst geschätzt. Gewebeslots mit Auffälligkeiten (mehr oder weniger als 2

Gensignale von KRAS bei regelrechten 2 Zentromersonden) wurden genauer untersucht. Hierzu wurden ca. 20 Zellkerne ausgezählt, indem die Kopiezahlen für Gen und Zentromer bestimmt wurden. Als Amplifikation wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen KRAS-Signalen wie Zentromer12-Signalen ($\text{Ratio KRAS/Zen12} \geq 2,0$) definiert. Gewebeproben, die eine KRAS/Zentromer12-Ratio von über 1,0, aber unter 2,0 aufwiesen ($1,0 < \text{Ratio KRAS/Zen12} < 2,0$), wurden als „gains“ bezeichnet. Alle anderen Gewebeproben ($\text{Ratio KRAS/Zen12} \leq 1,0$) wurden als normal definiert.

2.4 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, Grad des Tumors, „Staging“ und Genamplifikationen darzustellen, wurden die „Kontingenz Tabellen“ und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Für die Feststellung von Signifikanzen wurde der P-Wert berechnet.

Ergebnisse

3.1 KRAS Amplifikationen in humanen Tumortypen

Mit Hilfe der Analyse des Tissue Microarray konnte eine große Gruppe unterschiedlicher Tumore, hoch standardisiert auf eine KRAS Amplifikation hin untersucht werden. Von den 4896 Tumor Gewebeproben des Multi-Tumor Arrays konnten 3527 (72%) erfolgreich mit der FISH analysiert werden. Bei 1369 Tumoren konnte kein Resultat erhalten werden, weil entweder der entsprechende Gewebespot auf dem MTA fehlte (26,5%) oder weil kein Fluoreszenzsignal für KRAS sichtbar war (73,5%).

Eine KRAS Amplifikation gemäß der vordefinierten Quotienten (siehe 2.3) wurde in 53 (1,50%) der untersuchten Tumor Gewebeproben gefunden. Dabei zeigten sich in der Regel hochgradige Amplifikationen mit einer KRAS/Zentromersonden Ratio von $\geq 5,0$. KRAS Zugewinne, die nicht den Schwellenwert für eine Amplifikation erreichten (Gains) wurden in weiteren 44 (1,25%) der Tumoren gefunden. KRAS Amplifikationen wurden besonders häufig in verschiedenen Lungenkarzinomen (10,7%), Magen-Karzinomen (13,4 %), Adenokarzinomen des Ösophagus (15,8%), sowie Seminomen (15,3%), und Nicht Seminomen (23,8%), detektiert. Eine ausführliche Liste aller KRAS Amplifikationen auf dem TMA ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tumortyp	n	auswertbar	Gain (%)	Amp. (%)	Normal (%)
Oropharynx					
Mundboden	54	34	0	2,9	98,1
Schilddrüse medullär	34	15	6,7	0	93,3
Gastrointestinal-Trakt					
Magen intestinal	63	39	20,5	12,8	66,7
Magen diffus	56	28	17,9	14,3	67,8
Dünndarm	22	12	8,3	0	91,7
Anal ADCA+PECA	17	13	7,7	15,4	76,9
Colon (high grade)	40	24	4,2	0	95,8
Ösophagus SQCC	60	46	2,2	0	97,8
Ösophagus ADCA	60	38	0	15,8	84,2
Karziboide	40	18	5,6	0	94,4
Pulmo					
Lunge PECA	59	39	2,6	7,7	89,7
Lunge ADCA	71	49	2,0	16,3	81,7
Lunge bronchioalveolär	15	9	0	11,1	88,9
Lunge großzellig	41	24	0	4,2	95,8
Urogenitaltrakt					
Urothel	122	79	1,3	1,3	97,4
Gynäkologie					
Seminom	92	59	13,6	15,3	71,1
Non Seminom	45	21	19,0	23,8	57,2
Ovar serös	63	41	0	4,9	95,1
Ovar mucös	45	32	0	3,1	96,9
Zervix PECA	63	36	0	2,8	97,2
Vulva PECA	61	38	2,6	2,6	94,8
Keimzelltumore					
Teratom	61	26	11,5	7,7	80,8
Dermatologie					
Haut PECA	51	30	10,0	0	90

Tab. 2: Auswertung eines Multi Tumor Array (MTA 4).

Für diese Tabelle wurden 4896 Tumor Gewebeproben eines Multi-Tumor Arrays auf KRAS-Amplifikationen hin ausgewertet. Die Ergebnisse für KRAS- Gains und Amplifikationen sind für jeden Tumor separat in Prozent (%) angegeben. Dabei ist (n) die Gesamtanzahl der Gewebeproben eines Tumortyps und auswertbar die von (n) ausgehend tatsächlich auswertbare Anzahl der Gewebeproben eines Tumortyps.

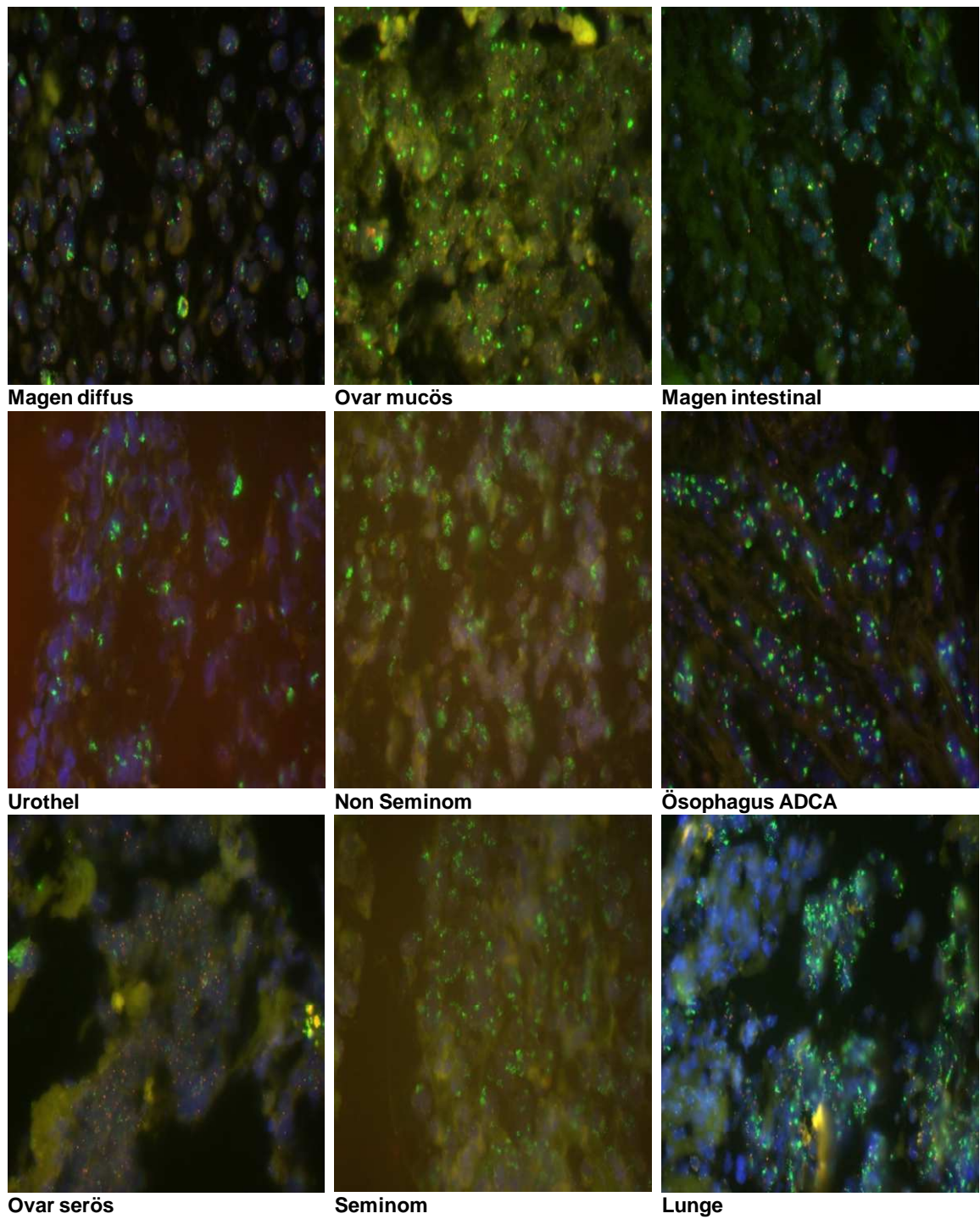


Abb. 5: KRAS High-Level Amplifikationen

Die Abbildung zeigt High Level Amplifikationen von KRAS, die während der Studie auf dem MTA4 gefunden und fotografiert worden sind.

Die Abbildung zeigt Photos von Spots auf dem Tissue Microarray. Gut erkennen kann man KRAS Amplifikationen, welche sich in unterschiedlichen Kopiezahlen in den jeweiligen Tumor Gewebeproben darstellen. In den meisten Fällen sind hier Tumorgewebearten gezeigt, in denen KRAS Amplifikationen in >10% detektiert werden konnten. Einzige Ausnahme stellt hierbei das Urothel Foto dar. Es zeigt die einzige in diesem Tumorgewebe gefundene KRAS Amplifikation.

3.2 Untersuchte Tumorentitäten ohne KRAS Amplifikationen

Tumortyp	n	auswertbar	Tumortyp	n	auswertbar
Angiosarkom	7	5	Neuroblastom	51	32
Astrozytom	49	27	Neurofibrom	60	43
Basalzelladenom	37	20	NNR Adenom	21	13
Basalzellkarzinom	67	34	NNR Karzinom	8	3
Chondrosarkom	5	3	Niere chromophob	56	32
Colon low grade	56	31	Niere colibri	9	5
Colon high grade	40	24	Niere klarzellig	69	45
Desmoid	9	3	Niere papillär	31	18
Ependymom	10	6	Non-Hodgkin Lymphom	9	8
Endometrium	60	29	Oligodendrogliom	28	17
Endometrium serös	58	30	Onkozytom	62	39
Gallenblase	30	13	Ovar, Brenner	45	17
GIST	46	28	Ovar, endometroid	22	13
Granulosazelltumor	8	6	Pankreas ADCA Papille	29	18
Hämangioperizytom	7	4	Pankreas ADCA duktal	56	29
Hepatocelluläres (HCC)	7	4	Pankreas neuroendokrin	20	13
Histiozytom fibrös	25	17	Paraganglion	35	21
Hodgkin Lymphom	43	29	Penis PECA	36	22
Karzinom	38	18	Phäochromozytom	64	31
Larynx	57	26	Pilomatrixom	48	29
Leiomyom	27	12	Pleomorphes Adenom	73	56
Leiosarkom	28	19	Prostatakarzinom	63	31
Liposarkom	16	11	Riesenzellsehnen-		
Mamma apokrin	17	11	scheidenkarzinom	40	19
Mamma duktal	62	42	Schilddrüse Adenom	65	29
Mamma lobulär	65	31	Schilddrüse anaplast.	3	1
Mamma muzinös	61	39	Schilddrüse folikulär	47	23
Mamma medullär	54	27	Schilddrüse medullär	31	15
Mamma tubulär	60	29	Schilddrüse papillär	54	31
Mamma phylloid	48	32	Stromasarkom	12	8
Mamma kribriforme	26	18	Schwannom	14	11
Meckelzellkarzinom	5	2	Spinaliom	63	34
Melanom (maliges)	48	32	Thymom	57	29
Mesotheliom	28	15	Warthin Tumor	57	25
Medulloblastom	4	3	Vagina PECA	22	12
Mucoepidermoid	46	31	Zervix ADCA	48	15
Naevi (benigne)	59	38	Zervix adenosquamös	3	2

Tab. 3: Tumortypen auf dem MTA4 ohne eine KRAS Amplifikation

Es sind alle auf dem MTA 4 enthaltenen Tumorentitäten aufgeführt, in denen keine KRAS- Gains oder -Amplifikation nachgewiesen werden konnten. Hierbei steht (n) für die Gesamtanzahl der auf dem MTA 4 enthaltenen Gewebeproben eines Tumortyps und auswertbar für die Anzahl der in der Auswertung tatsächlich berücksichtigten Gewebeproben eines Tumortyps.

3.3 Vergleich der Häufigkeit von KRAS-Amplifikation Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen

Insgesamt waren auf dem Multi-Tumor Array 567 Plattenepithelkarzinome aus 12 verschiedenen Tumortypen und 1083 Adenokarzinome aus 22 verschiedenen Tumortypen vorhanden. Eine KRAS Amplifikation zeigte sich in 2,1% von 332 auswertbaren Plattenepithelkarzinomen und in 4,4% von 612 auswertbaren Adenokarzinomen ($p=0,0585$).

Dabei schwankte die Rate der Amplifikation in den Plattenepithelkarzinomen zwischen 2,6 (Vulvakarzinom) und 10% (Analkarzinom) sowie in den Adenokarzinomen zwischen 3,1 (muzinöses Ovarialkarzinom) und 18,3% (Analkarzinome). Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammen gefasst.

Diese zeigt, dass bei Adeno- sowie auch bei Plattenepithelkarzinomen KRAS Gains / Amplifikationen nicht generell vorhanden sind, sondern nur in bestimmten Tumortypen auftreten. Hierbei zeigt sich die deutlich höheren Amplifikationsraten von KRAS in Adenokarzinomen (>10%) gegenüber den Plattenepithelkarzinomen (<10%). Insgesamt kommen KRAS Amplifikationen in Adenokarzinomen, laut Auswertung, mit 4,4 Prozent ungefähr doppelt so häufig vor, wie in Plattenepithelkarzinomen 2,1%. Von den 944 auswertbaren Gewebeslots entfallen 612 auf Adenokarzinomen und 332 auf Plattenepithelkarzinomen. Damit ist die Anzahl der auswertbaren Adenokarzinomen gegenüber den Plattenepithelkarzinomen ungefähr doppelt so hoch. Die prozentuale Anzahl der Gains unterscheidet sich hingegen nicht voneinander.

Tumortyp	n	auswertbar	Gain (%)	Amp. (%)	Normal (%)
Plattenepithelkarzinome					
Mundboden	54	34	0	2,9	98,1
Ösophagus SQCC	60	46	2,2	0	97,8
Lunge PECA	59	39	2,6	7,7	89,7
Zervix PECA	63	36	0	2,8	97,2
Vulva PECA	61	38	2,6	2,6	94,8
Haut PECA	51	30	10,0	0	90
Anal PECA	13	10	10	10	80
Larynx	57	26	0	0	100
Mesotheliom	28	15	0	0	100
Penis PECA	36	22	0	0	100
Vagina PECA	22	12	0	0	100
Spinaliom	63	34	0	0	100
Gesamt PECA	567	332	2,1	2,1	
Adenokarzinome					
Magen intestinal	63	39	20,5	12,8	66,7
Magen diffus	56	28	17,9	14,3	67,8
Dünndarm	22	12	8,3	0	91,7
Colon (high grade)	40	24	4,2	0	95,8
Ösophagus ADCA	60	38	0	15,8	84,2
Lunge ADCA	71	49	2,0	16,3	81,7
Ovar serös	63	41	0	4,9	95,1
Ovar mucös	45	32	0	3,1	96,9
Anal ADCA	4	3	0	18,3	82,7
Colon low grade	56	31	0	0	100
Endometrium gesamt* ¹	118	59	0	0	100
Gallenblase	30	13	0	0	100
Mamma gesamt* ²	259	150	0	0	100
Pankreas gesamt* ³	85	47	0	0	100
Prostatakarzinom	63	31	0	0	100
Zervix ADCA	48	15	0	0	100
Gesamt ADCA	1083	612	2,1	4,4	

Tab. 4: Vergleich der Häufigkeit von KRAS Amplifikationen bei Adeno- versus Plattenepithelkarzinomen auf dem MTA4

Die Tabelle zeigt den Vergleich von Plattenepithel- und Adenokarzinomen auf Basis des MTA4. In der Tabelle sind alle Tumorentitäten, die auf dem untersuchten MTA4 vorkommen und entweder Plattenepithel oder Adenokarzinomen zugeordnet werden können aufgeführt. Dabei steht (n) für die Gesamtanzahl der Gewebeproben eines Tumortyps und auswertbar für die von (n) ausgehend tatsächlich auswertbare Anzahl der Gewebeproben eines Tumortyps. Die Anzahl von KRAS- Gains und Amplifikationen ist in % angegeben. Endometrium gesamt*¹: serös, endometroid. Mamma gesamt*²: apokrin, duktal, apokrin, mucinös und medulär. Pankreas gesamt*³: ADCA Papille und duktal.

Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Häufigkeit von KRAS Amplifikationen in 98 unterschiedliche Tumortypen untersucht. Insgesamt 3527 Tumoren konnten im Gewebe Microarray (TMA) – Format erfolgreich auf eine Amplifikation des KRAS Lokus hin analysiert werden. Damit stellt diese Studie die bisher umfassendste Analyse von KRAS Amplifikationen in humanen Tumoren dar.

Die Ergebnisse der Studie erlauben es, eine Liste der Tumoren hinsichtlich der KRAS-Amplifikationshäufigkeit aufzustellen. Es zeigte sich, dass KRAS-Amplifikationen besonders häufig in nicht-seminösen Keimzelltumoren (23,8%), Adenokarzinomen der Lunge (16%) und des Ösophagus (16%), Analkarzinomen (15%), Seminomen (15%), Magentumoren (diffus 14%, intestinal 13%) sowie in bronchioalveolären Karzinomen der Lunge (11%), auftreten.

Bisher sind in der Literatur nur vergleichsweise wenige Daten zu KRAS-Amplifikationen vorhanden. Eine Pubmed-Suche (Stand November 2010) erbrachte nur 27 publizierte Studien, die den KRAS-Amplifikationsstatus mit verschiedenen Methoden untersucht haben. Erwartungsgemäß ergab sich die beste Übereinstimmung zwischen den eigenen Ergebnissen und den publizierten Studien für die FISH-Methode. In der Literatur wird die höchste Amplifikationsrate in Seminomen und Nicht-Seminomen 10-54% [43-52] beschrieben, gefolgt von Adenokarzinomen der Lunge 2-13% [41; 53-55]. Diese Tumortypen hatten auch in der vorliegenden Untersuchung die höchste Amplifikationsrate. Eine weitere FISH Studie, die 3% Amplifikation an Mundbodenkarzinomen fand [56], stimmt exakt mit der vorliegenden Studie überein.

Eine nur geringfügig weniger gute Übereinstimmung ergibt sich bei PCR-Studien. Z.B. fanden Corso et al KRAS Amplifikationen in 18% der Magentumoren und Mc Intrye et al. in 37% der Keimzelltumoren, im Vergleich zu 13% bzw. 15-24% in der aktuellen Studie [52; 57]. Auch bei den ADCA des Ösophagus wichen die von Miller mittels PCR gefundenen 10% KRAS- Amplifikationen von unsern mittels FISH gefundenen 16% leicht ab [58]. Diese Unterschiede sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Methodik und Definition von Schwellenwerten zurückzuführen. Insbesondere werden in PCR-Studien oft unterschiedlichste Referenz-Gene auf anderen Chromosomen verwendet, um z.B. basierend auf der Ratio des Test- zum Referenz-Gen eine Amplifikation zu definieren. Bei

einem Schwellenwert von Ratio Test: Referenz ≥ 2.0 zu Definition einer Amplifikation können bereits kleinere Ploidie-Effekte (wie z.B. die Verdopplung eines Chromosoms 12) zu einem erhöhten Messwert führen, der jedoch nicht spezifisch für die KRAS-Kopiezahl ist. In der FISH-Analyse wird das Centromer des Chromosoms 12 als Referenz benutzt, so dass solche Effekte nicht mit gemessen werden.

Obwohl auch die (Array-) CGH genau wie die PCR isolierte DNA misst, ist durch die Übersicht über alle Chromosomen eine bessere Einschätzung der Kopiezahlveränderung möglich. So können kleine, definierte Zugewinne im Bereich des KRAS-Genes als Amplifikationen gedeutet und von größeren Zugewinnen ganzer Chromosomen oder Chromosomenarmen abgegrenzt werden. Dies zeigt sich auch im Vergleich der publizierten CGH-Daten mit den eigenen FISH-Daten: Abgesehen von einer Studie, die 18% KRAS-Amplifikationen in Gastrointestinalen Stromatumoren zeigt [57], rangieren auch bei den CGH-Analysen die Seminome/nicht-Seminome und die Adenokarzinome der Lunge an erster Stelle der KRAS-amplifizierten Tumoren [43; 52; 55]. Eine Zusammenfassung aller bisher publizierten Studien zur KRAS-Amplifikation in humanen Tumoren ist in Tabelle 5 gezeigt.

Tumortyp	Amplifikation [%]	Fallzahl	Autor	Methode	PMID
Lunge gesamt	2,2	1516	Waschow, M.	FISH	N.P.
	7,0	100	Wagner, PL.	FISH	19762526
	13,3	166	Modrek, B.	FISH	19671679
	12	34	Boelens, MC.	aCGH	19324446
Magen gesamt	4,7	86	Mita, H.	DGS	19545448
	17,5	63	Corso, G.	PCR	20937558
	100	1	Vasko, R.	Gene Scanning	20438546
	10,5	19	Peng, DF.	CGH	14595756
	4,0	58	Sakakura, C.	CGH	10092127
Ösophagus ADCA	10,3	87	Miller, CT	PCR, S. Bolt	14581353
	3,3	30	Riegman, HP.	CGH	11306503
Stammzell- tumore	8,0	55	Roelofs, H.	FISH, CGH	11021820
	87 (i12p)	23	Sung, MT.	FISH	18162782
	45,5 (i12p)	202	Roudrigues, E.	Zytogenetisch	7512366
	54	11	Kerne, KM	FISH	15167939
	17,8	45	Zafarana, G.	FISH	11912161
	11,3	53	Bussey, KJ.	FISH	11369053
	100	6	Gisselsson, D.	FISH	9790500
	10,3	58	Henegariu, MD.	FISH	9725767
	75 (i12p)	4	Blough, RI.	FISH	9688184
36,5	63	MC Intrye, A.	PCR	16354586	
Teratom	83 (i12p)	6	Poulus, C	FISH	16547466
Niere, klarzelliges ADCA	16,6	36	Kozma, L	Dotblot	9022137
				Hybridisierung	
GIST	18,2	22	Astolfi, A.	Affymetrix U133, SNP 6.0	20548289
Orale Plattenepithel- Karzinome	3,4	29	Sheu, JJC.	FISH	19276369
Pankreas (Zelllinien)	4,2	72	Chen, S.	CGH	18836286
	32	25	Gysin, S.	CGH	15929091
	40	15	Heidenblad, M.	FISH, CGH	11979555
Adnexen	31,6	19	Snijders, AM.	CGH	12833150

Tab. 5: Literaturrecherche zu KRAS Amplifikationen in verschiedenen Tumortypen

Studien in denen KRAS-Amplifikationen in verschiedenen Tumortypen gefunden worden sind. Hierzu wurde eine Pubmed. Recherche durchgeführt. Die Studien wurden aufgeschlüsselt nach Tumortyp, Anzahl der untersuchten Fälle, KRAS-Amplifikation in Prozent, Autor und verwendete Methode. Dabei steht NP für nicht publiziert [43-69].

Eigene Daten FISH (%)		Literatur Daten nach Methodik und Prozent (%)			
		FISH	CGH/aCGH	PCR	Southern Blot
Keimzelltumore	15- 24	8-54	8	36	-
Lungen ADCA	16	2-13	12	12	-
Ösophagus ADCA	16	-	3	10	-
Analkarzinom	15	-	-	-	-
Magenkarzinom	13	-	4-10	18	-
Lunge BACA	11	-	-	-	-
Mundboden PECA	3	3	-	-	-
Niere, CADCA	-	-	-	-	16
Pankreas (Zelllinie)	-	40	4-32	-	-
Adnexen	-	-	32	-	-
GIST	-	-	19	-	-

Tab. 6: Vergleich Ergebnisse eigene Studie mit der Literaturrecherche

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich von unseren mittels FISH Analyse gefundenen Daten mit allen in der Pubmed Recherche gefundenen Ergebnissen. Zum Vergleich wurden nur diejenigen Tumortypen aus unserer Studie heran gezogen, bei denen entweder die KRAS Amplifikationsrate >10% war oder aber eine andere Studie ebenfalls KRAS Amplifikationen im selben Tumortyp gefunden hat. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse der anderen Studien nach der verwendeten Methodik aufgeschlüsselt. BACA*¹: Bronchioalveoläres Karzinom.

Obwohl die „Reihenfolge“ der KRAS-amplifizierten Tumoren der vorliegenden Studie gut mit der Literatur übereinstimmt (Tab. 6), fallen trotzdem teils erhebliche Unterschiede in der absoluten Anzahl der Amplifikationen auf. Diese Diskrepanzen sind besonders augenfällig bei den Seminomen. In einigen Studien werden bis zu 80% „Amplifikationen“ gefunden (Tab. 5). Diese hohen Werte reflektieren jedoch vielleicht weniger tatsächliche Unterschiede zwischen den Studien, sondern spiegeln eher eine Besonderheit von Chromosom 12p bei diesem Tumortyp wieder. Typisch für Keimzelltumoren sind Isochromosomen 12p (i12p), die dadurch entstehen, dass der lange (q-Arm) des Chromosoms abbricht und der während der Mitose verdoppelte kurze (p-Arm) nicht in die Tochterzelle wandert, sondern den Platz des fehlenden q-Arms einnimmt. Auf diese Weise entsteht das Isochromosom mit 2 p-Armen. Je nach Meßmethode kann diese Verdopplung dann leicht als „Amplifikation“ von Genen auf dem p-Arm fehlinterpretiert werden [63].

Neben den bereits bekannten Tumortypen mit KRAS-Amplifikationen zeigt unsere Studie aber auch neue Tumortypen auf, die zumindest in Einzelfällen Amplifikationen von KRAS haben können. Dazu zählen Ovarialkarzinome, Analkarzinome, Tumore der Haut, Zervix- und Vulvatumore.

Umgekehrt ist aber auch anzumerken, dass der fehlende Nachweis einer KRAS Amplifikation in einzelnen Tumortypen kein Beweis dafür ist, dass es tatsächlich niemals zu dieser Veränderung kommt. Mit durchschnittlich 30-40 Tumorproben je Tumortyp auf dem TMA können theoretisch nur solche Tumortypen als „KRAS-Amplifizierer“ gefunden werden, die rein statistisch gesehen mindestens etwa 3%-KRAS Amplifikationen aufweisen. Aufgrund der kleinen Fallzahl ist auch nicht zu erwarten, dass die Ergebnisse in einzelnen Tumortypen uneingeschränkt repräsentativ sind. Die Annahme bestätigt sich im Vergleich mit der von Waschow durchgeführten Studie zu Lungentumoren in unserem Labor, welche unsere und andere in der Literatur, mittels FISH, gefundenen Ergebnisse [53] erheblich nach unten korrigiert, obwohl dieselbe FISH –Sonde und dasselbe Laborprotokoll benutzt wurde. Die Gründe für die Abweichung können zum einen in Interobserver-Varianzen liegen (beide Studien wurden von unterschiedlichen Personen ausgewertet), oder in der Verteilung der Tumoren auf den TMAs. So sind auf dem Multitumorarray tendenziell mehr große, fortgeschrittene Tumoren repräsentiert als auf dem speziellen Lungenarray, der aus konsekutiven Tumoren hergestellt worden ist. Unter der Annahme, dass KRAS-Amplifikation, wie typischerweise alle anderen Gen-Amplifikationen auch [43; 70] häufiger bei entdifferenzierten und fortgeschrittenen

Tumoren zu finden sind, verwundert die höhere Rate auf dem MTA nicht. Wenn aber auch die absolute Anzahl und Häufigkeit der KRAS-Amplifikationen auf dem MTA nicht unbedingt repräsentativ für konsekutive Tumorkollektive ist, so liegt die Stärke dieser Analyse doch in der Vergleichbarkeit der Tumortypen des Arrays untereinander.

Dieser Aspekt wird auch an einer weiteren Beobachtung deutlich. So deutet erst die kombinierte Analyse aller Tumortypen darauf hin, dass KRAS-Amplifikationen vielleicht häufig in Adenokarzinomen (ADCA) verschiedenster Herkunft auftreten könnten.

Insgesamt fanden sich in 4,4% (27/612) der ADCA und in 2,1% (7/332) der PECA in unserer Studie KRAS- Amplifikationen. Obwohl dieser Unterschied statistisch knapp nicht signifikant ist ($p=0.059$) stellt er doch einen interessanten Trend dar.

Zumindest im Ösophagus-Karzinom konnten wir einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,0015$) feststellen. So fanden sich im ADCA des Ösophagus in 15,8% (6/38) gegenüber 0% (0/46) in PECA. In diesem Tumortyp entstehen KRAS-Amplifikationen besonders häufig bereits im Barrett- Ösophagus [58], welcher mit ADCA assoziiert ist. Dieser Zusammenhang bedeutet aber nicht zwingend, dass es im PECA des Ösophagus generell keine KRAS- Amplifikationen gibt, sie treten vielleicht nur viel seltener auf.

Eine ähnliche Situation ist bereits für HER2 bekannt. So wird in 16% der ADCA des Ösophagus eine Überexpression dieses Gens beschrieben, wohingegen sie nur in 5% der PECA auftritt [71]. Diese Beobachtung setzt sich über verschiedene weitere humane Tumortypen fort. So treten HER2- Amplifikationen bei 15-20% aller untersuchten Magenkarzinomen auf [72; 73] und überwiegen auch in ADCA der Lunge (35-47%) gegenüber den PECA (1-40%) [74-76]. Am häufigsten werden HER2 Amplifikationen in 20-25% der Mamakarzinomen, einem ebenfalls phänotypischen ADCA, gefunden [77].

Ein möglicher Zusammenhang zwischen KRAS und ADCA wird indirekt auch dadurch untermauert, dass RAS-Mutationen in verschiedenen Tumortypen, wie z.B. in Tumore des Ösophagus, des Gastrointestinaltraktes oder der Lunge häufiger in ADCA als in PECA auftreten [78-80]. Insbesondere ADCA des Ösophagus weisen in > 30% eine RAS-Mutationen auf [78], während sie gar nicht oder nur in sehr geringer Anzahl im PECA detektiert wurden [79]. Auch in humanen Lungentumoren, wo die häufigsten detektierten Mutationen am Codon 12 und weniger an den Codons 13 und 61 vorkommen, werden

KRAS- Mutationen in 7-30% der ADCA und damit häufiger als in PECA ca.16% gefunden [81-82].

Obwohl die Möglichkeit, einer funktionellen Relevanz von KRAS Amplifikationen ähnlich den KRAS Mutationen besteht, gibt es hierzu bis jetzt nur ungenügende Daten. Allgemein bekannt ist, dass Amplifikationen und Mutationen von KRAS zu den häufigsten Veränderungen im Zell-Zyklus regulatorischer Signalwege gehören (Abb. 5). Während für KRAS- Mutationen die onkogene Aktivierung in zahlreichen Studien belegt ist [84; 85], haben sich nur wenige Studien mit den Konsequenzen einer KRAS- Amplifikation beschäftigt. Insbesondere ist unklar, ob diese Amplifikationen dieselben molekularen Effekte auslösen wie aktivierende Mutationen.

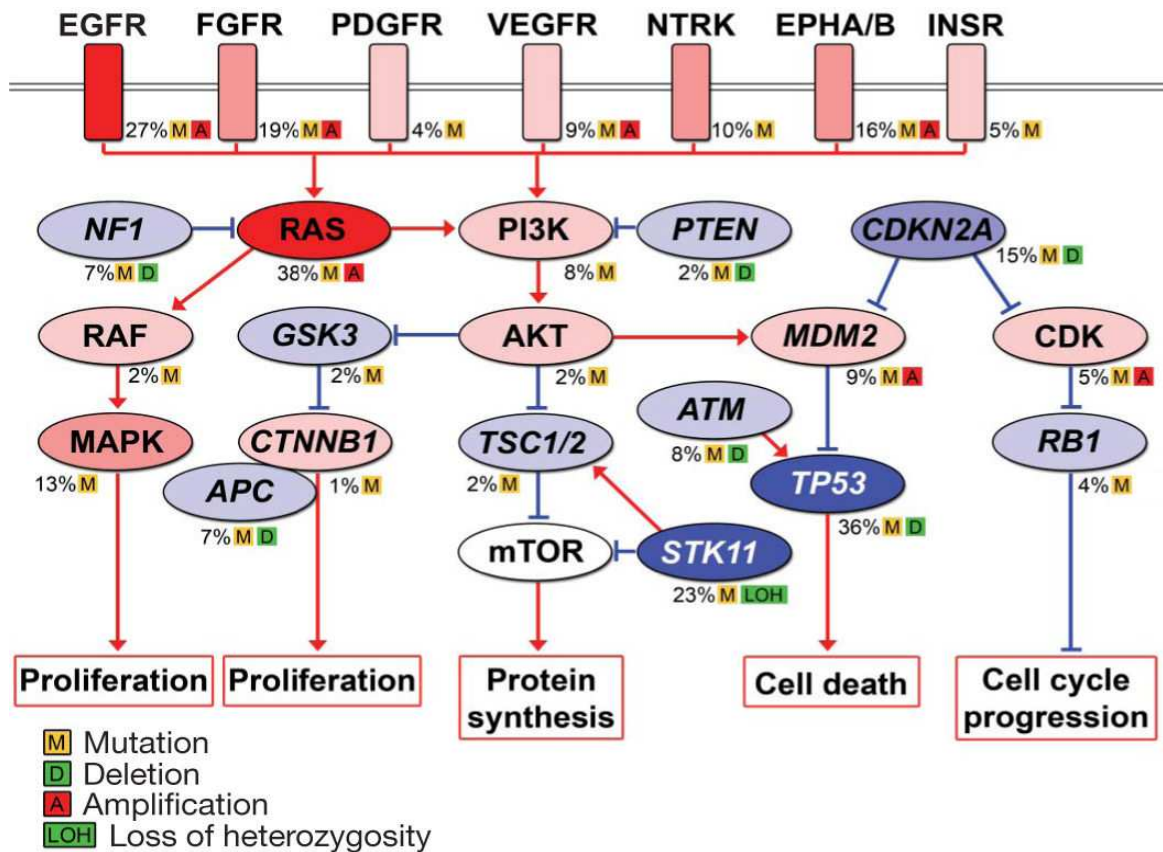


Abb. 5: Signalwege, welche im Zellzyklus eine Rolle spielen.

Die Abbildung zeigt Signalwege, welche im Zellzyklus eine Rolle spielen. Weiter zeigt sie prozentuale Häufigkeiten mit denen einzelne regulatorische Gene entweder Ihre Heterozygotie verlieren oder aber mutiert, deletiert, oder amplifiziert oder werden. Onkogene sind dabei rot oder rosa und Tumorsuppressorgene in verschiedenen Blautönen dargestellt. Je dunkler die Farbe desto häufiger wurden genetische Veränderungen in diesem Gen in verschiedenen Tumortypen gefunden. Der Prozentsatz und die Art der genetischen Veränderung sind unter jedem Gen angegeben. Abbildung übernommen von Ding, et al.2008 [84].

Modrek et al. konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass KRAS-Amplifikationen mit einem erhöhten mRNA Level korrelieren [54]. Ding et al. fanden, dass High-Level KRAS- Amplifikationen häufig mit KRAS- Mutationen zusammen auftreten [83].

Merlo erklärt dieses Phänomen dadurch, dass in jedem wachsenden Tumor eine Art evolutionärer Prozess auf Mikroebene [86] wirkt. Dieser Prozess übt einen Selektionsdruck auf jede neue Mutationen aus. Somit werden vorteilhafte Mutationen innerhalb der Population verbreitet. Allerdings können auch so genannte neutrale (passanger)

Mutationen weiter verbreitet werden, wenn sie sich auf einem Gen befinden, welches unter einem positiven Selektionsdruck steht. Somit könnten auch Gains oder Amplifikationen eine Aktivierung von mutiertem KRAS verursachen, wobei die KRAS Mutation selbst neutral ist. Dieses führt zu der Annahme, dass KRAS Mutationen und KRAS Amplifikationen unabhängig voneinander auftreten und dass die KRAS Aktivierung von beiden Seiten ausgelöst werden kann. Der Grund warum eine KRAS Amplifikation häufig mit einer KRAS Mutation gefunden wird liegt dann darin, dass Gains im Tumor einem positiven Selektionsdruck unterliegen, und dieser in Tumoren mit mutiertem KRAS stärker wirkt [54].

Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob KRAS- Amplifikationen zu einer Resistenz gegen Thyrosin- Inhibitoren führen, wie es von KRAS- Mutationen bekannt ist [87]. Eine Studie von Cepero et al. zeigt allerdings, dass KRAS- Amplifikationen eine wichtige Rolle bei der Resistenz von Tumorzellen gegen spezifische MET- Inhibitoren [88] spielen. Es wäre somit denkbar, dass KRAS- Amplifikationen nicht nur bei der Resistenz gegen MET- Inhibitoren, sondern auch bei einer Resistenz gegen eine Anti-EGFR Therapie eine Rolle spielen. Bisher hat die Anti-EGFR Therapie nur bei einem kleinen Teil der Patienten mit Lungen- und Kolon-Karzinomen einen positiven Effekt. Zumindest bei Lungen-Karzinomen wäre es denkbar, dass KRAS- Amplifikationen zu einer Resistenzbildung beitragen können. Wenn das stimmt, könnte ein Test auf KRAS- Amplifikation helfen, Patienten mit geringerem Therapieerfolg bei einer Anti-EGFR Therapie zu selektieren. Diese Patienten können dann gleich mit anderen für sie wirkungsvolleren Methoden therapiert werden.

Auch für andere Tumore, bei denen eine Anti-EGFR Therapie angewandt oder diskutiert wird, wie z.B. Ösophagus-, Magens-, Mundboden oder Lungentumoren [89], konnten wir in unserer Studie KRAS Amplifikationen nachweisen. Untersuchungen über das Anti-EGFR Therapieansprechen in diesen Tumortypen ist bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde die Tissue Microarray- Technologie (TMA) eingesetzt um 3527 unterschiedliche Tumore vergleichend auf eine KRAS- Amplifikation hin zu untersuchen. Mit Hilfe des TMA ist es möglich diese große Anzahl einzelner Gewebeproben gleichzeitig und mit identischen Reagenzien zu analysieren. Hierdurch lässt sich eine hervorragende Standardisierung der Analyse erreichen. Variablen, welche bei der Wiederholung eines Experiments z.B. durch wiederholt hergestellte Sonden auftreten

können, werden beim TMA vermieden. Dieser Aspekt ist vor allem deshalb wichtig, weil es für viele Onkogene noch keine industriellen Sonden gibt. Jede Sonde muss deshalb im Labor selbstständig hergestellt werden, wobei die Qualität nicht immer gleich bleibend garantiert werden kann. Weiter können alle Schritte, von der Herstellung der Sonde, über die Hybridsierung auf dem Tumorgewebe bis hin zum Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskopie von einer einzigen Person durchgeführt werden. Somit können Variationen z.B. beim Auszählen, welche aufgrund von mehreren beteiligten Personen entstehen können, vermieden werden. Beim klassischen Großschnittverfahren können nur wenige durchgehende Objektträger pro Tag behandelt werden, wodurch eine Standardisierung wie sie in unserer Studie erreicht wird, unmöglich ist. Indem wird eine viel größere Menge an Sonden verbraucht, was die direkte Vergleichbarkeit der Analysen erschweren kann, wenn es zu Schwankungen in der Qualität einzelner Reagenzien kommt. Mit Hilfe der von uns verwendeten TMA Technik, lassen sich standardisiert eine große Anzahl unterschiedlicher Tumortypen gleichzeitig analysieren. Dadurch können die Kosten der Analyse gesenkt werden. Sollte sich in weiterführenden Studien bestätigen, dass Amplifikationen in Form von Gains oder Amplifikationen unabhängig von KRAS Mutationen in frühen Phasen der Tumorentstehung auftreten könnten sie in den Mittelpunkt der Diagnostik rücken. Mit der von uns genutzten TMA Technik könnten dann eine große Anzahl an Gewebeproben schnell, hoch standardisiert und kostengünstig auf KRAS Amplifikationen hin untersucht werden. Das könnte dabei helfen Krebs in einer Vorstufe oder in einem frühen Stadium zu diagnostizieren. Damit könnten mehr Menschen kurativ therapiert werden und so die Mortalitätsrate gesenkt werden.

Zusammenfassung

Amplifikationen des KRAS Onkogens sind wiederholt in einigen humanen Tumortypen wie z.B. Lungenkarzinom, Magenkarzinom, Ösophaguskarzinom, Stammzelltumore, Teratome, Nierenzellkarzinome und Mundbodenkarzinomen beschrieben worden. Jedoch schwanken die Amplifikationsraten in den einzelnen Studien stark. Ziel dieser Studie war es, mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung in einem Kollektiv von über 4800 Gewebeproben von 100 verschiedenen humanen Tumortypen, die Häufigkeit von KRAS-Amplifikationen zu bestimmen. Ein Ergebnis konnte von 3527 Gewebeproben erhalten werden. Eine KRAS Amplifikation wurde in 53 (1,5%) der untersuchten Tumorgewebeproben gefunden. Sie wurden besonders häufig in Lungenkarzinomen (10,7%), Magenkarzinomen (13,4%), Adenokarzinomen des Ösophagus (15,8%), Seminomen (15,3%) sowie im Nicht-Seminomen (23,8%) detektiert. Insgesamt zeigten 74 der untersuchten Tumortypen keine KRAS Amplifikation. Ein Vergleich zwischen 332 Plattenepithelkarzinomen aus 12 verschiedenen Tumortypen und 612 Adenokarzinomen aus 22 verschiedenen Tumortypen zeigte einen markanten Unterschied in der KRAS Amplifikationsrate. So war KRAS in den Adenokarzinomen etwa doppelt so häufig (4,4%) amplifiziert wie in den Plattenepithelkarzinomen (2,1%; $p=0,0585\%$).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass KRAS Amplifikationen in etwa der Hälfte der humanen Tumortypen zumindest in einzelnen Fällen vorkommen können. Sie sind etwa doppelt so häufig in Adenokarzinomen wie in Plattenepithelkarzinomen. Aus der Literatur geht hervor, dass auch aktivierende KRAS Mutationen insbesondere in Adenokarzinomen auftreten. Bisher ist nicht bekannt ob KRAS Amplifikationen eine Resistenz gegen Anti-EGFR Therapien verursachen könnten. Wäre dieses der Fall demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass vor allem in den Tumortypen mit häufiger KRAS-Amplifikation ein FISH Test auf KRAS Amplifikationen vor dem Beginn der Therapie hilfreich sein könnte um die Ansprechwahrscheinlichkeit auf die Behandlung vorhersagen zu können. Diese Studie ist ein weiteres Beispiel für die hohe Potenz der Gewebemikroarraytechnologie um potentiell klinisch relevante Genveränderungen in humanen Tumoren umfassend zu untersuchen.

Abkürzungen

aCGH	array-Komparativer Genomischer Hybridisierung
ADCA	Adenocarcinom
BAC	Bacteria
BACA	Bronchioalveoläres Karzinom
ca.	circa
CFS	commom fragile sites
DHFR	Dihydrofolat reductase
dkfz	Deutsches Krebsforschungszentrum
DM	Double-minute
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
et al.	Lat. et alii, und andere
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
GAP	GTPase aktivierenedes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
HER	Herceptin
HSR	homogeneously staining regiones
kb	Kilobasen
KRAS	Kirsten rat sarcoma
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierten-Proteinkinase

mb	Megabasen
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTA 4	Multi Tumor Array 4
MTX	Methotrexat
N.P.	nicht publiziert
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
NTP	Nukleosidtriphosphate
PCR	Polimerase chain reaction
PECA	<i>Plattenepithelkarzinom</i>
Pol I	DNA Polymerase I
RAF	rapidly growing fibrosarcoma
Rpm	Rounds per minute
RTK	Rezeptor Thyrosin Kinasen
SSC	Sodium Chloride-Sodium Phosphate-EDTA Buffer
SNP 6.0	Single nucleotide polymorphism 6.0
TMA	Tissue Micro Array
TTP	Thymidin <i>triphosphat</i>
UKE	Universitätsklinikums Eppendorf
UTP	Uridin-5'- <i>triphosphat</i>

UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
Zen	Zentromersonde
μ	micro
μg	microgram

Literaturverzeichnis

1. Nahta R, Hortobagyi GN, Esteva FJ. *Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention*. *Oncologist*. 8(1):5-17.
2. Savage DG, Antman KH. (2002) *Imatinib mesylate a new oral targeted therapy*. *N Engl J Med*. 346(9):683-93
3. Hynes NE. (2000) *Tyrosine kinase signalling in breast cancer*. *Breast Cancer Res*. 2(3):154-7
4. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. *The EMBO Journal* Vol 19 No.13 pp3159-3167
5. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y. (1999) *The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(9):4995-5000.
6. Yarden Y, Sliwkowski MX. (2001) *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(2):127-37.
7. Alba A. Brandes, E.F., Alicia Tosoni, Monika E. Hegi and Roger Stupp, *Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Neuro-oncology: Hopes and Disappointments*. *Clin Cancer Res* 2008;(14)4, 2008: p. 957-960.
8. Allan R. Li, D.C., Gregory J. Riely, William Pao, Vincent A. Miller, Maureen F. Zakowski, Valerie Rusch, Mark G. Kris, and Marc Ladany, *EGFR Mutations in Lung Adenocarcinomas, Clinical Testing Experience and Relationship to EGFR Gene Copy Number and Immunohistochemical Expression*. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2008. Vol. 10: p. 242 - 284.
9. Anna ôaczek, M.W.-J., Krzysztof Piotr Bielawski, and A.B. Janusz Jamkiewicz, Włodzimierz Olszewski, Piotr Rhone, Jacek Jassem, *Gene copy numbers of HER family in breast cancer*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008. 134: p. 271–279.
10. Christian Kersting, C.G., Konstantin Agelopoulos, Hartmut Schmidt, Paul J. van Diest, Heribert Juergens, Winfried Winkelmann, Matthias Kevric, Georg Gosheger, Burkhard Brandt, Stefan Bielack and Horst Buerger, *Epidermal Growth Factor Receptor Expression in High-Grade Osteosarcomas Is Associated with a Good Clinical Outcome*. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(10)May 15, 2007: p. 2998-3005.

11. Khawla Al-Kuraya, H.N., Prashant Bavi, Abdul K Siraj, Shahab Uddin, Adnan Ezzat, Nasser Al Sanea, Fouad Al-Dayel, Hadeel Al-Mana, Salwa S Sheikh, Martina Mirlacher, Coya Tapia, Ronald Simon, Guido Sauter, Luigi Terracciano and Luigi Tornillo, *HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer*. J. Clin. Pathol. 2007, 2008. 60: p. 768-772.
12. Zsuzsa Rakosy, L.V., Szilvia Ecsedi, Zoltan Voko, Agnes Begany, Mark Barok, Zsuzsa Krekk, Monika Gallai, Zoltan Szentirmay, Roza Adany and Margit Balazs, *EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis*. Int. J. Cancer, 2007. 121: p. 1729–1737.
13. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. (1995) *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol. 19(3):183-232.
14. Harris AL, Nicholson S, Sainsbury R, Wright C, Farndon J. (1992) *Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers*. J Natl Cancer Inst Monogr. (11):181-7.
15. Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giuli P, Borasio P, Mossetti C, Ardisson F, Lausi P, Scagliotti GV (2004) *Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer*. Ann Oncol. 15(1):28-32.
16. Pao W, Miller VA. *Epidermal Growth Factor Receptor Mutations, Small-Molecule Kinase Inhibitors, and Non–Small-Cell Lung Cancer: Current Knowledge and Future Directions*. Journal of Clinical Oncology, 2005. 23: p. 2556-2568.
17. Schwentner, I., et al., *Identification of the rare EGFR mutation p.G796S as somatic and germline mutation in white patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck, 2008.
18. Yarden Y, Sliwkowski MX. *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Feb;2(2):127-37.
19. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis*. Cancer Res. 1995 Oct 15;55(20):4575-80.
20. Sugio K, Kishimoto Y, Virmani AK, Hung JY, Gazdar AF. *K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas*. Cancer Res. 1994 Nov 15;54(22):5811-5.

21. Albuschat, R., *Neue EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren mit Salicyloyl- oder Chinazolin-Teilstrukturen*. Dissertation, Berlin 2003.
22. Kwiatkowski DJ, Harpole DH Jr, Godleski J, Herndon JE 2nd, Shieh DB, Richards W, Blanco R, Xu HJ, Strauss GM, Sugarbaker DJ. *Molecular pathologic substaging in 244 stage I non-small-cell lung cancer patients: clinical implications*. J.Clin.Oncol.1998 Jul;16(7):2468-77
23. Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC, Bos JL. *Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung*. Cancer Res. 1988 Oct 15;48(20):5738-41.
24. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, Wagenaar SS, Vanderschueren RG, van Zandwijk N, Mooi WJ, et al. *K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung*. N Engl J Med. 1990 Aug 30;323(9):561-5.
25. Tapia C, Savic S, Wagner U, Schönegg R, Novotny H, Grilli B, Herzog M, Barascud AD, Zlobec I, Cathomas G, Terracciano L, Feichter G, Bubendorf L. *HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases*. Breast Cancer Res. 2007;9(3):R31.
26. Ramieri MT, Murari R, Botti C, Pica E, Zotti G, Alo PL. *Detection of HER2 amplification using the SISH technique in breast, colon, prostate, lung and ovarian carcinoma* Anticancer Res. 2010 Apr;30(4):1287-92.
27. Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Brümmendorf TH, Bokemeyer C, Izbicki JR, Sauter G. *HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer* Hum Pathol. 2009 Jun;40(6):769-77. Epub 2009 Mar 9.
28. Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis MCh, Quaas A, Link BC, Schurr PG, Kaifi JT, Gros SJ, Yekebas EF, Marx A, Simon R, Izbicki JR, Sauter G. *Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus*. Mod Pathol. 2007 Jan;20(1):120-9. Epub 2006 Nov 24.
29. Alt FW, Kellems RE, Bertino JR, Schimke RT. *Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells*. 1978. Biotechnology. 1992; 24:397-410.
30. Yoshimoto M, Caminada De Toledo SR, Monteiro Caran EM, et al. (1999) *MYCN gene amplification. Identification of cell populations containing double minutes and*

- homogeneously staining regions in neuroblastoma tumors. Am J Pathol. 155(5):1439-43*
31. Hahn PJ (1993) *Molecular Biology of Double-Minute Chromosomes* Bio Essays Vol. 15, No.7:477-483
 32. Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Trakhtenbrot L, Kerem B. (2002) *A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. Cancer Cell. 1(1):89-97*
 33. Lo. AW, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane JP. (2002) *DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line .Neoplasia 4(6):531-8*
 34. John-HA; Birnstiel-ML; Jones-KW (1969) *RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature. Aug 9; 223(206): 582-7*
 35. Gall-JG; Pardue-ML (1969) *Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations Proc-Natl-Acad-Sci-USA Jun; 63(2): 378-83*
 36. Langer-PR; Waldrop-AA; Ward-DC (1981) *Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. Nov; 78(11): 6633-7*
 37. Manuelidis-L; Langer-Safer-PR; Ward-DC (1982) *High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. J-Cell-Biol. Nov; 95(2 Pt 1): 619-25*
 38. Pinkel-D; Straume-T; Gray-JW (1986) *Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization Proc-Natl-Acad-Sci-USA May; 83(9): 2934-8*
 39. Tkachuk DC., D. Pinkel, WL. Kuo, HU. Weier, JW. Gray (1991) *Clinical application of fluorescence in situ hybridization Genet-Anal-Tech-Appl. Apr; 8(2): 67-74*
 40. Hopman-AH; van-Hooren-E; van-de-Kaa-CA; Vooijs-PG; Ramaekers-FC (1991) *Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. Mod-Pathol. Jul; 4(4): 503-13*
 41. Waschow M. Dissertation: *KRAS-Amplifikation im humanen Lungenkarzinom* Universitätsklinikum Hamburg, Institut für Pathologie (2008)
 42. Simon, R., M. Mirlacher, and G. Sauter, *Tissue microarrays. Methods Mol Med, 2004. 97: p. 377-89.*
 43. Roelofs H, Mostert MC, Pompe K, Zafarana G, van Oorschot M, van Gurp RJ, Gillis AJ, Stoop H, Beverloo B, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH. *Restricted 12p amplification and RAS mutation in human germ cell tumors of the adult testis. Am J Pathol. 2000 Oct;157(4):1155-66.*

44. Sung MT, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Zhang S, Montironi R, Cheng L. *Primary mediastinal seminoma: a comprehensive assessment integrated with histology, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization for chromosome 12p abnormalities in 23 cases.* Am J Surg Pathol. 2008 Jan;32(1):146-55.
45. Rodriguez E, Houldsworth J, Reuter VE, Meltzer P, Zhang J, Trent JM, Bosl GJ, Chaganti RS. *Molecular cytogenetic analysis of i(12p)-negative human male germ cell tumors.* Genes Chromosomes Cancer. 1993 Dec;8(4):230-6.
46. Kernek KM, Brunelli M, Ulbright TM, Eble JN, Martignoni G, Zhang S, Michael H, Cummings OW, Cheng L. *Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosome 12p in paraffin-embedded tissue is useful for establishing germ cell origin of metastatic tumors* Mod Pathol. 2004 Nov;17(11):1309-13.
47. Zafarana G, Gillis AJ, van Gurp RJ, Olsson PG, Elstrodt F, Stoop H, Millán JL, Oosterhuis JW, Looijenga LH *Coamplification of DAD-R, SOX5, and EKII in human testicular seminomas, with specific overexpression of DAD-R, correlates with reduced levels of apoptosis and earlier clinical manifestation.* Cancer Res. 2002 Mar 15;62(6):1822-31.
48. Bussey KJ, Lawce HJ, Himoe E, Shu XO, Suijkerbuijk RF, Olson SB, Magenis RE. *Chromosomes 1 and 12 abnormalities in pediatric germ cell tumors by interphase fluorescence in situ hybridization.* Cancer Genet Cytogenet. 2001 Mar;125(2):112-8.
49. Gisselsson D, Höglund M, Mertens F, Mitelman F, Mandahl N. *Chromosomal organization of amplified chromosome 12 sequences in mesenchymal tumors detected by fluorescence in situ hybridization.* Genes Chromosomes Cancer. 1998 Nov;23(3):203-12.
50. Henegariu O, Vance GH, Heiber D, Pera M, Heerema NA. *Triple-color FISH analysis of 12p amplification in testicular germ-cell tumors using 12p band-specific painting probes.* J Mol Med. 1998 Aug;76(9):648-55.
51. Blough RI, Heerema NA, Ulbright TM, Smolarek TA, Roth LM, Einhorn LH. *Interphase chromosome painting of paraffin-embedded tissue in the differential diagnosis of possible germ cell tumors.* Mod Pathol. 1998 Jul;11(7):634-41.
52. McIntyre A, Summersgill B, Spendlove HE, Huddart R, Houlston R, Shipley J. *Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors.* Neoplasia. 2005 Dec;7(12):1047-52.
53. Wagner PL, Perner S, Rickman DS, LaFargue CJ, Kitabayashi N, Johnstone SF, Weir BA, Meyerson M, Altorki NK, Rubin MA. *In situ evidence of KRAS amplification and*

- association with increased p21 levels in non-small cell lung carcinoma.* Am J Clin Pathol. 2009 Oct;132(4):500-5.
54. Modrek B, Ge L, Pandita A, Lin E, Mohan S, Yue P, Guerrero S, Lin WM, Pham T, Modrusan Z, Seshagiri S, Stern HM, Waring P, Garraway LA, Chant J, Stokoe D, Cavet G. *Oncogenic activating mutations are associated with local copy gain.* Mol Cancer Res. 2009 Aug;7(8):1244-52. Epub 2009 Aug 11.
55. Boelens MC, Kok K, van der Vlies P, van der Vries G, Sietsma H, Timens W, Postma DS, Groen HJ, van den Berg A. *Genomic aberrations in squamous cell lung carcinoma related to lymph node or distant metastasis.* Lung Cancer. 2009 Dec;66(3):372-8. Epub 2009 Mar 25.
56. Sheu JJ, Hua CH, Wan L, Lin YJ, Lai MT, Tseng HC, Jinawath N, Tsai MH, Chang NW, Lin CF, Lin CC, Hsieh LJ, Wang TL, Shih IeM, Tsai FJ. *Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma.* Cancer Res. 2009 Mar 15;69(6):2568-76. Epub 2009 Mar 10.
57. Corso G, Velho S, Paredes J, Pedrazzani C, Martins D, Milanezi F, Pascale V, Vindigni C, Pinheiro H, Leite M, Marrelli D, Sousa S, Carneiro F, Oliveira C, Roviello F, Seruca R. *Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability.* Eur J Cancer. 2010 Oct 9. Pubmed: 20937558
58. Miller CT, Moy JR, Lin L, Schipper M, Normolle D, Brenner DE, Iannettoni MD, Orringer MB, Beer DG. *Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia.* Clin Cancer Res. 2003 Oct 15;9(13):4819-25.
59. Vasko R, Koziol M, Füzesi L, König F, Strutz F, Müller GA. *Fulminant plasmapheresis-refractory thrombotic microangiopathy associated with advanced gastric cancer.* Ther Apher Dial. 2010 Apr;14(2):222-5.
60. Peng DF, Sugihara H, Mukaisho K, Tsubosa Y, Hattori T. *Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples from individual tumours.* J Pathol. 2003 Nov;201(3):439-50.
61. Sakakura C, Mori T, Sakabe T, Ariyama Y, Shinomiya T, Date K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Takahashi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J. *Gains, losses, and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization.* Genes Chromosomes Cancer. 1999 Apr;24(4):299-305.

62. Riegman PH, Vissers KJ, Alers JC, Geelen E, Hop WC, Tilanus HW, van Dekken H. *Genomic alterations in malignant transformation of Barrett's esophagus*. *Cancer Res*. 2001 Apr 1;61(7):3164-70.
63. Poulos C, Cheng L, Zhang S, Gersell DJ, Ulbright TM. *Analysis of ovarian teratomas for isochromosome 12p: evidence supporting a dual histogenetic pathway for teratomatous elements*. *Mod Pathol*. 2006 Jun;19(6):766-71.
64. Kozma L, Kiss I, Nagy A, Szakáll S, Ember I. *Investigation of c-myc and K-ras amplification in renal clear cell adenocarcinoma*. *Cancer Lett*. 1997 Jan 1;111(1-2):127-31.
65. Astolfi A, Nannini M, Pantaleo MA, Di Battista M, Heinrich MC, Santini D, Catena F, Corless CL, Maleddu A, Saponara M, Lolli C, Di Scioscio V, Formica S, Biasco G. *A molecular portrait of gastrointestinal stromal tumors: an integrative analysis of gene expression profiling and high-resolution genomic copy number*. *Lab Invest*. 2010 Sep;90(9):1285-94. Epub 2010 Jun 14.
66. Chen S, Auletta T, Dovirak O, Hutter C, Kuntz K, El-ftesi S, Kendall J, Han H, Von Hoff DD, Ashfaq R, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Hruban RH, Lucito R. *Copy number alterations in pancreatic cancer identify recurrent PAK4 amplification*. *Cancer Biol Ther*. 2008 Nov;7(11):1793-802. Epub 2008 Nov 21.
67. Gysin S, Rickert P, Kastury K, McMahon M. *Analysis of genomic DNA alterations and mRNA expression patterns in a panel of human pancreatic cancer cell lines*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Sep;44(1):37-51.
68. Heidenblad M, Jonson T, Mahlamäki EH, Gorunova L, Karhu R, Johansson B, Höglund M. *Detailed genomic mapping and expression analyses of 12p amplifications in pancreatic carcinomas reveal a 3.5-Mb target region for amplification*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Jun;34(2):211-23.
69. Snijders AM, Nowee ME, Fridlyand J, Piek JM, Dorsman JC, Jain AN, Pinkel D, van Diest PJ, Verheijen RH, Albertson DG. *Genome-wide-array-based comparative genomic hybridization reveals genetic homogeneity and frequent copy number increases encompassing CCNE1 in fallopian tube carcinoma*. *Oncogene*. 2003 Jul 3;22(27):4281-6.
70. Klaus-Martin Schulte¹, Dieter Niederacher², Han-Xiang An², Stephanie Staudt¹, Dietmar Simon¹, Matthias Wilhelm Beckmann², Peter E. Goretzki¹ *INT-2 gene amplification in differentiated human thyroid cancer* *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 101-104

71. Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis MCh, Quaas A, Link BC, Schurr PG, Kaifi JT, Gros SJ, Yekebas EF, Marx A, Simon R, Izbicki JR, Sauter G. *Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus.* Mod Pathol. 2007 Jan;20(1):120-9. Epub 2006 Nov 24.
72. Jørgensen JT. *Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer.* Oncology. 2010;78(1):26-33. Epub 2010 Feb 25.
73. Rüschoff J, Nagelmeier I, Baretton G, Dietel M, Höfler H, Schildhaus HU, Büttner R, Schlake W, Stoss O, Kreipe HH. *Her2 testing in gastric cancer. What is different in comparison to breast cancer?* Pathologe. 2010 May;31(3):208-17.
74. Hirsch FR, Franklin WA, Veve R, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr. *HER2/neu expression in malignant lung tumors.* Semin Oncol. 2002 Feb;29(1 Suppl 4):51-8.
75. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, Veve R, Chen L, Helfrich B, Zeng C, Baron A, Bunn PA Jr. *Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas.* Br J Cancer. 2002 May 6;86(9):1449-56.
76. Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Kato H. *Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer.* Int J Cancer. 2003 Jan 1;103(1):61-6.
77. Ross JS, Fletcher JA. *The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy.* Stem Cells. 1998;16(6):413-28. Review.
78. Lord RV, O'Grady R, Sheehan C, Field AF, Ward RL. *K-ras codon 12 mutations in Barrett's oesophagus and adenocarcinomas of the oesophagus and oesophagogastric junction.* J Gastroenterol Hepatol. 2000 Jul;15(7):730-6.
79. Arber N, Shapira I, Ratan J, Stern B, Hibshoosh H, Moshkowitz M, Gammon M, Fabian I, Halpern Z. *Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors.* Gastroenterology. 2000 Jun;118(6):1045-50.
80. Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, Li J, Chen Q. *KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies.* Lung Cancer. 2010 Sep;69(3):272-8. Epub 2009 Dec 22.
81. Planchard D, Loriot Y, Besse B. *Impact of KRAS in standard treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients in 2009: prognostic and predictive value.* Bull Cancer. 2009 Dec;96 Suppl:S57-68.
82. Kim YT, Kim TY, Lee DS, Park SJ, Park JY, Seo SJ, Choi HS, Kang HJ, Hahn S, Kang CH, Sung SW, Kim JH. *Molecular changes of epidermal growth factor receptor*

- (*EGFR*) and *KRAS* and their impact on the clinical outcomes in surgically resected adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2008 Jan;59(1):111-8. Epub 2007 Sep 29.
83. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, et al. *Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma*. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1069-75.
84. Loboda A, Nebozhyn M, Klinghoffer R, Frazier J, Chastain M, Arthur W, Roberts B, Zhang T, Chenard M, Haines B, Andersen J, Nagashima K, Paweletz C, Lynch B, Feldman I, Dai H, Huang P, Watters J. *A gene expression signature of RAS pathway dependence predicts response to PI3K and RAS pathway inhibitors and expands the population of RAS pathway activated tumors*. *BMC Med Genomics*. 2010 Jun 30;3:26.
85. Rizzo S, Bronte G, Fanale D, Corsini L, Silvestris N, Santini D, Gulotta G, Bazan V, Gebbia N, Fulfaro F, Russo A. *Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy?* *Cancer Treat Rev*. 2010 Nov;36 Suppl 3:S56-61. Review.
86. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC *Cancer as an evolutionary and ecological process*. *Nat Rev Cancer*. 2006 Dec;6(12):924-35. Epub 2006 Nov 16. Review
87. Dahabreh IJ, Terasawa T, Castaldi PJ, Trikalinos TA. *Systematic Review: Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Treatment Effect Modification by KRAS Mutations in Advanced Colorectal Cancer*. *Ann Intern Med*. 2011 Jan 4;154(1):37-49.
88. Cepero V, Sierra JR, Corso S, Ghiso E, Casorzo L, Perera T, Comoglio PM, Giordano S. *MET and KRAS gene amplification mediates acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors*. *Cancer Res*. 2010 Oct 1;70(19):7580-90. Epub 2010 Sep 14.
89. http://www.onkodin.de/e20556/e20635/e61281/e61282/index_ger.html (ASCO-Report 2009)

Danksagungen

Herrn PD Dr. Ronald Simon danke ich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit es selbstständig zu bearbeiten sowie seine Unterstützung beim schriftlichen Teil.

Herrn Prof. Dr. Guido Sauter danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie für seine Bereitschaft die Arbeit zu begutachten.

Herrn Dr. Frederik Holst danke ich für die Betreuung im Labor sowie die guten Ratschläge während der Arbeit.

Dem gesamten Team der molekularen Pathologie danke ich dafür, dass sie bei der Arbeit immer mit Witz und guten Ratschlägen zur Seite gestanden haben.

Ebenso danke ich meinen Kommilitonen, mit denen ich die 8 Monate im Labor, um die Erfolge in diesem Projekt gerungen habe.

Abschließend danke ich meiner Familie dafür, dass sie mir in all dieser Zeit den Rücken freigehalten und gestärkt haben.

Eidesstattliche Erklärung

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: