

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**INZIDENZ VON SOMATISCHEN ONKOGENEN
*EGFR-, HRAS- UND KRAS-MUTATIONEN IN SEBORRHOISCHEN
KERATOSEN***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ivelina Antonova Georgieva

2014

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**INZIDENZ VON SOMATISCHEN ONKOGENEN
*EGFR-, HRAS- UND KRAS-MUTATIONEN IN SEBORRHOISCHEN
KERATOSEN***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ivelina Antonova Georgieva

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hafner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rar. nat. Charalampos Aslanidis

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die seborrhoische Keratose	1
1.1.1	Definition und klinisches Bild	1
1.1.2	Sonderformen	3
1.1.2.1	<i>Melanoakanthom</i>	3
1.1.2.2	<i>Verruca-plana-artige seborrhoische Warze (Keining und Halter 1949) ...</i>	3
1.1.2.3	<i>Stukkokeratose (Keratosis alba)</i>	3
1.1.2.4	<i>Dermatosis papulosa nigra (Castellani, 1925).....</i>	4
1.1.2.5	<i>Leser-Trélat-Zeichen und Leser-Trélat-Syndrom (Trélat, 1890; Leser, 1901)</i>	4
1.1.2.6	<i>Haber-Syndrom (Haber, 1965).....</i>	5
1.1.2.7	<i>Irritierte Verruca seborrhoica</i>	5
1.2	Epidemiologie.....	5
1.3	Ätiopathogenese.....	6
1.3.1	Ätiologische Faktoren	6
1.3.1.1	<i>Höheres Lebensalter</i>	6
1.3.1.2	<i>Exzessive Sonnenexposition</i>	7
1.3.1.3	<i>Genetische Prädisposition.....</i>	7
1.3.1.4	<i>Weitere Triggerfaktoren</i>	8
1.3.2	Molekulare Pathogenese	8
1.3.2.1	<i>Biochemische Eigenschaften und Funktion des EGFR-Gens.....</i>	12
1.3.2.2	<i>Biochemische Eigenschaften und Funktion der RAS-Genfamilie</i>	13
1.3.2.3	<i>Biochemische Eigenschaften und Funktion des PIK3R1-Gens</i>	14
1.3.2.4	<i>Biochemische Eigenschaften und Funktion des FGFR2-Gens.....</i>	14
1.4	Diagnostik.....	16
1.4.1	Inspektion.....	16
1.4.2	Histopathologie	17
1.5	Differentialdiagnose	19
1.6	Therapie und Prognose	20
2	Zielsetzung und Fragestellung der experimentellen Arbeit	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23

3.1.1	Laborgeräte	23
3.1.2	Verbrauchsmaterial	25
3.1.3	Chemikalien	26
3.1.4	Enzyme	27
3.1.5	Puffer und Lösungen	27
3.1.6	DNA-Präparation und DNA-Modifikation	29
3.1.6.1	<i>DNA-Isolation aus frisch-gefrorenen Proben</i>	29
3.1.6.2	<i>Aufreinigung der DNA-Proben</i>	30
3.1.6.3	<i>RAS SNaPShot® Multiplex Assay</i>	31
3.1.6.4	<i>Sequenzierung</i>	32
3.1.7	Synthetische Oligonukleotide	33
3.1.7.1	<i>Primersequenzen für die Analyse von EGFR, PIK3R1 und FGFR2</i>	33
3.1.7.2	<i>Primersequenzen für die RAS-Genanalyse</i>	34
3.1.8	Software und Internet-Ressourcen	35
3.2	Studiendesign und Patientenkollektiv	35
3.3	Methoden	38
3.3.1	Proteinase-K-Verdau und DNA-Isolierung	38
3.3.2	Quantitative und qualitative DNA-Analyse	39
3.3.3	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	40
3.3.4	Amplifikation der DNA für die Analyse der Gene EGFR, PIK3R1 und FGFR2	42
3.3.4.1	<i>PCR für EGFR</i>	42
3.3.4.2	<i>PCR für PIK3R1</i>	44
3.3.4.3	<i>PCR für FGFR2</i>	45
3.3.5	Agarose-Gel-Elektrophorese	46
3.3.6	Sequenzierung von FGFR2, PIK3R1 und EGFR	47
3.3.6.1	<i>Aufreinigung der DNA-Amplifikate</i>	47
3.3.6.2	<i>Amplifikation der DNA mittels Sequenzier-PCR</i>	48
3.3.6.3	<i>Aufreinigung der Produkte der Sequenzier-PCR</i>	49
3.3.6.4	<i>DNA-Sequenzierung nach Sanger</i>	49
3.3.7	Analyse von RAS-Hotspot-Genmutationen mittels SNaPshot® Multiplex System Assay	50
4	Ergebnisse	54
4.1	Studiendesign und Vorversuche	54

4.2	Klinisch-pathologische Charakteristika und Korrelation mit dem Mutationsstatus	54
4.3	Analyse von <i>EGFR</i>-Mutationen bei seborrhoischen Keratosen	56
4.4	Analyse der <i>RAS</i>-Genmutationen bei seborrhoischen Keratosen	57
4.5	Analyse von <i>PIK3R1</i>-Mutationen bei seborrhoischen Keratosen.....	59
4.6	<i>FGFR2</i>-Mutationsstatus bei seborrhoischen Keratosen	60
5	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	61
6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	66
7	Anhang.....	75
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	75
7.2	Abbildungsverzeichnis	77
7.3	Tabellenverzeichnis	78
7.4	Lebenslauf	79
7.5	Danksagung.....	80
7.6	Originalarbeit	81
7.7	Kongressbeiträge (Poster)	81

1 Einleitung

Die seborrhoische Keratose (SK) ist ein sehr häufiger, benigner Hauttumor, der aus der Epidermis hervorgeht. Die SK stellt ein sehr interessantes Forschungsobjekt dar, da sie multiple onkogene Mutationen aufweist, die auch bei zahlreichen malignen Tumoren anderer Organe gefunden werden. Durch die Kenntnis der molekularen Grundlagen dieses benignen Hauttumors lassen sich im Vergleich mit malignen epithelialen Tumoren möglicherweise wichtige neue Erkenntnisse zur Tumorentstehung ableiten.

Im Folgenden soll ein aktueller Überblick über die bisherigen klinischen und experimentellen Studien zur SK gegeben werden.

1.1 Die seborrhoische Keratose

1.1.1 Definition und klinisches Bild

Die SK, auch synonym als *Verrucae seborrhoicae seniles*, Alterswarzen, seborrhoische Warzen, Basalzellakanthome, Basalzellpapillome oder benigne Akanthokeratosen bezeichnet, repräsentieren häufig vorkommende, benigne, epidermale Tumoren der Haut, die der Dermatologe oft in seinem Alltag als Nebenbefund beobachten kann (Furue et al 2011, Hafner und Vogt 2008, Yeatman et al 1997). Sie zeichnen sich durch eine große morphologische Variationsbreite aus (siehe Kapitel 1.1.2). Die SK stellen sich zunächst als flache, später als erhabene, glatte, scharf begrenzte, leicht bräunliche bis braun-schwarz pigmentierte Hauttumoren mit matter zerklüfteter Oberflächenbeschaffenheit dar (Abbildung 1 a), 1 b)). Sie wirken wie auf die Haut aufgeklebt und fühlen sich weich und fettig an (seborrhoisch = fettig). Die SK erreichen in der Regel einen mittleren Durchmesser von 0,5 – 1 cm. Sie sind rundliche oder oval geformte Hauttumoren, die einzeln oder multipel vorkommen. Zu den Prädilektionsstellen gehören Gesicht, Schläfenregion, Hals, Dekolleté, Brust, Oberarme und Rücken. In seltenen Fällen wurden SK auch an den Konjunktiven beobachtet (Gulias-Canizo et al 2006, Kim et al 2009). Ein anderer Fallbericht zeigte, dass sie sehr selten auch innerhalb des äußeren Gehörganges vorkommen können (Ozbay et al 2012). Die Schleimhäute sind meist ausgespart. In höherer Anzahl bilden diese benignen Tumoren manchmal typische Verteilungsmuster aus. Die Anordnung kann am Rücken und Abdomen ähnlich einen „Christmas tree pattern“ sein (Abbildung 2) (Hafner und Vogt 2008) oder in Form von einem „Raindrop pattern“ Rücken, Brust oder Abdomen betreffen (Heffernan und Khavari 1998, Zhang und Zhu 2011).

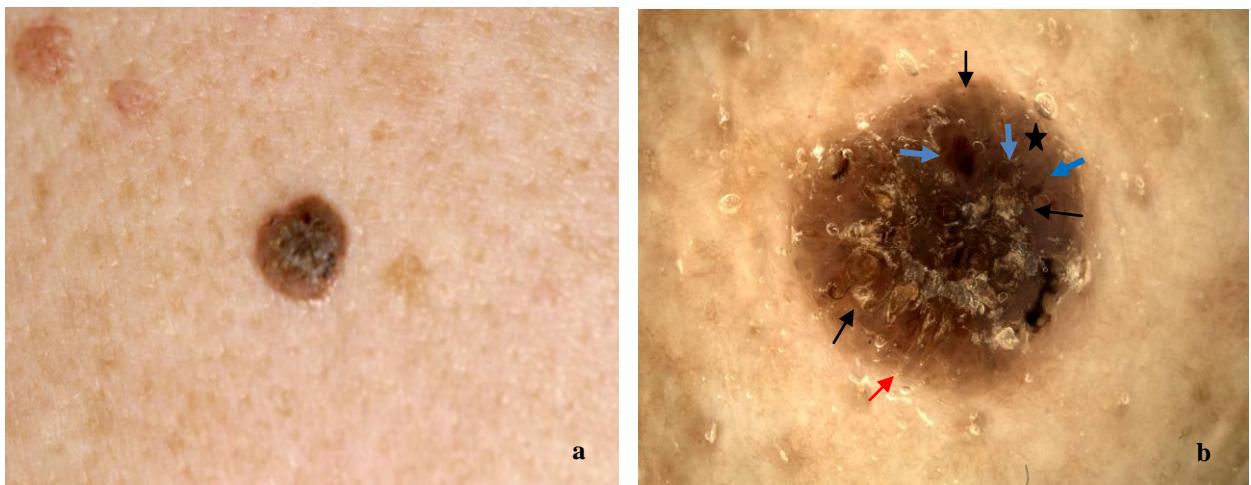


Abbildung 1: Seborrhoische Keratose: a) Klinisches und b) Dermatoskopisches Bild

Abbildung 1 a) stellt ein typisches klinisches Bild einer pigmentierten SK dar. Charakteristisch sind die ovale Form des Hauttumors, die scharfe Abgrenzung zu der Umgebung und die hell-braune homogene Farbe. Auflichtmikroskopisch (Abbildung 1 b)) erkennt man zahlreiche unterschiedlich große, runde, hellbraune Spots (→), die histologisch Pseudohornzysten entsprechen, sowie die sogenannten pseudofollikulären Öffnungen mit gelbbraunen Farbtönen (→). Die SK zeigt außerdem ein fingerabdruckartiges Muster (★). Zu erkennen ist die typische mottenfraßartige Begrenzung dieses Hauttumors (→).



Abbildung 2: Seborrhoische Keratosen, angeordnet in Form eines "Christmas tree pattern"

In Abbildung 2 sind multiple SK in Form von einem „Christmas tree pattern“ am Rücken und Abdomen eines Patienten zu erkennen.

1.1.2 Sonderformen

Jeder Patient kann neben den oben beschriebenen typischen SK weitere Formen und Varianten aufweisen. Morphologisch werden folgende Formen unterschieden:

1.1.2.1 *Melanoakanthom*

Das Melanoakanthom stellt klinisch eine besonders stark pigmentierte SK dar.

Histologisch erkennt man eine Proliferation von dendritischen Melanozyten sowohl in der junktionalen als auch in der oberen Schicht der hyperplastischen Epidermis (Tabelle 3).

1.1.2.2 *Verruca-plana-artige seborrhoische Warze (Keining und Halter 1949)*

Die Verruca-plana-artige seborrhoische Warze ist ein sehr flacher, stärker pigmentierter Hauttumor. Sie betrifft vor allem die Handrücken und die Unterarme der älteren Menschen mit lichtgeschädigter Haut.

Histologisch ist ein stark pigmentiertes Basalzelllager mit initialer akanthotischer Sprossung der Rete Malpighii erkennbar (Tilgen 2005).

1.1.2.3 *Stukkokeratose (Keratosis alba)*

Bei der Stukkokeratose handelt es sich um eine nur wenige Millimeter große, flache, nicht pigmentierte SK mit rauer, weißlicher Oberflächenbeschaffenheit, die meistens die sonnenexponierten Areale, wie die Handrücken, die Unterarmstreckseiten, die Unterschenkel, die Knöchelregionen und die Fußrücken, betrifft und gelegentlich in höherer Anzahl an der Haut vorkommt. Die Stukkokeratose manifestiert sich oft ab dem 40. Lebensjahr. Männer scheinen im Vergleich zu Frauen etwa viermal häufiger betroffen zu sein. Die Stukkokeratose wirkt wie auf die Hautoberfläche aufgeklebt und lässt sich leicht mit einem scharfen Löffel oder einer Ringkürette abtragen, ohne dass eine Blutung entsteht.

Die Stukkokeratose ist histologisch einer hyperkeratotischen SK sehr ähnlich. Charakteristisch für sie ist die papillomatotische Epidermis mit Orthohyperkeratose. Besonderes Merkmal ist das Fehlen von Pseudohornzysten (Hafner und Vogt 2008).

1.1.2.4 *Dermatosis papulosa nigra* (Castellani, 1925)

Die Dermatosis papulosa nigra ist eine Sonderform der SK bei stärker pigmentierten Hauttypen. Dieser Hauttumor tritt häufiger bei Frauen auf und kommt familiär gehäuft vor. In der Regel steigt die Anzahl der Hautläsionen mit zunehmendem Alter an. Typische Prädilektionsstellen sind Gesicht, Hals, Brust und oberer Rücken. Die Dermatosis papulosa nigra zeigt keine Rückbildungstendenz. Eine Therapie ist oft nicht notwendig. Patienten lassen aus kosmetischen Gründen diese Hautveränderung mittels Kürettage, Laser (Cole et al 2009) oder Kryotherapie entfernen.

Die Dermatosis papulosa nigra entspricht histologisch einer akanthotischen SK. Die (Pseudo-) Hornzysten kommen etwas weniger häufig vor (Hafner und Vogt 2008).

1.1.2.5 *Leser-Trélat-Zeichen und Leser-Trélat-Syndrom* (Trélat, 1890; Leser, 1901)

Das Leser-Trélat-Zeichen wird als plötzliches Auftreten von multiplen SK definiert, die sich großenprogradient zeigen und im Verlauf an Anzahl zunehmen. Dieses Auftreten wird meistens von starkem Pruritus begleitet. Das Entstehen der SK dauert im Durchschnitt ca. 15 Wochen, kann jedoch in einzelnen Fällen von Tagen bis zu einem Jahr variieren (Yaniv et al 1994). Die beiden Geschlechter sind etwa gleich häufig betroffen. Laut dieser Definition ist das Leser-Trélat-Zeichen nicht einem Leser-Trélat-Syndrom gleichbedeutend (Heaphy et al 2000). Das Zeichen kann sich mit oder ohne ein internes malignes Geschehen auf der Haut manifestieren. Im Gegensatz dazu handelt es sich beim Leser-Trélat-Syndrom um eruptive, an Größe und Anzahl zunehmende, v.a. im Bereich des Rumpfes lokalisierte SK, die in Assoziation mit Adenokarzinomen, insbesondere der Lunge (Ceylan et al 2002, Heaphy et al 2000), des Magens (Stieler und Plewig 1987) oder des Kolons (Cohn und Classen 1993, Ponti et al 2010) sowie der Harnblase (Yaniv et al 1994), der Leber und des Pankreas (Hirano et al 1993, Lindelof et al 1992, Schwengle et al 1988), aber auch bei Mammakarzinomen (Lynch et al 1982, Stieler und Plewig 1987), Lymphomen (Halevy et al 1980, Kaplan und Jegesothy 1984), Leukämien (Greer et al 1978, Kechijian et al 1979) und Plattenepithelkarzinomen (Lindelof et al 1992) vorkommen. Das Leser-Trélat-Syndrom stellt somit ein paraneoplastisches Syndrom dar. Das Leser-Trélat-Syndrom kann sich in etwa 35% der Fälle auch in Zusammenhang mit Acanthosis nigricans maligna manifestieren (Hafner und Vogt 2008, Schwartz 1996, Yaniv et al 1994). Viele klinische Fallberichte zeigen eine Häufung im zunehmenden Alter, das Leser-Trélat-Syndrom kann aber auch jüngere Menschen betreffen (Barron und Prendiville 1992, Hardy et al 1997, Westrom und Berger 1986). Es ist ein

prognostisch ungünstiger Marker, da das maligne interne Tumorleiden meist schon vorangeschritten ist. Eine Tumorsuche ist in dem Fall erforderlich. Bei vollständiger Tumorresektion wird oft eine Rückbildung der SK beobachtet, umgekehrt treten bei Tumorrezidiv erneut SK auf (Ponti et al 2010).

1.1.2.6 *Haber-Syndrom (Haber, 1965)*

Unter dem Begriff Haber-Syndrom versteht man eine autosomal-dominante Genodermatose, die durch ein rosacea-artiges Gesichtserythem mit intraepidermalen Epitheliomen und zahlreichen verruziformen bis bowenoiden Papeln im Achsel- und Leistenbereich charakterisiert ist. Diese Papeln entsprechen histologisch SK mit vielen Melanozyten und Melanophagen. Bei Patienten mit Haber-Syndrom können hyperkeratotische Herde an Knien und Ellenbogen vorhanden sein. Häufig beobachtet man eine Xerosis cutis am ganzen Integument. Das Haber-Syndrom kann in jedem Lebensalter, sogar in der Kindheit auftreten (Binet et al 1986, Hafner und Vogt 2008, Sanderson und Wilson 1965, Stolz und Ramrath 2005).

1.1.2.7 *Irritierte Verruca seborrhoica*

Die irritierte SK fällt meistens durch eine entzündlich gerötete, schmerzhafte, schuppige Plaque an ihrer Oberfläche auf. Sie wird oft durch mechanische Reizung verursacht.

1.2 Epidemiologie

Trotz ihrer Häufigkeit gibt es bisher keine genaueren statistischen Daten zur Epidemiologie der SK.

Die SK stellt einen weltweit verbreiteten epidermalen Hauttumor dar. Ihre Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter deutlich an. Die SK können solitär oder multipel auftreten. Es gibt keine Geschlechtsprävalenz. Die kaukasische Bevölkerung ist häufiger betroffen als dunkelhäutige Menschen (Graham-Brown et al 1990, Hafner und Vogt 2008, Verhagen et al 1968).

1.3 Ätiopathogenese

Trotz ihrer hohen Inzidenz ist nur wenig über die Ätiologie und Pathogenese der SK bekannt. Klinische Fallberichte von Familien mit multiplen SK (Bedi 1977, Rongioletti et al 1988) sowie in jüngster Zeit begonnene Genanalysen (Hafner et al 2008) haben gezeigt, dass es sich bei den SK um echte Tumoren mit genetischen Alterationen handelt. Ein genetischer Mosaizismus als ursächlicher Faktor wird derzeit noch diskutiert (Mabuchi et al 2008).

1.3.1 Ätiologische Faktoren

Die auslösenden Faktoren für das Auftreten der SK sind bisher noch nicht abschließend identifiziert worden. Die bisher bekannten Mechanismen werden im Folgenden vorgestellt.

1.3.1.1 *Höheres Lebensalter*

Viele klinische Studien haben nachgewiesen, dass die Anzahl und die Größe der SK mit höherem Lebensalter korrelieren (Hafner und Vogt 2008, Kennedy et al 2003, Memon et al 2000, Yeatman et al 1997), sie treten jedoch auch bei jüngeren Patienten auf. Eine australische Studie beschrieb, dass die Prävalenz der SK bei älteren Menschen höher ist. Yeatman et al. (1997) untersuchten 100 australische Patienten, die sich zurzeit der Studie in den Altersgruppen zwischen 15-25, 26-50, 51-75 und über 75 Jahre befanden. Die Studie demonstrierte, dass SK bei 15- bis 25-jährigen Patienten nur in 12% der Fälle vorhanden waren, bei Menschen über 50 Jahre waren sie jedoch in bis zu 100% der Fälle nachweisbar (Yeatman et al 1997). Eine britische Studie (Memon et al 2000) zeigte demgegenüber eine niedrigere Prävalenz der SK, was mit der Sonnenexposition der teilgenommenen Patienten korrelieren kann. Es wurden dabei 968 Patienten verschiedener Altersgruppen körperlich untersucht. 54,8% der männlichen und 38% der weiblichen Patienten wiesen mindestens eine SK auf. Die Prävalenz stieg mit zunehmendem Lebensalter deutlich an. Die höchste Prävalenz der SK zeigte sich bei über 70-Jährigen (ca. 80% bei den Männern und 65% bei den Frauen) (Memon et al 2000).

1.3.1.2 *Exzessive Sonnenexposition*

Als anderer eigenständiger Triggerfaktor wird die ultraviolette Strahlung (UVB) angesehen (Hafner und Vogt 2008, Kwon et al 2003, Yeatman et al 1997). Die Studie von Kwon et al (2003) wies nach, dass es signifikante Unterschiede in der Größe, Farbe und Morphologie der SK gibt, wenn man die sonnenexponierten mit den nicht-sonnenexponierten Körperarealen vergleicht. In diese klinische Studie wurden 303 Patienten verschiedener Altersgruppen eingeschlossen. Die SK zeichneten sich durch eine schnellere Wachstumstendenz mit steigender kumulativer UV-Belastung im zunehmenden Lebensalter aus. Im Gegensatz zu den SK auf den nicht-lichtexponierten Körperarealen zeigten die SK auf den chronisch sonnenexponierten Körperstellen bei 40-Jährigen eine 5,7-fach erhöhte Wachstumstendenz, sie war bei 50-Jährigen 11,2-fach und bei 60-Jährigen 18,3-fach erhöht. Auf sonnenexponierter Haut traten die SK in Form von kleinen, flachen, multiplen Hauttumoren auf. Die bedeckten Körperareale charakterisierten sich dagegen durch solitär liegende, große SK mit verruköser Oberfläche. Interessanterweise zeigten Kwon et al, dass die Lichtbestrahlung die Morphologie der SK ändern kann. Die Sonnenexposition führt zur Stimulation der Pigmentproduktion und zum Transfer des Melanins aus den Melanozyten. Die SK erscheinen in dunkleren Farbtönen im Vergleich zu den an den bedeckten Körperpartien vorkommenden SK. Die oben genannte Studie demonstrierte, dass Patienten mit kumulativer UV-Belastung über 6 Stunden pro Tag ein 2,3-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten von SK im Vergleich zu Patienten mit kumulativer UV-Belastung von weniger als 3 Stunden pro Tag haben (Kwon et al 2003). Yeatman et al (1997) beobachteten in ihrem australischen Kollektiv ein gehäuftes Auftreten von SK bei steigender kumulativer UV-Belastung, allerdings lag die Prävalenz der SK an den sonnenexponierten Körperarealen etwas niedriger. Auch hier konnte man eine deutliche Korrelation zwischen Alter, Sonnenexposition und Entstehen von SK nachweisen (Yeatman et al 1997). Demgegenüber zeigte die niederländische Fallkontrollstudie von Kennedy et al (2003), dass die Inzidenz der SK weder mit den schmerzhaften Sonnenbränden in der Vorgeschichte der Patienten noch mit der kumulativen Sonnenexposition assoziiert ist (Kennedy et al 2003). Die Rolle der kumulativen UV-Belastung bei den SK wird weiterhin kontrovers diskutiert.

1.3.1.3 *Genetische Prädisposition*

Die genetische Prädisposition stellt vermutlich einen wichtigen Risikofaktor in der Genese der SK dar. Bereits 1977 begann die Suche nach einer Korrelation von benignen Hauttumoren

wie den SK und familiärer Disposition. T.R. Bedi (1977) beschrieb einen Fall einer 32-jährigen Patientin mit multiplen, asymptomatischen, pigmentierten Hautläsionen am ganzen Integument. Die Histologie entsprach der einer SK. Die Patientin berichtete, dass sie diese Hautveränderungen seit ihrer Geburt habe. Ähnliche Hauttumoren wiesen viele von ihren Familienangehörigen ebenfalls von Geburt an auf (Bedi 1977). Im Laufe der nächsten Jahre wurden weitere klinische Fallberichte veröffentlicht, die eine genetische Prädisposition für die Entstehung der SK implizieren. Sie beschrieben ein gehäuftes Auftreten von SK über Generationen, manchmal bereits in ungewöhnlich jungem Alter. Es wurde ein autosomal dominanter Erbgang vermutet (Hafner und Vogt 2008, Hafner et al 2008, Rongioletti et al 1988). Wie die genetische Prädisposition mit den SK korreliert, bleibt noch offen. Hier sind weitere Studien notwendig.

Aus diesen Daten ergibt sich jedoch das Bild einer polygenetischen, multifaktoriellen erblichen Disposition.

1.3.1.4 Weitere Triggerfaktoren

Neben den bereits genannten Triggerfaktoren werden vor allem Viren (Gushi et al 2003, Li et al 2004, Zhao et al 1989), Bakterien, Allergene, aber auch Drogen, Medikamente, Vitaminmangel (Lu'o'ng und Nguyen 2013), Nahrungsmittel, Vakzine sowie Belastung, Stress, Klimawechsel und hormonelle Umstellungsphasen, wie z.B. Schwangerschaft, als auslösende Faktoren in Betracht gezogen (Miller und Cooper 2007). Die Frage, ob diese Faktoren eine Rolle in der Pathogenese der SK spielen, bleibt noch offen. Weitere Untersuchungen müssen hier Klarheit schaffen.

1.3.2 Molekulare Pathogenese

Aus experimentellen Untersuchungen konnte man in den letzten Jahren einige interessante Erkenntnisse auf dem Gebiet der Molekulargenetik gewinnen.

Eine französische Studie untersuchte zum ersten Mal die Rolle der onkogenen Mutationen des *FGFR3*-Gens in der Epidermis (Logie et al 2005). Das *FGFR3*-Gen ist auf dem Chromosom 4 (4p16.3) lokalisiert (Thompson et al 1991) und kodiert für den FGF-Rezeptor 3. Der membranständige Tyrosinkinase-Rezeptor gehört zu der Familie der FGF-Rezeptoren. Er wird aktiviert, wenn ein Ligand gebunden hat. Seine Aktivierung ist für zahlreiche Prozesse in der Zelle wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellmigration u.a. mitverantwortlich. Er steuert somit die frühe Embryogenese, Morphogenese, Angiogenese, Wundheilung und

Tumorigenese von vielen verschiedenen Geweben (Johnson und Williams 1993, Schlessinger 2000). Spezifische ligandunabhängige Rezeptor-aktivierende Keimbahn-Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens wurden in früheren Studien in einer Reihe von autosomal dominant vererbaren humanen skelettalen Dysplasiesyndromen und Kraniosynostosen, wie z.B. der thanatophorischen Dysplasie, der Achondroplasie, des SADDAN- („Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans“-) Syndroms und des Pfeiffer-, Apert- und Crouzon-Syndroms demonstriert (Naski et al 1996, Ornitz und Marie 2002, Robertson et al 2000, Tavormina et al 1995, Tavormina et al 1999, Vajo et al 2000). Diese schwerwiegenden Skelettfehlbildungen werden oft von einer Acanthosis nigricans der Haut begleitet, die histologisch einer SK sehr ähnlich ist. Das gehäufte Auftreten dieser Hautveränderung ließ vermuten, dass *FGFR3* auch hier eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen kann. Somatische Gain-of-function-*FGFR3*-Mutationen fanden sich weiterhin in einer Reihe von benignen und malignen Tumoren: Harnblasentumoren, multiples Myelom (Chesi et al 1997, Chesi et al 2001), Zervix-, Ovarialkarzinom (Billerey et al 2001, Cappellen et al 1999), epidermaler Naevus (Hafner et al 2006b, Hafner et al 2006c, Hafner et al 2007c, Toll und Real 2008). Interessanterweise gelang der französischen Arbeitsgruppe, einen mutierten Keratin-5-Promotor in der basalen Epidermis von transgenen Mäusen zu exprimieren. Die Mäuse entwickelten Hautläsionen ohne malignes Potential, die den humanen SK ähnlich waren. Basierend auf diesen Ergebnissen analysierten Logie et al (2005) die Rolle der onkogenen Mutationen in den Exons 7, 10 und 15 des *FGFR3*-Gens in 62 humanen SK. Die Exons enthielten die häufigsten onkogenen *FGFR3*-Mutationen, die in den oben genannten Skelettfehlbildungen und Tumoren gefunden worden sind. In 24 von 62 SK-Proben (39 %) wurden die *FGFR3*-Punktmutationen R248C, S249C, G372C, S373C, Y375C, K652E und K652M demonstriert. Die Vermutung, dass diese Punktmutationen eine ligandunabhängige Aktivierung der Signalwege in den Keratinozyten der SK bewirken, führte zu einer weiteren experimentellen Studie, die den genaueren Einfluss der *FGFR3*-Punktmutation R248C auf die Zelleigenschaften und Bewegung der Keratinozyten untersuchte (Hafner et al 2010a). Sie verglich das Verhalten von Keratinozyten mit der *FGFR3*-Punktmutation mit dem von *FGFR3*-Wildtyp Keratinozyten. Die Arbeitsgruppe von Hafner et al (2010) wies nach, dass die Punktmutation R248C eine höhere Zelldichte, eine verminderte Apoptoserate sowie eine niedrigere Affinität der Keratinozyten zu Fibronectin, jedoch keine Migrationsfähigkeit verursacht. Weitere Studien (Hafner et al 2010b, Hallermann et al 2004) bewiesen weiterhin, dass die SK ihre genetische Stabilität trotz des Vorhandenseins von aktivierenden onkogenen Mutationen behalten. Es zeigte sich, dass

onkogene *FGFR3*-Mutationen bei ihrer funktionellen Auswirkung und Aktivierung der zellulären Signaltransduktionswege jedoch gewebespezifisch sind (L'Hote und Knowles 2005).

Diese Ergebnisse haben das Interesse von weiteren Forschungsgruppen auf diesem Gebiet erweckt. Hafner et al untersuchten weitere onkogene Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens bei den SK (Hafner et al 2007d), die unter den malignen Tumoren vor allem bei den oberflächlichen papillären malignen Harnblasenkarzinomen identifiziert wurden. Auch die Rolle des *PIK3CA*-Gens (catalytic p110-alpha subunit of class 1 phosphatidylinositol 3-kinase) wurde untersucht (Eswarakumar et al 2005, Lopez-Knowles et al 2006, Schlessinger 2004). Die Arbeitsgruppe konzentrierte sich auf die Exons 9 und 20 innerhalb des *PIK3CA*-Gens und auf die Exons 7, 10 und 15 des *FGFR3*-Gens. Sie schloss in ihre Studie 62 Proben von SK sowie 33 Proben von epidermalen Naevi ein. 16% der histologisch gesicherten SK wiesen Punktmutationen (E542K, E545K und H1047R) im *PIK3CA*-Gen auf. Onkogene Mutationen im *FGFR3*-Gen wurden in 31% der untersuchten SK nachgewiesen; drei SK zeigten gleichzeitig Aberrationen in *PIK3CA* und *FGFR3*. Interessanterweise lagen diese Mutationen innerhalb der helikalen Domäne des *PIK3CA*-Gens. Die onkogenen Mutationen, die bei den malignen Tumoren gefunden worden sind, befanden sich jedoch in der Kinase-Domäne.

Ein wichtiger Durchbruch gelang in einer weiteren experimentellen Studie von Hafner et al (Hafner et al 2010b). Sie untersuchte onkogene Mutationen innerhalb der *FGFR3*-, *PIK3CA*-, *KRAS*-, *HRAS*-, *EGFR*-, *AKT1*-, *TSC1*-, *PTPN11*- und *PTEN*-Gene bei 175 SK. Diese Gene nehmen an der Aktivierung der *FGFR3*-RAS-MAPK- sowie PI3K-AKT-mTOR-Signaltransduktionswege teil und wurden bei einer Vielfalt von malignen humanen Tumoren nachgewiesen (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). In ca. 89% der Proben fanden sich multiple onkogene Mutationen, die in den *FGFR3*-, *PIK3CA*-, *KRAS*-, *HRAS*- und *EGFR*-Genen lagen. Sie sind in Tabelle 1 aufgelistet und in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Einige der SK wiesen gleichzeitig zwei onkogene Mutationen auf. Die häufigsten Mutationen bei den SK befanden sich im Bereich des *FGFR3*-Gens (Hafner et al 2006a, Hafner et al 2006c, Hafner et al 2007a, Hafner et al 2007b, Hafner et al 2007c, Hafner et al 2008, Hafner et al 2010a, Hafner et al 2010b). Im Gegensatz zu anderen Tumoren, die diese Mutationen aufwiesen, zeigte diese Studie keine Induktion von Seneszenz und keinen DNA-Schaden in den SK. Sie repräsentieren somit genetisch stabile Läsionen der Haut (Hafner et al 2010b).

Gen	Mutation	Häufigkeit der Mutation in den untersuchten SK-Proben
<i>FGFR3</i>		Insg. 124/175 (71%)
	K652M	39/175 (22%)
	R248C	31/175 (18%)
	K652E	17/175 (10%)
	Y375C	12/175 (7%)
	G372C	10/175 (6%)
	S249C	9/175 (5%)
	S373C	5/175 (3%)
	A393E	3/175 (2%)
<i>PIK3CA</i>		Insg. 80/159 (50%)
	E542K	51/159 (32%)
	E545K	24/159 (15%)
	H1047L	2/159 (1%)
	H1047R	2/159 (1%)
	N345K	1/159 (1%)
<i>AKT1</i>		Insg. 3/173 (2%)
	E17K	3/173 (2%)
	G16G	2/173 (1%)
<i>HRAS</i>		Insg. 5/160 (3%)
	G12D	4/160 (3%)
	Q61K	1/160 (1%)
<i>KRAS</i>		Insg. 12/59 (20%)
	G12D	7/59 (12%)
	G12V	3/59 (5%)
	G12C	2/59 (3%)
<i>EGFR</i>		Insg. 1/14 (7%)
	R108K	1/14 (7%)
<i>PTPN11</i>		Insg. 0/144 (0%)
<i>TSC1</i>		Insg. 1/128 (1%)
	D510H	1/128 (1%)
<i>PTEN</i>		Insg. 0/30 (0%)

Tabelle 1: Überblick der Mutationen innerhalb der *FGFR3*-, *PIK3CA*-, *AKT1*-, *HRAS*-, *KRAS*-, *EGFR*-, *PTPN11*-, *TSC1*- und *PTEN*-Gene in der experimentellen Studie von Hafner et al (Hafner et al 2010b)

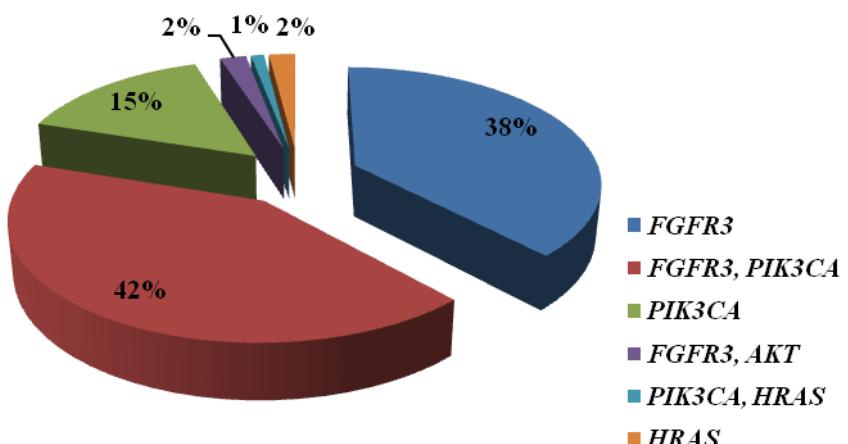


Abbildung 3: Mutationsstatus der seborrhoischen Keratosen gemäß Hafner et al (Hafner et al 2010b)

Wie oben beschrieben, zeigte die Studie von Hafner et al (2010), dass in ca. 89% der SK onkogene Mutationen vorhanden sind. Der Mutationsstatus der restlichen 11% der SK blieb ungewiss (Hafner et al 2010b). Basierend auf diesen Überlegungen haben wir uns in der vorliegenden Arbeit auf Gene konzentriert, die möglicherweise ein neues Spektrum von Mutationen bei den SK eröffnen könnten. *EGFR*-, *RAS*-, *PIK3R1*- und *FGFR2*-Gene stellten solche Genkandidaten dar. Onkogene *EGFR*-, *HRAS*- und *KRAS*-Mutationen wurden schon in früheren Studien beschrieben, diese wurden jedoch nur bei einer begrenzten Anzahl von SK mittels des OncoCarta Panel v1.0 demonstriert (Hafner et al 2010b).

1.3.2.1 Biochemische Eigenschaften und Funktion des *EGFR*-Gens

Der EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), auch synonym als ErbB, HER1, mENA, ErbB1, PIG61 bezeichnet, ist ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Er kommt in multiplen epithelialen Zellen vor. Durch Aktivierung leitet der EGF-Rezeptor extrazelluläre Signale von der Zelloberfläche in das Zellinnere weiter (Abbildung 4). Er kontrolliert eine Vielzahl an Proteinen, die zahlreiche Enzyme aktivieren. Diese steuern weiterhin die Interaktion zwischen den Molekülen. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch Andocken eines spezifischen Liganden wie z.B. des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an der extrazellulären Domäne des Proteins. Dadurch kommt es zur Rezeptordimerisierung sowie zur konstitutiven Autophosphorylierung der EGFR-Tyrosinkinase, was in einer erhöhten Zellproliferation, -differenzierung, -migration und verminderter Apoptose resultiert (Schlessinger 2004, Tapia et al 2009). Durch negative Rückkopplungsmechanismen wird die aktivierte Form des EGFR in normalen Zellen wieder schnell inaktiviert. Eine Überexpression dieses Rezeptors sowie eine dauerhafte Aktivierung der Tyrosinkinase z.B. durch onkogene Mutationen können zu Änderungen des Gleichgewichts der zellulären Prozesse führen, die eine maligne Zelltransformation begünstigen können (Pines et al 2010).

Viele experimentelle Studien demonstrierten, dass Mutationen innerhalb des *EGFR*-Gens in die Entwicklung und Progression von multiplen humanen Tumoren wie z.B. dem Mammakarzinom (Teng et al 2011), dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Kato et al 2010, Tapia et al 2009), dem Glioblastom (Lee et al 2006), dem kolorektalen Karzinom (Lankiewicz et al 2008), dem hepatzellulären Karzinom (Wang et al 2009), dem Prostatakarzinom (Peraldo-Neia et al 2011), dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom (Lee et al 2007) und anderen Neoplasien (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) involviert sind. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien und der Cosmic Database

stellen die Missense-Punktmutationen mit 48,9% die häufigsten genetischen Alterationen innerhalb des *EGFR*-Gens dar, gefolgt von in-frame-Deletionen (40%) und Komplex-Mutationen (6,5%). Die Nukleotid-Veränderungen sind v.a. innerhalb der Exons 3, 18, 19, 20 und 21 lokalisiert. Bei den SK der vorliegenden Arbeit analysierten wir daher mögliche Mutationen im Bereich der Exons 3, 18, 19 und 21 des *EGFR*-Gens.

1.3.2.2 Biochemische Eigenschaften und Funktion der RAS-Genfamilie

Die *RAS*-Gene sind gut erforschte Tumor-assoziierte Proto-Onkogene, die durch ihre Aktivierung eine entscheidende Rolle in den RAS/MAPK- (Mitogen activated protein kinase) Signaltransduktionswegen spielen. Dadurch kontrollieren sie signifikante Zellprozesse wie Zellproliferation, -differenzierung, Aufbau des Zytoskeletts, Zellmigration, Exo- und Endozytose sowie Apoptose (Barbacid 1987, Malumbres und Barbacid 2003). Die *RAS*-Genfamilie wird durch ihre drei Hauptvertreter *HRAS* [Harvey-RAS, (Harvey 1964)], *KRAS* [Kirsten-RAS, (Kirsten und Mayer 1967)] und *NRAS* [im humanen Neuroblastom identifiziert, (Shimizu et al 1983)] gekennzeichnet, die für die an der Innenseite der Zellmembran liegenden RAS-Proteine (*HRAS*, *NRAS* und *KRAS*) kodieren. Sie binden an Guanin-Nukleotide und besitzen eine intrinsische GTPase-Aktivität. Durch Bindung von spezifischen Liganden an die membranständigen Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (z.B. EGFR, FGFR) wird eine Signalkaskade in der Zelle ausgelöst (Abbildung 4), die dazu führt, dass die RAS-Proteine von ihrer GDP-bindenden Form in ihre aktive GTP-Form überführt werden. Diese Umwandlung ermöglicht das Weiterleiten von Signalen in das Zellinnere. Eine vollständige Inaktivierung von RAS wird durch Rückkopplungsmechanismen, also durch verstärkende Adaptermoleküle (GTPase aktivierende Proteine; GAP), ermöglicht. Onkogene Mutationen innerhalb der *RAS*-Genfamilie können durch Überexpression oder sogar durch funktionelle langfristige Aktivierung der RAS-Proteine an der Entwicklung und Progression von multiplen humanen Tumoren beteiligt sein. Onkogene *HRAS*-, *KRAS*- sowie *NRAS*-Mutationen führen häufig zu erhöhter Mitogenesis (Caldas und Kern 1995, Chen et al 2011, Kim et al 2000, Kompier et al 2010, Krypuy et al 2006, Milasin et al 1993, Newell et al 2009). Basierend auf diesen Überlegungen wurden zahlreiche experimentelle Studien durchgeführt. Zu den am häufigsten identifizierten Mutationen gehören die Substitution-Missense-Mutationen mit 98,9% innerhalb des *HRAS*-Gens, 99,8% innerhalb des *KRAS*-Gens und mit 99,5% aller Mutationen, die bei dem *NRAS*-Gen beschrieben wurden (Cosmic Database). Die onkogenen Mutationen liegen in den Codons 12, 13 und 61 des jeweiligen Gens. Sie wurden in zahlreichen humanen Tumorgeweben wie dem duktalen Adenokarzinom

des Pankreas (Caldas und Kern 1995), Magenkarzinom (Chen et al 2011), Kolonkarzinom, Gallenblasenkarzinom (Kim et al 2000), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Krypuy et al 2006), hepatzellulären Karzinom (Newell et al 2009), Harnblasenkarzinom (Kompier et al 2010), Basalzellkarzinom, spinozellulären Karzinom (Daya-Grosjean et al 1993) und anderen Neoplasien demonstriert. Jedoch nur wenige Studien haben onkogene Mutationen im Bereich der *RAS*-Genfamilie bei benignen humanen Tumoren erforscht. Onkogene Mutationen wurden bei den Spitz Naevi, den atypischen spitzoiden Tumoren (Da Forno et al 2009, Indsto et al 2007, van Engen-van Grunsven et al 2010), dem Keratoakanthom (Corominas et al 1989) und beim Naevus sebaceus (Groesser et al 2012b) identifiziert. Derzeit sind fünf verschiedene *RAS*-Mutationen (*HRAS* G12D, *HRAS* Q61K, *KRAS* G12D, *KRAS* G12V und *KRAS* G12C) bei den SK nachgewiesen (Hafner et al 2010b).

1.3.2.3 Biochemische Eigenschaften und Funktion des *PIK3R1*-Gens

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt: die *PIK3CA*-Untereinheit kodiert für die katalytische Untereinheit p110, die *PIK3R1*-Untereinheit für die regulatorische Untereinheit p85 α der Klasse-1-Phosphatidylinositol-3-Kinase. PI3K ist an einer Vielzahl von zellulären Schlüsselfunktionen wie dem Zellwachstum, dem Überleben, der Zellproliferation, der Proteinsynthese, der Migration, der Zelldifferenzierung, der Zelladhäsion, der Mitose und der Apoptose beteiligt (Roymans und Slegers 2001). Frühere Studien haben gezeigt, dass onkogene *PIK3CA*-Mutationen in bis zu 50% der SK vorkommen (Hafner et al 2007d, Hafner et al 2010b). Onkogene Gain-of-function-*PIK3R1*-Mutationen wurden in verschiedenen malignen Tumoren, wie dem Urothelkarzinom (Sjodahl et al 2011), dem Ovarialkarzinom, dem Kolonkarzinom (Philp et al 2001), dem Glioblastom (Network 2008) u.a. demonstriert. *PIK3R1* wurde jedoch noch nicht bei der SK erforscht.

1.3.2.4 Biochemische Eigenschaften und Funktion des *FGFR2*-Gens

Da 65% der molekularen Struktur vom FGFR2 (auch als Keratinozyten Wachstumsfaktor Rezeptor, KGFR bezeichnet) der vom FGFR3 homolog ist (Zhang et al 1999), beschäftigte sich die vorliegende Arbeit auch mit der Suche nach onkogenen Mutationen in den Exons 7, 9, 12 und 14 des *FGFR2*-Gens. Diese entsprechen den Exons 7, 10 und 15 des *FGFR3*-Gens, in denen multiple Mutationen bei den SK durch frühere Studien nachgewiesen worden sind (Hafner et al 2006a, Hafner et al 2006c, Hafner et al 2007a, Hafner et al 2007b, Hafner et al 2007c, Hafner et al 2008, Hafner und Hartmann 2010, Hafner et al 2010b).

FGFR2 setzt sich aus mindestens 22 Exons und 21 Introns zusammen (Ingersoll et al 2001). *FGFR2* stellt somit das Gen mit der größten genomischen Struktur in der *FGFR*-Genfamilie (*FGFR1-FGFR4*) dar. Es ist auf Chromosom 10 lokalisiert und kodiert für einen membranständigen Rezeptor (*FGFR2*). Der *FGFR2* besteht aus einer extrazellulären, liganden-bindenden Domäne, einer Transmembrandomäne zur Plasmamembranlokalisierung bzw. -verankerung und einer zytoplasmatischen Domäne, die Kinaseaktivität besitzt. Die extrazelluläre liganden-bindende Domäne setzt sich aus drei Immunglobulin (Ig)-like-Domänen (D1-D3) zusammen. Bei Aktivierung durch Bindung von FGFs, Heparin oder Heparan Sulfat Proteoglycan (HSPG) dimerisiert der *FGFR2* an seiner extrazellulären Domäne, dadurch aktiviert er durch Phosphorylierung intrazellulär die Proteine ShC, Phospholipase-C γ , STAT1, Gab1 und FRS2 α (Abbildung 4). Die andockenden Proteine FRS2 α und FRS2 β regulieren weiterhin die RAS-MAPK- und PI3K-AKT-Signaltransduktionswege (Eswarakumar et al 2005). Auf diese Weise kontrolliert *FGFR2* wichtige Zellfunktionen wie Zellproliferation, -differenzierung, -migration und -überleben (Belleudi et al 2011, Eswarakumar et al 2005, Schlessinger 2004). Rückkopplungsmechanismen inaktivieren den Rezeptor.

Ähnlich wie bei *FGFR3* wurden verschiedene *FGFR2*-Isoformen beschrieben. Sie entstehen durch alternatives Spleißen des *FGFR2*-Transkripts. Die C-terminal exprimierten Exons 8 und 9 des *FGFR2*-Gens kodieren für die Hälfte der IgIII-like Domäne und können innerhalb des Gens unterschiedlich verknüpft werden (Eswarakumar et al 2005). Es bilden sich zwei Isoformen: die *FGFR2* IIIb- und die *FGFR2* IIIc-Isoform. Die *FGFR2* IIIb-Isoform wird vor allem im epithelialen Gewebe exprimiert und hat eine typische Affinität zu FGF (Fibroblast Wachstumsfaktor) -1, -3, -7, -10 und -22. Die *FGFR2* IIIc-Isoform wird dagegen im mesenchymalen Gewebe exprimiert. Sie zeigt eine spezifische Affinität zu FGF-1, -2, -4, -6, -9, -17 und -18 (Eswarakumar et al 2005). Die in dieser Studie verwendeten Codons von *FGFR2* wurden nach dem offenen Leseraster (engl. „open reading frame“) der *FGFR2* IIIb-Isoform nummeriert. *FGFR2*-Mutationen wurden in einer Vielzahl von malignen Tumoren demonstriert: Endometriumkarzinom, Zervixkarzinom (Dutt et al 2008, Pollock et al 2007), Lungenkarzinom (Dutt et al 2008, Marks et al 2007), Magen-, Kolonkarzinom (Jang et al 2001) und malignes Melanom (Gartside et al 2009). Sie wurden auch bei Patienten mit Kraniosynostose-Syndromen wie Crouzon- (de Ravel et al 2005, Gorry et al 1995, Rutland et al 1995), Jackson-Weiss- (Jabs et al 1994, Park et al 1995), Pfeiffer- (Meyers et al 1996, Rutland et al 1995), Apert- (Wilkie et al 1995) und Beare-Stevenson-Syndrom (Passos-Bueno et al 1999, Przylepa et al 1996) beschrieben. Die identifizierten onkogenen *FGFR2*-

Mutationen wurden vor allem in der extrazellulären Region nachgewiesen, die zum Andocken des Liganden sowie zur Aktivierung des FGFR2 beiträgt (Ingersoll et al 2001, Pollock et al 2007).

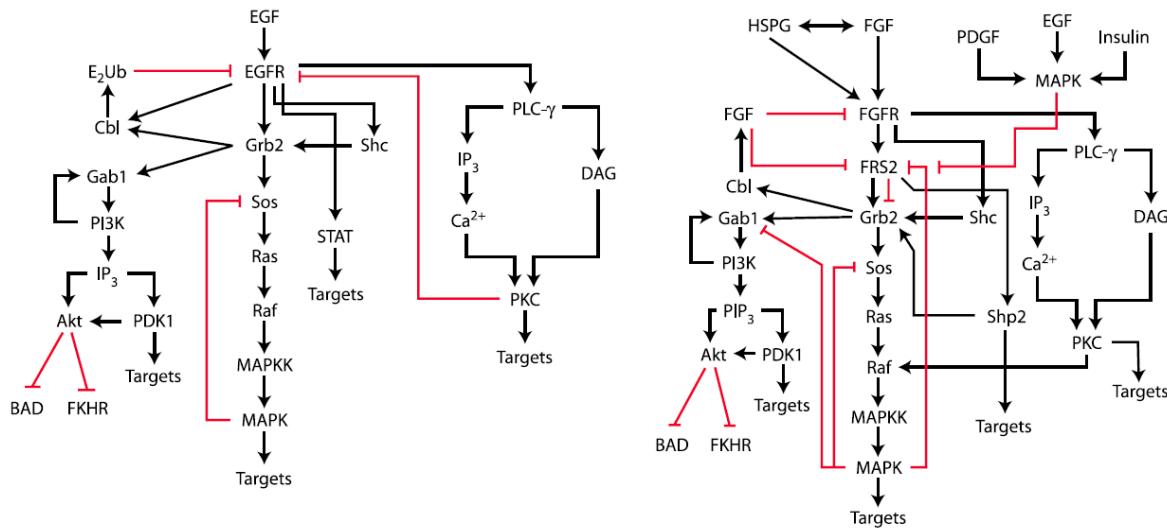


Abbildung 4: Signaltransduktionswege der EGF- und FGF-Rezeptoren nach Schlessinger (Schlessinger 2004)

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Signaltransduktionswege, die die EGF- und FGF-Rezeptoren in der Zelle steuern. Die schwarzen Pfeilen stellen die stimulierenden, die roten die inhibierenden Signaltransduktionswege dar.

Die bisherigen Studien lieferten signifikante Informationen über die SK auf molekularer Ebene. Die Frage, wieso diese Hauttumoren trotz des Vorhandenseins von onkogenen Mutationen nicht entarten, bleibt jedoch noch offen.

1.4 Diagnostik

Die Diagnostik der SK erfolgt in der Regel klinisch durch Inspektion und Dermatoskopie, im Zweifelsfall durch die Histopathologie. Sie ergibt sich aus dem typischen klinischen Aspekt, aus der Lokalisation sowie aus dem klinischen Verlauf der Hauttumoren.

1.4.1 Inspektion

Bei der Inspektion fallen die ersten typischen Kriterien der SK auf: sie sind fettig und fühlen sich weich an. Ihre Oberfläche ist zerklüftet und von Hornperlen durchgesetzt (Abbildung 1 a)). Sie sind breitbasig aufsitzende, flache oder erhabene, scharf abgegrenzte, hell- bis dunkelbraun pigmentierte, epidermale Hauttumoren. Häufig liegen sie an den chronisch sonnenexponierten Hautarealen. Handflächen und Fußsohlen sind ausgespart.

Auflichtmikroskopisch sind sowohl Primär- als auch Sekundärkriterien bei den SK erkennbar (Tabelle 2).

Differentialdiagnostische Kriterien

Primärkriterien

- multiple Pseudohornzysten
- comedoartige pseudofollikuläre Öffnungen
- Gyrus- und Sulcus-Muster
- fingerabdruckartige Struktur
- mottenfraßartige Begrenzung
- Gelee-Zeichen
- Wobble-Zeichen III (Braun et al 2000)

Sekundärkriterien

- Teleangiektasien
- baumartig verzweigte Gefäße unterschiedlichen Durchmessers
- großflächige weißlich-gelbliche Areale
- opake gelbbraune bis graubraune Farbtöne
- traubenartige Muster bei flachen SK
- vereinzelt vorkommende echte verzweigte Streifen
- evtl. Schollen, Punkte, anuläre Strukturen

Tabelle 2: Auflichtmikroskopische differentialdiagnostische Kriterien der seborrhoischen Keratose

Unter dem Begriff Primärkriterien versteht man Merkmale, deren Nachweis beweisend für die Diagnose ist. Sind die Primärkriterien nur diskret vorhanden, können die Sekundärkriterien hilfreich sein. Bei den Sekundärkriterien handelt es sich um Merkmale, die bei der Diagnosestellung wichtig sind, aber nicht eindeutig einer bestimmten Hautveränderung zuzuordnen sind (Stolz et al 2004b, Stolz 2005).

1.4.2 Histopathologie

Die histopathologische Untersuchung einer SK zeigt oft Akanthose, verursacht durch Proliferation von squamösen und basaloiden Zellen, begleitet von Hyperkeratose und Hornzysten in der Epidermis. Die SK ist zumeist durch ein exophytisches Wachstum charakterisiert, man kann aber auch eine endophytische Wachstumstendenz beobachten. Es kommen keine Kern- oder Zellatypien vor. Histologisch werden folgende Formen und Varianten der SK unterschieden (Tabelle 3) (Hafner und Vogt 2008, Mishima und Pinkus 1960, Tilgen 2005):

Histologischer Subtyp	Merkmale
1. Akanthotische seborrhoische Keratose	häufigster histologischer Subtyp; oft exophytischer Tumor mit flacher Basis und stark ausgeprägter, breiter Akanthose von basaloiden Zellen der Epidermis; gleichmäßiger epidermaler Zellrasen; Papillomatose; Hyperkeratose; vermehrtes Vorkommen von Melanozyten; Hyperpigmentierung möglich; Ausbildung von multiplen Horn- und Pseudohornzysten; geringe Oberflächenverhornung.
2. Hyperkeratotische seborrhoische Keratose	ausgeprägte papillomatöse Epithelproliferation und mächtige Orthohyperkeratose mit kirchturmartigen zipfligen Ausziehungen des akanthotischen und hyperkeratotischen Plattenepithels; spärlich gebildete Akanthose; Pseudohornzysten vorhanden.
3. Adenoide seborrhoische Keratose	netzige Akanthose bei mäßiger oder geringer Hyperkeratose und Papillomatose; vernetzte Epithelstränge in der Dermis; basaloide Zelldifferenzierung; Hyperpigmentierung des Tumorparenchyms mit Akzentuierung der dermoepidermalen Junktionszone möglich; oft lympho-histiozytäres Infiltrat in der Dermis; selten Horn- und Pseudohornzysten vorhanden.
4. Klonale seborrhoische Keratose	hyperplastische Epidermis mit umschriebenen Epithelnestern aus basaloiden oder blassen größeren Zellen (Borst-Jadassohn-Phänomen).
5. Bowenoide seborrhoische Keratose	intraepidermale Zelltypien, v.a. an den sonnenexponierten Körperarealen.
6. Irritierte seborrhoische Keratose	akanthotische Verbreiterung der Epidermis; ausgeprägtes bandförmiges Entzündungsinfiltrat; „squamous eddies“ (umschriebene Wirbelbildungen von eosinophilen Plattenepithelzellen).
7. Melanoakanthom	sehr stark pigmentierte, langsam wachsende akanthotische SK; vermehrtes Vorkommen von Melanozyten; Proliferation basaloider Epithelzellen.

Tabelle 3: Histologische Klassifikation der seborrhoischen Keratose

1.5 Differentialdiagnose

Gelegentlich sind die SK aufgrund ihrer Form, unterschiedlichen Ausprägung von Größe, Tiefenausdehnung und Farbe sowie ihren sekundären Veränderungen wie Nässen, Erosion, Ulzeration oder Krustenauflagerung klinisch schwer von anderen gut- oder bösartigen Hauttumoren zu unterscheiden (Abbildung 5). Aufgrund dieser morphologischen Vielfalt erfordern einige Sonderformen die histopathologische Untersuchung zur klaren Differenzierung.

In der initialen Entwicklungsphase kann die Unterscheidung von einer SK (Abbildung 5) und einem dermalen melanozytären Naevus schwierig sein. Die Dermatoskopie sollte in allen Zweifelsfällen angewandt werden. Eine hypopigmentierte verruköse SK kann anfänglich klinisch einer Verruca vulgaris oder einer Verruca plana sehr ähnlich sein. Eine flache hyperpigmentierte SK auf sonnengeschädigter Haut ist von einer Lentigo senilis (Altersflecken) abzugrenzen. Differentialdiagnostisch müssen besonders eine invertierte follikuläre Keratose oder ein Klarzellakanthom bedacht werden. An den lichtexponierten Hautarealen ist der Morbus Bowen als Differentialdiagnose weiterhin zu erwägen. Kommt eine SK im Bereich der Brustwarze oder des Warzenhofes vor, ist sie oft schwer vom Morbus Paget unterscheidbar. Ebenso abzugrenzen ist die SK in ihrem flachen Entwicklungsstadium von dem initialen verrukösen oder polypoiden superfiziell spreitenden malignen Melanom sowie von der Lentigo maligna. Bei Irritationen oder Vorhandensein von Krustenauflagerungen können die SK klinisch einem (pigmentierten) Basalzellkarzinom ähnlich sein. Eine hyperkeratotische SK kann manchmal von einer aktinischen Keratose sehr schwer abgrenzbar sein. Entscheidend sind der dermatoskopische und der histologische Befund.

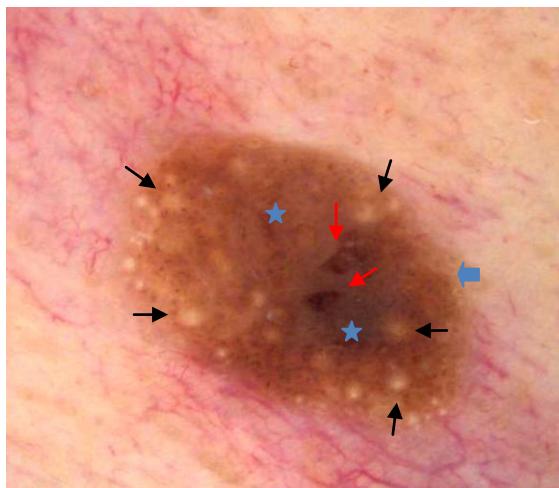


Abbildung 5. Dermatoskopisches Bild einer pigmentierten seborrhoischen Keratose

Bei dermatoskopischer Betrachtung sind die typischen weißlich-gelblichen (Pseudo-)Hornzysten (→), die in gelbbraunen bis graubraunen opaken Farbtönen erscheinenden pseudofollikulären Öffnungen (→) sowie die zahlreichen hyperkeratotischen Areale (★) sichtbar, welche die SK kennzeichnen (Stolz et al 2004a). In der Peripherie sind eine fingerabdruckartige Struktur sowie eine mottenfraßartige Begrenzung (→) zu erkennen. Die Hauttumoren sind scharf begrenzt; es besteht eine Symmetrie bzgl. Farbe, Struktur und Farbton. Pigmentnetz, aggregierte Schollen und verzweigte Streifen fehlen.

1.6 Therapie und Prognose

Die SK stellen in der Regel asymptomatische, harmlose Hauttumoren ohne malignes Potential dar. Aus diesem Grund ist eine Therapie bei diesen benignen Hauttumoren nicht zwingend erforderlich. Sie können aber in einzelnen Fällen in großer Anzahl auftreten und auf diese Weise kosmetisch störend wirken. Sie können die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigen. Dadurch ergibt sich der Wunsch der Patienten, diese Hautveränderungen zu entfernen. Ein anderer wichtiger Grund für einen therapeutischen Eingriff ist eine ungünstige Lage. Manche SK werden ständig mechanisch entweder durch die Kleidung oder durch andere Gegenstände, die in Kontakt mit dem Körper kommen, gereizt. Chronisch-mechanische Reizungen können zu Hautirritationen führen, die sich im Verlauf in kleine Blutungen, lokale Infektionen, Krustenauflagerungen oder Wachstumszunahme dieser Hauttumoren weiterentwickeln können.

Die SK können sehr selten aber auch durch ihre Anzahl, Größe und Wachstumszunahme im Bereich des Ohres oder der Augenlider das Hörvermögen oder sogar das Sehvermögen beeinträchtigen. In diesem Fall ist eine operative Exzision zu empfehlen.

Bei Verdacht auf Leser-Trélat-Syndrom sollte eine orientierende Tumorsuche mittels Röntgenuntersuchung des Thorax, Oberbauchsonographie oder bestimmter Tumormarker erfolgen.

Die Therapie der SK besteht in der operativen Entfernung. Sie können durch folgende Verfahren behandelt werden: durch Kürettage (oberflächliche Gewebeabtragung) in Lokalanästhesie mit Hilfe einer scharfen Kürette oder eines scharfen Löffels, durch Shave-Exzision oder durch Laserabtragung in Vereisung oder Lokalanästhesie (Erbium-Yag-Laser, CO₂-Laser). Bei der oberflächlichen Gewebeabtragung ist die Wundheilung in der Regel narbenfrei. Alternativ ist eine Kryotherapie oder Schälbehandlung (Peeling) mit Trichloressigsäure oder entsprechend konzentrierten Fruchtsäuren möglich.

2 Zielsetzung und Fragestellung der experimentellen Arbeit

Die SK sind weit verbreitete epidermale Hauttumoren, die in der Regel keine Tendenz zur malignen Entartung zeigen. Ihre Prävalenz ist sehr hoch in der hellhäutigen Bevölkerung. Trotz ihrer Häufigkeit und Benignität liegen viele Aspekte im Bereich der Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese noch im Dunkeln.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, weitere Genmutationen bei der SK zu identifizieren.

3 Material und Methoden

Die folgenden Kapitel beschreiben den Ablauf der experimentellen Studie sowie die dazu verwendeten Materialien und Methoden.

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Elektrophoreseapparaturen	
Flachbettkammern für Agarosegele	BioRad, München
Gel-Elektrophoreseapparatur DNA SUB CELL™	BioRad, München
Gel-Elektrophoreseapparatur MINI SUB™ DNA CELL	BioRad, München
Geltrockner Modell 583	BioRad, München
Spannungsgenerator für die Elektrophoresekammern	BioRad, München
Power Pac 3000 Power Supply	
Zentrifugen	
Allegra® X-15R Zentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, California, USA
Fisherbrand® Mikrozentrifuge	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Mikrozentrifuge Mikro 22	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mini spin	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Sonstige Geräte

ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, CA, USA
ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Digitaldrucker P95DE	Mitsubishi, Ratingen
Elektronischer manueller Mehrfachdispenser	Brand, Wertheim
Handy Step®	
Finnpepette Digital 4500 Single Channel Mikropipette 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Thermo Labsystems, CA, USA
Finnpipette F1 Einkanalpipette 10 – 100 µl	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Finnpipette Model 4510 Multichannel Digital Pipette 0,5 – 10 µl, 0,2 – 2,0 µl	Thermo Labsystems, CA, USA
Focus Single Channel Digital Pipette	Thermo Labsystems, CA, USA
Gefriermikrotom HM 500 OM	MICROM International GmbH, Walldorf
Mikrowelle Privileg 8520	Gustav Schickedanz KG, Fürth
Multipipette® plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen
Peltier Thermal Cycler	BioRad, München
Pipetten Pipetman 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipetten Research 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette Reference 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettus Easypet	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät	VWR International™, Darmstadt
Schüttler Reax 2000	Heidolph, München
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ	Watertown, Massachusetts, USA
Research	
Thermomixer compact	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
VisiDoc-It™ mit Reproständer	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg
Waage MC1, Laboratory LC 6200 D	Sartorius, Göttingen

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
16-Kapillar Arrays	Applied Biosystems, CA, USA
96-Well Septamatten	Applied Biosystems, CA, USA
Deckgläser	Carl Roth GmbH Co. & KG, Karlsruhe
Envi-Ro-Tech Freezer Spray	Thermo Scientific Shandon, Pittsburgh, PA, USA
MicroAmp® Optical 96-Well Reaktionsplatte	Applied Biosystems, CA, USA
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger Superfrost	Vogel Medizinische Technik, Gießen
Parafilm „M“ Laboratory Film	Pechiney Plastic Packing, Menasha, USA
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos	BIOZYM, Oldenburg
Pipettenspitzen 10, 20, 200, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Combitips® plus, Biopur®	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen PLASTIBRAND®	Brand®, Wertheim
Pipettenspitzen SafeSeal-Tips® Premium 10, 20, 100, 200, 1000 µl	BIOZYM, Oldenburg
PP-Test Röhrchen 50 ml, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,6, 1,6 ml	BIOZYM, Oldenburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 1,7 ml Costar®	Costar, New York, USA

3.1.3 Chemikalien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Bromphenolblau	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
dNTP Set	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll Typ 400	Pharmacia, Freiburg
Hi-Di™ Formamide (deionized Formamide)	Applied Biosystems, California, USA
POP-7™ polymer	Applied Biosystems, California, USA
Primersequenzen zur Amplifikation ausgewählter <i>EGFR</i> -Genfragmente	Metabion GmbH, Martinstryed
Primersequenzen zur Amplifikation ausgewählter <i>FGFR2</i> -Genfragmente	Apara-Bioscience GmbH, Denzlingen
Primersequenzen zur Amplifikation ausgewählter <i>PIK3R1</i> -Genfragmente	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Primersequenzen zur Amplifikation ausgewählter <i>RAS</i> -Genfragmente	Metabion GmbH, Martinstryed
Red gel, fluorescent nucleic acid gel stain	Biotium Inc., Hayward, California, USA
TrackIt™ 100 bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
Trizma® hydrochloride (Tris/HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
UltraPure™ Agarose	Invitrogen, USA
Wasser für die Chromatographie LiChrosolv®	Merck KGaA, Darmstadt
Wasser für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH Co. & KG, Karlsruhe
Wasserfilteranlage MILLIPORE	Millipore, Eschborn

3.1.4 Enzyme

Enzyme	Hersteller
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
Exonuclease I (10 U/µl)	USB Corp., Ohio, USA
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)	Promega Corp., USA
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Shrimp Alkalische Phosphatase (1 U/µl)	USB Corp., Ohio, USA
Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

3.1.5 Puffer und Lösungen

Die in dieser Studie verwendeten Puffer wurden mit destilliertem Wasser angesetzt. Mit „x“ bezeichnet man die „fache“ Konzentration der Stammlösung, aus welcher verdünnt wird.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Allgemeine Lösungen	
EDTA (0,5 M, pH 8,0):	<p>73,1 g Ethyldiamintetraacetat 800 ml H₂O röhren, mit NaOH auf pH 8,0 einstellen, mit H₂O auf 1000 ml auffüllen. Lagerung: bei Raumtemperatur.</p>
Lösungen für die DNA-Amplifikation	
dNTP-Mix (1000 µl, 10 mM):	<p>100 µl 100 mM dATP 100 µl 100 mM dCTP 100 µl 100 mM dTTP 100 µl 100 mM dGTP 600 µl nukleasefreies H₂O Lagerung: bei -20°C.</p>

Lösungen und Puffer für die Agarose-Elekrophorese:

50x TAE-Puffer:	242,0 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 100,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml dH ₂ O Aliquotieren, Autoklavieren. Lagerung: bei Raumtemperatur.
1x TAE-Puffer:	10 ml 50x TAE-Puffer ad 500 ml dH ₂ O Lagerung: bei Raumtemperatur.
Agarosegel (2%):	2 g Agarose ad 100 ml 1x TAE-Puffer
Stoppuffer:	0,75 g Ficoll (Typ 400) 60 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) 0,0125 g Bromphenolblau ad 5 ml H ₂ O Lagerung: bei 4°C.
Ethidiumbromidlösung (0,04%):	125 µl Ethidiumbromid ad 500 ml H ₂ O Lagerung: bei Raumtemperatur.
GelRed ^(TM)	gebrauchsfertig Lagerung: bei 4°C.

3.1.6 DNA-Präparation und DNA-Modifikation

3.1.6.1 DNA-Isolation aus frisch-gefrorenen Proben

Testkit

Hersteller

QIAamp® DNA Mini Kit für die DNA-Isolation aus frisch-gefrorenen SK-Präparaten Qiagen, Hilden

enthält:

- QIAGEN® - Protease
- Proteinase K
- Puffer: AL, ATL, AE, AW1 (konzentriert) und AW2 (konzentriert)
- QIAamp Mini Spin Säulen
- 2 ml Sammelgefäß

Vorbereitung vor Anwendung:

- AW1-Puffer für die DNA-Isolation:

19 ml AW1-Puffer-Stammlösung

25 ml Ethanol (96-100%)

Lagerung: bei Raumtemperatur (15-25°C).

- AW2-Puffer für die DNA-Isolation:

13 ml AW2-Puffer-Stammlösung

30 ml Ethanol (96-100%)

Lagerung: bei Raumtemperatur (15-25°C).

- Puffer: AL, ATL, AE

Gebrauchsfertig.

Lagerung: bei Raumtemperatur (15-25°C).

3.1.6.2 Aufreinigung der DNA-Proben

Testkit

Hersteller

**QIAquick® PCR-Purification Kit nach der DNA-
Amplifikation**

Qiagen, Hilden

enthält:

- Puffer: PB, PE (konzentriert), EB
- Loading Dye
- pH-Indikator I
- QIAquick Spin Säulen
- 2 ml Sammelgefäß

Vorbereitung vor Anwendung:

- PE-Waschpuffer:

55 ml PE-Puffer-Stammlösung

220 ml Ethanol (96-100%)

Lagerung: bei Raumtemperatur (15-25°C).

- Puffer: PB, EB

Gebrauchsfertig.

Lagerung: bei Raumtemperatur (15-25°C).

**Dye Ex® 2.0 Spin Kit für Reinigung von DNA-Proben
zur Sequenzierung**

Qiagen, Hilden

enthält:

- DyeEx™ 2.0 Spin Säulen mit Gel-Filtration
- 2 ml Sammelgefäß

Gebrauchsfertig.

Lagerung: bei Raumtemperatur.

3.1.6.3 RAS SNaPShot® Multiplex Assay

Testkit

**ABI PRISM® SNaPShot® Multiplex Kit für die
Amplifikation von RAS-Genloci**

Hersteller

Applied Biosystems,
California, USA

enthält:

SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix bestehend aus:

- AmpliTaq® DNA Polymerase, FS, gebrauchsfertig
- fluoreszenzmarkierte ddNTPs
- Reaction buffer

SNaPshot® Multiplex Control Primer-Mix (30 µl total)

bestehend aus:

- 20A primer (0,05 pmol/µl)
- 28G/A primer (0,10 pmol/µl)
- 36G primer (0,05 pmol/µl)
- 44T primer (0,30 pmol/µl)
- 52C/T primer (0,30 pmol/µl)
- 60C primer (0,30 pmol/µl)

SNaPshot® Multiplex Control Template (60 µl total) enthält:

- Amplicon von CEPH DNA

Lagerung: zwischen -15 und -20°C in Gefrierfach mit konstanter Temperatur.

3.1.6.4 Sequenzierung

Testkit

Hersteller

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

Applied Biosystems

California, USA

enthält:

- BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5x)
- Terminator Ready Reaction Mix
- pGEM®-3Zf(+) double-stranded DNA Control Template
- -21 M13 Control Primer (forward)

Lagerung: bei Temperaturen zwischen -15 und -25°C.

Hinweis: den BigDye Sequencing-Puffer bei 4°C lagern.

Weitere Lösungen für die Sequenzierung am ABI Prism®

Genetic Analyzer

GeneScan™-120 LIZ™ size standard

Applied Biosystems

Lagerung: bei Temperaturen zwischen 2 und 8°C.

Hi-Di™ Formamide

Applied Biosystems

Lagerung: bei Temperaturen zwischen -15 und -25°C.

3.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelistet.

3.1.7.1 Primersequenzen für die Analyse von *EGFR*, *PIK3R1* und *FGFR2*

Primer	Primersequenz (5'>3') fwd	Länge (bp)	Primersequenz (3'>5') rev	Länge (bp)	Konzentration in der Reaktion (μM)	Ann.
<i>EGFR</i>-Primer						
Exon 3	ATGTCCTCATTGCCCTAAC	20	AGCTCCTTCAGTCCGGTTT	20	0,4	60°C
Exon 18	Outer Primer GCATGGTGAGGGCTGAGGTGA	21	Outer Primer CCCCACCAGACCATGAGAGGC	21	0,4	58°C
Exon 18	Inner Primer ACCCTTGTCTCTGTGTTCTTGT CCC	25	Inner Primer GCCAGCCCAGAGGCCTGTG	20	0,4	52°C
Exon 19	Outer Primer TGCCAGTTAACGTCTTCCTTC	21	Outer Primer CCACACAGCAAAGCAGAAC	20	0,4	60°C
Exon 19	Inner Primer AACGTCTTCCTCTCTCTG	21	Inner Primer CCACACAGCAAAGCAGAAC	20	0,4	60°C
Exon 21	Outer Primer AGCTTCTCCCATGATGATCT GTCC	25	Outer Primer GGCAGCCTGGTCCCTGGTGC	21	0,4	60°C
Exon 21	Inner Primer TCCCCATGATGATCTGTCCCTC ACA	24	Inner Primer CAGGAAAATGCTGGCTGACCTA AAG	25	0,4	60°C
<i>PIK3R1</i>-Primer						
Exon 9	GGGTTTGGGCTGATATTAAA	21	TGTCTAACATCGTAAGTGGAT AATTG	27	0,2	55°C
Exon 10	TTTGATTAAATACCTTATCCAT TGAA	26	CCCCACCTCATTCTGTAAAAA	20	0,2	55°C
Exon 12	TACCCAGATAATAACAAATAC GTTTC	26	TTCATGTATAGGATTCCATTCA A	24	0,2	55°C
Exon 12/13	CAGTAGAAGAAGATTGGAAG AAGACTTG	28	CTGCTATCACCCTTTAGTAAC TACTTAC	30	0,2	60°C
<i>FGFR2</i>-Primer						
Exon 7	GGTCTCTCATTCTCCCATCCC	21	CCAAACAGGAAATCAAAGAAC	21	0,25	60°C
Exon 7 (Codon 310)	GTGGTCGGAGGAGACGTAGA	20			0,25	60°C
Exon 7 (Codon 252)	TTCAAAGGTGTCAGCCAGCAG	21	CCTTGCAGACAAACTCTACGTCT C	24	0,25	60°C
Exon 9	TGGCCTGCTTATCTGTTCT	20	GGTCATGGGGAGGAGTAA	20	0,25	60°C
Exon 12	GCTGCCCATGAGTTAGAGGA	20	TATTGGGCGAATGCAGTT	20	0,25	60°C
Exon 14	CTTTTGTTCTGGCGGTGTT	20	CCACTGTGTTACTGCCATCG	20	0,25	60°C

Tabelle 4: Verwendete Primerpaare bei der Identifikation der *EGFR*-, *PIK3R1*- und *FGFR2*-Genmutationen der seborrhoischen Keratosen

Die Tabelle beinhaltet die Primersequenz (fwd: vorläufige Primersequenz, rev: rückläufige Primersequenz), die Primerlänge (bp: Basenpaare), die Annealing-Temperatur (Ann.) und die Endkonzentration der Primer in der Reaktion (μM).

3.1.7.2 Primersequenzen für die RAS-Genanalyse

Primer	Primersequenz (5'>3') fwd bzw. (3'>5') rev	Länge (bp)	Konzentration in Reaktion (μ M)	Ann.
Multiplex-PCR-Primer				
HRAS exon 1 fwd	CAGGAGACCCCTGAGGAGG	19	0,6	55°C
HRAS exon 1 rev	TCGTCACAAATGGTTCTG	20	0,6	55°C
HRAS exon 2 fwd	GGAGACGTGCCTGTTGGA	18	0,3	55°C
HRAS exon 2 rev	GGTGGATGTCCTCAAAAGAC	20	0,3	55°C
KRAS exon 1 fwd	GGCCTGCTGAAAATGACTG	19	0,3	55°C
KRAS exon 1 rev	GGTCCTGCACCAGTAATATG	20	0,3	55°C
KRAS exon 2 fwd	CCAGACTGTGTTCTCCCTT	20	0,3	55°C
KRAS exon 2 rev	CACAAAGAAAGCCCTCCCCA	20	0,3	55°C
NRAS exon 1 fwd	GGTGTGAAATGACTGAGTAC	20	0,3	55°C
NRAS exon 1 rev	GGGCCTCACCTCTATGGTG	19	0,3	55°C
NRAS exon 2 fwd	GGTGAAACCTGTTGTTGGA	20	0,3	55°C
NRAS exon 2 rev	ATACACAGAGGAAGCCTTCG	20	0,3	55°C
SNaPshot®-PCR-Primer-Set 1				
HRAS pos 34 fwd	T17 CTGGTGGTGGTGGCGCC	35	0,5	58,5°C
HRAS pos 182 rev	T18 GCATGGCGCTGTACTCCTCC	38	0,15	58,5°C
HRAS pos 35 rev	T31 CGCACTCTGCCACACCG	50	0,7	58,5°C
HRAS pos 181 fwd	T46 CATCCTGGATACCGCCGGC	65	0,7	58,5°C
HRAS pos 37 rev	T55 CAGCGCACTTGCACAC	75	0,7	58,5°C
KRAS pos 34 rev	T25 GGCACACTTGCCTACGCCAC	45	0,5	58,5°C
KRAS pos 181 rev	T41 CTCATTGCACGTACTCCTCTT	63	0,2	58,5°C
KRAS pos 35 fwd	T49 AACTTGTTAGTTGGAGCTG	70	0,2	58,5°C
NRAS pos 182 fwd	T33GACATACTGGATACAGCTGGAC	55	0,5	58,5°C
NRAS pos 34 fwd	T62 CTGGTGGTGGTTGGAGCA	80	0,2	58,5°C
SNaPshot®-PCR-Primer-Set 2				
HRAS pos 183 fwd	T62 CCTGGATACCGCCGGCCA	80	0,3	58,5°C
HRAS pos 38 rev	T64 GTCAGCGCACTTGCACAC	85	0,2	58,5°C
KRAS pos 37 rev	T15 CAAGGCACACTTGCCTACGC	35	0,7	58,5°C
KRAS pos 183 rev	T29 CCTCATTGCACGTACTCCTC	50	0,7	58,5°C
KRAS pos 38 fwd	T33CTGTGGTAGTTGGAGCTGGT	55	0,2	58,5°C
KRAS pos 182 fwd	T56 ATTCTCGACACAGCAGGT	75	0,5	58,5°C
NRAS pos 181 rev	T18 CTCATGGCACTGTACTCTCTT	40	0,2	58,5°C
NRAS pos 37 fwd	T26 GGTGGTGGTTGGAGCAGGT	45	0,2	58,5°C
NRAS pos 183 rev	T38 CTCTCATGGCACTGTACTCTTC	60	0,5	58,5°C
NRAS pos 38 rev	T44 GTCAGTGCCTTCCCAACA	65	0,5	58,5°C
NRAS pos 180 fwd	T49 GGACATACTGGATACAGCTGG	70	0,3	58,5°C
NRAS pos 35 fwd	T71 CTGGTGGTGGTTGGAGCAG	90	0,2	58,5°C

Tabelle 5: Auflistung der in der Multiplex-PCR, SNaPshot®-PCR und bei der Sequenzierung eingesetzten Primer

Aufgeführt sind die vorläufigen (fwd) und rückläufigen (rev) Primer für die jeweiligen Exons, ihre Länge (bp), ihre Endkonzentration in der entsprechenden Reaktion (μ M) und die Annealing-Temperatur (Ann.).

3.1.8 Software und Internet-Ressourcen

Die vorliegende Doktorarbeit wurde mit Microsoft® Office Word 2007 angefertigt. Die Erstellung der Abbildungen und Tabellen erfolgte mit Microsoft® Office Excel 2007, Microsoft® Office Word 2007 oder mit IrfanView-Image Viewer Version 4.33. Die Auswertung der sequenzierten DNA-Proben wurde mit Data Collection Version 4.9 durchgeführt. Das Literatur- und Quellenverzeichnis wurde mit Hilfe des Programms EndNote X5 angefertigt. Außerdem wurden folgende Internet-Ressourcen verwendet:

Cosmic database <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.2 Studiendesign und Patientenkollektiv

Die Patienten rekrutierten sich aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Universitätsklinikum Regensburg. Der Zeitraum für diese experimentelle Studie bezog sich auf die Jahre 2009 – 2011. Vor dem Beginn der Studie wurden die beteiligten dermatologischen Patienten von einem Arzt der Klinik und Poliklinik für Dermatologie ausführlich über den operativen Eingriff und die möglichen Risiken aufgeklärt, anschließend haben sie schriftlich der Teilnahme an der Studie zugestimmt. Die Durchführung dieser Studie erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Regensburg in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki.

In diese Studie sind insgesamt 14 Patienten (6 weibliche und 8 männliche) kaukasischer Herkunft mit multiplen SK eingeschlossen. Die Hauttumoren wurden von einem Arzt der dermatologischen Abteilung mittels scharfem Löffel kürtiert. Die klinisch-pathologischen Merkmale der Patienten und der kürtierten SK sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Hälfte des Materials wurde routinemäßig in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und histopathologisch an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Universitätsklinikum Regensburg untersucht, die andere Hälfte wurde gleich nach der Gewebebegewinnung bei -80°C kryokonserviert. Nach Abschluss der Diagnosestellung wurde DNA mittels Proteinase-K-Verdau isoliert. Von den 79 SK-Proben wurden 58 DNA-Proben ausgesucht, die die beste DNA-Qualität sowie die höchste DNA-Konzentration aufwiesen. Danach erfolgten die Reinigung der DNA-Produkte und die Vorbereitung der Proben zur Sequenzierung.

Probe Nr.	Histopathologischer Subtyp	Lokalisation	EGFR	RAS	PIK3R1	FGFR2
Patient Nr. 1, männlich, Alter des Patienten bei der Kürettage: 44 Jahre alt						
1	Akanthotisches Basalzellakanthom	Schläfe rechts	wt	wt	wt	wt
2	Akanthotisches Basalzellakanthom	parietal rechts	wt	wt	wt	wt
3	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär rechts	wt	wt	wt	wt
4	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rücken lumbal rechts	wt	wt	wt	wt
5	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär links	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 2, männlich, Alter des Patienten bei der Kürettage: 73 Jahre alt						
6	Akanthotisches Basalzellakanthom	Unterbauch rechts	wt	wt	wt	wt
7	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rücken lumbal links	wt	wt	wt	wt
8	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rückenmitte rechts	wt	<i>HRAS c.37G>C</i>	wt	wt
9	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär rechts	wt	wt	wt	wt
10	Akanthotisches Basalzellakanthom	Abdomen mittig	wt	wt	wt	wt
11	Akanthotisches Basalzellakanthom	Schulter links	wt	wt	wt	wt
12	Akanthotisches Basalzellakanthom	Flanke links	wt	wt	wt	wt
13	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rückenmitte links unten	wt	wt	wt	wt
14	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rückenmitte links oben	wt	wt	wt	wt
15	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rückenmitte	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 3, weiblich, Alter der Patientin bei der Kürettage: 67 Jahre alt						
16	Akanthotisches Basalzellakanthom	submammär links lateral	wt	wt	wt	wt
17	Akanthotisches Basalzellakanthom	submammär links medial	wt	wt	wt	wt
18	Akanthotisches Basalzellakanthom	intermammär	wt	<i>HRAS c.37G>C</i>	wt	wt
19	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär rechts	c.2573T>G	wt	wt	wt
Patient Nr. 4, männlich, Alter des Patienten bei der Kürettage: 86 Jahre alt						
20	Akanthotisches Basalzellakanthom	interskapulär	wt	wt	wt	wt
21	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rücken lumbal mittig	wt	wt	wt	wt
22	Akanthotisches Basalzellakanthom	subskapulär rechts	wt	wt	wt	wt
23	Akanthotisches Basalzellakanthom	lumbal rechts	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 5, weiblich, Alter der Patientin bei der Kürettage: 64 Jahre alt						
24	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär links proximal	wt	wt	c.1176C>T	wt
25	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär links distal	wt	wt	c.1176C>T	wt
26	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rückenmitte rechts lateral	wt	wt	c.1176C>T	wt
27	Pigmentiertes akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär rechts	wt	wt	c.1176C>T	wt
Patient Nr. 6, weiblich, Alter der Patientin bei der Kürettage: 84 Jahre alt						
28	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär links	wt	wt	wt	wt
29	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rückenmitte rechts lateral	wt	wt	wt	wt
30	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär rechts	wt	wt	wt	wt
31	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rücken lumbal rechts	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 7, männlich, Alter des Patienten bei der Kürettage: 72 Jahre alt						
32	Akanthotisches Basalzellakanthom	klavikulär links lateral	wt	wt	wt	wt
33	Akanthotisches Basalzellakanthom	Abdomen links	wt	wt	wt	wt
34	Pigmentiertes akanthotisches Basalzellakanthom	mammär rechts	wt	wt	wt	wt
35	Hyperkeratotisches Basalzellakanthom	Rücken lumbal mittig	wt	<i>HRAS c.182A>T</i>	wt	wt
Patient Nr. 8, weiblich, Alter der Patientin bei der Kürettage: 86 Jahre alt						
36	Akanthotisches Basalzellakanthom	Abdomen links	wt	wt	wt	wt
37	Akanthotisches Basalzellakanthom	mammär links	wt	wt	wt	wt
38	Akanthotisches Basalzellakanthom	klavikulär rechts	wt	wt	wt	wt
39	Akanthotisches Basalzellakanthom	Schläfe rechts	wt	wt	wt	wt

Patient Nr. 9, weiblich, Alter der Patientin bei der Kürettage: 40 Jahre alt						
40	Akanthotisches Basalzellakanthom	Flanke rechts	wt	wt	wt	wt
41	Akanthotisches Basalzellakanthom	submammär links	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 10, männlich, Alter des Patienten bei der Kürettage: 70 Jahre alt						
42	Akanthotisches Basalzellakanthom	subskapulär rechts	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 11, männlich, Alter des Patienten bei der Kürettage: 66 Jahre alt						
43	Akanthotisches Basalzellakanthom	interskapulär	wt	wt	wt	wt
44	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär rechts	wt	wt	wt	wt
45	Akanthotisches Basalzellakanthom	Flanke links	wt	wt	wt	wt
46	Akanthotisches Basalzellakanthom	Oberbauch mittig	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 12, weiblich, Alter der Patientin bei der Kürettage: 75 Jahre alt						
47	Akanthotisches Basalzellakanthom	Flanke rechts	wt	wt	wt	wt
48	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär links distal	wt	wt	wt	wt
49	Akanthotisches Basalzellakanthom	skapulär links proximal	wt	HRAS c.182A>T	wt	wt
50	Akanthotisches Basalzellakanthom	subskapulär rechts	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 13, männlich, Alter des Patienten bei der Kürettage: 77 Jahre alt						
51	Akanthotisches Basalzellakanthom	Schulter links	wt	wt	wt	wt
52	Akanthotisches Basalzellakanthom	subskapulär links	wt	KRAS c.35G>T	wt	wt
53	Akanthotisches Basalzellakanthom	Rückenmitte	wt	wt	wt	wt
54	Akanthotisches Basalzellakanthom	Oberbauch mittig	wt	wt	wt	wt
Patient Nr. 14, männlich, Alter des Patienten bei der Kürettage: 83 Jahre alt						
55	Hyperkeratotisches Basalzellakanthom	mammär links	wt	wt	wt	wt
56	Hyperkeratotisches Basalzellakanthom	mammär rechts	wt	wt	wt	wt
57	Hyperkeratotisches Basalzellakanthom	Schulter links	wt	wt	wt	wt
58	Akanthotisches Basalzellakanthom	Schulter rechts	wt	wt	wt	wt

Tabelle 6: Klinisch-pathologische Charakteristika und Ergebnisse der genetischen Analyse der 58 seborrhoischen Keratosen

(wt: Wildtyp; die Codons von *FGFR2* wurden nach dem „open reading frame“ der *FGFR2* IIIb-Isoform nummeriert)

3.3 Methoden

3.3.1 Proteinase-K-Verdau und DNA-Isolierung

Die SK-Präparate wurden gleich nach der Kürettage bei -80°C kryokonserviert. Vor der DNA-Isolierung wurden die SK-Präparate kurz bei -20°C in dem Gefriermikrotom HM 500 OM (MICROM International GmbH, Walldorf) gelagert. Anschließend wurden von jedem gewonnenen Basalzellkanthom ca. 25 mg Gewebe vorsichtig mit dem Skalpell entnommen und in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß überführt.

Die DNA-Isolierung aus den frisch-gefrorenen SK erfolgte nach dem Herstellerprotokoll von QIAamp (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 11/2007) mit dem QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Germany).

Arbeitsprotokoll:

- 1) Nach Herstellerprotokoll wurde das gewonnene Gewebe zunächst mit 180 µl ATL-Digestionspuffer behandelt und mit 20 µl gebrauchsfertiger Proteinase K lysiert. Anschließend wurde die Suspension geschüttelt und bei 56°C unter leichtem regelmäßigen Schütteln über Nacht inkubiert. Als Endprodukt ergab sich eine homogene, durchsichtige Lösung.
- 2) Nach dem Proteinase-K-Verdau wurden alle Proben kurz zentrifugiert und mit 200 µl AL-Puffer aufgefüllt. Danach wurden sie noch einmal für ca. 15 s lang geschüttelt.
- 3) Die Proben wurden für 10 min bei 70°C inkubiert, dann kurz bei 6000 x g (entspricht 8000 rpm bei einer Tischzentrifuge) abzentrifugiert.
- 4) Anschließend wurden 200 µl Ethanol (96 – 100%) in jedes Reaktionsgefäß pipettiert, kurz vermischt und bei 6000 x g (8000 rpm) abzentrifugiert.
- 5) Die enthaltene Lösung wurde in spezielle Säulen überführt (QIAamp Mini Spin Column), in denen die DNA an eine spezielle Membran gebunden wird. Das Reaktionsgefäß wurde bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugiert. Danach wurde das QIAamp-Filtersäulchen auf ein neues, sauberes, 2 ml großes Auffanggefäß gegeben. Das Filtrat wurde verworfen.
- 6) Jedes Säulchen wurde mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen (Vorbereitung: Zum Wasch-Puffer AW1 wurde vor Beginn der Reaktion Ethanol absolut zugegeben, siehe Kapitel 3.1.6.1). Die Lösung wurde anschließend bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugiert. Das QIAamp-Säulchen wurde auf ein neues Auffanggefäß (2 ml) gegeben. Der Durchlauf wurde ausgeschüttet.

- 7) Ein zweiter Waschschritt erfolgte mit 500 µl AW2-Puffer (Vorbereitung: Zum Wasch-Puffer AW2 wurde vor Beginn der Reaktion Ethanol absolut zugegeben, siehe Kapitel 3.1.6.1). Das Reaktionsröhren wurde bei maximaler Geschwindigkeit (20000 x g, 14000 rpm) für 3 min zentrifugiert. Danach wurde das Filtersäulchen in ein neues, sauberes, 2 ml großes Auffanggefäß überführt. Der Durchlauf wurde verworfen. Um alle Pufferreste zu entfernen, wurde jede Probe 1 min lang bei maximaler Geschwindigkeit (20000 x g, 14000 rpm) zentrifugiert.
- 8) Es erfolgte eine Überführung in ein neues, 1,5 ml großes Reaktionsgefäß und die Zugabe von 100 µl AE-Puffer. Die Probe wurde für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde danach verworfen und das Eppendorf-Gefäß mit der isolierten DNA wurde auf Eis gestellt.

Die gewonnene DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die DNA-Proben können alternativ auch bei -20°C für eine längere Haltbarkeit gelagert werden. Die gereinigte DNA war weitgehend frei von Proteinen, Nukleasen und Inhibitoren.

3.3.2 Quantitative und qualitative DNA-Analyse

Die photometrische Messung der Absorption der DNA-Proben zur qualitativen Analyse erfolgte unter Verwendung eines Spektralphotometers (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser. Eine OD (optische Dichte) von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Zur Abschätzung des Verunreinigungsgrades der DNA-Proben wurde anschließend ihre Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Aus dem Quotienten OD260/OD280 wird berechnet, ob die DNA-Probe ausreichend rein ist. Der Optimalbereich liegt zwischen einem Wert von 1,6 und 2,0.

1 µl unverdünnte Probe wurde direkt auf die Messoberfläche des NanoDrop ND-1000 Spektrometers pipettiert und analysiert. Somit wurden sowohl Konzentrations-, als auch Qualitätsmessungen der isolierten DNA durchgeführt. Zum Nullabgleich wurde 1 µl Aqua dest. verwendet. Es wurden 58 von 79 SK-Proben mit der höchsten DNA-Konzentration und der besten DNA-Qualität ausgesucht und in diese Studie eingeschlossen.

3.3.3 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde im Jahr 1986 von Kary Banks Mullis entwickelt (Mullis et al 1986). Seit dieser Zeit stellt sie ein unverzichtbares Verfahren in der Genetik dar. Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die Amplifikation eines bestimmten DNA-Bereichs zwischen zwei bekannten Regionen *in vitro*. Sie ist durch hohe Spezifität und Sensitivität gekennzeichnet. Wichtige Voraussetzung für gute Ergebnisse ist das sterile Arbeiten, um Kontaminationen mit Fremd-DNA zu vermeiden. Es werden destilliertes Wasser, spezifische Oligonukleotidprimer, die zu den 3'-Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes komplementär sind, Puffer, eine thermostabile DNA-Polymerase und vier verschiedene Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) in ausreichender Menge verwendet. Die Polymerase-Kettenreaktion verläuft in drei aufeinanderfolgenden Schritten, die sich mehrmals in Form von Zyklen wiederholen und zur Vervielfältigung des ausgewählten DNA-Abschnittes führen. Der zwischen den Oligomeren liegende DNA-Sequenzbereich wird exponentiell amplifiziert (Abbildung 6).

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde im Rahmen der vorliegenden Studie bei der Amplifikation von ausgewählten DNA-Abschnitten der Genkandidaten *EGFR*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3R1* und *FGFR2* verwendet (Abbildung 6).

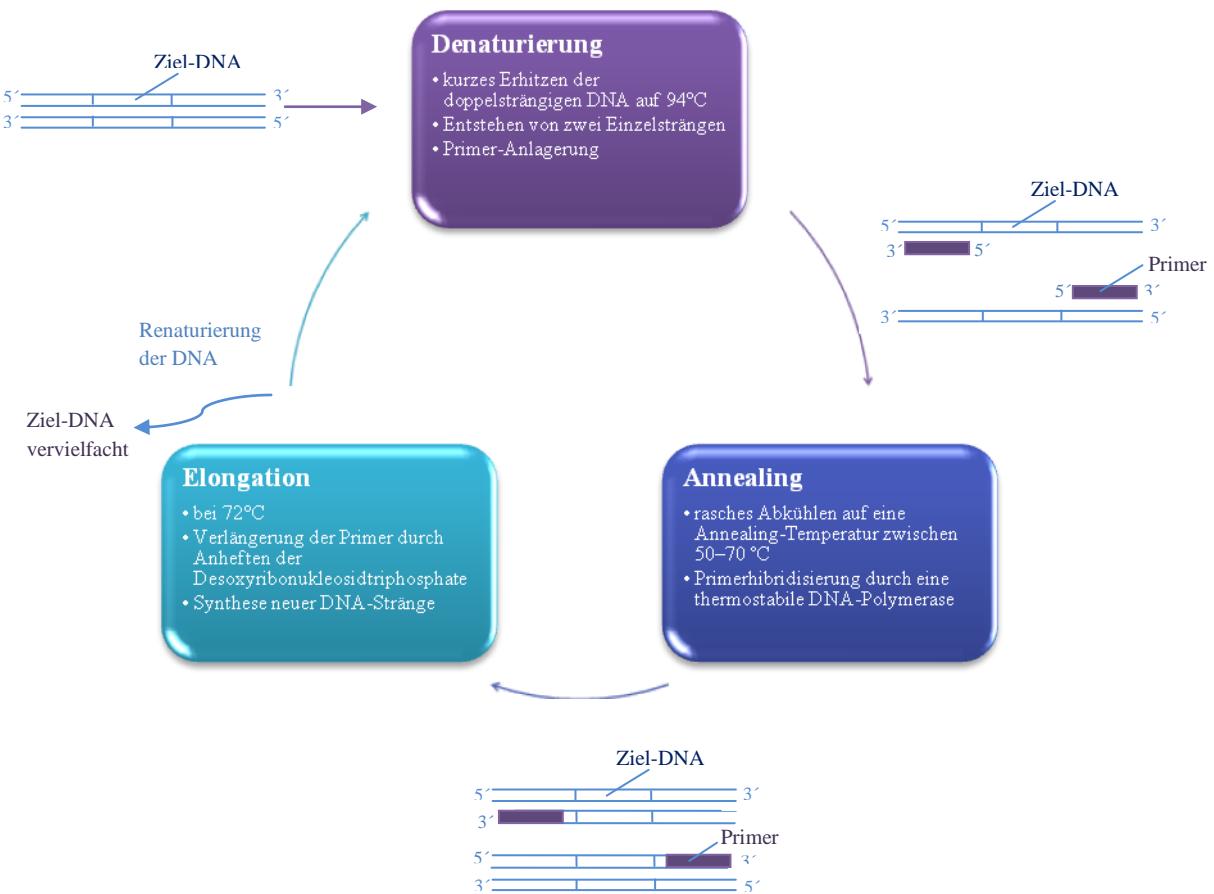


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase-Kettenreaktion in der vorliegenden Studie (vgl. (Löffler 2000))

3.3.4 Amplifikation der DNA für die Analyse der Gene *EGFR*, *PIK3R1* und *FGFR2*

3.3.4.1 PCR für *EGFR*

Für die genaue Amplifikation von ausgewählten *EGFR*-Genabschnitten in den Exons 18, 19 und 21 wurden zwei voneinander unabhängige und nacheinander laufende Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt. Die Amplifikation der Region in Exon 3 wurde durch eine einzige Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht. Es erfolgte eine Vervielfältigung von DNA-Bereichen in den Exons 3, 18, 19 und 21 des *EGFR*-Gens. Die PCR-Ansätze sind in Tabelle 7 beschrieben, die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Die erste Polymerase-Kettenreaktion enthält folgende PCR-Zutaten: 3,0 µl 10x Rx Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 µl DMSO (5%), 1,8 µl MgCl_2 (1,5 µM), 0,6 µl dNTPs (0,2 mM), 0,5 µl Primer-Mix aus einem vorläufigen und einem rückläufigen äußeren Primer (Endkonzentration 0,4 µM), 0,1 µl Taq DNA Polymerase (0,02 U/µl) und 10,0 µl (9,0 µl dH_2O + 1,0 µl DNA) der aus der DNA-Isolierung enthaltenen Template-DNA. Anschließend wurden 12,5 µl dH_2O in das Reaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktion fand in einem Volumen von 30 µl statt.

Bei der zweiten PCR fanden folgende Reagenzien Verwendung: es wurden 19,5 µl dH_2O für die Reaktion mit den inneren Primern der Exons 19 oder 21 bzw. 20,5 µl dH_2O für die Reaktion mit den inneren Primern des Exons 18 eingesetzt. Anschließend wurden 3,0 µl 10x Rx-Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 µl DMSO (5 %), 1,8 µl MgCl_2 (1,5 µM), 0,6 µl dNTPs (0,2 mM), 0,5 µl Primer-Mix aus dem vorläufigen inneren Primer und dem rückläufigen inneren Primer des entsprechenden Exons (Endkonzentration von den eingesetzten Primern beträgt 0,4 µM), 0,1 µl Taq DNA Polymerase (0,02 U/µl) und 3 bzw. 2 µl Template-DNA vom letzten PCR-Lauf pipettiert. Die Reaktion fand in einem Volumen von 30 µl statt (Tabelle 7).

Zu jeder PCR wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle vorbereitet. Hierzu wurde die DNA durch eine entsprechende Menge von Kontroll-DNA (EDTA-Blut) bzw. dH_2O ersetzt.

PCR-Zutaten	PCR von Exon 3 (Codon 108), 1. PCR von Exon 18 (outer Primer) und Exon 19 and 21 (outer Primer)	2. PCR von Exon 18 (inner Primer)	2. PCR von Exon 19 und 21 (inner Primer)
dH₂O	12,5 µl	20,5 µl	19,5 µl
DMSO	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
MgCl₂	1,8 µl	1,8 µl	1,8 µl
10x Rx-Puffer mit (NH₄)₂SO₄	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl
dNTPs	0,6 µl	0,6 µl	0,6 µl
Primer-Mix	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl
Template-DNA	10,0 µl (9,0 µl dH ₂ O + 1,0 µl DNA)	2,0 µl	3,0 µl

Tabelle 7: Erste und zweite PCR für die Amplifikation von DNA-Bereichen in den Exons 3, 18, 19 und 21 vom EGFR-Gen

DMSO: Dimethyl sulfoxide (Merck, Darmstadt, Germany); 10x Rx-Puffer mit (NH₄)₂SO₄: gebrauchsfertig; enthält kein MgCl₂; dNTPs: Desoxyribonukleosidtriphosphate; Primer-Mix: enthält eine Mischung aus vorläufigem und rückläufigem Primer in einer Endkonzentration von 0,4 µM; Taq-Polymerase: Taq DNA Polymerase, recombinant (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany). Beim Pipettieren wird die Reihenfolge der Reagenzien exakt befolgt.

Die verwendeten PCR-Programme für die Amplifikation der DNA-Abschnitte in den Exons 3, 18, 19 und 21 sind in Tabelle 8 beschrieben. Nach Beendigung der PCR-Reaktionen wurden alle DNA-Proben auf Eis gestellt.

Schritt	Exon 3, Codon 108	Exon 18 (outer)	Exon 18 (inner)	Exon 19 und 21 (outer)	Exon 19 und 21 (inner)
1.	94,0°C für 45 s	94,0°C für 3 min	94,0°C für 3 min	94,0°C für 5 min	94,0°C für 5 min
2.	60,0°C für 45 s	94,0°C für 1 min			
3.	72,0°C für 1 min	58,0°C für 1 min	52,0°C für 1 min	60,0°C für 1 min	60,0°C für 1 min
4.	Gehe zum 1. Schritt, 44x	72,0°C für 1 min			
5.	72,0°C für 2 min	Gehe zum 2. Schritt, 34x	Gehe zum 2. Schritt, 34x	Gehe zum 2. Schritt, 34x	Gehe zum 2. Schritt, 29x
6.	4,0°C für immer	72,0°C für 8 min			
7.	Ende	8,0°C für immer	8,0°C für immer	8,0°C für immer	8,0°C für immer
8.		Ende	Ende	Ende	Ende

Tabelle 8: PCR-Programme für die Amplifikation von ausgewählten DNA-Bereichen innerhalb der Exons 3, 18, 19 und 21 des EGFR-Gens

3.3.4.2 PCR für *PIK3R1*

Die vorliegende Arbeit evaluiert auch die Rolle von *PIK3R1* in der Ätiologie und Pathogenese der SK. Für dieses Ziel wurde die DNA aus dem frisch-gefrorenen Gewebe isoliert (siehe Kapitel 3.3.1) und amplifiziert. Für die PCR wurden 33,0 µl dH₂O, 5 µl 10x Taq-Puffer mit (NH₄)₂SO₄, 3,0 µl MgCl₂, 1,0 µl Primer-Mix (jeweils 20 pM des vorläufigen und rückläufigen Primers) (Tabelle 4), 1 µl dNTPs (10 µM), 5 µl DMSO : dH₂O (im Verhältnis 1:1), 1 µl Taq-Polymerase (Fermentas) und 1 µl Template-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Das Programm für die PCR bestand aus den folgenden Schritten:

Schritt	Exon 9, 10, 12	Exon 13
1.	94,0°C für 10 min	94,0°C für 10 min
2.	94,0°C für 40 s	94,0°C für 40 s
3.	55,0°C für 40 s	60,0°C für 40 s
4.	72,0°C für 40 s	72,0°C für 40 s
5.	Gehe zum 2. Schritt, 40x	Gehe zum 2. Schritt, 40x
6.	72,0°C für 10 min	72,0°C für 10 min
7.	4,0°C für immer	4,0°C für immer
8.	Ende	Ende

Tabelle 9: PCR-Programme für die Amplifikation von ausgewählten DNA-Bereichen innerhalb der Exons 9, 10, 12 und 13 des *PIK3R1*-Gens

Die Annealing-Temperatur ist spezifisch für die bei dieser Reaktion verwendeten Primerpaare. Die Hybridisierung bei den Exons 9, 10 und 12 erfolgte bei 55,0°C für 40 s, bei Exon 12/13 bei 60°C für 40 s.

Jeder Lauf der Polymerase-Kettenreaktion wurde von einer Negativ- und einer Positivkontrolle begleitet. Dann wurden die Proben auf 4,0°C abgekühlt und bis zur Anwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Die DNA-Konzentration und die DNA-Qualität wurden elektrophoretisch kontrolliert (siehe Kapitel 3.3.5). Die gewünschten PCR-Fragmente wurden aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.6.1) und danach sequenziert (siehe Kapitel 3.3.6.2 – 3.3.6.4).

3.3.4.3 PCR für FGFR2

Als Nächstes erfolgte die Analyse möglicher Hotspot-Mutationen innerhalb des *FGFR2*-Gens. Die Studie konzentrierte sich auf die Exons 7, 9, 12 und 14 im *FGFR2*-Gen (siehe Kapitel 1.3.2.1). Für den PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl benötigte man 18,075 µl dH₂O, 5,0 µl 5x PCR-Puffer, 0,3 µl Primer-Mix ((vorläufiger + rückläufiger Primer) : dH₂O = 1:1, Tabelle 4), 0,5 µl dNTPs (10 µM) und 0,125 µl Go-Taq Polymerase (Promega Corp.), um es mit 1 µl Template-DNA zu vermischen. Nachdem sämtliche Reagenzien pipettiert wurden, wurde jede Probe geschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurde sie in den bereits auf die Starttemperatur von 94°C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Dann wurde das folgende Programm gestartet:

Schritt	Exon 7, 9, 12, 14
1.	94,0°C für 45 s
2.	60,0°C für 45 s
3.	72,0°C für 1 min
4.	Gehe zum 1. Schritt, 44 x
5.	72,0°C für 2 min
6.	4,0°C für immer
7.	Ende

Tabelle 10: PCR-Programm für die Amplifikation von ausgewählten DNA-Bereichen innerhalb der Exons 7, 9, 12 und 14 des *FGFR2*-Gens

Nach Beendigung des PCR-Programms wurden die Proben im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden danach mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe Kapitel 3.3.5), aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.6.1) und später für die Sequenzierung vorbereitet (siehe Kapitel 3.3.6.2 – 3.3.6.4).

3.3.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Um den Erfolg der PCR zu belegen, wurden exemplarisch Agarose-Gele angefertigt, in denen sich die DNA elektrophoretisch auftrennte.

Die Auftrennung der doppelsträngigen DNA-Moleküle im Größenbereich von 500 bp bis 12 kbp wurde in 2%-igen horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch durchgeführt. Die Gelvorbereitung erfolgte unter dem Abzug in einem Erlenmeyerkolben (je nach Anzahl der DNA-Proben) durch Vermischen von 1 bzw. 2 g Agarose mit ca. 50 bzw. 100 ml 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer). Die Lösung wurde in der Mikrowelle erhitzt, zwischendurch geschwenkt und in der vorher vorbereiteten Gelkammer mit einem Kamm, zwischen Gelkammer und Glasplatte, gegossen. Es sollten möglichst keine Bläschen entstehen, da sie die Auswertung der Bandenmuster stören könnten. Die Geltrocknung erfolgte für ca. 30 Minuten unter dem Abzug. Danach wurde das Gel horizontal in die Gelwanne gelegt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Der Kamm wurde vorsichtig herausgezogen. Vor dem Auftragen wurden 5 µl der aufzutrennenden Proben-DNA auf einem Paraffinfilm mit 2 µl Ficoll-Stopfipper vermischt. Anschließend wurden 6 µl Probenlösung in die Slots pipettiert. Eine Positiv- (Kontroll-DNA) und eine Negativkontrolle (dH₂O), die parallel zu den Proben in jeder PCR mit den entsprechenden Primern gelaufen sind, wurden als Kontrollen in die letzten Slots von jedem Agarose-Gel pipettiert. Als Standardgröße diente die TrackIt™ 100 bp DNA Ladder, die von der Firma Invitrogen (USA) bezogen wurde. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 80 bzw. 120 Volt innerhalb von 1 Stunde. Am Ende der Laufzeit wurden die Gele in eine Wanne mit Wasser gelegt und für 30 Minuten mit 100 µl Ethidiumbromid, einem DNA-interkalierenden Agens, das als sehr giftig und reizend eingestuft und unter geeigneten Vorsichtsmaßnahmen pipettiert wird oder mit 4 µl Red Gel, einem ultrasensitiven, extrem stabilen und umweltfreundlichen Fluoreszenzfarbstoff, gefärbt. Diese Agenzien lagern sich in den DNA-Doppelstrang ein, sodass die DNA unter UV-Bestrahlung als sichtbare Bande auf dem Gel erscheint (Abbildung 7). Die Auswertung und Photographie der Gele erfolgte mit dem VisiDoc-It™ mit Reproständer (VisiDoc-It™ Imaging System, LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg).

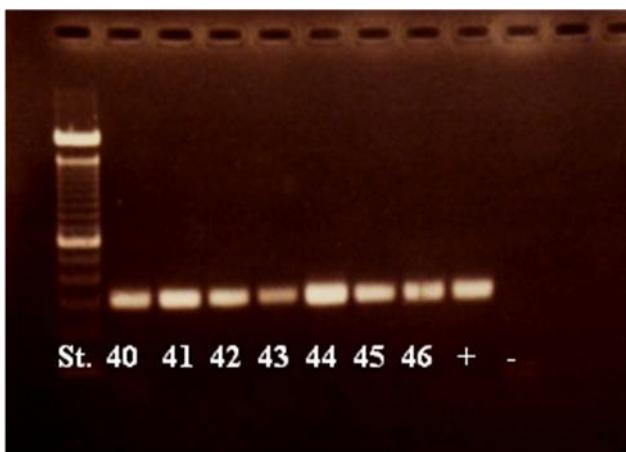


Abbildung 7: Agarose-Gel-Elektrophorese mit Marker

Gel-Elektrophorese der SK-Proben 40-46 nach der Amplifikation von ausgewählten *PIK3R1*-DNA-Abschnitten innerhalb von Exon 13. Die Proben wurden mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Bild wurde mittels VisiDoc-It™ Imaging System aufgenommen. Die einzelnen Proben wurden als weiße Bänder unter UV-Licht dargestellt. Als Standardgröße (St.) diente die TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Slot 1). Die letzten zwei Slots stellten die Positiv (+) und Negativkontrolle (-) dar.

3.3.6 Sequenzierung von *FGFR2*, *PIK3R1* und *EGFR*

3.3.6.1 Aufreinigung der DNA-Amplifikate

Nach dem PCR-Lauf wurden die DNA-Proben, die die gewünschten Sequenzen der Exons von *FGFR2*, *PIK3R1* und *EGFR* enthielten (siehe Kapitel 3.3.4.1 – 3.3.4.3), von freien Primern, dNTPs und verschiedenen Salzen mittels Affinitätschromatographiesäulchen des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden, Germany) gereinigt. Diese Verunreinigungen hätten die Erfassung der Signale am Sequenzierteil gestört. Die Reinigung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll von QIAquick (QIAquick® Spin Handbook 03/2008).

Arbeitsprotokoll:

- 1) Jede DNA-Probe wurde mit fünf Volumenanteilen PB-Puffer vermischt.
- 2) Ein QIAquick-Filtersäulchen wurde in ein 2 ml großes Auffanggefäß überführt.
- 3) Die DNA-Lösung wurde dann auf das Säulchen aufgetragen (Bindung der DNA) und für 1 min bei 17900 x g (13000 rpm) abzentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Säulchen auf dasselbe Auffanggefäß aufgesetzt.
- 4) Anschließend wurde jede Probe mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen (Vorbereitung: Der Wasch-Puffer PE wurde vor Beginn der Aufreinigung mit Ethanol absolut verdünnt, siehe Kapitel 3.1.6.2). Die Zentrifugation wurde danach bei 17900 x g (13000 rpm) für

1 min durchgeführt. Der Durchlauf wurde verworfen und das Säulchen wurde wieder für 1 min bei 17900 x g (13000 rpm) zentrifugiert, um alle Pufferreste zu entfernen.

- 5) Die QIAquick-Filtersäule wurde dann auf ein sauberes, 1,5 ml großes Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. Die DNA-Probe wurde anschließend mit 30 µl EB-Puffer versetzt und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nächstes erfolgte eine weitere einminütige Zentrifugation der Proben bei 17900 x g (13000 rpm).
- 6) Die Säule wurde verworfen und das Eppendorf-Gefäß mit der gereinigten DNA (ca. 28 µl) auf Eis gestellt.

5 µl DNA wurden anschließend auf ein 2%-iges Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch kontrolliert und mittels VisiDoc-It™ Imaging System visualisiert (siehe Kapitel 3.3.5).

3.3.6.2 *Amplifikation der DNA mittels Sequenzier-PCR*

Die zu sequenzierende DNA der *FGFR2*-, *PIK3R1*- und *EGFR*-Gene wurde einer Sequenzier-PCR nach folgendem ABI BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit-Protokoll (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Protocol 09/2002) unterzogen. Diese Reaktion, die Aufreinigung der Proben sowie die Sequenzierung wurden in dem Labor des Instituts der klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin durchgeführt.

Der Reaktionsansatz (20 µl) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 2 µl Terminator Ready Reaction Mix (TRR), 3 µl 5x BigDye Terminator v1.1 Sequencing Puffer, 3,2 µl Primer (1 pmol/µl), 1 µl dsDNA, bis 10,8 µl dH₂O (LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt). Die Reaktion fand in einem Endvolumen von 20 µl statt. Die Proben wurden anschließend kurz gemischt und bei 4000 rpm abzentrifugiert. Dann kamen sie in den auf 95°C vorgeheizten Thermocycler (mit geheiztem Deckel). Somit konnte eine unspezifische Reaktion während des Aufheizens verhindert werden. Das PCR-Programm wurde gestartet (Tabelle 11).

Schritt	<i>EGFR, FGFR2, PIK3R1</i>
1.	95,0°C für 1 min
2.	96,0°C für 10 s
3.	50,0°C für 15 s
4.	60,0°C für 4 min
5.	Gehe zum 2. Schritt, 25 x
6.	4,0°C für immer
7.	Ende

Tabelle 11: Sequenzier-PCR-Programm für *EGFR*, *FGFR2* und *PIK3R1*

Das PCR-Gefäß mit der amplifizierten DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei 4,0°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.3.6.3 Aufreinigung der Produkte der Sequenzier-PCR

Die Aufreinigung der Produkte der Sequenzier-PCR erfolgte mit Hilfe der Gel-Filtration des DyeEx 2.0 Spin Kits gemäß den Angaben des Herstellers (DyeEx 2.0 Spin Protocol for Dye-Terminator Removal, DyeEx™ Handbook, 05/2002).

Arbeitsprotokoll:

- 1) Die DyeEx 2.0 Spin-Säulen wurden vorsichtig geschüttelt, damit sich das Gel von den Wänden des Gefäßes ablöst.
- 2) Der Deckel von jedem Säulchen wurde zu 1/4 aufgedreht.
- 3) Im Anschluss wurde von jedem Spin-Säulchen ein Teil von dem Boden abgebrochen.
- 4) Das Spin-Säulchen wurde danach in ein 2 ml großes Reaktionsgefäß überführt.
- 5) Die Säulchen wurden bei 750 x g, 3 min lang abzentrifugiert.
- 6) Das Spin-Säulchen wurde vorsichtig auf ein frisches, 1,5 ml großes Reaktionsgefäß gegeben. Der Inhalt der Sequenzier-PCR-Probe (ca. 20 µl) wurde im Anschluss langsam und vorsichtig in die Mitte des Gels pipettiert. Die Pipettenspitze sollte dabei nicht in Berührung mit der Geloberfläche kommen.
- 7) Die Zentrifugation wurde danach bei 750 x g für 3 min durchgeführt.

Die so gereinigte DNA wurde dann bis zur Sequenzierung (siehe Kapitel 3.3.6.4) bei 4,0°C aufbewahrt.

3.3.6.4 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung wurde nach der von Frederick Sanger entwickelten enzymatischen Kettenabbruchmethode mit einem Kapillarelektrophoresesystem (ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) durchgeführt. Diese Reaktion erfolgte durch Einsetzen von Primern (siehe Kapitel 3.3.4 für die Genanalyse der *FGFR2*-, *PIK3RI*- und *EGFR*-Gene bzw. Kapitel 3.3.7 für die *RAS*-Genanalyse), die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Die gewonnenen Amplifikate wurden im Anschluss von den ungebundenen Primern, dNTPs und Salzen befreit (siehe Kapitel 3.3.6.1). 4 µl jedes in Kapitel 3.3.6.3 gereinigten PCR-Produkts wurden dann mit 15 µl HiDi™-Formamiden (Applied Biosystems, California, USA) vermischt und in eine spezielle 96-Well-Reaktionsplatte überführt. Die Platte wurde kurz in der Allerga X-15 R Centrifuge (Beckman Coulter GmbH) abzentrifugiert

und in den ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi) gestellt. Nun wurde der Sequenzierungsvorgang gestartet. Der ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer saugte für jede Probe separat ein gebrauchsfertiges Polymer (POP-7™ Polymer (Sequencing Run Module: RapidSeq36_POP7)) über eine Kapillare an. Des Weiteren wurden noch destilliertes Wasser und 1x Analyzer-Puffer benötigt. Die Proben wurden zunächst denaturiert, danach auf einem Sequenziergel ihrer Länge nach elektrophoretisch aufgetrennt und in beiden sense- und antisense-Richtungen für mögliche heterozygote Mutationen analysiert. Die Produkte wurden anschließend mittels eines spezifischen Laser-Photometers am Ende des Kapillargels quantitativ vermessen. Der Laser konnte die vier Fluoreszenzfarbstoffe voneinander unterscheiden, was das Ablesen der Sequenz möglich machte. Das Auswerten der Ergebnisse erfolgte mit dem Sequencher 4.9™ Programm, das die Rohdaten in Form von farbigen Chromatogrammen darstellte (siehe Kapitel 4). Durch Vergleich der PCR-Proben aus dem Normal- und Tumorgewebe konnte eine Aussage über den Mutationsstatus der SK gemacht werden.

3.3.7 Analyse von *RAS*-Hotspot-Genmutationen mittels SNaPshot® Multiplex System Assay

Die *RAS*-Genanalyse der SK wurde mit einem hoch sensitiven SNaPshot® Multiplex System Assay (Kompier et al 2010) durchgeführt.

Interessant für die Studie waren drei DNA-Abschnitte innerhalb der Codons 12, 13 und 61 der *HRAS*-, *KRAS*- und *NRAS*-Gene, die sich jeweils in den Exons 2 und 3 jedes der oben genannten Gene befinden. Diese Regionen wurden mit Hilfe von ausgewählten Primern (Tabelle 5) durch Multiplex-PCR amplifiziert. Anschließend wurden mutationsspezifische Primer (Tabelle 5), die mit Didesoxyribonukleotiden markiert waren, zu den einzelnen Reaktionen hinzugefügt. Für die Multiplex-PCR wurden 32 µl dH₂O, 5 µl 10x Puffer, 3 µl MgCl₂, 1 µl Primer-Mix (Tabelle 12), 1 µl dNTPs (10 µM) (Fermentas), 5 µl DMSO : dH₂O (1:1) und 1 µl Taq-Polymerase (Fermentas) mit 2 µl Template-DNA vermischt. Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 50 µl statt.

Bestandteile des Primer-Mix für die Multiplex-PCR	Stockkonzentration (μ M)	Volumen in Primer-Mix	Konzentration in Primer-Mix (μ M)
<i>HRAS</i> Exon 1 Fwd	100	45	0,6
<i>HRAS</i> Exon 1 Rev	100	45	0,6
<i>HRAS</i> Exon 2 Fwd	100	25	0,3
<i>HRAS</i> Exon 2 Rev	100	25	0,3
<i>KRAS</i> Exon 1 Fwd	100	25	0,3
<i>KRAS</i> Exon 1 Rev	100	25	0,3
<i>KRAS</i> Exon 2 Fwd	100	25	0,3
<i>KRAS</i> Exon 2 Rev	100	25	0,3
<i>NRAS</i> Exon 1 Fwd	100	25	0,3
<i>NRAS</i> Exon 1 Rev	100	25	0,3
<i>NRAS</i> Exon 2 Fwd	100	25	0,3
<i>NRAS</i> Exon 2 Rev	100	25	0,3
dH₂O		160	

Tabelle 12: Primer-Mix für die Multiplex-PCR

Das Programm für die Multiplex-PCR bestand aus den folgenden Schritten:

Schritt	RAS
1.	95.0°C für 5 min
2.	95.0°C für 45 s
3.	55.0°C für 45 s
4.	72.0°C für 45 s
5.	Gehe zum 2. Schritt, 34 x
6.	72.0°C für 10 min
7.	4.0°C für immer
8.	Ende

Tabelle 13: Programm für die Multiplex-PCR des SNaPshot® Assays

Jede Reaktion wurde mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die DNA durch ein entsprechendes Volumen dH₂O bzw. Blut-DNA ersetzt. Am Ende des PCR-Laufs wurden die Proben mit dem amplifizierten PCR-Produkt auf Eis gestellt. Die Produkte der PCR ließen sich elektrophoretisch in einem Agarosegel auftrennen (siehe Kapitel 3.3.5).

Nach der Amplifikation stellen die PCR-Produkte eine Mischung aus doppelsträngiger DNA, ungebundenen einzelsträngigen Primern, dNTPs, Enzymen sowie Puffer-Komponenten dar. Um diese Elemente von der DNA zu trennen und die PCR-Produkte für die Sanger-Sequenzierung vorzubereiten, wurden die amplifizierten PCR-Fragmente anschließend mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und Exonuclease I (Exo I) verdaut. Für diesen Schritt wurden 15 μ l PCR-Produkt aus der Multiplex-PCR, 3 μ l SAP (1U/ μ l), 2 μ l Exo I (verdünnt auf 1 U/ μ l mit 1x Tris-MgCl₂ pH 9,0; 1:10 Verdünnung) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l

eingesetzt. Die Proben wurden anschließend geschüttelt und im PCR-Gerät bei 37,0°C für 10 min, danach bei 72,0°C für 15 min inkubiert. Nach Beendigung des Programms wurden sie bei 4,0°C gelagert. Die weitere Analyse des Mutationsstatus der Proben erfolgte nach dem Herstellerprotokoll von Applied Biosystems (ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit Protocol 2010) mit dem ABI Prism® SNaPshot® Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Das ABI Prism® SNaPshot® Multiplex Kit kann Einzel-Nukleotid-Polymorphismen („single nucleotide polymorphisms“, SNPs) in einer DNA-Probe detektieren. Das Prinzip dieses Kits ist ein unmarkierter Oligonukleotidprimer um ein einziges Didesoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTP) zu verlängern. In einer Mischung von fluoreszent markierten ddNTPs und einer DNA-Polymerase, die den Primer um ein einziges Desoxyribonukleosidtriphosphat in 3'-Richtung verlängert, bindet der Primer an der Zielsequenz. Für diese Reaktion wurden zwei verschiedene Sets spezifischer Primer vorbereitet (Tabelle 5), die nur an den erwünschten Stellen auf dem Template binden und das gewünschte Produkt begrenzen. Set 1 untersuchte die folgenden Positionen: 34, 35, 37, 181 und 182 innerhalb *HRAS*; 34, 35 und 181 innerhalb *KRAS*; 34 und 182 von *NRAS*. Set 2 umfasste folgende Nukleinbasen-Positionen: 38 und 183 von *HRAS*; 37, 38, 182 und 183 von *KRAS*; 35, 37, 38, 180, 181 und 183 von *NRAS*. Die Primer-Mischungen der beiden Sets sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 detailliert beschrieben. Die SNaPshot®-PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Es wurden 2,5 µl SNaPshot® Ready Reaction Mix, 2,0 µl 5x Sequencing Puffer (Tris-MgCl₂, pH 9,0), 1,0 µl SNaPshot®-Multiplex-Primer-Mix und 2,5 µl nukleasefreies H₂O mit 2 µl PCR-Produkt (vorher mit SAP/Exo I verdaut) vermischt.

Bestandteile des Primer-Mix für die SNaPshot®-PCR	Stockkonzentration (µM)	Volumen in Primer-Mix	Konzentration in Primer-Mix (µM)
<i>HRAS</i> pos 34 fwd	100	25	0,5
<i>HRAS</i> pos 182 rev	100	7,5	0,15
<i>KRAS</i> pos 34 rev	100	25	0,5
<i>HRAS</i> pos 35 rev	100	35	0,7
<i>NRAS</i> pos 182 fwd	100	25	0,5
<i>KRAS</i> pos 181 rev	100	10	0,2
<i>HRAS</i> pos 181 fwd	100	35	0,7
<i>KRAS</i> pos 35 fwd	100	10	0,2
<i>HRAS</i> pos 37 rev	100	35	0,7
<i>NRAS</i> pos 34 fwd	100	10	0,2
dH₂O		282,5	

Tabelle 14: Zusammensetzung des SNaPshot®-Multiplex-Primer-Mix für die Detektion der Mutationen innerhalb der *HRAS*-, *NRAS*- und *KRAS*-Gene, Set 1

Bestandteile des Primer-Mix für die SNaPshot®-PCR	Stockkonzentration (μ M)	Volumen in Primer-Mix	Konzentration in Primer-Mix (μ M)
<i>KRAS</i> pos 37 rev	100	35	0,7
<i>NRAS</i> pos 181 rev	100	10	0,2
<i>NRAS</i> pos 37 fwd	100	10	0,2
<i>KRAS</i> pos 183 rev	100	35	0,7
<i>KRAS</i> pos 38 fwd	100	10	0,2
<i>NRAS</i> pos 183 rev	100	25	0,5
<i>NRAS</i> pos 38 rev	100	25	0,5
<i>NRAS</i> pos 180 fwd	100	15	0,3
<i>KRAS</i> pos 182 fwd	100	25	0,5
<i>HRAS</i> pos 183 fwd	100	15	0,3
<i>HRAS</i> pos 38 rev	100	25	0,2
<i>NRAS</i> pos 35 fwd	100	25	0,2
dH ₂ O		245	

Tabelle 15: Zusammensetzung des SNaPshot®-Multiplex-Primer-Mix für die Detektion der Mutationen innerhalb der *HRAS*-, *NRAS*- und *KRAS*-Gene, Set 2

Das Programm für die PCR umfasste 25 Zyklen. Die Proben wurden zunächst für 10 s bei 96,0°C denaturiert, dann für 40 s bei 58,5°C hybridisiert. Die PCR-Produkte wurden bei 4,0°C aufbewahrt. Zur Entfernung der überschüssigen Didesoxyribonukleotide wurde das entstandene Produkt (10 μ l Ansatz) mit 1 μ l Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (1U/ μ L) ohne Exo I (würde die SNaPshot®-Primer beschädigen) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 60 min bei 37,0°C in dem Cycler-Gerät inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz für 15 min auf 72,0°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4,0°C aufbewahrt. Zu jeder PCR-Reaktion wurden eine positive Kontrollreaktion mit Kontrolltemplate und eine negative Kontrollreaktion ohne Kontrolltemplate angefertigt. Das Ergebnis aus dieser Kontrollreaktion wurde mit den Proben des jeweiligen PCR-Laufs abgeglichen.

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde jedes gewonnene Amplifikat mittels ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert (das Prinzip der Sequenzierung wurde im Kapitel 3.3.6.4 beschrieben).

1 μ l jedes im Kapitel 3.3.7 gewonnenen PCR-Produkts wurde mit 10 μ l HiDi™-Formamiden (Applied Biosystems, California, USA) und 0,5 μ l GeneScan-120-LIZ Size Standard (Marker) vermischt und in eine spezielle 96-Well-Reaktionsplatte überführt. Die Platte wurde kurz abzentrifugiert und in den ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi) gestellt. Der Sequenzierungsvorgang wurde gestartet und wie im Kapitel 3.3.6.4 beschrieben durchgeführt.

Dieser Schritt der Genanalyse wurde im Zentrum für molekularpathologische Diagnostik am Institut für Pathologie durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Studiendesign und Vorversuche

In den Jahren 2009 bis 2011 wurde die Mutationsanalyse der Genkandidaten *EGFR*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS*, *PIK3R1* und *FGFR2* an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt. Um den Versuchsaufbau dieser Studie zu optimieren und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Zunächst wurde, wie zum ersten Mal von Goelz et al beschrieben (Goelz et al 1985), doppelsträngige DNA von formalinfixiertem und paraffineingebettetem SK-Gewebe isoliert, amplifiziert und später sequenziert. Die Ergebnisse der erhaltenen Chromatogramme, die von der Firma GATC zur Verfügung gestellt wurden, waren allerdings sehr unbefriedigend und schlecht auswertbar. Aus diesem Grund konzentrierte sich die vorliegende Studie auf frische Präparate von dermatologischen Patienten. 14 Patienten kaukasischer Herkunft sind in diese Studie eingeschlossen worden. Insgesamt wurden 58 histologisch gesicherte frische SK-Proben von 8 Männern und 6 Frauen analysiert. Die Proben setzten sich aus 54 akanthotischen (93%) und 4 hyperkeratotischen SK (7%) (Tabelle 6) zusammen. Von jedem dieser Patienten wurden ca. 4 Proben höchster DNA-Qualität und DNA-Konzentration in dieser Studie verwendet (siehe Kapitel 3.2).

4.2 Klinisch-pathologische Charakteristika und Korrelation mit dem Mutationsstatus

Der Altersmedian der beteiligten Patienten lag bei 71 Jahren, mit einer Spanne von 40 bis 86 Jahren (Tabelle 6). Das mediane Alter der Patienten mit sowie ohne relevante Mutationen war mit 72,8 Jahren und 69,2 Jahren vergleichbar. 5 von 14 Patienten wiesen eine onkogene Mutation in einer der untersuchten SK auf. Interessant ist die Tatsache, dass die identifizierten onkogenen Mutationen besonders oft an den sonnenexponierten Stellen wie dem Rücken, der Schulter und der Brust vorkamen (Tabelle 16). Da die Zahl der gefundenen Mutationen insgesamt jedoch niedrig war, kann nicht beurteilt werden, ob diese Korrelation tatsächlich signifikant ist. 4 von 5 Mutationen betrafen akanthotische SK, die den häufigsten histologischen Subtyp der SK darstellen. Die übrigen klinisch-pathologischen Charakteristika und ihre Korrelation mit dem Mutationsstatus sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 zusammengefasst.

Patient Nr.	Probe Nr.	Alter	Geschlecht	Histologischer Subtyp	Lokalisation	Mutation
2	8	73	m	Akanthotische SK	Rückenmitte rechts	<i>HRAS</i> c.37G>C
3	18	67	w	Akanthotische SK	intermammär	<i>HRAS</i> c.37G>C
3	19	67	w	Akanthotische SK	skapulär rechts	<i>EGFR</i> c.2573T>G
5*	24	64	w	Akanthotische SK	skapulär links	<i>PIK3RI</i> p.F392F
5*	25	64	w	Akanthotische SK	skapulär links	<i>PIK3RI</i> p.F392F
5*	26	64	w	Akanthotische SK	Rückenmitte rechts	<i>PIK3RI</i> p.F392F
5*	27	64	w	Pigmentierte akanthotische SK	skapulär rechts	<i>PIK3RI</i> p.F392F
7	35	72	m	Hyperkeratotische akanthotische SK	Rücken lumbal mittig	<i>HRAS</i> c.182A>T
12	49	75	w	Akanthotische SK	skapulär links	<i>HRAS</i> c.182A>T
13	52	77	m	Akanthotische SK	subskapulär links	<i>KRAS</i> c.35G>T

Tabelle 16: Klinisch-pathologische Charakteristika der seborrhoischen Keratosen mit onkogenen Mutationen

Aufgeführt sind das Alter und das Geschlecht (m: männlich, w: weiblich) der Patienten während der Kürettage der SK mit identifizierten Mutationen, der histologische Subtyp und die Lokalisation der SK sowie die gefundenen Mutationen.

* bei der *PIK3RI*-Mutation p.F392F handelt es sich um einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus im Exon 9, Codon 392, der keine Änderungen der Aminosäuresequenz verursachte und somit keinen Effekt auf die Struktur und Funktion des *PIK3RI*-Proteins zeigte. Somit gehört er nicht zu den signifikanten Genmutationen in dieser Studie.

Tabelle 17 verschafft einen Überblick der gefundenen Mutationen bei den 58 SK dieser Studie.

Gen	Exon	Mutationstyp	Nukleotid-Substitution	Aminosäure-Substitution	Häufigkeit
<i>EGFR</i>	21	Punktmutation	c.2573T>G	p.L858R	1/58 (2%)
<i>HRAS</i>	2	Punktmutation	c.37G>C	p.G13R	2/58 (3%)
<i>HRAS</i>	3	Punktmutation	c.182A>T	p.Q61L	2/58 (3%)
<i>KRAS</i>	2	Punktmutation	c.35G>T	p.G12V	1/58 (2%)
<i>PIK3RI</i>	9	Einzelnukleotid-Polymorphismus	c.1176C>T	p.F392F	4/58 (7%)

Tabelle 17: Überblick der detektierten Genmutationen

4.3 Analyse von *EGFR*-Mutationen bei seborrhoischen Keratosen

Die *EGFR*-Genanalyse umfasste 58 Proben von SK, die durch die Sanger-Methode direkt sequenziert wurden. Es wurden die am häufigsten vorkommenden *EGFR*-Genmutationen analysiert, die sich in den Exons 18, 19 und 21 befinden (Cosmic Database). Diese Mutationen wurden bei einer Vielzahl von malignen Tumoren beschrieben (siehe Kapitel 1.3.2.1). Von großem Interesse waren außerdem die möglichen Mutationen innerhalb des Exons 3, die bereits früher bei den SK demonstriert wurden (Hafner et al 2010b). Bei der Analyse wurde eine Punktmutation (1/58; 2%) identifiziert. Sie liegt innerhalb des Exons 21 und stellt nach der Cosmic Database die häufigste Punktmutation des *EGFR*-Gens dar. Es handelt sich um die Punktmutation p.L858R (c.2573T>G) im Codon 858, die durch die Transversion CTG → CGG gekennzeichnet ist und einen Austausch der Aminosäure Leucin durch Arginin verursacht (Tabelle 17, Abbildung 8). Diese Aberration wurde zum ersten Mal bei einer SK demonstriert. Um herauszufinden, ob es sich in diesem Fall um eine somatische oder eine Keimbahn-Mutation handelt, untersuchten wir die übrigen drei SK-Proben desselben Patienten. Diese zeigten keine Änderung in der Aminosäuresequenz. Die entdeckte Punktmutation stellt somit eine somatische Mutation dar. Um Artefakte sicher auszuschließen, wurde die Probe mit der identifizierten Mutation ein zweites Mal amplifiziert und anschließend erneut sequenziert. Im Gegensatz zu der Studie von Hafner et al (Hafner et al 2010b) zeigte Exon 3 keine Mutation.

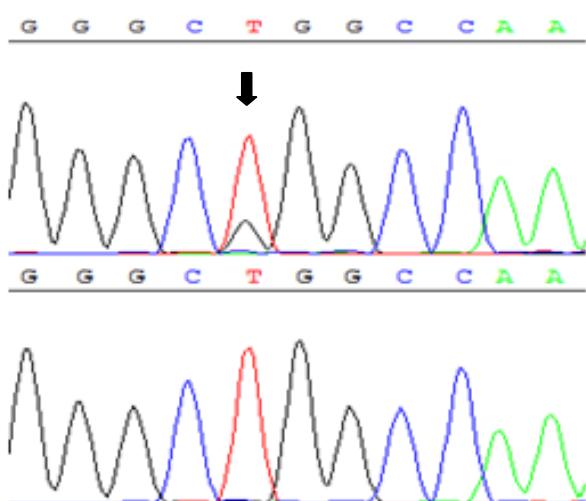


Abbildung 8: Darstellung der somatischen *EGFR*-Punktmutation c.2573T>G (p.L858R)

Abbildung 8 illustriert die somatische *EGFR*-Punktmutation c.2573T>G (p.L858R) (Pfeil), identifiziert bei Patient Nr. 3, in SK-Probe 19 (Tabelle 6). Sie wurde im Codon 858 entdeckt und zum ersten Mal bei einer SK beschrieben. Bei dieser Mutation wird die Aminosäure Leucin durch die Aminosäure Arginin innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne des *EGFR*-Gens ersetzt. Der zweite Teil der Abbildung zeigt zum Vergleich die Wildtyp-Sequenz.

4.4 Analyse der *RAS*-Genmutationen bei seborrhoischen Keratosen

Die *RAS*-Genanalyse wurde mit einem hoch sensitiven modifizierten SNaPshot® Multiplex Assay durchgeführt. Mittels zwei Sets mit spezifischen Primern (siehe Kapitel 3.3.7, Tabelle 5) wurden die am häufigsten vorkommenden *HRAS*-, *KRAS*- und *NRAS*-Hotspot-Mutationen (*HRAS* G12V, *KRAS* G12D, *NRAS* Q61L, *KRAS* G12V, *KRAS* G12S, *KRAS* G12C, *KRAS* Q61K, *HRAS* G13R, *HRAS* Q61L, *HRAS* Q61R, *NRAS* Q61R, *KRAS* G13D, *NRAS* G12V, *NRAS* Q61K und *KRAS* Q61L) analysiert. Sie befinden sich in den Exons 2 und 3 des jeweiligen Gens. Die Proben zeigten 3 verschiedene Genmutationen in 5 verschiedenen SK-Proben von unterschiedlichen Patienten (5/58, 9%): c.37G>C (p.G13R) - und c.182A>T (p.Q61L) -Punktmutation innerhalb des *HRAS*-Gens (Abbildung 9 und 10), sowie c.35G>T (p.G12V) -Punktmutation im Bereich des *KRAS*-Gens (Abbildung 11). Zwei SK-Proben (Probe Nr. 8 von Patient Nr. 2 und Probe Nr. 18 von Patient Nr. 3) zeigten die Punktmutation c.37G>C (p.G13R) im *HRAS*-Gen, innerhalb des Codons 13. In diesem Fall wird die Aminosäure Glycin durch die Aminosäure Arginin ersetzt. Um falsch-positive Punktmutationen auszuschließen, wurden zwei voneinander unabhängige PCR-Untersuchungen durchgeführt. Mittels Analyse der Proben desselben Patienten wurde nachgewiesen, dass die Punktmutation c.37G>C (p.G13R) in dem Fall eine somatische Mutation darstellte. Als Nächstes wurde eine c.182A>T (p.Q61L) -Punktmutation innerhalb des *HRAS*-Gens identifiziert. Sie befand sich im Exon 3 und ist durch einen Aminosäureaustausch von Glutamin durch Leucin innerhalb des Codons 61 gekennzeichnet. Diese lag in den SK der Patienten 7 und 12 vor, und zeigte sich als somatische Mutation. Die beiden Punktmutationen c.37G>C (p.G13R) und c.182A>T (p.Q61L) wurden zum ersten Mal bei der SK beschrieben. Die dritte Mutation – c.35G>T (p.G12V) – befand sich im Codon 12 des *KRAS*-Gens und verursacht einen Austausch der Aminosäure Glycin durch Valin. Diese Mutation wurde auf der Basis der Analyse aller Proben desselben Patienten als somatisch verifiziert. Die Tabelle 17 gibt einen Überblick über die identifizierten Mutationen. In der vorliegenden Studie wurden weiterhin Exon 2 und 3 des *NRAS*-Gens untersucht. Es zeigten sich keine Änderungen in der Aminosäuresequenz.

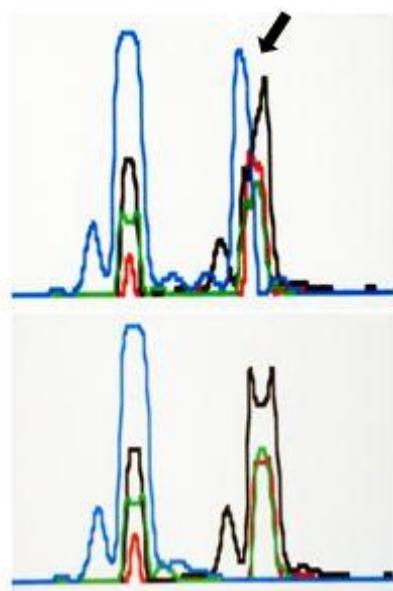


Abbildung 9: Darstellung der *HRAS*-Punktmutation p.G13R, identifiziert in der SK-Probe Nr. 18 von Patient Nr. 3

Die Abbildung zeigt die somatische *HRAS*-Punktmutation c.37G>C (p.G13R) (Pfeil), gefunden bei Patient Nr. 3, in Probe 18. Sie wurde im Codon 61 entdeckt und zum ersten Mal bei einer SK beschrieben. Zum Vergleich ist die Wildtyp-Sequenz der Basen in dieser Region dargestellt (unten).

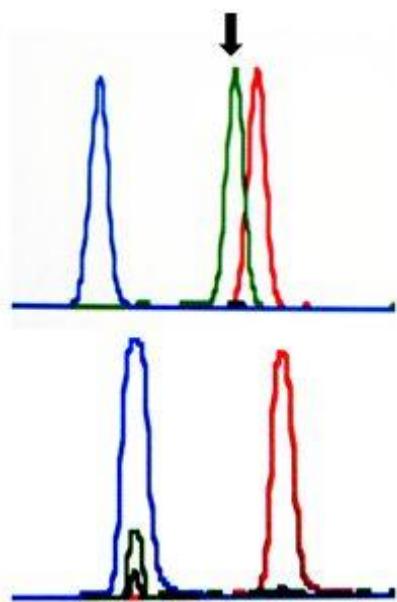


Abbildung 10: Darstellung der *HRAS*-Punktmutation p.Q61L in der SK-Probe Nr. 35 bei Patient Nr. 7

Abbildung 10 illustriert die bei SK-Probe Nr. 35 gefundene *HRAS*-Punktmutation c.182A>T (p.Q61L). Der Pfeil zeigt die Änderung der Basenabfolge von Adenin zu Thymin (oben) gegenüber der Wildtyp-Sequenz (unten), welche in einer Veränderung der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) resultiert. Die Aminosäure Glutamin wird durch die Aminosäure Leucin ersetzt.

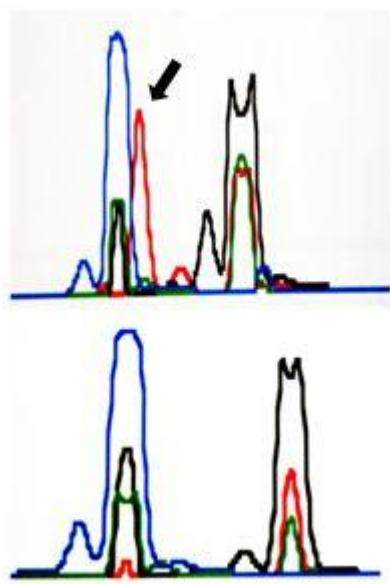


Abbildung 11: Darstellung der KRAS-Punktmutation p.G12V in der SK-Probe Nr. 52 bei Patient Nr. 13

Abbildung 11 zeigt die KRAS-Punktmutation p.G12V bei Patient Nr. 13 im Codon 12, innerhalb des Exons 2 (Gly → Val) auf, die nur in dem Tumorgewebe (oben) vorhanden war. Zum Vergleich ist die Wildtyp-Sequenz der Basen in dieser Region dargestellt (unten).

4.5 Analyse von *PIK3R1*-Mutationen bei seborrhoischen Keratosen

Die 58 SK-Proben wurden zusätzlich auf Genmutationen innerhalb des *PIK3R1*-Gens untersucht. Für die Analyse der Proben verwendeten wir ein standardisiertes Protokoll (siehe Kapitel 3.3.4.2) mit spezifisch ausgewählten Primerpaaren (Tabelle 4). Analysiert wurden die häufigsten Mutationen in den Exons 9, 10, 12 und 13 (G376R, E439del, KS459delN, D560Y, DKRMNS560del, N564K, R574fs, T576del und W583del) laut Cosmic Database. Interessant ist die Tatsache, dass alle 4 Proben des Patienten 5 einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (c1176C>T; p.F392F) innerhalb des Exons 9, im Codon 392 zeigten (Abbildung 12). Die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) in dieser Region blieb unverändert, was zu keiner Änderung der Struktur des *PIK3R1*-Proteins führte. Zur Bestätigung des Mutationsstatus wurden die Proben erneut durch eine unabhängige PCR amplifiziert und mittels Sanger-Methode analysiert.

Die genaue Aufstellung aller relevanten Mutationen ist in Tabelle 16 und Tabelle 17 wiedergegeben. Wir entdeckten keine somatischen Mutationen im *PIK3R1*-Gen.

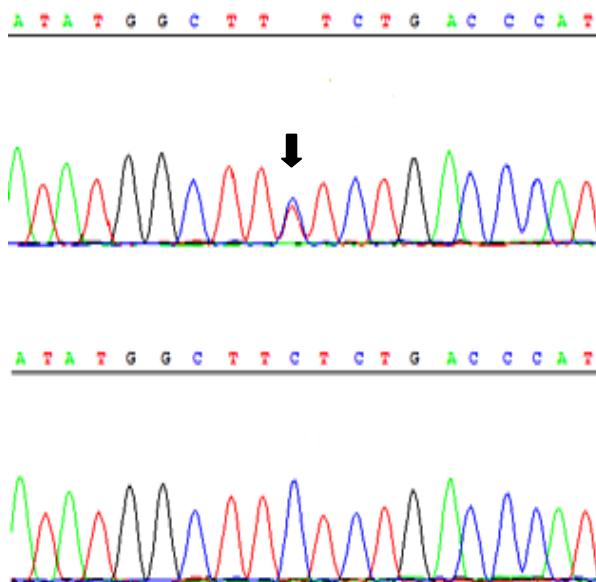


Abbildung 12: Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (c1176C>T; p.F392F) innerhalb des Exons 9, Codon 392 des PIK3R1-Gens bei Patient Nr. 5

Abbildung 12 stellt einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus innerhalb des PIK3R1-Gens dar (Pfeil). Diese „stille Mutation“ fand sich in allen 4 Proben (Probe Nr. 24-27) des Patienten 5, was für einen Keimbahn-Polymorphismus sprach. Zum Vergleich ist die Wildtyp-Sequenz dargestellt (unten).

4.6 FGFR2-Mutationsstatus bei seborrhoischen Keratosen

FGFR3 kodiert für eine transmembran liegende Rezeptor-Tyrosinkinase. Für den *FGFR3* wurden bereits in früheren Studien onkogene somatische Mutationen v.a. an den Positionen 248, 372, 373, 375, 393 und 652 in den Codons 7, 10 und 15 identifiziert (Hafner et al 2010b). Gain-of-function Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens wurden bei skelettalen Dysplasiesyndromen (de Ravel et al 2005, Gorry et al 1995, Jabs et al 1994, Park et al 1995, Passos-Bueno et al 1999, Przylepa et al 1996, Rutland et al 1995, Wilkie et al 1995), multiplem Myelom (Chesi et al 1997, Chesi et al 2001) sowie Harnblasen- und Ovarial-Karzinomen (Billerey et al 2001, Cappellen et al 1999) beschrieben. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die genetische Struktur des *FGFR3* zu 65% der des *FGFR2* entspricht. Analog zu den onkogenen Mutationen bei *FGFR3*, die v.a. in der extrazellulären Domäne der Linker-Region zwischen der Ig-like Domäne II und III lokalisiert sind, konzentrierten sich unsere Analysen auf die onkogenen Mutationen innerhalb der Exons 7, 9, 12 und 14 des *FGFR2*-Gens. Mit der Auswahl der Primer (Tabelle 4) wurde versucht, die Hotspot-Mutationen von *FGFR2* zu erfassen. Die DNA wurde amplifiziert, danach direkt durch Sanger-Technik sequenziert (siehe Kapitel 3.3.6.2 – 3.3.6.4) und mittels Sequencing Programm mit dem Wildtyp verglichen und ausgewertet. Die Experimente zeigten jedoch keine onkogenen Mutationen innerhalb des *FGFR2* bei den 58 SK.

5 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die seborrhoischen Keratosen (SK), auch synonym als Verrucae seborrhoicae seniles, Alterswarzen, Basalzellakanthome, Basalzellpapillome, benigne Akanthokeratosen oder seborrhoische Warzen bezeichnet, stellen häufig vorkommende benigne epidermale Tumoren der Haut dar, denen der Dermatologe oft in seinem Alltag als Nebenbefund begegnet (Furue et al 2011, Hafner und Vogt 2008, Yeatman et al 1997). Sie zeichnen sich durch eine große morphologische Variationsbreite aus.

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass es neben den bereits beschriebenen weitere bisher unentdeckte onkogene Mutationen innerhalb der Gene *EGFR* und *HRAS* gibt, die in die Pathogenese der SK involviert sind.

Signaltransduktionswege sind in zahlreiche Zellprozesse involviert. Mit ihrer Aktivierung können extrazelluläre Signale Reaktionen in der Zelle hervorrufen. Die RAS-Raf-MAPK-Kaskade steuert vor allem Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und das Überleben der Zelle. Die Kaskade besteht aus mehreren intrazellulären Komponenten – Protein-(Serin/Threonin)-Kinasen, auch als mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) bezeichnet, – die sich gegenseitig durch Phosphorylierung aktivieren. Dieser Prozess wird durch ein extrazelluläres Signal in Form von Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF, FGF, VEGF, PDGF oder Hormone getriggert (Sridhar et al 2005). Dadurch wird ein Signalmolekül erzeugt, das an der Zelloberfläche an eine Rezeptor-Tyrosinkinase bindet (Abbildung 4). Die Rezeptor-Tyrosinkinase ist ihrerseits an dem Grb2-Protein gebunden, das die Aktivierung des SOS-Faktors (ein GTP/GDP-Austausch-Faktor) kontrolliert. Als Folge beobachtet man den Übergang der inaktiven GDP-gebundenen Form des RAS-Proteins in seine aktive GTP-gebundene Form (Hilger et al 2002). Als nächster Schritt in der Signaltransduktionskaskade wird die MAPK-Kinase aktiviert. Sie phosphoryliert und aktiviert MAPK, die wiederum mehr als 50 bisher identifizierte Substrate hat (Hilger et al 2002). Zu diesen gehören z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Phospholipasen, Proteine des Zytoskeletts, und andere Proteine, die im Zytosol oder im Nukleus lokalisiert sind. Die freigesetzten Signalmoleküle erreichen z.B. den Nukleus, wo sie die Genexpression durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren kontrollieren. Die extrazellulären Signale werden somit in Zellreaktionen umgesetzt. Die onkogenen Mutationen resultieren in einer konstitutiven Aktivierung von essentiellen Signalkaskaden, die unabhängig von der Ligandenbindung stimuliert werden. Solche Mutationen werden als „hallmarks“ von Tumoren bezeichnet (Hanahan und Weinberg 2011). Interessanterweise wurden durch aktuelle Studien

onkogene Mutationen nachgewiesen, die sowohl bei benignen als auch malignen Tumoren vorkommen können. Beispiel dafür sind die onkogenen *BRAF*-Mutationen. Studien demonstrierten, dass sie sowohl bei benignen melanozytären Naevi als auch bei malignen Melanomen vorhanden sind (Dankort et al 2009, Pollock et al 2003). Es ist zwar möglich, dass sich die melanozytären Naevi in ein malignes Melanom umwandeln, die meisten bleiben jedoch benigne, weil sie eine Onkogen-induzierte Seneszenz zeigen (Michaloglou et al 2005). SK stellen einen benignen Tumor ohne relevantes Entartungspotential dar. Trotz ihrer genetischen Stabilität (Hafner et al 2010b, Hallermann et al 2004) zeigen diese epidermalen Hauttumoren multiple onkogene Mutationen, in 50% der Fälle wurden sogar gleichzeitig zwei onkogene somatische Mutationen nachgewiesen (Hafner et al 2010b). Im Gegensatz zu den benignen melanozytären Naevi spielt bei den SK die Onkogen-induzierte Seneszenz keine Rolle. Der genaue Wirkungsmechanismus, der die SK vor dem malignen Progress schützt, ist noch unbekannt. Die genetische Stabilität sowie die fehlenden genetischen Alterationen in Tumor-Suppressor-Genen könnten hier eine wichtige Rolle spielen (Hafner et al 2010b). Basierend auf diesen Überlegungen kann man behaupten, dass die onkogenen Mutationen nicht die einzige Voraussetzung sind, die zu Malignität und Tumorprogress führt (Lazebnik 2010, Woodman und Mills 2010). Die Mutationen können jedoch als Triggerfaktoren, wenn sich der maligne Tumor in seiner Manifestationsphase befindet, eine Rolle spielen.

Die SK stellt mit ihrer hohen Prävalenz beim Menschen sowie ihrer guten Zugänglichkeit ein perfektes Modell dar, um die Inzidenz und die Funktion von onkogenen Mutationen in benignen Tumoren zu untersuchen. Das Ziel dieser Studie war, neue onkogene Mutationen in ausgewählten Genen bei den humanen SK zu identifizieren. Anhand der früher durchgeführten experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass in ca. 89% der untersuchten SK onkogene Mutationen vorhanden sind, die eine Aktivierung des RAS-Raf-MAPK- und PI3K-AKT-Signalwegs verursachen können (Hafner et al 2010b).

Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGFR sind signifikante Komponenten dieser Signaltransduktionswege. Ihre Beteiligung an der Tumorzellproliferation sowie der Tumorprogression ist erwiesen. Darum ist das Wissen um die Eigenschaften und die Funktion der Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR ein wichtiger Angriffspunkt bei dem Verständnis und der Therapie von malignen Tumoren. Änderungen in deren Struktur durch onkogene Mutationen wurden in zahlreichen malignen Tumoren beschrieben. Dazu gehören das Mamma-Karzinom (Teng et al 2011), das nicht-kleinzelige Lungenkarzinom (Kato et al 2010, Tapia et al 2009), das Glioblastom (Wong et al 1987), das kolorektale Karzinom (Lankiewicz et al 2008), das Prostatakarzinom (Peraldo-Neia et al 2011), das epitheliale Ovarialkarzinom (Maihle et al

2002), das Plattenepithelkarzinom der Haut (Mauerer et al 2011) und andere Neoplasien. Die Mehrzahl der identifizierten *EGFR*-Genmutationen befindet sich innerhalb der Exons 18, 19 und 21. Wenig erforscht sind die Prävalenz und die Bedeutung dieser onkogenen Mutationen in benignen Läsionen. Eine frühere Studie von Hafner et al (Hafner et al 2010b) demonstrierte eine aktivierende somatische onkogene *EGFR*-Mutation im Exon 3 (R108K) in einer von 14 SK. Durch das verwendete OncoCarta® Panel wurden jedoch nicht alle Hotspot-Lokalisationen innerhalb des *EGFR*-Gens abgedeckt. In der vorliegenden Studie konzentrierten wir uns auf die Exons 3, 18, 19 und 21. Wir fanden eine aktivierende *EGFR*-Punktmutation, p.L858R (c.2573T>G), in einer akanthotischen SK. Diese wurde zum ersten Mal in einem benignen Tumor identifiziert und beschrieben. Diese Punktmutation gehört zu den häufigsten onkogenen *EGFR*-Mutationen und kommt in einer Vielzahl von malignen Tumoren vor, wie z.B. dem Lungenkarzinom, dem Ösophaguskarzinom oder dem Mammakarzinom (Cosmic Database). In Studien förderte diese Mutation die Suppression der proapoptotischen Zellsignale (Kumar et al 2008, Sordella et al 2004). Im Gegensatz zu der früheren Studie von Hafner et al (Hafner et al 2010b) konnten wir keine onkogenen Mutationen innerhalb des Exons 3 nachweisen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die somatische *EGFR*-Punktmutation p.L858R eine signifikante, jedoch wohl aber seltene Mutation bei der SK ist.

Die onkogenen somatischen *RAS*-Mutationen sind in ca. 30% der humanen Tumoren präsent (Schubbert et al 2007). Sie sind sowohl in malignen Tumoren wie dem duktalen Adenokarzinom des Pankreas (Caldas und Kern 1995), dem Magenkarzinom (Chen et al 2011), dem Kolonkarzinom, dem Gallenblasenkarzinom (Kim et al 2000), dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Krypuy et al 2006), dem hepatzellulären Karzinom (Newell et al 2009), dem Harnblasenkarzinom (Kompier et al 2010), dem Zervixkarzinom, dem Schilddrüsenkarzinom (Milasin et al 1993), dem Basalzellkarzinom, dem spinozellulären Karzinom (Daya-Grosjean et al 1993), als auch in benignen Läsionen wie dem Keratoakanthom (Corominas et al 1989), dem Spitz Naevus (Da Forno et al 2009, van Engen-van Grunsven et al 2010), dem keratinozytischen epidermalen Naevus (Bourdeaut et al 2010, Hafner et al 2011, Hafner et al 2012), dem Naevus sebaceus (Groesser et al 2012b) sowie in lichenoiden Keratosen (Groesser et al 2012a) vorhanden. *KRAS*- und *HRAS*-Mutationen wurden weiterhin bei den SK beobachtet. Die Prävalenz der onkogenen *KRAS*-Mutationen in der Studie von Hafner et al (2010) lag bei 20%, die der *HRAS*-Mutationen bei 3% der untersuchten SK (Hafner et al 2010b). Die Genanalyse umfasste nur wenige SK, so dass eine weitere Untersuchung notwendig war, um die Rolle dieser Mutationen in der Ätiologie der

SK zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit analysierte weitere signifikante Genloci der *RAS*-Genfamilie in den SK. Die Experimente wurden mithilfe eines hoch sensitiven SNaPshot® Multiplex Assays durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.7). Anhand dieser Studie wurden insgesamt 5 onkogene *RAS*-Mutationen unter den 58 untersuchten Hauttumoren (5/58, 9%) identifiziert. Eine *KRAS*-Mutation p.G12V (c.35G>T) befand sich in Probe Nr. 52 (Tabelle 6), somit lag die Prävalenz der *KRAS*-Mutationen in unserer Studie deutlich niedriger im Vergleich zu der Studie von Hafner et al (Hafner et al 2010b). Jedoch zeigt sich die *KRAS*-Mutation p.G12V häufiger in den malignen humanen Tumoren. Laut Cosmic Database kommt sie in Tumoren wie dem Pankreaskarzinom, dem Lungenkarzinom, dem Ovarialkarzinom oder dem Harnblasenkarzinom vor. Interessante Erkenntnisse auf diesem Gebiet demonstrierte auch die Studie von Daya-Grosjean et al (1993), die die *KRAS*-Mutation p.G12V bei den nicht melanozytären Hauttumoren Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom beschrieb (Daya-Grosjean et al 1993). Inwieweit jedoch die *KRAS*-Mutation p.G12V Einfluss auf die Entwicklung der SK nimmt, ist unbekannt.

Weitere Untersuchungen erfolgten im Bereich der Codons 12, 13 und 61 des *HRAS*-Gens, wo wir 4 onkogene Mutationen bei den 58 SK (7%) identifizierten. Diese Mutationen zeigten eine höhere Frequenz im Vergleich zur früheren Studie von Hafner et al (Hafner et al 2010b). Die beiden *HRAS*-Mutationen p.G13R (c.37G>C) und p.Q61L (c.182A>T) sind in dieser Studie zum ersten Mal bei den SK beschrieben worden. Die onkogene *HRAS*-Mutation p.G13R wurde bei einer Vielzahl von malignen Tumoren wie unter anderem dem Schilddrüsenkarzinom, dem Plattenepithelkarzinom der Haut, dem Harnblasenkarzinom, dem Nierenkarzinom oder dem Prostatakarzinom demonstriert (Cosmic Database). Sie stellt außerdem die häufigste Mutation im Naevus sebaceus dar (Groesser et al 2012b). Die p.Q61L-Punktmutation wurde in Tumorzellen des malignen Melanoms, des Plattenepithelkarzinoms der Haut, des Prostatakarzinoms, des Urothelkarzinoms, des Lungenkarzinoms u.a. (Cosmic Database) beobachtet. Die beiden gefundenen onkogenen somatischen Mutationen beteiligen sich somit sowohl an Prozessen, die zu gutartigen Tumoren führen, spielen aber auch in malignen Tumoren eine signifikante Rolle. Aus diesem Grund präsentieren sie ein interessantes Gebiet für die Tumorgrundlagenforschung und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass *NRAS*-Mutationen in niedriger Prävalenz in den keratinozytischen epidermalen Naevi vorhanden sind, die eine sehr ähnliche Histopathologie zu der SK zeigen, haben wir versucht, *NRAS*-Mutationen in den SK nachzuweisen. Hotspot-Mutationen innerhalb des *NRAS*-Gens waren in den ausgewählten Hauttumoren jedoch

abwesend (Tabelle 6). Ob Mutationen an anderen nicht untersuchten Loci in diesem Gen in der Ätiologie der SK eine Rolle spielen, bleibt noch ungewiss.

Ein weiteres Untersuchungsobjekt dieser Doktorarbeit stellte das *FGFR2*-Gen dar. Die Fibroblast-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Genfamilie ist ein wichtiger Regulator der frühen embryonalen Entwicklung, Morphogenese, Angiogenese, Wundheilung und der Tumorigenese (McKeehan et al 1998, Yamaguchi und Rossant 1995). Gain-of-function *FGFR3*-Mutationen wurden sowohl in benignen als auch in malignen Tumoren, wie z.B. dem multiplen Myelom, Harnblasenkarzinom, Zervixkarzinom (Cappellen et al 1999), epidermalen Naevus (Hafner et al 2006b, Hafner et al 2006c, Hafner et al 2007c, Toll und Real 2008) und der SK (Hafner et al 2006a, Hafner et al 2006c, Hafner et al 2007a, Hafner et al 2007b, Hafner et al 2008, Hafner et al 2010a, Hafner et al 2010b, Logie et al 2005) identifiziert. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass 65% der molekularen Struktur des *FGFR3*-Gens der des *FGFR2*-Gens entspricht, sowie unter der Vermutung, dass *FGFR2* eine signifikante Rolle in der Pathogenese der SK spielt, suchten wir analog zu den bisher gefundenen *FGFR3*-Mutationen nach Hotspot-Mutationen innerhalb des *FGFR2*-Gens in den Exons 7, 9, 12 und 14. Die Analyse zeigte keine Mutationen in diesen Genloci, was nahelegt, dass *FGFR2*-Mutationen keine wesentliche Bedeutung in der Pathogenese der SK haben.

Untersucht wurde auch die Funktion des *PIK3R1*-Gens in der Ätiologie der SK. Im Gegensatz zu den multiplen Mutationen, die in ca. 50% der Fälle im *PIK3CA* (katalytische Untereinheit der PI3K) der SK nachgewiesen wurden, zeigte *PIK3R1* keine onkogenen Punktmutationen. Dies führt zu dem Schluss, dass Mutationen in der regulatorischen PI3K-Untereinheit kaum Einfluss auf die Entwicklung der SK haben. Interessant für die Studie waren außerdem 4 SK-Proben des Patienten Nr. 5, die einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (p.F392F, c.1176C>T) enthielten. Der Einzel-Nukleotid-Polymorphismus lag im Exon 9, Codon 392 des *PIK3R1*-Gens und verursachte keine Änderung in der Aminosäuresequenz, was zu keiner Änderung der Struktur des *PIK3R1*-Proteins führte. Es ist jedoch noch nicht klar, ob dieser Einzel-Nukleotid-Polymorphismus von sonstiger Relevanz für die Proteinfunktion ist.

Zusammenfassend wird durch diese Studie deutlich, dass onkogene *HRAS*-, *KRAS*- und *EGFR*-Mutationen in die molekulare Pathogenese der SK involviert sind, die aber im Vergleich zu *FGFR3*- und *PIK3CA*-Mutationen in niedriger Frequenz vorkommen. Es bleibt bisher unklar, weshalb diese onkogenen Mutationen in bestimmten Organsystemen maligne Tumoren hervorrufen können, während sie in der Haut gutartige SK ohne Malignitätspotential induzieren. Weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung sind wünschenswert.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Barbacid M (1987). Ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**: 779-827.
- Barron LA, Prendiville JS (1992). The sign of Leser-Trelat in a young woman with osteogenic sarcoma. *J Am Acad Dermatol* **26**: 344-347.
- Bedi TR (1977). Familial congenital multiple seborrheic verrucae. *Arch Dermatol* **113**: 1441-1442.
- Belleudi F, Purpura V, Torrisi MR (2011). The receptor tyrosine kinase FGFR2b/KGFR controls early differentiation of human keratinocytes. *PLoS One* **6**: e24194.
- Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B *et al* (2001). Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* **158**: 1955-1959.
- Binet O, Audefray D, Beltzer-Garelly E, Gauchy O, Cesarini JP (1986). [Haber's syndrome. First French family (2 cases)]. *Ann Dermatol Venereol* **113**: 43-50.
- Bourdeaut F, Herault A, Gentien D, Pierron G, Ballet S, Reynaud S *et al* (2010). Mosaicism for oncogenic G12D KRAS mutation associated with epidermal nevus, polycystic kidneys and rhabdomyosarcoma. *J Med Genet* **47**: 859-862.
- Braun RP, Krischer J, Saurat JH (2000). The "wobble sign" in epiluminescence microscopy as a novel clue to the differential diagnosis of pigmented skin lesions. *Arch Dermatol* **136**: 940-942.
- Caldas C, Kern SE (1995). K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* **18**: 1-6.
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X *et al* (1999). Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* **23**: 18-20.
- Ceylan C, Alper S, Kilinc I (2002). Leser-Trelat sign. *Int J Dermatol* **41**: 687-688.
- Chen HC, Chen HJ, Khan MA, Rao ZZ, Wan XX, Tan B *et al* (2011). Genetic mutations of p53 and k-ras in gastric carcinoma patients from Hunan, China. *Tumour Biol* **32**: 367-373.
- Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM *et al* (1997). Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* **16**: 260-264.
- Chesi M, Brents LA, Ely SA, Bais C, Robbiani DF, Mesri EA *et al* (2001). Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* **97**: 729-736.
- Cohn MS, Classen RF (1993). The sign of Leser-Trelat associated with adenocarcinoma of the rectum. *Cutis* **51**: 255-257.
- Cole PD, Hatef DA, Kaufman Y, Pozner JN (2009). Laser therapy in ethnic populations. *Semin Plast Surg* **23**: 173-177.
- Corominas M, Kamino H, Leon J, Pellicer A (1989). Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): is HRAS involved in differentiation as well as proliferation? *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6372-6376.

- Da Forno PD, Pringle JH, Fletcher A, Bamford M, Su L, Potter L *et al* (2009). BRAF, NRAS and HRAS mutations in spitzoid tumours and their possible pathogenetic significance. *Br J Dermatol* **161**: 364-372.
- Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr. *et al* (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* **41**: 544-552.
- Daya-Grosjean L, Robert C, Drougard C, Suarez H, Sarasin A (1993). High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res* **53**: 1625-1629.
- de Ravel TJ, Taylor IB, Van Oostveldt AJ, Fryns JP, Wilkie AO (2005). A further mutation of the FGFR2 tyrosine kinase domain in mild Crouzon syndrome. *Eur J Hum Genet* **13**: 503-505.
- Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, Ramos AH, Onofrio RC, Hatton C *et al* (2008). Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8713-8717.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 139-149.
- Furue M, Yamazaki S, Jimbow K, Tsuchida T, Amagai M, Tanaka T *et al* (2011). Prevalence of dermatological disorders in Japan: a nationwide, cross-sectional, seasonal, multicenter, hospital-based study. *J Dermatol* **38**: 310-320.
- Gartside MG, Chen H, Ibrahim OA, Byron SA, Curtis AV, Wellens CL *et al* (2009). Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Cancer Res* **7**: 41-54.
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B (1985). Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **130**: 118-126.
- Gorry MC, Preston RA, White GJ, Zhang Y, Singhal VK, Losken HW *et al* (1995). Crouzon syndrome: mutations in two spliceoforms of FGFR2 and a common point mutation shared with Jackson-Weiss syndrome. *Hum Mol Genet* **4**: 1387-1390.
- Graham-Brown RA, Berth-Jones J, Dure-Smith B, Naafs B, Pembroke AC, Harth W *et al* (1990). Dermatologic problems for immigrant communities in a Western environment. *Int J Dermatol* **29**: 94-101.
- Greer KE, Hawkins H, Hess C (1978). Leser-Trelat associated with acute leukemia. *Arch Dermatol* **114**: 1552.
- Groesser L, Herschberger E, Landthaler M, Hafner C (2012a). FGFR3, PIK3CA and RAS mutations in benign lichenoid keratosis. *Br J Dermatol* **166**: 784-788.
- Groesser L, Herschberger E, Ruetten A, Ruivenkamp C, Lopriore E, Zutt M *et al* (2012b). Postzygotic HRAS and KRAS mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning syndrome. *Nat Genet* **44**: 783-787.
- Gulias-Canizo R, Aranda-Rabago J, Rodriguez-Reyes AA (2006). [Seborrheic keratosis of conjunctiva: a case report]. *Arch Soc Esp Oftalmol* **81**: 217-219.
- Gushi A, Kanekura T, Kanzaki T, Eizuru Y (2003). Detection and sequences of human papillomavirus DNA in nongenital seborrhoeic keratosis of immunopotent individuals. *J Dermatol Sci* **31**: 143-149.

- Hafner C, van Oers JM, Hartmann A, Landthaler M, Stoehr R, Blaszyk H *et al* (2006a). High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol* **126**: 2404-2407.
- Hafner C, van Oers JM, Vogt T, Landthaler M, Stoehr R, Blaszyk H *et al* (2006b). Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest* **116**: 2201-2207.
- Hafner C, Vogt T, Hartmann A (2006c). FGFR3 mutations in benign skin tumors. *Cell Cycle* **5**: 2723-2728.
- Hafner C, Hartmann A, Real FX, Hofstaedter F, Landthaler M, Vogt T (2007a). Spectrum of FGFR3 mutations in multiple intraindividual seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol* **127**: 1883-1885.
- Hafner C, Hartmann A, van Oers JM, Stoehr R, Zwarthoff EC, Hofstaedter F *et al* (2007b). FGFR3 mutations in seborrheic keratoses are already present in flat lesions and associated with age and localization. *Mod Pathol* **20**: 895-903.
- Hafner C, Hartmann A, Vogt T (2007c). FGFR3 mutations in epidermal nevi and seborrheic keratoses: lessons from urothelium and skin. *J Invest Dermatol* **127**: 1572-1573.
- Hafner C, Lopez-Knowles E, Luis NM, Toll A, Baselga E, Fernandez-Casado A *et al* (2007d). Oncogenic PIK3CA mutations occur in epidermal nevi and seborrheic keratoses with a characteristic mutation pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13450-13454.
- Hafner C, Vogt T (2008). Seborrheic keratosis. *J Dtsch Dermatol Ges* **6**: 664-677.
- Hafner C, Vogt T, Landthaler M, Musebeck J (2008). Somatic FGFR3 and PIK3CA mutations are present in familial seborrheic keratoses. *Br J Dermatol* **159**: 214-217.
- Hafner C, Di Martino E, Pitt E, Stempfl T, Tomlinson D, Hartmann A *et al* (2010a). FGFR3 mutation affects cell growth, apoptosis and attachment in keratinocytes. *Exp Cell Res* **316**: 2008-2016.
- Hafner C, Hartmann A (2010). [R248C FGFR3 mutation. Effect on cell growth, apoptosis and attachment in HaCaT keratinocytes]. *Pathologe* **31 Suppl 2**: 221-224.
- Hafner C, Toll A, Fernandez-Casado A, Earl J, Marques M, Acquadro F *et al* (2010b). Multiple oncogenic mutations and clonal relationship in spatially distinct benign human epidermal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20780-20785.
- Hafner C, Toll A, Real FX (2011). HRAS mutation mosaicism causing urothelial cancer and epidermal nevus. *N Engl J Med* **365**: 1940-1942.
- Hafner C, Toll A, Gantner S, Mauerer A, Lurkin I, Acquadro F *et al* (2012). Keratinocytic epidermal nevi are associated with mosaic RAS mutations. *J Med Genet* **49**: 249-253.
- Halevy S, Halevy J, Feuerman EJ (1980). The sign of Leser-Trelat in association with lymphocytic lymphoma. *Dermatologica* **161**: 183-186.
- Hallermann C, Gunawan B, Bertsch HP (2004). No chromosomal imbalances in seborrheic keratoses detectable by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol* **123**: 1204-1205.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Hardy RD, Duvic M, Bleyer WA (1997). The sign of Leser-Trelat. *Medical and pediatric oncology* **28**: 234-237.

- Harvey JJ (1964). An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* **204**: 1104-1105.
- Heaphy MR, Jr., Millns JL, Schroeter AL (2000). The sign of Leser-Trelat in a case of adenocarcinoma of the lung. *J Am Acad Dermatol* **43**: 386-390.
- Heffernan MP, Khavari PA (1998). Raindrop seborrheic keratoses: a distinctive pattern on the backs of elderly patients. *Arch Dermatol* **134**: 382-383.
- Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**: 511-518.
- Hirano T, Yoshioka H, Manabe T (1993). A case of pancreatic cancer with the sign of Leser-Trelat. *Nihon Geka Hokan* **62**: 203-208.
- Indsto JO, Kumar S, Wang L, Crotty KA, Arbuckle SM, Mann GJ (2007). Low prevalence of RAS-RAF-activating mutations in Spitz melanocytic nevi compared with other melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* **34**: 448-455.
- Ingersoll RG, Paznekas WA, Tran AK, Scott AF, Jiang G, Jabs EW (2001). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations. *Cytogenet Cell Genet* **94**: 121-126.
- Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M *et al* (1994). Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat Genet* **8**: 275-279.
- Jang JH, Shin KH, Park JG (2001). Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* **61**: 3541-3543.
- Johnson DE, Williams LT (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* **60**: 1-41.
- Kaplan DL, Jegesothy B (1984). The sign of Leser-Trelat associated with primary lymphoma of the brain. *Cutis* **34**: 164-165.
- Kato Y, Peled N, Wynes MW, Yoshida K, Pardo M, Mascaux C *et al* (2010). Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations. *J Thorac Oncol* **5**: 1551-1558.
- Kechijian P, Sadick NS, Mariglio J, Schulman P (1979). Cytarabine-induced inflammation in the seborrheic keratoses of Leser-Trelat. *Ann Intern Med* **91**: 868-869.
- Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN (2003). The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol* **120**: 1087-1093.
- Kim JH, Bae HW, Lee KK, Kim TI, Kim EK (2009). Seborrheic keratosis of the conjunctiva: a case report. *Korean J Ophthalmol* **23**: 306-308.
- Kim SW, Her KH, Jang JY, Kim WH, Kim YT, Park YH (2000). K-ras oncogene mutation in cancer and precancerous lesions of the gallbladder. *J Surg Oncol* **75**: 246-251.
- Kirsten WH, Mayer LA (1967). Morphologic responses to a murine erythroleukemia virus. *J Natl Cancer Inst* **39**: 311-335.

Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, van Rhijn BW, van der Kwast TH, Zwarthoff EC (2010). FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One* **5**: e13821.

Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A (2006). High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **6**: 295.

Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ (2008). Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* **26**: 1742-1751.

Kwon OS, Hwang EJ, Bae JH, Park HE, Lee JC, Youn JI *et al* (2003). Seborrheic keratosis in the Korean males: causative role of sunlight. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **19**: 73-80.

L'Hote CG, Knowles MA (2005). Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* **304**: 417-431.

Lankiewicz S, Rother E, Zimmermann S, Hollmann C, Korangy F, Greten TF (2008). Tumour-associated transcripts and EGFR deletion variants in colorectal cancer in primary tumour, metastases and circulating tumour cells. *Cell Oncol* **30**: 463-471.

Lazebnik Y (2010). What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* **10**: 232-233.

Lee DH, Lee GK, Kong SY, Kook MC, Yang SK, Park SY *et al* (2007). Epidermal growth factor receptor status in anaplastic thyroid carcinoma. *J Clin Pathol* **60**: 881-884.

Lee JC, Vivanco I, Beroukhim R, Huang JH, Feng WL, DeBiasi RM *et al* (2006). Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* **3**: e485.

Li YH, Chen G, Dong XP, Chen HD (2004). Detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in nongenital seborrheic keratosis. *Br J Dermatol* **151**: 1060-1065.

Lindelof B, Sigurgeirsson B, Melander S (1992). Seborrheic keratoses and cancer. *J Am Acad Dermatol* **26**: 947-950.

Löffler G (2000). Gentechnik. In: Löffler G (ed). *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: Deutschland. pp 350-359.

Logie A, Dunois-Larde C, Rosty C, Levrel O, Blanche M, Ribeiro A *et al* (2005). Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Human Molecular Genetics* **14**: 1153-1160.

Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A *et al* (2006). PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res* **66**: 7401-7404.

Lu'o'ng K, Nguyen LT (2013). The roles of vitamin D in seborrheic keratosis: possible genetic and cellular signalling mechanisms. *Int J Cosmet Sci* **35**: 525-531.

Lynch HT, Fusaro RM, Pester JA, Lynch JF (1982). Leser-Trelat sign in mother and daughter with breast cancer. *J Med Genet* **19**: 218-221.

- Mabuchi T, Akasaka E, Kondoh A, Umezawa Y, Matsuyama T, Ozawa A (2008). Seborrheic keratosis that follows Blaschko's lines. *J Dermatol* **35**: 301-303.
- Maihle NJ, Baron AT, Barrette BA, Boardman CH, Christensen TA, Cora EM *et al* (2002). EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* **107**: 247-258.
- Malumbres M, Barbacid M (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**: 459-465.
- Marks JL, McLellan MD, Zakowski MF, Lash AE, Kasai Y, Broderick S *et al* (2007). Mutational analysis of EGFR and related signaling pathway genes in lung adenocarcinomas identifies a novel somatic kinase domain mutation in FGFR4. *PLoS One* **2**: e426.
- Mauerer A, Herschberger E, Dietmaier W, Landthaler M, Hafner C (2011). Low incidence of EGFR and HRAS mutations in cutaneous squamous cell carcinomas of a German cohort. *Exp Dermatol* **20**: 848-850.
- McKeehan WL, Wang F, Kan M (1998). The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **59**: 135-176.
- Memon AA, Tomenson JA, Bothwell J, Friedmann PS (2000). Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *Br J Dermatol* **142**: 1154-1159.
- Meyers GA, Day D, Goldberg R, Daentl DL, Przylepa KA, Abrams LJ *et al* (1996). FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing. *Am J Hum Genet* **58**: 491-498.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM *et al* (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**: 720-724.
- Milasin J, Pujic N, Dedovic N, Gavric M, Vranic V, Petrovic V *et al* (1993). H-ras gene mutations in salivary gland pleomorphic adenomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* **22**: 359-361.
- Mishima Y, Pinkus H (1960). Benign mixed tumor of melanocytes and malpighian cells. Melanoacanthoma: Its relationship to Bloch's benign non-nevoid melanoepithelioma. *Arch Dermatol* **81**: 539-550.
- Mullis K, Falloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM (1996). Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* **13**: 233-237.
- Network CGAR (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**: 1061-1068.
- Newell P, Toffanin S, Villanueva A, Chiang DY, Minguez B, Cabellos L *et al* (2009). Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. *J Hepatol* **51**: 725-733.
- Ornitz DM, Marie PJ (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* **16**: 1446-1465.
- Ozbay M, Kinis V, Firat U, Bakir S, Yorgancilar E (2012). Seborrheic keratosis of the external auditory canal in a 1-year-old boy. *Turk J Pediatr* **54**: 543-544.

- Park WJ, Meyers GA, Li X, Theda C, Day D, Orlow SJ *et al* (1995). Novel FGFR2 mutations in Crouzon and Jackson-Weiss syndromes show allelic heterogeneity and phenotypic variability. *Hum Mol Genet* **4**: 1229-1233.
- Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertie AL, Alonso LG, Kitoh H (1999). Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* **14**: 115-125.
- Peraldo-Neia C, Migliardi G, Mello-Grand M, Montemurro F, Segir R, Pignochino Y *et al* (2011). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer* **11**: 31.
- Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH *et al* (2001). The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* **61**: 7426-7429.
- Pines G, Kostler WJ, Yarden Y (2010). Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett* **584**: 2699-2706.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM *et al* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**: 19-20.
- Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H *et al* (2007). Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* **26**: 7158-7162.
- Ponti G, Luppi G, Losi L, Giannetti A, Seidenari S (2010). Leser-Trelat syndrome in patients affected by six multiple metachronous primitive cancers. *J Hematol Oncol* **3**: 2.
- Przylepa KA, Paznekas W, Zhang M, Golabi M, Bias W, Bamshad MJ *et al* (1996). Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nat Genet* **13**: 492-494.
- Robertson SC, Tynan JA, Donoghue DJ (2000). RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad. *Trends Genet* **16**: 265-271.
- Rongioletti F, Corbella L, Rebora A (1988). Multiple familial seborrheic keratoses. *Dermatologica* **176**: 43-45.
- Roymans D, Slegers H (2001). Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* **268**: 487-498.
- Rutland P, Pulleyn LJ, Reardon W, Baraitser M, Hayward R, Jones B *et al* (1995). Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nat Genet* **9**: 173-176.
- Sanderson KV, Wilson HT (1965). Haber's Syndrome. Familial Rosacea-Like Eruption with Intraepidermal Epithelioma. *Br J Dermatol* **77**: 1-8.
- Schlessinger J (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-225.
- Schlessinger J (2004). Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* **306**: 1506-1507.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**: 295-308.
- Schwartz RA (1996). Sign of Leser-Trelat. *J Am Acad Dermatol* **35**: 88-95.

Schwengle LE, Rampen FH, Wobbes T (1988). Seborrhoeic keratoses and internal malignancies. A case control study. *Clin Exp Dermatol* **13**: 177-179.

Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T *et al* (1983). Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 2112-2116.

Sjodahl G, Lauss M, Gudjonsson S, Liedberg F, Hallden C, Chebil G *et al* (2011). A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One* **6**: e18583.

Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **305**: 1163-1167.

Sridhar SS, Hedley D, Siu LL (2005). Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* **4**: 677-685.

Stieler W, Plewig G (1987). [Acanthosis nigricans maligna and Leser-Trelat sign in double malignancy of the breast and stomach]. *Z Hautkr* **62**: 344-366.

Stolz W, Braun-Falco O, Bilek P, Burgdorf W, Landthaler M (2004a). Dermatoskopische Diagnosekriterien. *Farbatlas der Dermatoskopie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart. pp 11-40.

Stolz W, Braun-Falco O, Bilek P, Burgdorf W, Landthaler M (2004b). Nicht-melanozytäre pigmentierte Hautveränderungen. *Farbatlas der Dermatoskopie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart. pp 155-160.

Stolz W (2005). Dermatoskopie. In: Braun Falco O, Plewig G, Wolff H, Landthaler M (eds). *Dermatologie und Venerologie*. Springer Berlin: Heidelberg. pp 1325-1329.

Stolz W, Ramrath K (2005). Störungen der Melaninpigmentierung. In: Braun Falco O, Plewig G, Wolff H, Landthaler M (eds). *Dermatologie und Venerologie*. Springer Berlin: Heidelberg. p 860.

Tapia C, Savic S, Bihl M, Rufle A, Zlobec I, Terracciano L *et al* (2009). EGFR-Mutationsanalyse beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom. Erfahrungen aus der Routinediagnostik. *Pathologe* **30**: 384-392.

Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS *et al* (1995). Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* **9**: 321-328.

Tavormina PL, Bellus GA, Webster MK, Bamshad MJ, Fraley AE, McIntosh I *et al* (1999). A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am J Hum Genet* **64**: 722-731.

Teng YH, Tan WJ, Thike AA, Cheok PY, Tse GM, Wong NS *et al* (2011). Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res* **13**: R35.

Thompson LM, Plummer S, Schalling M, Altherr MR, Gusella JF, Housman DE *et al* (1991). A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington disease gene region of human chromosome 4. *Genomics* **11**: 1133-1142.

Tilgen W (2005). Benigne epitheliale Tumoren. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H, Landthaler M (eds). *Dermatologie und Venerologie*. Springer Berlin: Heidelberg. pp 1242-1244.

Toll A, Real FX (2008). Somatic oncogenic mutations, benign skin lesions and cancer progression: where to look next? *Cell Cycle* **7**: 2674-2681.

Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ (2000). The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev* **21**: 23-39.

van Engen-van Grunsven AC, van Dijk MC, Ruiter DJ, Klaasen A, Mooi WJ, Blokx WA (2010). HRAS-mutated Spitz tumors: A subtype of Spitz tumors with distinct features. *Am J Surg Pathol* **34**: 1436-1441.

Verhagen AR, Koten JW, Chaddah VK, Patel RI (1968). Skin diseases in Kenya. A clinical and histopathological study of 3,168 patients. *Arch Dermatol* **98**: 577-586.

Wang H, Jiang H, Zhou M, Xu Z, Liu S, Shi B *et al* (2009). Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity and resistance to 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* **279**: 30-38.

Westrom DR, Berger TG (1986). The sign of Leser-Trelat in a young man. *Arch Dermatol* **122**: 1356-1357.

Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD *et al* (1995). Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet* **9**: 165-172.

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987). Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6899-6903.

Woodman SE, Mills GB (2010). Are oncogenes sufficient to cause human cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20599-20600.

Yamaguchi TP, Rossant J (1995). Fibroblast growth factors in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 485-491.

Yaniv R, Servadio Y, Feinstein A, Trau H (1994). The sign of Leser-Trelat associated with transitional cell carcinoma of the urinary-bladder--a case report and short review. *Clin Exp Dermatol* **19**: 142-145.

Yeatman JM, Kilkenny M, Marks R (1997). The prevalence of seborrhoeic keratoses in an Australian population: does exposure to sunlight play a part in their frequency? *Br J Dermatol* **137**: 411-414.

Zhang RZ, Zhu WY (2011). Seborrheic keratoses in five elderly patients: an appearance of raindrops and streams. *Indian J Dermatol* **56**: 432-434.

Zhang Y, Gorry MC, Post JC, Ehrlich GD (1999). Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene and comparative analysis of the human FGFR gene family. *Gene* **230**: 69-79.

Zhao YK, Lin YX, Luo RY, Huang XY, Liu MZ, Xia M *et al* (1989). Human papillomavirus (HPV) infection in seborrheic keratosis. *Am J Dermatopathol* **11**: 209-212.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Purinbase)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (engl.: pair of bases)
C	Cytosin (Pyrimidinbase)
°C	Grad in Celsius
ca.	circa
ddNTPs	Didesoxyribonukleotide
dH ₂ O	destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (engl.: deoxynucleoside triphosphate)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: epidermal growth factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (engl.: Epidermal growth factor receptor)
et al.	und andere (lat.: et alii)
etc.	und sonstige (lat.: et cetera)
FGF	Fibroblast Wachstumsfaktor (engl.: fibroblast growth factor)
FGFR2	Fibroblast Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (engl.: fibroblast growth factor receptor 2)
FGFR3	Fibroblast Wachstumsfaktor Rezeptor 3 (engl.: fibroblast growth factor receptor 3)
g	Gramm
G	Guanin (Purinbase)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HRAS	Harvey-Ratten-Sarkom-Virusonkogen
kD	kilo-Dalton
KRAS	Kirsten-Ratten-Sarkom-Virusonkogen
l	Liter
μ	mikro
μl	Mikroliter
m	milli
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK	MAPK/extracellular-signal-regulated kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)

ml	Milliliter
n	nano
n.a.	not available
ng	Nanogramm
NRAS	Neuroblastom-RAS-Virusonkogen
Pat.	Patient/in
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase (engl.: phosphatidylinositol 3-kinase)
PIK3CA	(engl.: catalytic p110-alpha subunit of class 1 phosphatidylinositol 3-kinase)
PIK3R1	(engl.: regulatory p85-alpha subunit 1 of class 1 phosphatidylinositol 3-kinase)
RAS	(engl.: family of proteins, involved in cellular signal transduction; abbr. stands for rat sarcoma)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
s	Sekunde(n)
SH2	Scr-homology domain
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphism (engl.: single nucleotide polymorphism)
SK	seborrhoische Keratose(n)
T	Thymin (Pyrimidinbase)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit; Enzymeinheit
USA	United States of America
V	Volt
wt	Wildtyp (engl.: wild type)
z.B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungsverzeichnis

Seite

Abbildung 1: Seborrhoische Keratose: a) Klinisches und b) Dermatoskopisches Bild	2
Abbildung 2: Seborrhoische Keratosen, angeordnet in Form eines "Christmas tree pattern" ...	2
Abbildung 3: Mutationsstatus der seborrhoischen Keratosen gemäß Hafner et al (Hafner et al 2010b).....	11
Abbildung 4: Signaltransduktionswege der EGF- und FGF-Rezeptoren nach Schlessinger (Schlessinger 2004)	16
Abbildung 5. Dermatoskopisches Bild einer pigmentierten seborrhoischen Keratose	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase-Kettenreaktion in der vorliegenden Studie (vgl. (Löffler 2000))	41
Abbildung 7: Agarose-Gel-Elektrophorese mit Marker.....	47
Abbildung 8: Darstellung der somatischen <i>EGFR</i> -Punktmutation c.2573T>G (p.L858R)....	56
Abbildung 9: Darstellung der <i>HRAS</i> -Punktmutation p.G13R, identifiziert in der SK-Probe Nr. 18 von Patient Nr. 3.....	58
Abbildung 10: Darstellung der <i>HRAS</i> -Punktmutation p.Q61L in der SK-Probe Nr. 35 bei Patient Nr. 7	58
Abbildung 11: Darstellung der <i>KRAS</i> -Punktmutation p.G12V in der SK-Probe Nr. 52 bei Patient Nr. 13.....	59
Abbildung 12: Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (c1176C>T; p.F392F) innerhalb des Exons 9, Codon 392 des <i>PIK3R1</i> -Gens bei Patient Nr. 5	60

7.3 Tabellenverzeichnis

Seite

Tabelle 1: Überblick der Mutationen innerhalb der <i>FGFR3</i> -, <i>PIK3CA</i> -, <i>AKT1</i> -, <i>HRAS</i> -, <i>KRAS</i> -, <i>EGFR</i> -, <i>PTPN11</i> -, <i>TSC1</i> - und <i>PTEN</i> -Gene in der experimentellen Studie von Hafner et al (Hafner et al 2010b)	11
Tabelle 2: Auflichtmikroskopische differentialdiagnostische Kriterien der seborrhoischen Keratose.....	17
Tabelle 3: Histologische Klassifikation der seborrhoischen Keratose.....	18
Tabelle 4: Verwendete Primerpaare bei der Identifikation der <i>EGFR</i> -, <i>PIK3R1</i> - und <i>FGFR2</i> -Genmutationen der seborrhoischen Keratosen.....	33
Tabelle 5: Auflistung der in der Multiplex-PCR, SNaPshot®-PCR und bei der Sequenzierung eingesetzten Primer	34
Tabelle 6: Klinisch-pathologische Charakteristika und Ergebnisse der genetischen Analyse der 58 seborrhoischen Keratosen	37
Tabelle 7: Erste und zweite PCR für die Amplifikation von DNA-Bereichen in den Exons 3, 18, 19 und 21 vom <i>EGFR</i> -Gen.....	43
Tabelle 8: PCR-Programme für die Amplifikation von ausgewählten DNA-Bereichen innerhalb der Exons 3, 18, 19 und 21 des <i>EGFR</i> -Gens.....	43
Tabelle 9: PCR-Programme für die Amplifikation von ausgewählten DNA-Bereichen innerhalb der Exons 9, 10, 12 und 13 des <i>PIK3R1</i> -Gens	44
Tabelle 10: PCR-Programm für die Amplifikation von ausgewählten DNA-Bereichen innerhalb der Exons 7, 9, 12 und 14 des <i>FGFR2</i> -Gens.....	45
Tabelle 11: Sequenzier-PCR-Programm für <i>EGFR</i> , <i>FGFR2</i> und <i>PIK3R1</i>	48
Tabelle 12: Primer-Mix für die Multiplex-PCR	51
Tabelle 13: Programm für die Multiplex-PCR des SNaPshot® Assays	51
Tabelle 14: Zusammensetzung des SNaPshot®-Multiplex-Primer-Mix für die Detektion der Mutationen innerhalb der <i>HRAS</i> -, <i>NRAS</i> - und <i>KRAS</i> -Gene, Set 1	52
Tabelle 15: Zusammensetzung des SNaPshot®-Multiplex-Primer-Mix für die Detektion der Mutationen innerhalb der <i>HRAS</i> -, <i>NRAS</i> - und <i>KRAS</i> -Gene, Set 2	53
Tabelle 16: Klinisch-pathologische Charakteristika der seborrhoischen Keratosen mit onkogenen Mutationen	55
Tabelle 17: Überblick der detektierten Genmutationen	55

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Nachname Ivelina Antonova Georgieva

Geburtsdatum 12.04.1984

Geburtsort Varna, Bulgarien

Schulausbildung:

1991 – 1996 Grundschule: “Georgi Sava Rakovski” – Varna, Bulgarien

1996 – 1998 Mathematisches Gymnasium “Dr. Peter Beron” – Varna

1998 – 2003 Fünftes Fremdsprachengymnasium “Yoan Ekzарh” – Varna

Studium:

Humanmedizin an der Universität Regensburg

Oktober 2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

August 2010 – Juli 2011 Praktisches Jahr

- Innere Medizin: Hämatologie, Onkologie, Nephrologie, Kardiologie im Klinikum Passau
 - Allgemein-, Unfall-, Viszeral-, Gefäß- und Plastische Chirurgie im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg, Lehrkrankenhaus der Universität Regensburg
 - Wahlfach: Dermatologie an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg

November 2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

November 2011 Approbation zur Ausübung des ärztlichen Berufes

Berufliche Erfahrung:

Juli 2012 – Dezember 2012

Assistenzärztin an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Mannheim, Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Sergij Goerdt

Seit 01.01.2013

Ärztin im Treffpunkt Haut am Theaterplatz, Praxis für Dermatologie, Allergologie, ästhetische und Laserbehandlungen, medizinische Kosmetik, Ludwigshafen am Rhein, Dr. med. Markus Kratofiel

Wissenschaftliche Erfahrung:

Publikationen

Low incidence of oncogenic *EGFR*, *HRAS* and *KRAS* mutations in seborrheic keratosis. Am J Dermatopathol. 2013 Jun 4.

Poster

Low incidence of oncogenic *EGFR*, *HRAS* and *KRAS* mutations in seborrheic keratosis, ADF-Tagung, Dessau, März 2013

7.5 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Mark Berneburg und Prof. Dr. Dr. h.c. M. Landthaler für die Möglichkeit der Durchführung dieser Promotionsarbeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen Personen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Hafner für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe, für die freundliche Überlassung des interessanten Themas sowie für die kontinuierliche fachliche Unterstützung und sein Vertrauen. Er stand mir stets mit wertvollen Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite und hat meine wissenschaftliche Entwicklung und Verwirklichung immens gefördert. Somit hat Herr Prof. Dr. Christian Hafner meine Begeisterung für die Forschung auf dem Gebiet der Dermatologie weiter gestärkt.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Charalampos Aslanidis für die harmonische Zusammenarbeit und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin richten.

Bei Frau Eva Herschberger, Frau Tatjana Schifferstein, Frau Lydia Kuenzel und Frau Dagmar Alzinger möchte ich mich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor, für die Einarbeitung in die Methodik sowie die Beratung und Hilfestellung bei der Auswertung des experimentellen Teils der Arbeit bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Frau Christine Fabritius für die Unterstützung bei der Auswahl der Bilder bedanken. Sie haben mir bei dem Zustandekommen dieser Arbeit sehr geholfen.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern Prodekan Prof. Dr. Anton Georgiev und Prof. Dr. Neli Georgieva, meinem Ehemann Krasen Dimitrov, meinem Bruder Tsvetoslav Georgiev und meinen Großeltern aussprechen, die mich während des gesamten medizinischen Studiums in jeder Hinsicht herzlich unterstützt haben. Sie haben mir durch hilfreiche und liebevolle Ratschläge viel Mut, Kraft und Hoffnung gegeben. Ohne ihre aktive Unterstützung und ihr uneingeschränktes Vertrauen in mich wäre Vieles nicht möglich gewesen. Diese Arbeit ist ihnen gewidmet.

Dann gilt mein besonderer Dank meinen Patienten, welche ohne finanzielle Entschädigung freiwillig an dieser experimentellen Studie teilgenommen und ihre Zeit investiert haben.

7.6 Originalarbeit

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden als Originalartikel beim „The American Journal of Dermatopathology“ publiziert:

Georgieva IA, Mauerer A, Groesser L, Herschberger E, Aslanidis C, Dietmaier W, Landthaler M, Hafner C (2014). Low incidence of *EGFR*, *HRAS* and *KRAS* mutations but absence of *FGFR2*, *PIK3R1* and *NRAS* mutations in human seborrheic keratosis. *Am J Dermatopathol* **36**: 635-642

7.7 Kongressbeiträge (Poster)

I. Georgieva, A. Mauerer, L. Groesser, E. Herschberger, C. Aslanidis, W. Dietmaier, M. Landthaler, C. Hafner; Regensburg, Mannheim (2013). Low incidence of oncogenic EGFR, HRAS and KRAS mutations but absence of FGFR2, PIK3R1 and NRAS mutations in seborrheic keratosis. ADF-Tagung, Dessau, März 2013

Low Incidence of Oncogenic *EGFR*, *HRAS*, and *KRAS* Mutations in Seborrheic Keratosis

Ivelina A. Georgieva,*† Andreas Mauerer,* Leopold Groesser,* Eva Herschberger,* Charalampos Aslanidis,‡ Wolfgang Dietmaier,§ Michael Landthaler,* and Christian Hafner*

Abstract: Seborrheic keratosis (SK) represents a frequent epidermal skin tumor. Although lacking a malignant potential, these tumors reveal multiple oncogenic mutations. A previous study identified activating mutations in 89% of SK, particularly in *FGFR3* and *PIK3CA* genes. The aim of this study was to identify further oncogenic mutations in human SK. Therefore, we screened for mutations in *EGFR*, *FGFR2*, *PIK3R1*, *HRAS*, *KRAS*, and *NRAS* genes using both Sanger sequencing of selected exons and a multiplex SNaPshot assay in 58 SK of 14 patients. We identified a somatic *EGFR* p.L858R mutation in 1 SK. Furthermore, the *HRAS* mutations p.G13R (2/58 SK) and p.Q61L (2/58 SK) were found. These mutations have not been described in human SK yet. In addition, 1 SK revealed the *KRAS* p.G12V mutation, which has already been reported in SK. No mutations were detected in *FGFR2*, *PIK3R1*, and *NRAS* genes. The results of this study suggest that activating mutations of *EGFR*, *HRAS*, and *KRAS* contribute to the pathogenesis of human SK, although at a lower frequency than *FGFR3* and *PIK3CA* mutations. *FGFR2*, *PIK3R1*, and *NRAS* mutations obviously do not have a significant role in the development of SK.

Key Words: EGFR, RAS, PIK3R1, FGFR2, seborrheic keratosis, oncogenic mutation

(Am J Dermatopathol 2014;36:635–642)

INTRODUCTION

Seborrheic keratoses (SK), also referred to as verrucae seborrhoicae, seborrheic warts, senile keratoses, basal cell acanthomas or verrucae seniles, represent one of the most common benign epidermal tumors of the human skin.¹ Their clinical appearance is characterized by well-circumscribed, round or oval-shaped, flat or elevated light to dark pigmented skin lesions with a typical diameter of 0.5–1 cm. Their

From the *Department of Dermatology, University of Regensburg, Regensburg, Germany; †Department of Dermatology, Venereology, and Allergology, University Medical Center Mannheim, Ruprecht-Karls-University of Heidelberg, Mannheim, Germany; ‡Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Regensburg, Regensburg, Germany; and §Molecular Pathology Diagnostic Unit, Institute of Pathology, University of Regensburg, Regensburg, Germany.

Supported by the grant HA 5531/1-2 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to C. Hafner.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: Ivelina A. Georgieva, Department of Dermatology, Venereology, and Allergology, University Medical Center Mannheim, Ruprecht-Karls-University of Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim, Germany (e-mail: ivelinageorgieva@yahoo.com).

© 2013 Lippincott Williams & Wilkins

incidence increases with age. In some cases, a familial predisposition seems to exist.^{1–3} Despite their lack of malignant potential, SK harbors multiple oncogenic mutations. A previous study identified activating mutations of *FGFR3*, *PIK3CA*, *HRAS*, *KRAS*, *AKT1*, and *EGFR* in 89% of the lesions.⁴ Thus, SK represents a perfect model tumor to study the molecular mechanisms preventing malignant progression of tumors in the presence of multiple oncogenic mutations.

Because in the previous study 11% of SK still revealed a wild-type status for the investigated gene loci,⁴ we screened additional candidate genes to identify novel oncogenic mutations and to get a more comprehensive mutational spectrum of human SK. *PIK3R1* and *FGFR2* represent 2 candidate genes for human SK. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) gene comprises *PIK3CA* that encodes the catalytically active p110 α subunit and *PIK3R1* encoding the p85 α regulatory subunit. The enzyme is involved in fundamental cellular functions including cell survival, growth, proliferation, protein synthesis, mitosis, and motility.⁵ Previous studies identified *PIK3CA* mutations in up to 50% of human SK.^{4,6} Oncogenic *PIK3R1* mutations have been demonstrated in several malignant tumors, including urothelial carcinoma,⁷ ovarian and colon cancer,⁸ and glioblastoma.⁹

Mutations in *FGFR3* are the most frequent mutations identified in SK.⁴ *FGFR2* [also referred to as Keratinocyte Growth Factor (KGF)] shares 65% of the molecular structure with *FGFR3*.¹⁰ *FGFR2* is expressed in keratinocytes and involved in important cellular functions.¹¹ *FGFR2* mutations have been identified in endometrial carcinoma, cervical carcinoma,^{12,13} lung squamous cell carcinoma,^{13,14} gastric carcinoma,¹⁵ and malignant melanoma¹⁶ and in the germline of patients with Crouzon,^{17–19} Jackson Weiss,^{20,21} Pfeiffer,^{18,22} Apert,²³ and Beare–Stevenson syndromes.^{24,25}

Based on these considerations, we screened human SK for potential mutations in *PIK3R1* and *FGFR2*. In addition to these genes, we analyzed the SK for potential *EGFR* and *RAS* gene mutations. Oncogenic *EGFR*, *HRAS*, and *KRAS* mutations had been already identified in SK previously, but these analyses were limited only to a small number of SKs and to a few hotspot regions covered by the OncoCarta panel v1.0.⁴

MATERIALS AND METHODS

Sample Acquisition

From 2009 to 2011, 58 SKs from 14 white patients (8 male and 6 female) were collected at the Department of Dermatology, University of Regensburg. The SK underwent

routine histopathological examination at the Department of Dermatology, University of Regensburg. Written informed consent was obtained from the patients. The study was approved by the local ethics committee of the University of Regensburg and performed according to the Declaration of Helsinki.

One half of each SK was immediately frozen after curettage and stored at -80°C , and the other half underwent a routine histopathological diagnostic procedure. Clinicopathological data of the patients and SKs are shown in Table 1. The median patient age at the time of SK removal was 71 years (range 40–86 years). The histological subtypes included 54 acanthotic SKs and 4 hyperkeratotic SKs. Genomic DNA was extracted from the fresh-frozen tissue samples with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, and the DNA was analyzed and quantified by NanoDrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnology, Erlangen, Germany).

Mutation Analysis

For the analysis of *EGFR* mutations, exons 3, 18, 19, and 21 were directly sequenced by the Sanger method. Accordingly, exons 9, 10, 12, and 13 of *PIK3R1*, and exons 7, 9, 12 and 14 of *FGFR2* were analyzed by Sanger sequencing. Primer sequences are listed in Table 2, and polymerase chain reaction conditions can be obtained from the authors. Hotspot mutations of *HRAS*, *KRAS*, and *NRAS* were analyzed using a modified highly sensitive *RAS* SNaPshot multiplex assay.²⁶ Set 1 covers the following base positions: 34, 35, 37, 181, and 182 of *HRAS*; 34, 35, and 181 of *KRAS*; and 34 and 182 of *NRAS*. Set 2 covers the following base positions: 38 and 183 of *HRAS*; 37, 38, 182, and 183 of *KRAS*; 35, 37, 38, 180, 181, and 183 of *NRAS*. Each detected mutation was confirmed by a second independent polymerase chain reaction.

RESULTS

EGFR

We analyzed 58 SKs for *EGFR* mutations in exons 3, 18, 19, and 21. Exon 3 was sequenced because we identified a point mutation in this exon in 1 SK of a previous study.⁴ Exons 18, 19, and 21 contain the most frequent *EGFR* mutations in cancer according to the COSMIC database (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). An *EGFR* mutation was detected only in 1 of the 58 (2%) SKs. This c.2573T>G (p.L858R) mutation (Fig. 1) occurred in exon 21 and has not been described in SK before. Three further SKs analyzed from the same patient did not reveal this substitution, indicating a somatic mutation.

FGFR2

FGFR3 mutations in human SK are almost exclusively found at hotspot loci. The same *FGFR3* mutations have been reported in malignant tumors and in the germline in developmental disorders. These *FGFR3* hotspot mutations obviously provide a selective advantage because of their high activation potential of the dependent signaling pathways.²⁷ In analogy to *FGFR3*, we focused on the most frequent mutations reported

in the *FGFR2* gene in cancer and developmental disorders. These mutations are preferentially localized in exons 7, 9, 12, and 14 of *FGFR2*. However, direct sequencing of these exons revealed no *FGFR2* mutations in 58 SKs.

PIK3R1

According to previous reports, *PIK3R1* mutations in human cancer were localized in exons 9, 10, 12, and 13. We therefore screened for *PIK3R1* mutations in human SK sequencing these exons. A single nucleotide change (c.1176C>T; p.F392F) in exon 9 was found in all 4 SKs of patient 5, which did not result in an exchange of the amino acid. The presence of this single nucleotide change in all analyzed SK of 1 patient suggests that it represents a germline single nucleotide polymorphism. It is unknown whether this polymorphism is of functional relevance. We detected no somatic *PIK3R1* mutations in the analyzed SK.

HRAS, KRAS, and NRAS

A highly sensitive modified SNaPshot multiplex assay was used to analyze hotspot mutations of *HRAS*, *KRAS*, and *NRAS*. *RAS* mutations were found in 5 of the 58 (9%) SKs (Table 1; Fig. 1). Two SKs showed the *HRAS* c.37G>C (p.G13R) mutation. Both mutations were somatic because the other SKs of these patients did not reveal this mutation. The *HRAS* c.182A>T (p.Q61L) mutation was present in 2 SKs. Further SKs of these patients did not reveal the mutation, thus confirming its somatic character. Both the *HRAS* p.G13R and the p.Q61L mutation have not been reported in human SK previously. We furthermore identified a *KRAS* c.35G>T (p.G12V) mutation in 1 SK. Like the *HRAS* mutations, this mutation was somatic because 3 further SKs of the same patient showed a wild-type sequence at *KRAS* codon 12. No *NRAS* mutations were detected in this study.

DISCUSSION

Oncogenic mutations result in a constitutive activation of signaling pathways independent from the presence of stimulating factors such as ligands. These mutations are therefore referred to as a "hallmark" of cancer.²⁸ Interestingly, the same oncogenic mutations found in cancer can be present in benign tumors. Oncogenic *BRAF* mutations, for example, are found both in benign melanocytic nevi and in malignant melanoma.^{29,30} Although some melanocytic nevi may show a progression to malignant melanoma, most will remain benign because of oncogene-induced senescence.³¹ SKs are also benign skin tumors lacking a relevant malignant potential. Despite this benign character, they can show multiple oncogenic mutations, and in a previous study, almost 50% of the tumors revealed the presence of 2 oncogenic mutations in different genes.⁴ In contrast to melanocytic nevi, oncogene-induced senescence is obviously not involved in human SK.^{4,32} These data suggest that oncogenic mutations are not sufficient to cause progression and malignancy,^{33,34} although they may act as driver mutations when the malignant tumor is already established. The latter is observed in metastasized *BRAF* mutant malignant melanoma, which is responsive to a highly specific inhibition of activating *BRAF* mutations.³⁵

TABLE 1. Analysis of EGFR, RAS, PIK3R1, and FGFR2 Mutations in SK

No.	Histological Subtype	Sex	Age (yrs)	Localization	EGFR	RAS	PIK3R1	FGFR2
1	Acanthotic		44	Head	wt	wt	wt	wt
2	Acanthotic			Head	wt	wt	wt	wt
3	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
4	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
5	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
6	Acanthotic	M	73	Abdomen	wt	wt	wt	wt
7	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
8	Acanthotic			Back	wt	HRAS c.37G>C	wt	wt
9	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
10	Acanthotic			Abdomen	wt	wt	wt	wt
11	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
12	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
13	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
14	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
15	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
16	Acanthotic	F	67	Chest	wt	wt	wt	wt
17	Acanthotic			Chest	wt	wt	wt	wt
18	Acanthotic			Chest	wt	HRAS c.37G>C	wt	wt
19	Acanthotic			Shoulder	c.2573T>G	wt	wt	wt
20	Acanthotic	M	86	back	wt	wt	wt	wt
21	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
22	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
23	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
24	Acanthotic	F	64	Shoulder	wt	wt	c.1176C>T	wt
25	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	c.1176C>T	wt
26	Acanthotic			Back	wt	wt	c.1176C>T	wt
27	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	c.1176C>T	wt
28	Acanthotic	F	84	Shoulder	wt	wt	wt	wt
29	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
30	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
31	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
32	Acanthotic	M	72	Shoulder	wt	wt	wt	wt
33	Acanthotic			Abdomen	wt	wt	wt	wt
34	Acanthotic			Chest	wt	wt	wt	wt
35	Hyperkeratotic			Back	wt	HRAS c.182A>T	wt	wt
36	Acanthotic	F	86	Abdomen	wt	wt	wt	wt
37	Acanthotic			Chest	wt	wt	wt	wt
38	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
39	Acanthotic			Head	wt	wt	wt	wt
40	Acanthotic	F	40	Chest	wt	wt	wt	wt
41	Acanthotic			Chest	wt	wt	wt	wt
42	Acanthotic	M	70	Back	wt	wt	wt	wt
43	Acanthotic	M	66	Back	wt	wt	wt	wt
44	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
45	Acanthotic			Abdomen	wt	wt	wt	wt
46	Acanthotic			Abdomen	wt	wt	wt	wt
47	Acanthotic	F	75	Abdomen	wt	wt	wt	wt
48	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt
49	Acanthotic			Shoulder	wt	HRAS c.182A>T	wt	wt
50	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
51	Acanthotic	M	77	Shoulder	wt	wt	wt	wt
52	Acanthotic			Back	wt	KRAS c.35G>T	wt	wt
53	Acanthotic			Back	wt	wt	wt	wt

(continued on next page)

TABLE 1. (Continued) Analysis of *EGFR*, *RAS*, *PIK3R1*, and *FGFR2* Mutations in SK

No.	Histological Subtype	Sex	Age (yrs)	Localization	<i>EGFR</i>	<i>RAS</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>FGFR2</i>
54	Acanthotic			Abdomen	wt	wt	wt	wt
55	Hyperkeratotic	M	83	Chest	wt	wt	wt	wt
56	Hyperkeratotic			Chest	wt	wt	wt	wt
57	Hyperkeratotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt
58	Acanthotic			Shoulder	wt	wt	wt	wt

All codons of *FGFR2* are numbered according to the open reading frame of the *FGFR2 IIIb* isoform.

Age, age at the time of the SK curettage; M, male; F, female; wt, wild-type.

The detailed mechanisms preventing malignant progression of SK are unknown, but the lack of genetic instability and the absence of alterations in tumor suppressor genes might play an important role. Using array comparative genomic hybridization, SK revealed a profound genomic stability.⁴ Another study reported also no chromosomal imbalances in human SK by conventional comparative genomic hybridization.³⁶ SKs did not show mutations in the tumor suppressor genes *TSC1* and *PTEN*.⁴ Furthermore, SK revealed absent or weak expression of the DNA damage response protein 53BP1, which correlates with genomic instability, in contrast to actinic keratosis, Morbus Bowen, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma.³⁷ Taken together, these data support the hypothesis that oncogenic mutations in SK provide a limited proliferation advantage for the affected keratinocytes, but the genomic stability prevents malignant progression, invasion, and metastasis. Some oncogenic mutations may occur already during embryogenesis, resulting in a mosaicism of mutant and wild-type cells. These mutations can result in benign proliferative lesions such as epidermal nevi but also predispose to cancer such as urothelial carcinoma, depending on the affected cell types and tissues.³⁸

SKs represent a perfect model to study the presence and function of oncogenic mutations in benign tumors because of their easy accessibility and high prevalence in man. The objective of the present study was to identify new oncogenic mutations in human SK. Previous studies identified mutations activating the RAS-RAF-MAPK and PI3K-AKT signaling pathways in human SK. Receptor tyrosine kinases such as *EGFR* are localized upstream of these signaling pathways. Genetic aberrations of *EGFR* have been described in several malignant tumors including breast cancer,³⁹ non-small cell lung cancer,^{40,41} glioblastoma,⁴² colorectal cancer,⁴³ prostate cancer,⁴⁴ epithelial ovarian cancer,⁴⁵ squamous cell carcinoma of the skin,⁴⁶ and other neoplasms. Most mutations are localized in exons 18, 19, and 21. The frequency of *EGFR* mutations in benign tumors is only marginally known. Our previous study suggested the occurrence of *EGFR* mutations in SK, but not all hotspot loci within the *EGFR* gene were covered by the used OncoCarta assay. This study demonstrated an activating *EGFR* p.L858R mutation in 1 SK, which has not yet been described in a benign tumor. According to recent reports, this point mutation represents one of the most frequent *EGFR* mutations in a wide range of malignant tumors, including lung cancer, esophageal squamous cell

carcinoma, and breast carcinoma. It seems to be essential for suppression of proapoptotic signals in cancers harboring the mutation.^{47,48} Of note, in contrast to our recent study of 175 SKs from Spanish and German patients,⁴ we could not find further *EGFR* mutations in exon 3. Our results indicate that *EGFR* mutations occur rarely in human SK. Because the majority of SK in our study were of the acanthotic subtype, a distinct distribution of the mutations in other subtypes can be not excluded.

Somatic *RAS* mutations are present in approximately 30% of human tumors.⁴⁹ They occur in a variety of malignant tumors such as pancreatic ductal adenocarcinoma,⁵⁰ stomach cancer,⁵¹ colorectal cancer, gallbladder cancer,⁵² non-small cell lung cancer,⁵³ hepatocellular carcinoma,⁵⁴ bladder cancer,²⁶ cervical carcinoma, and pleomorphic adenomas of the salivary glands,⁵⁵ but have also been identified in benign lesions such as keratoacanthoma,⁵⁶ melanocytic nevus,^{4,57,58} keratinocytic epidermal nevus,^{38,59,60} and nevus sebaceous.⁶¹ In human SK, *KRAS* and *HRAS* mutations have been reported previously.⁴ *KRAS* mutations were found in 20% of SK and *HRAS* mutations in 3% of SK. Because these analyses were partially restricted to a subset of SK, we screened for additional mutations in *HRAS*, *KRAS*, and *NRAS* genes using a highly sensitive SNaPshot multiplex assay. *RAS* mutations were detected in 5 of the 58 (9%) SK. A *KRAS* mutation was identified only in 1 SK, therefore being less frequent than in the previous study. This *KRAS* p.G12V mutation is frequently found in malignant tumors of the pancreas, lung, ovary, and biliary tract according to COSMIC database. Of note, the *KRAS* p.G12V mutation was also detected in non-melanoma skin cancer (basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma).⁶² Furthermore, this mutation was already identified in human SK of our previous study.⁴ *NRAS* mutations were absent both in the SK of this study and of our previous study.⁴ The findings suggest that *NRAS* hotspot mutations do not have a major role in the pathogenesis of human SK. In contrast, *NRAS* mutations have been identified in keratinocytic epidermal nevi, which are histopathologically very similar to SK,⁵⁹ albeit at a low frequency. We identified 4 of the 58 (7%) *HRAS* mutations. These mutations were more frequent than in our previous study.⁴ Both the p.G13R and the p.Q61L *HRAS* mutations have not been reported in human SK before. The *HRAS* p.G13R mutation has been described in several human cancers including thyroid carcinoma, squamous cell carcinoma, bladder cancer, kidney cancer, and prostate cancer according to the COSMIC database, and represents the most

TABLE 2. Primer Sequences

Primer	Sequence (5'>3') Fwd	Size (bp)	Sequence (3'>5') Rev	Size (bp)
EGFR exon 3	ATGTCCTCATTGCCCTCAAC	20	AGCTCCTTCAGTCGGTTTT	20
EGFR exon 18	Outer primer: GCATGGTGAGGGCTGA GGTGA	21	Outer primer: CCCCACAGACCATGAG AGGC	21
EGFR exon 18	Inner primer: ACCCTTGTCCTGTGTTCTT GTCCC	25	Inner primer: GCCCAGCCCAGAGGCCTGTG	20
EGFR exon 19	Outer primer: TGCCAGTTAACGTCTCCTTC	21	Outer primer: CCACACAGCAAAGCAGAAAC	20
EGFR exon 19	Inner primer: AACGTCTCCTCTCTCTG	21	Inner primer: CCACACAGCAAAGCAGAAAC	20
EGFR exon 21	Outer primer: AGCTTCTTCCATGATGATC TGTCC	25	Outer primer: GGCAGCCTGGTCCCTGGTGTGTC	21
EGFR exon 21	Inner primer: TCCCATGATGATCTGTCCC TCACA	24	Inner primer: CAGGAAAATGCTGGCTGACCT AAAG	25
PIK3R1 exon 9	GGGTTTGGGCTGATATTAAA	21	TGTCTAAACATCGTAACGGATAATT	27
PIK3R1 exon 10	TTTGATTAAATACCTTATCCATTGAA	26	CCCCACCTCATTCGTAAGAA	20
PIK3R1 exon 12	TACCCAGATAATAACAAATACGTTTC	26	TTCATGTATAGGATTCCATTCAA	24
PIK3R1 exon 12/13	CAGTAGAAGAAGATTGAGAAGACTTG	28	CTGCTATCACCACATTAGTAACACTTAC	30
FGFR2 exon 7	GGTCTCTCATCTCCATCCC	21	CCAACAGGAAATCAAAGAAC	21
FGFR2 exon 7 (codon 310)	GTGGTCGGAGGAGACGTAGA	20		
FGFR2 exon 7 (codon 252)	TTCAAAGGTGTCAGCCAGCAG	21	CCTTCAGACAAACTCTACGTCTC	24
FGFR2 exon 9	TGGCCTGCTTATCTGTTCCCT	20	GGTCATGGGGAGGAGTAAA	20
FGFR2 exon 12	GCTGCCATGAGTTAGAGGA	20	TATTGGCGAATGCAGTT	20
FGFR2 exon 14	CTTTTGTTCTGGCGGTGTT	20	CCACTGTGTTACTGCCATCG	20
Multiplex PCR primer HRAS exon 1	CAGGAGACCCGTAGGAGG	19	TCGTCCACAAATGGTCTG	20
Multiplex PCR primer HRAS exon 2	GGAGACGTGCCTGTTGGA	18	GGTGGATGTCCTCAAAGAC	20
SNaPshot Primer Set 1 HRAS pos 34 fwd	T17 CTGGTGGTGGTGGCGCC	35		
SNaPshot primer set 1 HRAS pos 182 rev	T18 GCATGGCGCTGTACTCCTCC	38		
SNaPshot primer set 1 HRAS pos 35 rev	T31 CGCACTCTTGCCCACACCG	50		
SNaPshot primer set 1 HRAS pos 181 fwd	T46 CATCCTGGATACCGCCGGC	65		
SNaPshot primer set 1 HRAS pos 37 rev	T55 CAGCGCACTCTGCCACAC	75		
SNaPshot primer set 2 HRAS pos 183 fwd	T62 CCTGGATACCGCCGGCCA	80		
SNaPshot primer set 2 HRAS pos 38 rev 1	T64 GTCAGCGCACTCTGCCACAC	85		
Multiplex PCR primer KRAS exon 1	GGCCTGCTGAAATGACTG	19	GGTCCTGCACCAGTAATATG	20
Multiplex PCR primer KRAS exon 2	CCAGACTGTGTTCTCCCTT	20	CACAAAGAAAGCCCTCCCCA	20
SNaPshot primer set1 KRAS pos 34 rev	T25 GGCACTCTTGCCCTACGCCAC	45		
SNaPshot primer set 1 KRAS pos 181 rev	T41 CTCATTGCACTGTACTCCTCTT	63		
SNaPshot primer set 1 KRAS pos 35 fwd	T49 AACTTGTGGTAGTTGGAGCTG	70		
SNaPshot primer set 2 KRAS pos 37 rev	T15 CAAGGCACTCTGCCACGC	35		
SNaPshot primer set 2 KRAS pos 183 rev	T29 CCTCATTGCACTGTACTCCTC	50		
SNaPshot primer set 2 KRAS pos 38 fwd	T33 CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGT	55		
SNaPshot primer set 2 KRAS pos 182 fwd	T56 ATTCTCGACACAGCAGGTC	75		
Multiplex PCR primer NRAS exon 1	GGTGTGAAATGACTGAGTAC	20	GGGCCTCACCTCTATGGTG	19
Multiplex PCR primer NRAS exon 2	GGTGAAACCTGTTGTTGGA	20	ATACACAGAGGAAGCCTTCG	20
SNaPshot primer Set 1 NRAS pos 182 fwd	T33 GACATACTGGATACAGCTGGAC	55		
SNaPshot primer set 1 NRAS pos 34 fwd	T62 CTGGTGGTGGTTGGAGCA	80		
SNaPshot primer set 2 NRAS pos 181 rev	T18 CTCATGGCACTGTACTCCTCTT	40		
SNaPshot primer set 2 NRAS pos 37 fwd	T26 GGTGGTGGTTGGAGCAGGT	45		
SNaPshot primer set 2 NRAS pos 183 rev	T38 CTCTCATGGCACTGTACTCTTC	60		
SNaPshot primer set 2 NRAS pos 38 rev	T44 GTCAGTGCCTTCCAAACA	65		
SNaPshot primer set 2 NRAS pos 180 fwd	T49 GGACATACTGGATACAGCTGG	70		
SNaPshot primer set 2 NRAS pos 35 fwd	T71 CTGGTGGTGGTTGGAGCAG	90		

fwd, forward; PCR, polymerase chain reaction; pos, position; rev, reverse.

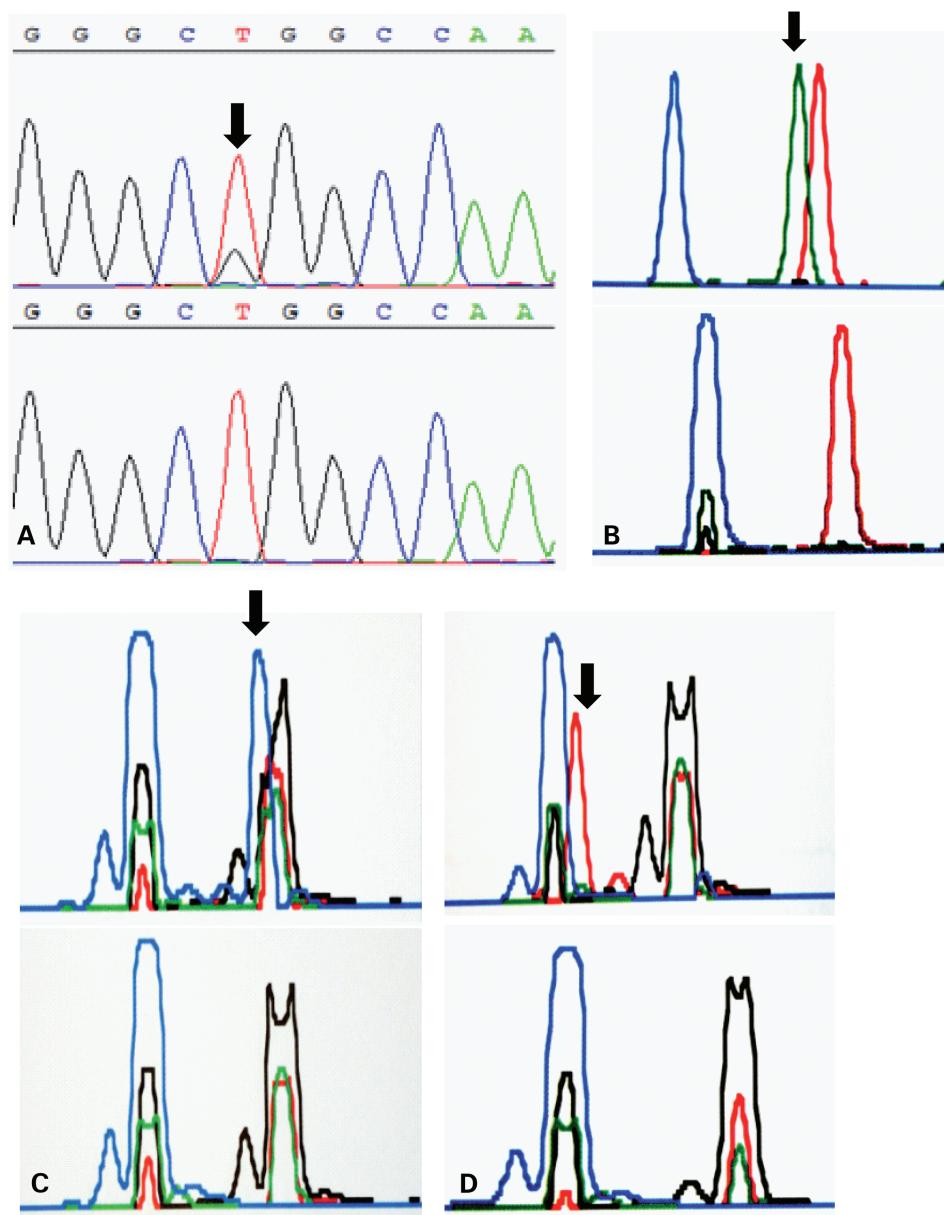


FIGURE 1. *EGFR* and *RAS* gene mutations in SK. A, The heterozygous *EGFR* c.2573T>G mutation (arrow) was detected in SK sample 19, resulting in a p.L858R substitution within the tyrosine kinase domain of *EGFR*. A wild-type control is shown below. B, The heterozygous *HRAS* c.182A>T (p.Q61L) mutation (arrow) was found in SK sample 35 by a SNaPshot multiplex assay. An example of a wild-type sequence at this position is shown below. C, The heterozygous *HRAS* c.37G>C (p.G13R) mutation (arrow) was detected in SK sample 18 by a SNaPshot multiplex assay. An example of a wild-type sequence at this position is shown below. D, Sample 52 displays the heterozygous *KRAS* c.35G>T (p.G12V) mutation (arrow) using a SNaPshot multiplex assay. An example of a wild-type sequence at this position is shown below.

frequent mutation in nevus sebaceous.⁶¹ The *HRAS* p.Q61L mutation is already known from malignant melanoma, squamous cell carcinoma, prostate carcinoma, urothelial carcinoma, and lung cancer.

The fibroblast growth factor receptor gene family is an important key regulator for early embryonic development, morphogenesis, angiogenesis, wound healing, and tumorigenesis.^{63,64} Gain-of-function *FGFR3* mutations have been identified in a variety of benign and malignant tumors, including multiple myeloma, carcinoma of the urinary bladder, cervical carcinoma,⁶⁵ epidermal nevus,^{27,66,67} and SK.^{2,4,27,66,68-72} In contrast to malignant tumors, its activation in SK does not induce a typical oncogenic signal in keratinocytes.³² Because *FGFR2* and *FGFR3* share 65% of their sequence,¹⁰ we assumed that *FGFR2* might also play a significant role in

the pathogenesis of SK. However, we could not detect any *FGFR2* mutations in SK, suggesting that activating mutations of this receptor are not significantly involved in the pathogenesis of human SK. Likewise, *PIK3CA* mutations obviously do not mainly contribute to SK development, in contrast to *PIK3CA* mutations, which are found in up to 50% of SK. These findings suggest that mutations in the catalytic subunit but not in the regulatory subunit of PI3K are relevant for the pathogenesis of these benign epidermal tumors.

In conclusion, our results show that *HRAS*, *KRAS*, and *EGFR* mutations are involved in the pathogenesis of human SK, although considerably less frequent than *FGFR3* and *PIK3CA* mutations. These findings further substantiate previous reports that benign human SK harbor multiple bona fide oncogenic mutations known from human cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all patients for their participation in this study, and Lydia Kuenzel, Dagmar Alzinger, and Tatjana Schifferstein for their excellent technical support.

Author Contributions: Conceived and designed the experiments: I.A.G., E.H., and C.H. Performed the experiments: I.A.G. and E.H. Contributed materials: I.A.G., E.H., and A.M. Analyzed and discussed the data: I.A.G., A.M., L.G., C.A., W.D., M.L., and C.H. Wrote the manuscript: I.A.G. and C.H. Supervised the project: C.H.

REFERENCES

- Hafner C, Vogt T. Seborrheic keratosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2008;6:664-677.
- Hafner C, Vogt T, Landthaler M, et al. Somatic FGFR3 and PIK3CA mutations are present in familial seborrhoeic keratoses. *Br J Dermatol.* 2008;159:214-217.
- Rongioletti F, Corbelli L, Rebora A. Multiple familial seborrheic keratoses. *Dermatologica.* 1988;176:43-45.
- Hafner C, Toll A, Fernandez-Casado A, et al. Multiple oncogenic mutations and clonal relationship in spatially distinct benign human epidermal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:20780-20785.
- Roymans D, Slegers H. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem.* 2001;268:487-498.
- Hafner C, Lopez-Knowles E, Luis NM, et al. Oncogenic PIK3CA mutations occur in epidermal nevi and seborrhoeic keratoses with a characteristic mutation pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:13450-13454.
- Sjodahl G, Lauss M, Gudjonsson S, et al. A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One.* 2011;6:e18583.
- Philp AJ, Campbell IG, Leet C, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res.* 2001;61:7426-7429.
- Network CGAR. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455:1061-1068.
- Zhang Y, Gorry MC, Post JC, et al. Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene and comparative analysis of the human FGFR gene family. *Gene.* 1999;230:69-79.
- Belleudi F, Purpura V, Torrisi MR. The receptor tyrosine kinase FGFR2b/KGFR controls early differentiation of human keratinocytes. *PLoS One.* 2011;6:e24194.
- Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene.* 2007;26:7158-7162.
- Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, et al. Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:8713-8717.
- Marks JL, McLellan MD, Zakowski MF, et al. Mutational analysis of EGFR and related signaling pathway genes in lung adenocarcinomas identifies a novel somatic kinase domain mutation in FGFR4. *PLoS One.* 2007;2:e426.
- Jang JH, Shin KH, Park JG. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res.* 2001;61:3541-3543.
- Gartside MG, Chen H, Ibrahim OA, et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Cancer Res.* 2009;7:41-54.
- de Ravel TJ, Taylor IB, Van Oostveldt AJ, et al. A further mutation of the FGFR2 tyrosine kinase domain in mild Crouzon syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:503-505.
- Rutland P, Pulley L, Reardon W, et al. Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nat Genet.* 1995;9:173-176.
- Gorry MC, Preston RA, White GJ, et al. Crouzon syndrome: mutations in two spliceoforms of FGFR2 and a common point mutation shared with Jackson-Weiss syndrome. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1387-1390.
- Jabs EW, Li X, Scott AF, et al. Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat Genet.* 1994;8:275-279.
- Park WJ, Meyers GA, Li X, et al. Novel FGFR2 mutations in Crouzon and Jackson-Weiss syndromes show allelic heterogeneity and phenotypic variability. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1229-1233.
- Meyers GA, Day D, Goldberg R, et al. FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing. *Am J Hum Genet.* 1996;58:491-498.
- Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, et al. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet.* 1995;9:165-172.
- Przypleba KA, Pazneka W, Zhang M, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nat Genet.* 1996;13:492-494.
- Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, et al. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat.* 1999;14:115-125.
- Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, et al. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One.* 2010;5:e13821.
- Hafner C, Vogt T, Hartmann A. FGFR3 mutations in benign skin tumors. *Cell Cycle.* 2006;5:2723-2728.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-674.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 2003;33:19-20.
- Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet.* 2009;41:544-552.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005;436:720-724.
- Hida Y, Kubo Y, Arase S. Activation of fibroblast growth factor receptor 3 and oncogene-induced senescence in skin tumours. *Br J Dermatol.* 2009;160:1258-1263.
- Woodman SE, Mills GB. Are oncogenes sufficient to cause human cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:20599-20600.
- Lazebniak Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer.* 2010;10:232-233.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364:2507-2516.
- Hallermann C, Gunawan B, Bertsch HP. No chromosomal imbalances in seborrhoeic keratoses detectable by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol.* 2004;123:1204-1205.
- Naruke Y, Nakashima M, Suzuki K, et al. Alteration of p53-binding protein 1 expression during skin carcinogenesis: association with genomic instability. *Cancer Sci.* 2008;99:946-951.
- Hafner C, Toll A, Real FX. HRAS mutation mosaicism causing urothelial cancer and epidermal nevus. *N Engl J Med.* 2011;365:1940-1942.
- Teng YH, Tan WJ, Thike AA, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res.* 2011;13:R35.
- Tapia C, Savic S, Bihl M, et al. EGFR-mutations analyse beim nicht-kliezelligen lungenkarzinom. Erfahrungen aus der Routinediagnostik. *Pathologe.* 2009;30:384-392.
- Kato Y, Peled N, Wynne MW, et al. Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations. *J Thorac Oncol.* 2010;5:1551-1558.
- Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, et al. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:6899-6903.
- Lankiewicz S, Rother E, Zimmermann S, et al. Tumour-associated transcripts and EGFR deletion variants in colorectal cancer in primary tumour, metastases and circulating tumour cells. *Cell Oncol.* 2008;30:463-471.
- Peraldo-Neia C, Migliardi G, Mello-Grand M, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer.* 2011;11:31.

45. Maihle NJ, Baron AT, Barrette BA, et al. EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer. *Cancer Treat Res.* 2002;107:247–258.
46. Mauerer A, Herschberger E, Dietmaier W, et al. Low incidence of EGFR and HRAS mutations in cutaneous squamous cell carcinomas of a German cohort. *Exp Dermatol.* 2011;20:848–850.
47. Sordella R, Bell DW, Haber DA, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science.* 2004; 305:1163–1167.
48. Kumar A, Petri ET, Halmos B, et al. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:1742–1751.
49. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:295–308.
50. Caldas C, Kern SE. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol.* 1995;18:1–6.
51. Chen HC, Chen HJ, Khan MA, et al. Genetic mutations of p53 and k-ras in gastric carcinoma patients from Hunan, China. *Tumour Biol.* 2011;32: 367–373.
52. Kim SW, Her KH, Jang JY, et al. K-ras oncogene mutation in cancer and precancerous lesions of the gallbladder. *J Surg Oncol.* 2000;75:246–251.
53. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, et al. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:295.
54. Newell P, Toffanin S, Villanueva A, et al. Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. *J Hepatol.* 2009;51:725–733.
55. Milasin J, Pujic N, Dedovic N, et al. H-ras gene mutations in salivary gland pleomorphic adenomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993;22: 359–361.
56. Corominas M, Kamino H, Leon J, et al. Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): is HRAS involved in differentiation as well as proliferation? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:6372–6376.
57. van Engen-van Grunsven AC, van Dijk MC, Ruiter DJ, et al. HRAS-mutated Spitz tumors: a subtype of Spitz tumors with distinct features. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1436–1441.
58. Da Forno PD, Pringle JH, Fletcher A, et al. BRAF, NRAS and HRAS mutations in spitzoid tumors and their possible pathogenetic significance. *Br J Dermatol.* 2009;161:364–372.
59. Hafner C, Toll A, Gantner S, et al. Keratinocytic epidermal nevi are associated with mosaic RAS mutations. *J Med Genet.* 2012;49:249–253.
60. Bourdeau F, Herault A, Gentien D, et al. Mosaicism for oncogenic G12D KRAS mutation associated with epidermal nevus, polycystic kidneys and rhabdomyosarcoma. *J Med Genet.* 2010;47:859–862.
61. Groesser L, Herschberger E, Ruetten A, et al. Postzygotic HRAS and KRAS mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning syndrome. *Nat Genet.* 2012;44:783–787. doi : 10.1038/ng.2316.
62. Daya-Grosjean L, Robert C, Drougard C, et al. High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res.* 1993;53:1625–1629.
63. Yamaguchi TP, Rossant J. Fibroblast growth factors in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5:485–491.
64. McKeehan WL, Wang F, Kan M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998;59:135–176.
65. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet.* 1999;23: 18–20.
66. Hafner C, Hartmann A, Vogt T. FGFR3 mutations in epidermal nevi and seborrheic keratoses: lessons from urothelium and skin. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1572–1573.
67. Hafner C, van Oers JM, Vogt T, et al. Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest.* 2006;116: 2201–2207.
68. Logie A, Dunois-Larde C, Rosty C, et al. Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Hum Mol Genet.* 2005;14:1153–1160.
69. Hafner C, Hartmann A, Real FX, et al. Spectrum of FGFR3 mutations in multiple intraindividual seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol.* 2007; 127:1883–1885.
70. Hafner C, Di Martino E, Pitt E, et al. FGFR3 mutation affects cell growth, apoptosis and attachment in keratinocytes. *Exp Cell Res.* 2010; 316:2008–2016.
71. Hafner C, van Oers JM, Hartmann A, et al. High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol.* 2006;126: 2404–2407.
72. Hafner C, Hartmann A, van Oers JM, et al. FGFR3 mutations in seborrheic keratoses are already present in flat lesions and associated with age and localization. *Mod Pathol.* 2007;20:895–903.