

1 Einleitung

Schon zu Beginn dieses Jahrhunderts postulierte Theodor Boveri in seiner Arbeit „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“ (1): „Diese Urzelle des Tumors, wie ich sie im folgenden nennen will, ist nach meiner Hypothese eine Zelle, die infolge eines Vorgangs einen bestimmten, unrichtig kombinierten Chromosomenbestand besitzt. Dieser ist vor allem die Ursache die Wucherungstendenz, die auf alle Abkömmlinge der Urzelle, soweit sie durch reguläre mitotische Zweiteilung entstehen, übergeht“. Boveris vorausschauendes Konzept aus dem Jahre 1902, daß es sich bei Krebs um eine Erkrankung handelt, die auf Veränderungen der Chromosomen und damit letztlich des genetischen Materials (DNA) zurückzuführen ist, konnte sich natürlich erst nach der Entdeckung der DNA durch den erfolgreichen Einsatz gentechnischer Methoden in der experimentellen und klinischen Krebsforschung vollständig durchsetzen und bestätigt werden.

Eines der Hauptziele moderner Krebsforschung besteht in der Identifizierung der Gene, die für die Umwandlung von Normal- in Krebszellen verantwortlich sind, mit der Absicht, verbesserte diagnostische und therapeutische Verfahren für die Praxis zur Verfügung zu stellen.

Gene, die für Krebs verantwortlich oder zumindest bei dessen Entstehung beteiligt sind, werden allgemein als Krebsgene (Onkogene) bezeichnet. Aufgrund prinzipiell unterschiedlicher Funktionsweisen dieser Gene werden sie in zwei Gruppen eingeteilt:

Onkogene und Tumorsuppressorgene

Beiden Gruppen ist gemeinsam, daß sie die Proliferation von Zellen und deren Teilung beeinflussen. Die an sich „harmlosen“ Protoonkogene werden durch eine Aktivierung zu Onkogenen, während die onkogene Wirkung bei Tumorsuppressorgenen sich durch deren Funktionsverlust (in der Regel Inaktivierung durch Mutation/Deletion) offenbart.

Die Abbildung 1.1 veranschaulicht die Wirkungsweise der Onkogene und Tumorsuppressorgene bei deren Aktivierung bzw. Inaktivierung:

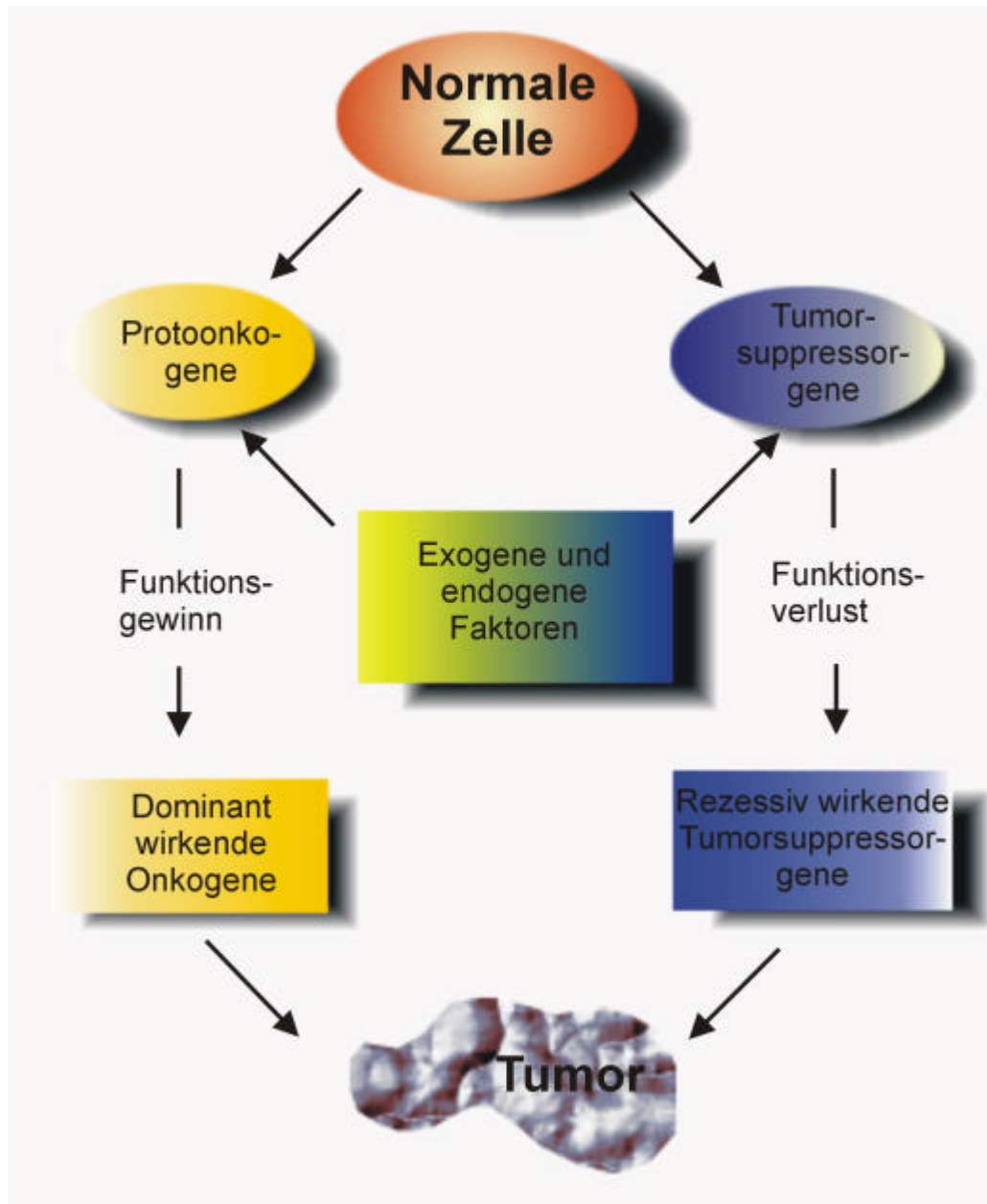


Abb.1.1: Exogene oder endogene Faktoren können zelluläre Proto-Onkogene aktivieren, so daß die auf zellulärer Ebene dominant wirkenden Onkogene zu einer unkontrollierten Proliferation der Zelle und in der Folge zur Tumorentstehung führen kann.

Im Gegensatz dazu können wiederum exo- oder endogene Faktoren zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Diese auf zellulärer Ebene rezessiv wirkenden Gene sind dann nicht mehr in der Lage die Zellproliferation zu kontrollieren.

Die Ursachen, die zu einer Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen führen, können unterschiedlich sein (z.B. ultraviolette und ionisierende Strahlung, best. Chemikalien, Viren). Eine Vielzahl der von Onkogenen exprimierten Proteine sind Proteinkinasen, also Proteine, die andere Proteine phosphorylieren, bei anderen handelt es sich um GTP-bindende und -spaltende G-Proteine. Diese Proteinklassen wirken meist als regulatorische Schalter für intrazelluläre Prozesse. Daneben können Onkogene auch für Proteine kodieren, die als Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren auftreten. Sie zeichnen sich dadurch aus, daß sie die Prozesse der Zellproliferation in permanent aktivierten Zustand halten (2).

Im folgenden sollen beispielhaft einige Aktivierungsmechanismen dargestellt werden:

a) *Translokation*

Bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) kommt es durch die reziproke Translokation zwischen Chromosom 22 und Chromosom 9 [t(9;22)] zur Entstehung des Philadelphia-Chromosom (22q-). Hierbei wird das ABL-Gen des Chromosom 9q auf das Chromosom 22q und das BCR-Gen des Chromosom 22q auf das Chromosom 9q verlagert. Die Translokation führt zu einer Fusion der beiden Gene auf dem nun verkürzten Chromosom 22q- (abl/bcr-Gen). Während das normale Protein niedrige Tyrosinase-Aktivität besitzt, haben die Fusionsproteine (es entstehen verschiedene Proteine durch unterschiedliche Bruchpunkte auf dem Chromosom 22q-) eine erhöhte Aktivität. Dies führt zu gesteigerter Teilung der betroffenen Zellen und letztlich zur Tumorerkrankung (3).

b) *Amplifikation*

Bei der Untersuchung an Neuroblastomen hat sich ein Zusammenhang zwischen der veränderten Expression von N-myc-Genen und des Neuroblastomstadiums ergeben (4). Patienten, die am Neuroblastom im Stadium I erkrankt waren, zeigten eine geringe Expression des N-myc-Gens (12,5%), während Patienten im Stadium III oder IV eine erhöhte Amplifikation des N-myc-Gen aufwiesen (>50%).

c) Punktmutationen

Punktmutationen des Kras-Gen (4), welches auf membrangebundene G-Proteine mit GTPase-Aktivität wirkt, fanden sich bei kolorektalen Tumoren (>40%) und Lungenadenokarzinomen (50%).

d) Phosphorylierung

Das Entstehen des Rous-Hühner-Sarkoms wird durch Phosphorylierung und damit Aktivierung der membrangebundenen Proteinkinase durch das v-src-Gen verursacht (4).

Wie bereits erwähnt, ist die Wirkungsweise der Tumorsuppressorgene und damit deren „Aktivierungsmechanismen“ prinzipiell verschieden von der der Protoonkogene:

Tumorsuppressorgene sind eine Gruppe von Genen, die u.a. die Teilung von Zellen kontrollieren. Erst der Verlust führt zu unkontrollierter Zellteilung und in der Folge zu Tumorwachstum.

Die Schwierigkeiten, den Verlust der Expression eines Tumorsuppressorgens (kurz: TSG) auf molekularer Ebene nachzuweisen, kann einer der Gründe dafür sein, daß sie erst später als ihre natürlichen Gegenspieler (die aktivierten Onkogene) entdeckt wurden, obwohl deren Existenz bereits erstmalig 1971 beim Retinoblastom von Knudson postuliert wurde (7). Das Retinoblastom ist ein von der undifferenzierten Retina (Netzhaut) ausgehender Tumor des Säuglings- und frühen Kindesalters in einem oder beiden Augen. Knudson hat anhand seiner Untersuchungen zeigen können, daß der Verlust beider Allele des Retinoblastom-Gens (RB-Gen), welches auf dem langen Arm des Chromosom 13 (13q14.1–13q14.2) liegt, zum Auftreten des Tumors führte. Ausgehend von seiner Beobachtung, daß im Tumorgewebe beide Allele defekt waren, postulierte er seine „Zwei-Stufen-Hypothese“ bezüglich des Funktionsverlust von TSG.

Um ein Tumorwachstum auszulösen müssen beide Allele des Gens defekt sein. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, daß sich Tumorsuppressorgene auf zellulärer Ebene rezessiv verhalten (d.h. ein gesundes Allel hält das normale Zellwachstum aufrecht). Es ist jeweils mindestens ein Ereignis an jedem der zwei

Allele notwendig, damit der Funktionsverlust des TSG auftritt. Nach heutigem Kenntnisstand tritt in einem der beiden Allele zunächst eine Punktmutation auf (Substitution, Deletion oder Insertion). Die Inaktivierung des zweiten Allels erfolgt in der Regel durch den Verlust von größeren Chromosomenabschnitten, der durch Fehlverteilung (mitotische Non-disjunction) oder andere Mechanismen (z.B. mitotische Rekombination mit Genkonversion bei heterozygoten Genloci) verursacht wird.

Die Abbildung 1.2 veranschaulicht Knudsons „Zwei-Stufen-Hypothese“, d.h. den Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens:

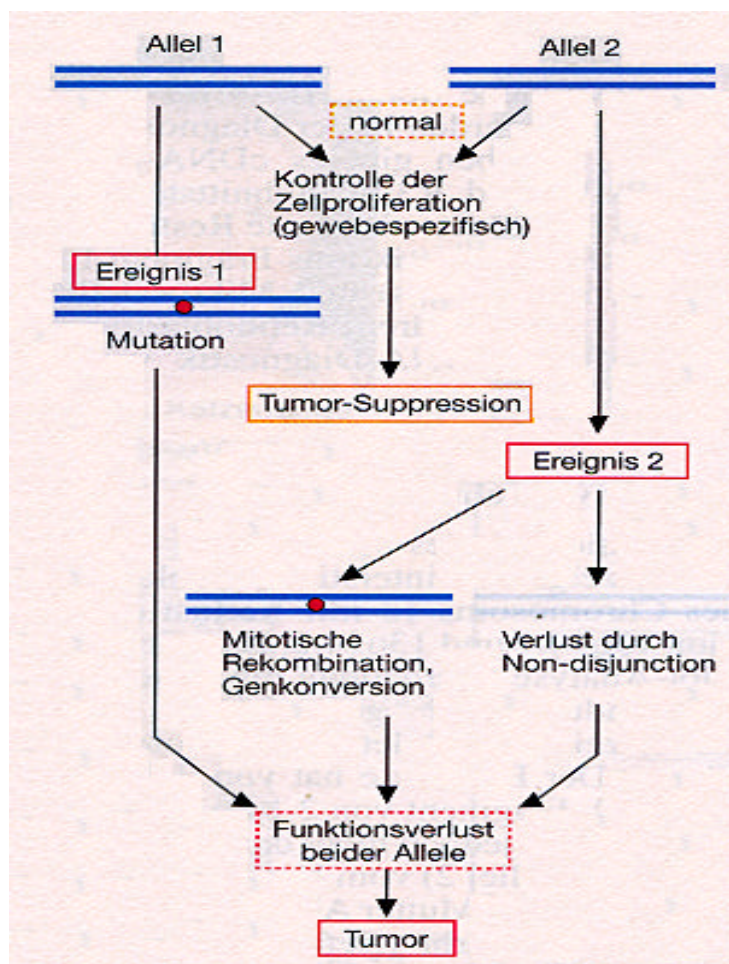


Abb. 1.2: Funktionsverlust beider Allele eines Tumorsuppressorgens

Die erste Mutation in einem TSG kann bereits in den Keimzellen (Gameten) vorliegen und wird von dem betroffenen Elternteil auf die nächste Generation übertragen (vererbt). Bei einer germinalen Mutation sind alle Zellen des Körpers für den vollständigen Funktionsverlust des betreffenden Gens prädisponiert und benötigen nur noch ein (mutatives) Ereignis, um den malignen Phänotyp auszuprägen. Infolge dieser hereditären Form entstehen in der Regel mehrere Tumoren multifokal aus verschiedenen Zellen und die Tumorneigung kann familiär gehäuft auftreten.

Bekannte Beispiele hierfür sind u.a. das Li-Fraumeni-Syndrom, welches bei Keimbahnmutationen des p53-Gens zu einem charakteristischen Spektrum von Tumoren führt (6;7), aber auch das bereits erwähnte RB-Gen. Knudson hat nachgewiesen, daß 40% der Patienten, die am Retinoblastom erkrankt waren, Keimbahnmutationen am Chromosom 13q14.1–13q14.2 aufwiesen.

Bei der somatischen Mutation findet die Mutation des 1. Allels in einer einzelnen Zelle des entsprechenden Gewebes statt. Das Ereignis am 2. Allel betrifft die gleiche Zelle. Der Tumor tritt bei der somatischen Mutation sporadisch auf und entsteht dann unifokal aus einer Zelle (3).

Ist das Genprodukt eines Tumorsuppressorgens bekannt (z.B. p53, RB-Gen), kann bei Vorhandensein entsprechender Reagenzien (z.B. monoklonale Antikörper) dessen Funktionsverlust relativ einfach nachgewiesen werden.

Sind diese Reagenzien nicht verfügbar oder handelt es sich bei den Genen um mutmaßliche Tumorsuppressorgene müssen andere Nachweismethoden gewählt werden.

In den letzten Jahren hat sich ein Verfahren etabliert, welches auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Diese Methode besteht aus einer sogenannten LOH-Analyse mittels Mikrosatelliten, die die Deletion eines Allels in Form größerer chromosomaler Verluste nachweist und einer anschließenden Mutationsanalyse des zweiten Allels.

Eine komplette Auflistung von Tumorsuppressorgenen (TSG), die mit unterschiedlichsten Tumoren in Verbindung gebracht werden, würden den Rahmen

dieser Einleitung sprengen. Für das Prostatakarzinom, das Gegenstand dieser Untersuchung ist, wurden folgende „Kandidaten-TSG“ detektiert:

Name	Genlocus	Jahr	Autor
p53	8p22	1993	G.Steven Bova (8)
	7q31.1	1995	Satoru Takahashi (9)
	17p	1996	James D. Brooks (10)
	6q14 – 21	1996	Kathleen A. Cooney (11)
KAI-1	11p11.2	1996	Jin – Tang Dong (12)
	13q14	1996	Kathleen A. Cooney (13)
	8p12 – 21	1996	Cathy D. Vocke (14)
	1q24	1997	Henrik Grönberg (15)
	16q22.1	1997	Alain Latil (16)

Tab.1.1: Bekannte „Kandidaten-TSG“ in Geweben von Prostatakarzinomen. Bis auf p53 und KAI-1 handelt es sich um noch nicht allgemein anerkannte Genregionen.

Bei der Suche nach defekten Genen bei Patienten mit Prostatakarzinomen gelang es Gray (17) und Trybus (18) eine Region auf dem langen Arm des Chromosom 10 ausfindig zu machen, deren Verlust für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sein sollte. Cairns konnte 1997 (19) nachweisen, daß in dieser Region der Funktionsverlust vom TSG PTEN an der Entstehung von Prostatakarzinomen beteiligt ist: Beim Vergleich des Tumor– mit Normalgewebe seiner 80 Patienten, die

an Prostatakarzinomen erkrankt waren, trat in > 28 % der Fälle an diesem Locus LOH auf.

Diese ersten Hinweise für eine mögliche Beteiligung des Gen PTEN bei der Entstehung des Prostatakarzinoms haben uns bewogen, diesen Angaben bei unserem Patientenmaterial nachzugehen.

Das TSG PTEN kartiert auf dem langen Arm des Chromosom 10 (10q23.3). Es besteht aus 9 Exons, die mRNA ist 1212 Basenpaare lang (EMBL accession number: U93051).

Für das PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) gibt es in der wissenschaftlichen Literatur zwei Synonyme. Es wird auch als MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers 1) bezeichnet (EMBL accession number: U92436), da der Verlust des TSG in verschiedenen Tumoren nachweisbar war. Die Bezeichnung TEP1 (TGF-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) beschrieb den Einfluß auf Wachstumsfaktoren. Durchgesetzt hat sich die Bezeichnung PTEN, da biochemische Untersuchungen belegen konnten, daß es sich um eine Lipidphosphatase handelt.

Neben dem Vorhandensein von LOH gab es noch andere Hinweise, daß es sich bei PTEN um ein TSG handelte:

Es konnte nachgewiesen werden, daß Keimbahnmutationen des Gen PTEN vorliegen. Debbie J. Marsh (20) untersuchte Patienten mit der vererbaren Cowden Krankheit (Synonym: multiples Hamartom-Syndrom) und dem Bannayan-Riley-Ruvalcava-Syndrom (autosomal-dominant erbliches Krankheitsbild mit Megalenzephalie, Hamartomen, Polyposis des Intestinaltrakts, Pigmentanomalien und verzögerter psychomotorischer Entwicklung). Sie stellte fest, daß 30 von 37 (81%) der an Cowden Krankheit leidenden Patienten Keimzellmutationen am Gen PTEN aufwiesen. Die Keimzellmutationen bei Patienten, die am Bannayan-Riley-Ruvalcava-Syndrom erkrankt waren betrug 57% (vier von sieben Patienten waren betroffen). Diese Beobachtungen stützen die „Zwei-Stufen-Hypothese“ von Knudson. Vorausgesetzt in der Keimbahn liegt bereits eine Mutation vor, bedarf es nur noch eines weiteren Mutationereignisses, um den erkrankten Phänotyp

auszuprägen. Es konnte festgestellt werden, daß die Patienten, bei denen eine Keimbahnmutation nachgewiesen werden konnte, ein erheblich höheres Risiko hatten (81% bzw. 57%), an Tumoren zu erkranken. Bei Menschen, die keine Keimbahnmutationen aufweisen, ist das Risiko des Auftretens von zwei Mutationsereignissen an beiden Allelen eines Gens wesentlich geringer.

Gentransfereexperimente stützten ebenfalls die Annahme, daß PTEN ein TSG ist (21), welches sich auf zellulärer Ebene rezessiv verhält. Versuche mit „knock-out-Mäusen“ konnten zeigen, daß Mäuse, die kein funktionelles Gen PTEN mehr besaßen, starben, bevor sie geboren waren, während Mäuse, die nur ein funktionierendes Allel des Gen PTEN hatten, häufiger maligne Neoplasien aufwiesen als die Kontrollmäuse, die heterozygot am Genlocus waren (also zwei gesunde Allele aufwiesen).

Als ein vierter Hinweis, daß PTEN die Kriterien für ein TSG erfüllt, können Versuche angesehen werden, bei denen Tumorzellen von Patienten mit Cowden-Syndrom und gleichzeitiger Gliomerkrankung hinsichtlich des PTEN Status untersucht wurden. Die Gliomzellen wiesen kein funktionelles Allel des Gen PTEN auf, da beim Cowden-Syndrom ein Allel in der Keimbahn bereits inaktiviert vorliegt. Eine zweite Mutation induzierte das Auftreten des Glioms. In diese Tumorzellen des Glioms wurde ein gesundes Gen PTEN transformiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß das Gliomwachstum inhibiert werden konnte.

Die biochemische Wirkungsweise des PTEN auf zellulärer Ebene läßt sich wie folgt beschreiben: Beim PTEN handelt es sich um eine Lipidphosphatase, deren Angriffsorte Phospholipide sind, die sich in der Plasmamembran befinden. Die Phospholipide wandeln extrazelluläre in intrazelluläre Signale um. Die bekannteste Phosphoinositidkaskade ist die Reaktionskette des IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat). Neben dem IP₃ gibt es noch andere Inositolphosphatverbindungen, wie z. B. das PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat).

PIP₃ ist ein weiteres intrazelluläres Phospholipid. Es fungiert als second messenger für proliferationsstimulierende Faktoren wie z.B. Insulin (Wachstumsfaktoren - kurz: WF). Wenn Insulin an der Zellwand gebunden wird, entsteht PIP₃ indem sich ein Phosphatmolekül mit PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat) verbindet. Auf

diesem Weg aktiviert PIP3 Substrate, die der Zellproliferation dienen, und die Proteinkinase B, die wiederum die Apoptose inhibiert.

Maehama und Dixon (22) haben in ihrer Publikation veranschaulicht, daß PTEN den second messenger PIP3 dephosphoryliert. Sie setzten menschliche Zellen mit funktionierenden PTEN Insulin aus. Es zeigte sich, daß die Konzentration von PIP3 abnahm, ohne das eine insulininduzierte Phosphoinositol-3-phosphatase nachgewiesen werden konnte. Andererseits konnte festgestellt werden, daß bei menschlichen Zellen mit defektem PTEN ohne Insulineinfluß die Konzentration von PIP3 zunahm.

Durch dieses Experiment konnten sie nachweisen, daß PTEN das 3. Kohlenstoffatom des Inositolrings von PIP3 zu PIP2 katalysiert. Es ist somit eine Phosphoinositid-3-phosphatase.

Die Abbildung 1.3 veranschaulicht die Wirkungsweise von PTEN auf zellulärer Ebene:

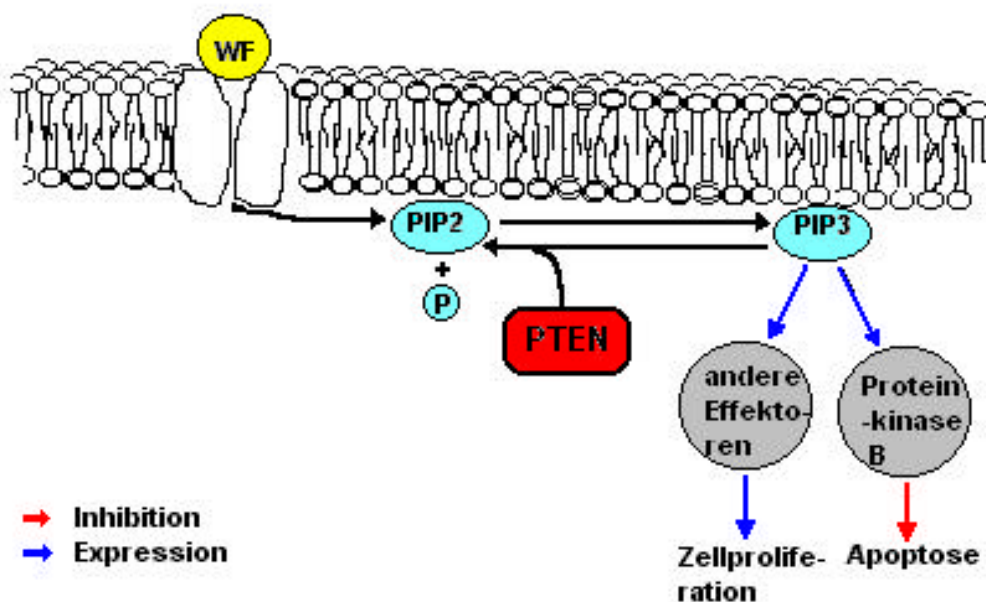


Abb. 1.3: Wirkungsweise der Phosphoinositid-3-phosphatase/PTEN auf zellulärer Ebene
 Indem PTEN PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert nimmt die Zellproliferation ab und die Apoptose wird nicht mehr gehemmt.
 Durch den Verlust von PTEN nimmt die Proliferation der Zellen zu und die Apoptose wird gehemmt. Es kommt zu unkontrolliertem Zellwachstum, d.h. zur Tumorentstehung.

Nachdem PTEN nachweislich bei vielen Tumoren offensichtlich eine essentielle Rolle bei deren Entstehung und/oder Progression spielt, liegt die Vermutung nahe, daß es auch bei der Entstehung von Prostatakarzinomen durchaus bedeutsam sein kann.

Das Prostatakarzinom ist eine der häufigsten malignen Neoplasien der westlichen Welt (23). Bezogen auf die Anzahl der männlichen Krebserkrankungen nimmt es die 1.Stelle vor dem Bronchialkarzinom ein.

Die wichtigste diagnostische Maßnahme zur Früherkennung des Prostatakarzinoms ist neben der rektalen Palpation die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens sowie transrektale Sonographie. Es entstehen 75% der Prostatakarzinome im hinteren Prostatalappen (24). Fast alle Karzinome wachsen in der äußeren Zone der Prostata (Rindenzone, subkapsuläre Lage), ein geringer Teil sowohl in der äußeren als auch in der inneren Zone (periurethrales Gebiet). Dabei handelt es sich meistens um fortgeschrittene Tumoren, die von der subkapsulären Zone an die Urethra vorgewachsen sind. Äußerst selten liegen Karzinome ausschließlich im periurethralen Bereich.

Die rektale Palpation ist Bestandteil der Vorsorgeuntersuchung des über 45 Jahre alten Mannes. Diese Krebsfrüherkennung nehmen jedoch nur ca. 15% der männlichen Bevölkerung wahr. Jede Verhärtung, abgrenzbarer Knoten oder höckriger Oberfläche bedarf der Abklärung mittels Stanz- oder Saugbiopsie (Trefferquote ca. 90%).

Es gibt vier Manifestationsformen des Prostatakarzinoms:

- a) Das *klinisch manifeste Prostatakarzinom* wird durch klinische Untersuchung mit nachfolgender histologischer Sicherung entdeckt.
- b) Als *latentes Prostatakarzinom* wird ein Krebs bezeichnet, der erst bei der Autopsie entdeckt wird.
- c) Unter einem *inzidenten Karzinom* versteht man einen zufällig im bioptischen Material entdeckten Prostatakrebs bei klinisch unverdächtiger Prostata.
- d) Von einem *okkulten Prostatakarzinom* spricht man, wenn beim Patienten zuerst eine Metastase bei zunächst noch unbekanntem Primärtumor festgestellt wird.

Die Klassifikation der Prostatakarzinome richtet sich nach dem maligne entarteten Gewebeanteil der Prostata. So sind 95% der Prostatakarzinome Adenokarzinome. Die restlichen 5% entfallen auf seltene Karzinome wie muzinöses und intraduktal-papilläres Karzinom, Karzinoid und kleinzelliges Karzinom, Transitionalkarzinom, adenoid-zystisches Karzinom und Plattenepithelkarzinom.

Der wichtigste organspezifische Laborparameter ist das PSA (prostataspezifisches Antigen). Sie gilt als Tumormarker und dient der Verlaufsbeobachtung unter der Therapie.

Die Therapie des Prostatakarzinoms richtet sich nach Stadium und Ausbreitung des Tumors. Je nachdem, ob ein kurativer oder palliativer Ansatz gewählt wird besteht die Therapie aus radikaler Prostatektomie, Radiotherapie, Hormon- oder/und Chemotherapie.

Genauso verhält es sich bei der Prognose. Ist der Tumor auf die Prostata beschränkt und wird eine radikale Prostatektomie durchgeführt beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 85%. Bei Metastasierung sinkt die 5-Jahresüberlebensrate auf ca. 20%.

Durch die Beobachtung des PSA-Wertes läßt sich bei einem erneuten Anstieg ein Rezidiv anzeigen und dementsprechend behandeln. Aus u.a. diesem Grund ist die Letalität (das Verhältnis der Anzahl der an einer bestimmten Krankheit Verstorbenen zur Anzahl neuer Fälle) um etwa ein Drittel niedriger als die Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungsfälle einer bestimmten Erkrankung innerhalb eines bestimmten Zeitraumes).

Um die hohen Kosten der Behandlungsmethoden zu senken, ist es sinnvoll, sein Engagement auf die Erforschung der Ursache zu lenken, um dann dort den Defekt behandeln zu können.

Deshalb konzentriert sich die moderne Krebsforschung auf die Identifizierung der Gene, die durch Aktivierung oder Inaktivierung das Tumorwachstum auslösen. Wenn diese Gene ausreichend biochemisch charakterisiert sind, ist es möglich, durch geeignete Methoden Arzneimittel herzustellen, die spezifisch wirken und dann am Ort des Geschehens den Gendefekt beseitigen.

Ein Beispiel hierfür ist der monoklonale Antikörper Herceptin, welcher bei einer speziellen Art von Brustkrebstumoren angewendet wird. Diese Tumoren tragen Rezeptoren HER2 (human epidermal receptor 2) für Wachstumshormone auf der Zelloberfläche. Herceptin ist in der Lage sich an diese Proteine anzulagern und somit die Bindungsstellen die für die Zellproliferation benötigten Rezeptoren HER2 zu blockieren. Da auch die Metastasen diese HER2-Rezeptoren tragen können ist der Antikörper auch bei proliferierenden Tumoren einsetzbar. Besonders wirksam ist Herceptin in Verbindung mit einer Chemotherapie. Während eine alleinige Behandlung mit Herceptin nur bei 14% der Patienten wirksam ist, konnte bei einer gleichzeitigen Behandlung mit den Chemotherapeutika Cyclophosphamid und Doxorubicin eine Wirksamkeit von 50% erreicht werden (25).

Unsere Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung der Frage leisten, ob Mutationen im Bereich des PTEN gehäuft auftreten und damit in Zusammenhang mit der Ätiologie des Prostatakarzinoms gebracht werden können.

Für die Experimente zur Mutationsanalyse von PTEN wurde genomische DNA, die aus dem Normalgewebe und dem dazugehörigem Tumorgewebe nach vorheriger Begutachtung eines Pathologen durch Mikrodissektion gewonnen wurde, isoliert und gereinigt.

Anschließend wurde eine Mikrosatelliten-Analyse durchgeführt, um Tumorgewebe zu identifizieren, die LOH im Bereich des Gen PTEN aufwiesen. Im Anschluß daran wurden die LOH-aufweisenden Tumorproben sequenziert, um Mutationen am Gen PTEN zu detektieren.