

**Mutationsanalyse neuroendokriner Tumoren
des Ileums**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Stoß, Laura

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Sipos

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Kopp

Für Maïke

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 NEUROENDOKRINE TUMOREN DES GASTROINTESTINALTRAKTS	1
1.2 NEUROENDOKRINE TUMOREN DES ILEUMS.....	4
1.2.1 Klinik	4
1.2.2 Pathogenese.....	5
1.2.3 Diagnostik.....	9
1.2.4 Therapie.....	10
1.2.5 Prognose	12
1.3 VORUNTERSUCHUNGEN DURCH DIE ARBEITSGRUPPE.....	12
1.4 ÜBERBLICK ÜBER AUSGEWÄHLTE TARGETS.....	14
1.4.1 <i>CABYR</i>	14
1.4.2 <i>ERBB2</i>	15
1.4.3 <i>ERCC4</i>	15
1.4.4 <i>MSH6</i>	15
1.4.5 <i>NFATC1</i>	16
1.4.6 <i>PIEZO2</i>	20
1.4.7 <i>PIK3C3</i>	20
1.5 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 MATERIAL	22
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.2 Puffer	22
2.1.3 Primer	23
2.1.4 Gebrauchsfertige Kits	24
2.1.5 Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.6 Geräte.....	25
2.2 METHODEN	26
2.2.1 Aufarbeitung der Gewebeproben	26
2.2.2 Nukleinsäureextraktion	27

2.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.2.4	Qualitäts-Polymerasekettenreaktion und Gelbild	29
2.2.5	DNA-Sequenzierung	31
2.2.6	Exomsequenzierung fünf ausgewählter Tumoren.....	35
2.2.7	Vorabanalysen an ausgewählten Targets	36
3	ERGEBNISSE.....	37
3.1	PRÄPARATION DER GEWEBEPROBEN.....	37
3.1.1	HE-Schnitte.....	37
3.1.2	Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA	37
3.2	ERGEBNISSE DER QUALITÄTS-PCR	39
3.3	AUSWAHL DER ZU ANALYSIERENDEN TUMORPROBEN	40
3.4	EXOMSEQUENZIERUNG	42
3.5	VALIDIERUNG DER EXOMSEQUENZIERUNG	43
3.6	ANALYSE DER AUSGEWÄHLTEN TARGETS AM KOLLEKTIV	44
3.6.1	Mutationsanalyse <i>CABYR</i>	44
3.6.2	Mutationsanalyse <i>ERBB2</i>	46
3.6.3	Mutationsanalyse <i>ERCC4</i>	48
3.6.4	Mutationsanalyse <i>MSH6</i>	49
3.6.5	Mutationsanalyse <i>NFATC1</i>	50
3.6.6	Mutationsanalyse <i>PIEZO2</i>	55
3.6.7	Mutationsanalyse <i>PIK3C3</i>	56
4	DISKUSSION.....	59
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	75
	DANKSAGUNG	IX
	ANHANG.....	X
	PCR-PROGRAMME.....	X
	DNA-LEITER.....	XII
	SEQUENZEN.....	XIII

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APC	adenomatous polyposis coli
BP	Basenpaar(e)
CABYR	calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated
CgA	Chromogranin A
c-myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CNV	Copy Number Variation
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
COX-2	Cyclooxygenase 2
CT	Computertomografie
DAD1	defender against cell death 1
DCC	DCC netrin 1 receptor
ddNTPs	Dideoxynukleotide
dNTP	Deoxynukleotid
DTCS	Dye Terminator Cycle Sequencing
EC	enterochromaffin
ELK-1	ELK1, member of ETS oncogene family
ERBB2	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERCC4	excision repair cross-complementation group 4
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Grading
GEP	Gastroenteropankreatisch
GI	Gastrointestinal-
GRP	Gastric release-Peptid
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCG	humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIC1	hypermethylated in cancer 1

HPF	high power field
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IFN γ	Interferon γ
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
MIB-1	mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1
MRT	Magnetresonanztomografie
MSH6	mutS homolog 6
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NE	neuroendokrin
NEC	neuroendokrines Karzinom
NEN	neuroendokrine Neoplasie
NET	neuroendokriner Tumor
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
NHR	NFAT Homology Region
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIEZO2	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2
PRRT	Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie
PET	Positronenemissionstomografie
PIK3C3	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3
Q-PCR	Qualitäts-Polymerase-Kettenreaktion
RASSF1a	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
RFA	Radiofrequenzablation
RHR	Rel homology region
rpm	Revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute
SEER	Surveillance-Epidemiology-and-End-Results
SLS	Sample Loading Solution
Smad4/DPC4	SMAD family member 4
SNP	single nucleotide polymorphism
SNV	single nucleotide variation

TACE	transarterielle Chemoembolisation
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TP53	tumor protein p53
VIP	vasointestinales Peptid
WHO	World Health Organization
5-HIES	5-Hydroxyindolessigsäure

1 Einleitung

1.1 Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NET) stellen Tumoren dar, die sich aus dem diffusen endokrinen System des Gastrointestinaltrakts heraus entwickeln. Dieses stellt das größte endokrine System des gesamten menschlichen Organismus dar und geht auf mindestens 13 verschiedene Typen neuroendokriner Zellen mit über 50 verschiedenen bioaktiven Peptiden und Aminen zurück [1, 2]. Letztere Substanzen, wie etwa Serotonin, Somatostatin sowie Gastrin werden nach ihrer Produktion in verschiedenen Vesikeln gespeichert. Immunhistochemisch sind diese Vesikel durch spezielle Proteine charakterisiert, insbesondere durch Chromogranin A und Synaptophysin. Die Expression dieser Proteine spiegelt in gewisser Weise eine Ähnlichkeit mit herkömmlichen Nervenzellen wider. Diese Ähnlichkeit sowie ihre Fähigkeit, Proteine zu sezernieren, führte zu der Bezeichnung "neuroendokrine Zellen" [3].

Das Vorhandensein neuroendokriner (NE)-Zellen ist jedoch nicht auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt. Vielmehr finden sich diese auch in vielen anderen Organen wie etwa Lunge, Thymus, Schilddrüse und Hypophyse [2]. In den Jahren 1999 bis 2010 erfasste das NET-Register Berlin 2009 gesicherte NET, wonach sich die häufigsten Primärlokalisationen innerhalb des Pankreas (34,2 %) sowie innerhalb des Dünndarms (25,8 %) fanden (vgl. Abbildung 1) [4].

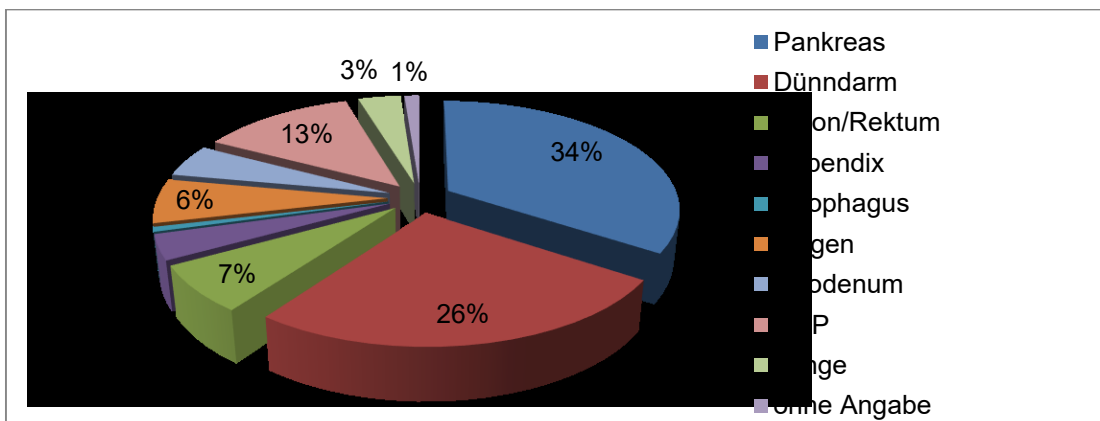


Abbildung 1: Primärtumorlokalisation neuroendokriner Tumoren, n=2009 (CUP = Cancer of unknown primary; modifiziert nach [4])

Die NE-Zellen des Gastrointestinaltrakts stammen nach heutigem Wissen von lokalen multipotenten gastrointestinalen Stammzellen ab und sind nicht – wie früher vermutet – Folge einer Migration aus der Neuralleiste [1]. Das zentrale Ereignis um die Differenzierung dieser Stammzellen, welches schlussendlich zur ungehemmten Proliferation und Tumorbildung führt, ist bis heute nur unzureichend verstanden (vgl. Kapitel 1.2.2). Tabelle 1 soll einen Überblick über die wichtigsten Arten von NE-Zellen, deren Lokalisation und zugehörigen Tumoren verschaffen.

Tabelle 1: Überblick über die wichtigsten NE-Zellen, deren Eigenschaften sowie über die sich aus ihnen ableitenden Tumoren [1, 2, 5]

NE-Zelle	Hormon	Lokalisation	Tumor
A-Zelle	Glukagon	Pankreas	Glukagonom
B-Zelle	Insulin	Pankreas	Insulinom
D-Zelle	Somatostatin	Gesamter GI-Trakt	Somatostatinom
EC-Zelle	Serotonin u.a.	Gesamter GI-Trakt	Karzinoid
G-Zelle	Gastrin	Magen, Duodenum	Gastrinom
VIP-Zelle	VIP	Gesamter GI-Trakt	VIPom
<i>NE: neuroendokrin</i>		<i>GI: Gastrointestinaltrakt</i>	
<i>EC: enterochromaffin</i>		<i>VIP: vasoaktives intestinales Peptid</i>	

NET weisen eine ausgeprägte biologische Heterogenität auf. Diese reicht von einem langsam wachsenden Verhalten bis zu sehr aggressiven Formen mit schnellem Voranschreiten der Krankheit und schlechter Prognose. Die WHO-Klassifikation von 2010 führte den Ausdruck der neuroendokrinen Neoplasien (NEN) als Oberbegriff für NET unterschiedlicher Differenzierungsgrade ein. Im Speziellen unterteilt diese die GEP-NEN in gut differenzierte neuroendokrine Tumoren G1 und G2 sowie schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome G3 (vgl. Tabelle 2) [5]. Zur Bestimmung des Gradings werden neuerdings entweder der Ki67-Index, ein Proliferationsmarker, oder der MIB-1-Index, eine Angabe der Mitoserate, erfasst [4, 6, 7]. Während ersterer immunhistochemisch bestimmt werden kann, erfolgt die Bestimmung der Mitosen manuell, indem diese i.d.R. in einem 10-fach vergrößerten Sichtfeld (entspricht 2 mm²) mikroskopisch ausgezählt werden [6].

Tabelle 2: WHO-Klassifikation gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien 2010 (modifiziert nach [6, 7])

Klassifikation	Grading	Ki67-Index	MIB-1-Index*
Neuroendokriner Tumor (Karzinoid)	Grad 1	≤ 2 %	< 2
Neuroendokriner Tumor	Grad 2	3-20 %	2-20
Neuroendokrines Karzinom	Grad 3	> 20 %	> 20

* in 10 HPF = 10 high power field = Sichtfeld in 10-facher Vergrößerung

Inzidenz sowie Prävalenz neuroendokriner Tumoren erlebten in den letzten Jahrzehnten einen extremen Zuwachs. Daten hierzu schwanken zwischen 2,5-6 Neuerkrankungen/100.000 pro Jahr [1, 6]. Laut des US-amerikanischen Surveillance-Epidemiology-and-End-Results (SEER)-Registers stellt dies bezogen auf die Jahre 1975 bis 2005 einen Anstieg auf 460 % der Dünndarm-NET sowie 720 % der gesamten GEP-NET dar (vgl. Abbildung 2) [1].

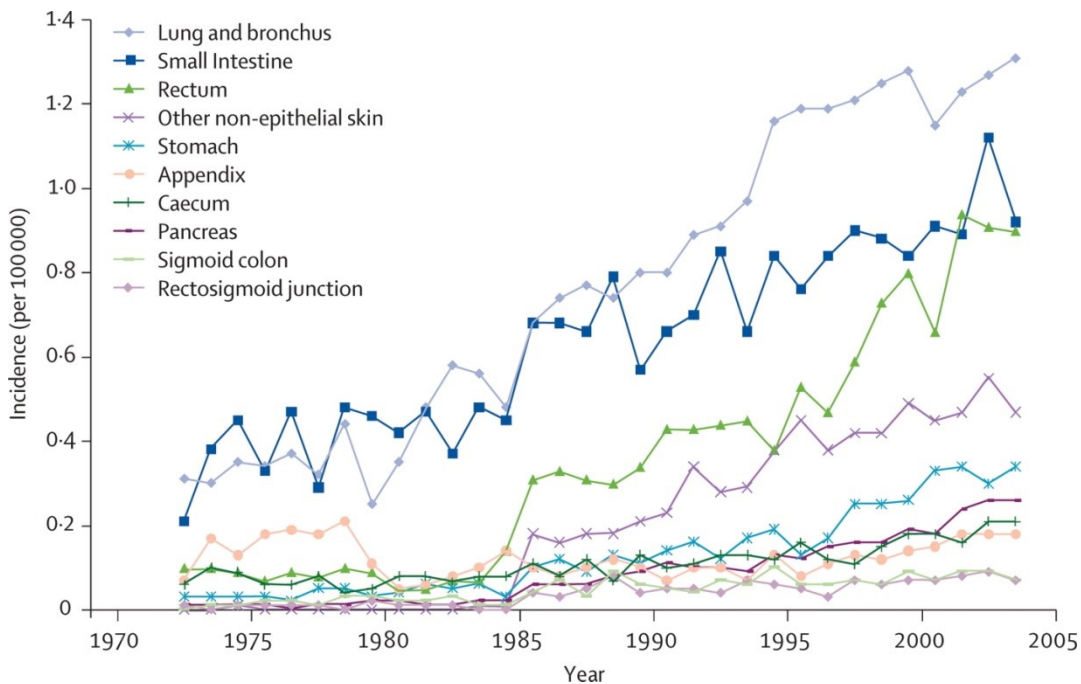


Abbildung 2: Inzidenz verschiedener neuroendokriner Tumoren in der US-Bevölkerung in den Jahren 1975 bis 2005 [1]

Mögliche Gründe hierfür sind zum einen die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten, ihr verbreiteter Gebrauch sowie eine erhöhte Prävalenz von Diabetes

mellitus und Adipositas [6]. Da die letzten beiden Faktoren in Zukunft vermutlich nicht an Bedeutung abnehmen, vielmehr sogar eher an Bedeutung gewinnen werden, ist weltweit eine stetige Steigerung der Inzidenzraten zu erwarten.

Neben dem meist sporadischen Auftreten neuroendokriner Tumoren finden sich zudem vereinzelt GEP-NET innerhalb genetischer Syndrome, wie u.a. im MEN1-Syndrom, im von Hippel-Lindau-Syndrom sowie im Rahmen der Neurofibromatose Typ 1 [1]. Dies sei nur am Rande erwähnt, da jene familiären NET sich äußerst selten im Ileum manifestieren und darüber hinaus für diese Arbeit nicht von Relevanz waren.

1.2 Neuroendokrine Tumoren des Ileums

1.2.1 Klinik

Neuroendokrine Tumoren des Dünndarms stellen nach NET des Pankreas die zweithäufigste Gruppe an neuroendokrinen Neoplasien dar. Ihre Lokalisation beschränkt sich hauptsächlich auf das distale Ileum. Proximales Ileum sowie Jejunum sind nur äußerst selten betroffen [6].

Die Klinik ilealer NET steht deren biologischer Heterogenität in nichts nach. Ihre Bandbreite beinhaltet einen komplett asymptomatischen Verlauf wie auch schwerste Beeinträchtigungen. Ihre Symptomatik hängt zum einen von ihrer Lokalisation, zum anderen von ihrer hormonellen Aktivität ab.

Funktionelle NET sind Tumoren, die exzessiv Hormone oder Neuropeptide sezernieren und über die dadurch angestoßenen Signalkaskaden hormon- bzw. peptidspezifische Symptome hervorrufen. Bei den funktionellen ilealen NET handelt es sich überwiegend um serotoninproduzierende Tumoren, die den enterochromaffinen Zellen des diffusen endokrinen Systems entspringen. Vermittelt durch eine Hypersekretion an Serotonin – basierend auf einer gesteigerten enzymatischen Umwandlung von Tryptophan in Serotonin – stehen klinisch chronische Durchfälle sowie eine Endokardfibrose im Vordergrund [8]. Zusätzliche Symptome wie Flushsymptomatik und Asthmaanfälle werden durch weitere anfallende Substanzen, insbesondere durch Bradykinin, ausgelöst. Die klinische Trias aus Flush, Durchfällen und kardialen Symptomen wird auch Karzinoid-Syndrom genannt [1]. Da Serotonin einem ausgeprägten hepatischen Metabolismus

unterliegt, sammelt es sich erst dann an, wenn das Leberparenchym bereits beschädigt ist, die Leber also metastatisch durchsetzt ist [1]. Die Karzinoidkrise stellt eine lebensbedrohliche Exazerbation des Karzinoid-Syndroms dar. Sie manifestiert sich in der Regel durch akut auftretende Hitzewallungen, Durchfälle und Asthmaanfälle, komplettiert durch extreme Blutdruckschwankungen sowie Herzrhythmusstörungen [9]. Die Karzinoid-Krise folgt nicht selten als Reaktion des Körpers auf eine Narkose oder eine Operation [6].

Den weitaus größeren Teil neuroendokriner Tumoren des Ileums stellen nichtfunktionelle NET dar. Diese fallen in der Regel erst sehr spät auf, da sich ihre Symptomatik aufgrund ihrer Hormoninaktivität auf sehr unspezifische Beschwerden wie Gewichtsverlust und Durchfälle beschränkt. Erstsymptom ist oftmals eine Darmverengung, bisweilen auch ein kompletter Darmverschluss. Gelegentlich werden im Rahmen einer Ultraschalluntersuchung Lebermetastasen festgestellt, deren Primärtumor sich in der Folge als NET herausstellt.

Die Metastasierung ilealer NET erfolgt verhältnismäßig früh und unabhängig von der Größe des Primärtumors. Zielorgane stellen insbesondere Leber und Peritoneum dar.

1.2.2 Pathogenese

Das gegenwärtige Wissen bezüglich der Pathogenese sporadischer ilealer NET zeigt sich als äußerst unergiebig. Unumstritten stellt sich diesbezüglich jedoch die Bedeutsamkeit des Chromosom 18 dar [10-16].

Copy Number Variations

Copy Number Variations (CNV) stellen eine Art Veränderung im Erbgut dar, die auf einem Gewinn oder einem Verlust einer genetischen Region beruhen. Die Spannweite reicht von veränderten Segmenten im Genom bis hin zum Gewinn oder Verlust eines gesamten Chromosoms. CNV werden regelmäßig im Genom von Tumorzellen beobachtet, weshalb ihnen eine Bedeutung in der Tumorgenese zugeschrieben wird.

Der Chromosom 18-Verlust stellt lediglich eine von vielen CNV dar, die sich in ilealen NET finden lassen. Tatsächlich fand sich in Untersuchungen durch Andersson et al. keine Tumorprobe ohne CNV-Nachweis [14]. So fand seine Forschungsgruppe im Durchschnitt 7,1 dieser Variationen pro Tumor mit einer Spannbreite von 1-22 CNV, wobei Chromosomenverluste gegenüber Chromosomengewinnen überwogen (Ratio = 1,4). Im Vergleich von Primärtumoren und Lebermetastasen fiel sodann auf, dass die CNV-Menge in Metastasen in etwa doppelt so hoch war wie die CNV-Menge im Primärtumor, sich das Verhältnis von Chromosomengewinnen zu Chromosomenverlusten jedoch im Wesentlichen unverändert darstellte. Tabelle 3 und Abbildung 3 zeigen die Häufigkeiten verschiedener CNV in NET des Ileums.

Tabelle 3: Häufigkeiten einzelner CNV in NET des Ileums [13-15]

Chromosomenverluste		Chromosomenzugewinne	
18	(74-100 %)	20	(17-33 %)
9p*	(14-50 %)	4	(30-33 %)
11q	(21 %)	14q	(17-23 %)
16q	(16 %)	5	(17-28 %)
13*	(16 %)	7*	(17 %)
3p	(14 %)	12, 13, 16	(5 %)

** nur in Lebermetastasen vorkommend*

Hinsichtlich ilealer NET zeigen zahlreiche Voruntersuchungen als häufigste CNV Verluste des Chromosom 18, ungeachtet dessen, ob der Verlust das gesamte Chromosom betrifft oder lediglich Teile davon (durchschnittlich in 74-100 % der untersuchten Proben) [13-15]. Interessanterweise findet sich eben diese CNV in ähnlicher Häufigkeit in Primärtumoren wie auch in Lebermetastasen wieder, so dass diese eher in der frühen Pathogenese ilealer NET von Bedeutung zu sein scheint [14].

Die Amplifikation von Chromosom 14q stellt gleichermaßen eine regelmäßige CNV dar und stand bereits im Zentrum von Forschungen mit Bezug zur Pathogenese ilealer NET. Grundlage hierfür war die Beobachtung, dass eine bei der

Amplifikation entstehende Region auf Chromosom 14 ein Kontrollelement umfasst, welches die Expression von DAD1 (Defender against Cell Death 1) steuert [17, 18]. Die Überexpression jenes antiapoptotischen Proteins wiederum stellt einen Indikator für schlechtes Therapieansprechen bestimmter Tumorarten (u.a. M. Hodgkin, Leberzellkarzinom, Prostatakarzinom) dar [15]. In Untersuchungen durch Kulke et al. Zeigte DAD1 eine deutlich erhöhte Expression in Tumorzellen ilealer NET im Vergleich zur normalen Mukosa [17, 18].

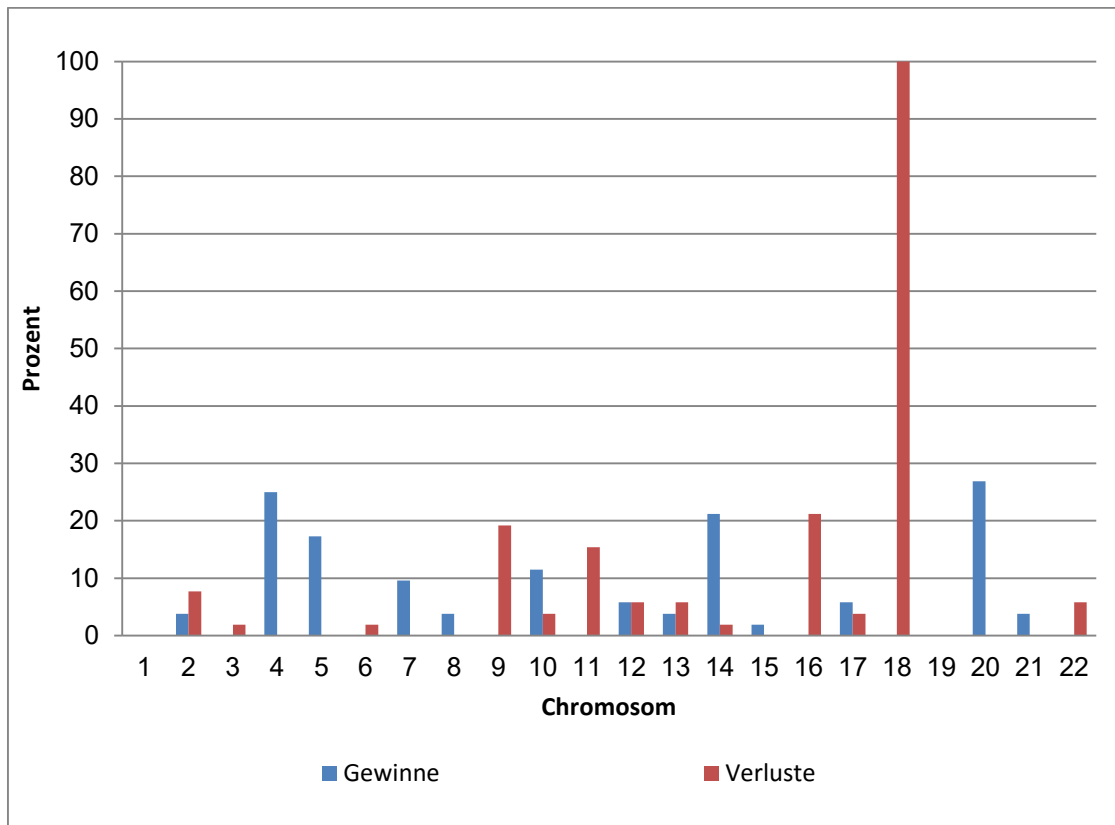


Abbildung 3: Prozentuale Häufigkeiten von CNV-Gewinnen (blau) und CNV-Verlusten (rot) pro Chromosom in neuroendokrinen Tumoren des Ileums ohne Unterscheidung zwischen segmentalen oder komplett chromosomalen CNV [13]: untersucht wurden 24 Primärtumoren, 1 Lebermetastase und 27 Mesenterialmetastasen.

Chromosom 7-Gewinne sowie Verluste der Chromosomen 9 und 13 wurden lediglich in Lebermetastasen gefunden, was auf eine mögliche Rolle dieser genetischen Aberrationen in der Tumorprogression und Ausbildung von Metastasen hinweist.

Genmutationsanalysen

Löllgen et al. untersuchten bereits vor zehn Jahren das auf Chromosom 18 lokalisierte Gen *Smad4/DPC4* in Bezug auf NET des Ileums. Eine Mutation des in Pankreas- und Kolonkarzinomen regelmäßig mutierten Tumorsuppressorgens konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [12]. Aus seinen Analysen schließt das Team um Löllgen weiterhin, das für die Pathogenese ilealer NET relevante Tumorsuppressorgen befände sich in einem Gencluster weiter distal der Chromosomen-Region 18q21.

TP53 sowie *p16^{INK4a}*, zwei in multiplen Tumoren veränderte Tumorsuppressorgene auf Chromosom 9, wurden innerhalb weiterer Forschungsprojekte molekularbiologisch analysiert. Auch sie zeigten keine Mutation [10].

Die häufigste, allerdings in gastrointestinalen NET im Gesamten detektierte Mutation, stellt die des *β-catenin*-Gens auf Chromosom 3 dar. Das Genprodukt *β-catenin* kann mutationsbedingt fortan nicht mehr phosphoryliert sowie degradiert werden und transloziert in den Kern, um hier in Kombination mit Cofaktoren die Transkription bestimmter für Zelldifferenzierung und Zellproliferation relevanter Gene zu induzieren [19]. In Untersuchungen durch Fujimori et al. konnte diese Mutation in 38 % aller GI-NET beobachtet werden [20]. Interessanterweise zeigen neuere Forschungsergebnisse, dass 30 % der GI-NET eine Translokation von *β-catenin* in den Kern aufweisen ohne eine entsprechende Mutation nachweisen zu können [19].

Hypermethylierte Gene

Viele Gene, hierunter *p16^{INK4a}*, *APC*, *MEN1*, *HIC1* und *RASSF1a*, zeigen innerhalb neuroendokriner Tumoren des Ileums Auffälligkeiten in der CpG-Methylierung [21, 22]. Diese hypermethylierten und dadurch stillgelegten Gene können ihrer eigentlichen Funktion nicht nachkommen, sodass hier eine mögliche Rolle in der Tumorgenese diskutiert werden kann. Dennoch muss im Auge behalten werden, dass bestimmte Gene – so etwa das *MEN1*-Gen – in bestimmten Tumoren nachweislich Bedeutung finden, ihre Methylierung in der Tumorgenese aber keine Rolle spielt [21].

1.2.3 Diagnostik

Laborchemische Diagnostik

Die laborchemische Diagnostik umfasst die sogenannten Tumormarker. Chromogranin A (CgA) ist ein sehr sensitiver und daher der mitunter bedeutendste Marker für NET, gibt jedoch keinen Anhaltspunkt über die zugrunde liegenden entarteten NE-Zellen. Weitere klinisch weniger relevante Tumormarker stellen das pankreatische Polypeptid und Untereinheiten an HCG dar [23]. Für alle Biomarker gilt, dass sie neben ihrem diagnostischen Nutzen vor allem in der Verlaufskontrolle nützlich sind. CgA wird in der Literatur sogar als möglicher prognostischer Biomarker beschrieben, der eine Korrelation mit Tumorlast sowie kürzerem Überleben aufweisen könnte [24].

Ein spezifischer Biomarker für serotonin-produzierende NET stellt die 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES), ein Abbauprodukt des Serotonins, im 24h-Sammelurin dar. Zusätzliche Marker stellen das Neuropeptid K, Substanz P und andere Tachykinine dar [23].

Bildgebende Diagnostik

In der Lokalisationsdiagnostik ilealer NET stellen Kernspintomografie und Computertomografie die Routine dar. Weniger Bedeutung haben aufgrund schwieriger endoskopischer Zugänglichkeit sowie eingeschränkter Verfügbarkeit Verfahren wie die Ileokoloskopie, die Ballonenteroskopie und die Kapselendoskopie [6]. Die Ganzkörper-Somatostatinrezeptorzintigrafie sowie das PET/CT stellen nuklearmedizinische Verfahren dar, bei denen dem Körper radioaktiv markierte Stoffe zugeführt werden, um danach deren Verteilung im Körper detektieren zu können [25]. Sie stützen sich auf die Tatsache, dass NET des Ileums meist eine erhöhte Expression an Somatostatinrezeptoren aufweisen und sind von großer Hilfe in der Primariussuche bei vorbestehenden Lebermetastasen.

Histologie

Zur Diagnosesicherung muss stets eine Biopsie erfolgen, deren histologische Aufarbeitung eine genaue Aussage über Art des Tumors und den Differenzierungsgrad ermöglicht. Immunhistochemische Untersuchungen bezüglich CgA,

Synaptophysin sowie Ki-67 und MIB-1 sind verpflichtend und können bei spezieller Fragestellung durch andere Untersuchungen erweitert werden [26].

Erweiterte Diagnostik

Bei jedem serotoninproduzierenden NET sollte eine Echokardiographie durchgeführt werden, um eine etwaige Endokardfibrose so früh wie möglich diagnostizieren sowie therapieren zu können.

Jeder Tumordiagnose folgt ein Staging zur Bestimmung von Tumorausbreitung sowie zum Ausschluss bzw. zum Nachweis von Lymphknoten- und Fernmetastasen, um eine dem Tumorstadium adäquate Therapie einleiten zu können.

1.2.4 Therapie

Operative Therapie des Primärtumors

Therapie der Wahl stellt aufgrund ihres kurativen Ansatzes die operative Entfernung des Tumors dar. Ein lokoregionäres, nicht-metastasiertes Tumorgeschehen wird daher reseziert, sofern die individuelle Situation des Patienten dies zulässt. Bezüglich der Resektion eines fortgeschrittenen Geschehens überwiegt, wenn auch nicht unumstritten, die Idee einer palliativen Operation, da sie das Risiko an Tumorblutung und Obstruktionssymptomen senkt [1, 2, 25, 27, 28].

Biotherapie

Biotherapeutika zeigen vornehmlich einen tumorstatischen, weniger einen tumoriziden Effekt und zeigen sich äußerst wirkungsvoll gegenüber Hypersekretions-symptomen [8, 9]. Somatostatinanaloga (Octreotid®/Lanreotid®) stellen hierbei die Therapie der ersten Wahl dar, unter welcher bei 40-80 % der Patienten eine Besserung der Symptome beobachtet werden konnte [2, 9]. Das Tumorstadium stabilisiert sich unter dieser Therapie in 24-57 % aller Fälle, bei etwa 10 % der Patienten kann ein komplettes Ansprechen beobachtet werden [9]. Nebenwirkungen beinhalten abdominelle Beschwerden, Steatorrhö und die Ausbildung von Gallensteinen [29].

Bleibt eine Besserung unter Somatostatinanaloga aus, sollte auf Interferon α umgestellt werden. Trotz der den Analoga ähnelnder Wirksamkeit stellt Interferon α

aufgrund der ausgesprochen gefährlichen Nebenwirkungen (Depression, Knochenmarks- und Hepatotoxizität u.a.) nur Mittel der zweiten Wahl dar [8, 9]. Im Gegensatz zu den Somatostatinanaloga kommt Interferon α nicht zur Therapie einer Karzinoidkrise zum Einsatz [9].

Chemotherapie

Obwohl Studien zu diesem Thema fehlen, stellt die Chemotherapie doch den Standard in der Behandlung schlecht differenzierter neuroendokriner Karzinome (NEC) dar. In bis zu 70 % der Fälle kann ein Ansprechen des Tumors beobachtet werden. Eine Chemotherapie mit den Substanzen Etoposid und Cisplatin hält jedoch oft nur die ersten 8-10 Monate an, danach kann häufig ein Tumorprogress beobachtet werden [25].

Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie (PRRT)

Die PRRT stellt eine weitere Behandlungsmöglichkeit metastasierter NET des Ileums dar. Voraussetzung ist die Expression von Somatostatinrezeptoren im Tumor, so dass sich radioaktiv markiertes Somatostatin gekoppelt an zytotoxischen Substanzen im Tumorgewebe anreichern kann [1]. Aufgrund einer dosisabhängigen Nephro- sowie Knochenmarkstoxizität stellte dieses Verfahren in der Vergangenheit eine kontrovers diskutierte Therapiemöglichkeit dar. Neuste Studien belegen jedoch für die PRRT ein im Vergleich mit anderen nicht-chirurgischen Therapiemöglichkeiten vorteilhafteres Abschneiden mit nur geringem Schädigungspotenzial [30].

Therapie der Lebermetastasen

Finden sich in der Leber wenige, günstig lokalisierte Herde, so können diese bei Abwesenheit extrahepatischer Metastasen und ausreichendem Restgewebe kurativ reseziert werden [31]. Stellt dies keine Möglichkeit dar, kommen u.a. die Radiofrequenzablation (RFA) sowie die transarterielle Chemoembolisation (TACE) zum Einsatz. Erstere verwendet Wechselstrom zur gezielten Hitze nekrose der Tumorzellen. Bei der TACE wird ein den Tumor versorgendes arterielles Gefäß embolisiert. Die Folge stellt eine Ischämie der Tumorzellen dar, was diese

sensibler gegenüber der in der gleichen Sitzung verabreichten Chemotherapeutika macht [25].

Eine palliative Resektion von Lebermetastasen im Sinne einer zytoreduktiven Therapie kann sich positiv auswirken auf tumorbedingte Beschwerden, Gesamtüberleben und Ansprechen der pharmakologischen Therapie [32-34].

Nicht zuletzt stellt die Lebertransplantation einen kurativen Ansatz zur Behandlung von Lebermetastasen dar. Sie setzt eine R0-Resektion des Primärtumors sowie den Ausschluss extrahepatischer Metastasen voraus.

1.2.5 Prognose

Die Prognose neuroendokriner Tumoren des Ileums hat sich in den letzten Jahren stetig verbessert. Dies liegt u.a. an den nunmehr besseren diagnostischen Möglichkeiten, deren verbreiteteren Anwendung sowie am Vorhandensein neuer therapeutischer Ansätze. Dem deutschen NET-Register zufolge lag das tumorspezifische 2-, 5- und 10-Jahresüberleben bei Diagnose eines neuroendokrinen Tumors des Verdauungstraktes in den Jahren 1999 bis 2010 bei 94 %, 85 % und 70 % [4]. Dies sind jedoch lediglich durchschnittliche Werte, die individuell extrem variieren und sich u.a. abhängig zeigen von Tumorgrading und TNM-Klassifikation (vgl. Kapitel 2.1).

1.3 Voruntersuchungen durch die Arbeitsgruppe

Vorarbeiten durch Joachim Brix beschäftigten sich insbesondere mit der Rolle des Chromosoms 18 in der Pathogenese ilealer NET. Grundlagen hierfür bildeten immunhistochemische Untersuchungen sowie FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)-Analysen. Eine vertiefende Darstellung folgender Ergebnisse findet sich in dessen medizinischer Dissertationsschrift [35].

In 65 % aller untersuchten Tumorproben ilealer NET konnte mittels FISH-Technik ein Chromosom 18-Verlust nachgewiesen werden, lediglich 24 % der Fälle wiesen diesen nicht auf. Die restlichen 11 % der untersuchten Proben stellten Mosaik dar, also Tumorproben, die sowohl Zellen mit unveränderten Chromosomen wie auch Zellen mit Chromosom 18-Verlust enthielten (vgl. Abbildung 4).

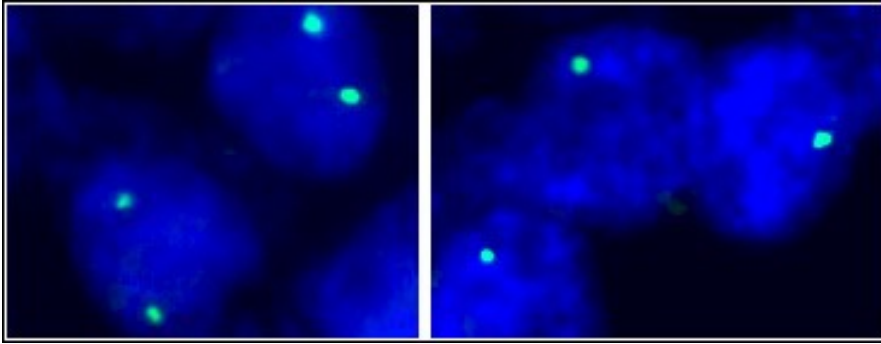


Abbildung 4: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis von Chromosom 18 innerhalb eines ilealen neuroendokrinen Tumors (1000-fache Vergrößerung): Zwei Signale pro Zellkern repräsentieren zwei Chromosomen 18 im Kern, ein Signal pro Zellkern repräsentiert einen Chromosom 18-Verlust.

Weiterhin erfolgten immunhistochemische Analysen hinsichtlich der Expression der Chromosom 18-Tumorsuppressorgene *DCC*, *Smad2*, *Smad4/DPC4* und *Maspin/SerpinB5*. In den Tumorproben ilealer NET konnte jedoch keine verminderte Expression von *DCC* und *Smad2* beobachtet werden. Lediglich drei von 87 Proben wiesen einen *Smad 4*-Verlust auf (vgl. Abbildung 5).

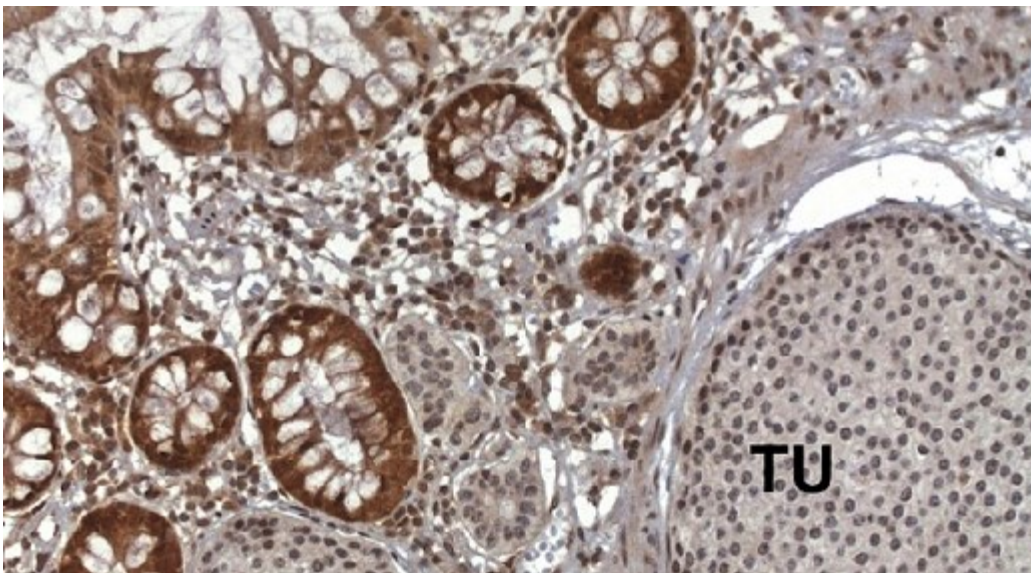


Abbildung 5: Smad4-Verlust in einem neuroendokrinen Tumor des Ileums (TU) bei hoher Expression von Smad4 in der umliegenden Mukosa

Maspin konnte in keiner der Tumorproben, jedoch in normaler Mukosa nachgewiesen werden. Weitere Analysen zeigten sodann, dass dieses per se nicht in

neuroendokrinen Zellen exprimiert ist, sodass hier keine verminderte Expression in den Tumorproben zu erwarten sein konnte.

1.4 Überblick über ausgewählte Targets

Die in dieser Arbeit durchgeführte Mutationsanalyse setzte eine vorherige Auswahl zu untersuchender Targets voraus. Grundlage hierfür stellte die Exomsequenzierung fünf neuroendokriner Tumoren des Ileums dar, welche mehr als 590 Mutationen detektierte. Um die Auswahl möglichst vielversprechender Targets hieraus zu gewährleisten, erfolgten Literaturrecherchen hinsichtlich der einzelnen Targets. Im Folgenden wird auf relevante Vorkenntnisse hinsichtlich ausgewählter Targets, insbesondere auf deren Kontext in der Tumorgenese, eingegangen.

1.4.1 CABYR

Das *CABYR* (calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated)-Gen befindet sich auf Chromosom 18. Sein Protein war in der Literatur zunächst als hodenspezifisches Protein bekannt [36]. Über die Jahre konnte dann mehr und mehr eine Überexpression einzelner *CABYR*-Isoformen in bestimmten Tumoren wie Gehirntumoren, Pankreastumoren, Ösophaguskarzinomen, Lungentumoren sowie Leberzellkarzinomen beobachtet werden [36, 37] (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Expressionsfrequenz der *CABYR*-mRNA-Isoformen in Leber-, Lungen- und Ösophaguskarzinomen, modifiziert nach [37]

Tumortyp	CABYR-a/-b		CABYR-c/-d		CABYR-e	
	TG (%)	NG (%)	TG (%)	NG (%)	TG (%)	NG (%)
Lunge	12	0	80	38,5	16	0
Leber	43,8	6,3	87,5	93,8	0	0
Ösophagus	16,6	6,3	59,5	31,3	4,8	6,3

TG: Tumorgewebe

NG: Normalgewebe

Des Weiteren zeigte sich eine Interaktion der Isoform *CABYR*-a mit dem glykolisierenden Enzym α -Enolase, welches insbesondere in der Tumorgenese von Bronchialkarzinomen eine Rolle spielt, aber auch in Tumoren von Mamma und

Prostata überexprimiert ist [37-39]. Die Anwendung eines spezifischen Antikörpers gegen α -Enolase, welche sich auf der Tumorzelloberfläche von großzelligen Bronchialkarzinomen findet, senkt nachweislich die Zellinvasion und die Zelldegradation der extrazellulären Matrix [38].

1.4.2 ERBB2

Auch bekannt als *HER2* (Human epidermal growth factor receptor 2) nimmt das auf Chromosom 17 lokalisierte *ERBB2*-Gen eine wichtige Rolle in Therapie und Prognose des Mammakarzinoms ein. Die Immunotherapie mittels des HER2-Antikörpers Trastuzumab ist im Falle eines HER2-positiven Karzinoms mittlerweile Teil der Standardtherapie.

Zudem sind Überexpression und Amplifikation dieses Proteins in vielen anderen Krebsarten zu verzeichnen, so beispielsweise beim Magenkarzinom, bei Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs, Urothelkarzinomen, bei Lungen- und Dickdarmkrebs sowie in wenigen Adenokarzinomen des Dünndarms [40-43].

1.4.3 ERCC4

Aufgrund seiner Funktion innerhalb des DNA-Reparatursystems steht *ERCC4* (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4) im Zentrum vieler Krebsforschungen. Aktuelle Arbeiten berichten dabei jedoch stimmig über protektive Effekte einiger DNA-Veränderungen bezüglich dieses auf Chromosom 16 befindlichen Gens, deren Vorhandensein mit einem geringeren Risiko bezüglich der Ausbildung bestimmter Krebsarten (insbesondere Magenkarzinome und oropharyngeale Karzinome) einhergehen [44, 45]. Eine Genmutationsanalyse innerhalb von Brust- und Ovarialkarzinomen konnten im Vergleich zum Normalkollektiv ebenfalls keine erhöhte Prävalenz von Mutationen in *ERCC4* nachweisen [46].

1.4.4 MSH6

Analog zu *ERCC4* stellt auch *MSH6* (mutS homolog 6) ein Protein des DNA-Reparatursystems dar, welches als Heterodimer mit *MSH2* an der DNA wirkt. Bekannt ist es vor allem aus dem Kontext des Lynch-Syndroms. Man nimmt an,

dass bis zu 20 % der Lynch-Syndrome eine Mutation im *MSH6*-Gen aufweisen [47, 48]. Aufgrund dieser nicht zu vernachlässigenden Anzahl stellt dieses auf Chromosom 2 befindliche Gen möglicherweise ein vielversprechendes Target innerhalb anderer Tumorarten dar. Eine große Studie von 2010 beschäftigte sich mit dem Tumorrisiko von Trägern eines mutierten *MSH6*-Gens. Letztere weisen eine im Vergleich zu Wildtyp-Trägern achtfach erhöhte Inzidenz von Kolorektalen Karzinomen auf. Unter weiblichen Trägerinnen einer *MSH6*-Mutation fand sich eine 26-fach erhöhte Inzidenz an Endometriumkarzinomen sowie eine sechsfach erhöhte Inzidenz von mit dem Lynch-Syndrom assoziierten Karzinomen (u. a. Ovarial und Magenkarzinome, Hirn-, Dünndarm und Nierentumoren) [49].

1.4.5 NFATC1

Ein besonderer Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Chromosom 18-Gen NFATC1, so vereinnahmten dessen Analysen einen verhältnismäßig großen Anteil der Gesamtanalysen. Entsprechend fällt auch dessen Darstellung ausführlicher aus.

NFAT (nuclear factor of activated T cells)-Proteine

Bereits 1988 rückte NFAT in das Interesse der Wissenschaft, als seine Bedeutung für die Aktivierung von T-Lymphozyten ergründet wurde [50]. Daneben erstreckt sich der Einfluss besagter Proteine über Signalgebung in der muskuloskeletalen Entwicklung hinweg bis hin zu Funktionen in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems [51]. Heute weiß man um das ubiquitäre Vorkommen der NFAT-Proteine und ihrer Rolle als Transkriptionsfaktoren in der Regulation von Zellwachstum und Zellentwicklung [52, 53].

Die NFAT-Familie umfasst fünf Proteine (NFAT1-NFAT5). Die Primärstruktur der verschiedenen NFAT-Proteine ähnelt sich stark. Bis auf NFAT5 weist jedes Protein der Familie zwei Domänen auf. Zum einen die sog. RHR (Rel Homology Region), welche als Andockstelle für transkriptionelle Bindungspartner dient. Zum anderen die NHR (NFAT Homology Region), wo sich die Calcineurin-Bindestelle befindet [53]. Eine weitere Stelle an der NHR bindet NFAT-responsive Elemente anderer Gene. Der Aktivierung dieser Proteine – ausgenommen NFAT5 – liegt ein Kalziumeinstrom in die Zelle zugrunde. In einer komplexen biochemischen

Reaktion resultiert aus dem Binden von Substraten an Immunrezeptoren eine Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum sowie ein Kalzium-einstrom von extrazellulär (vgl. Abbildung 6).

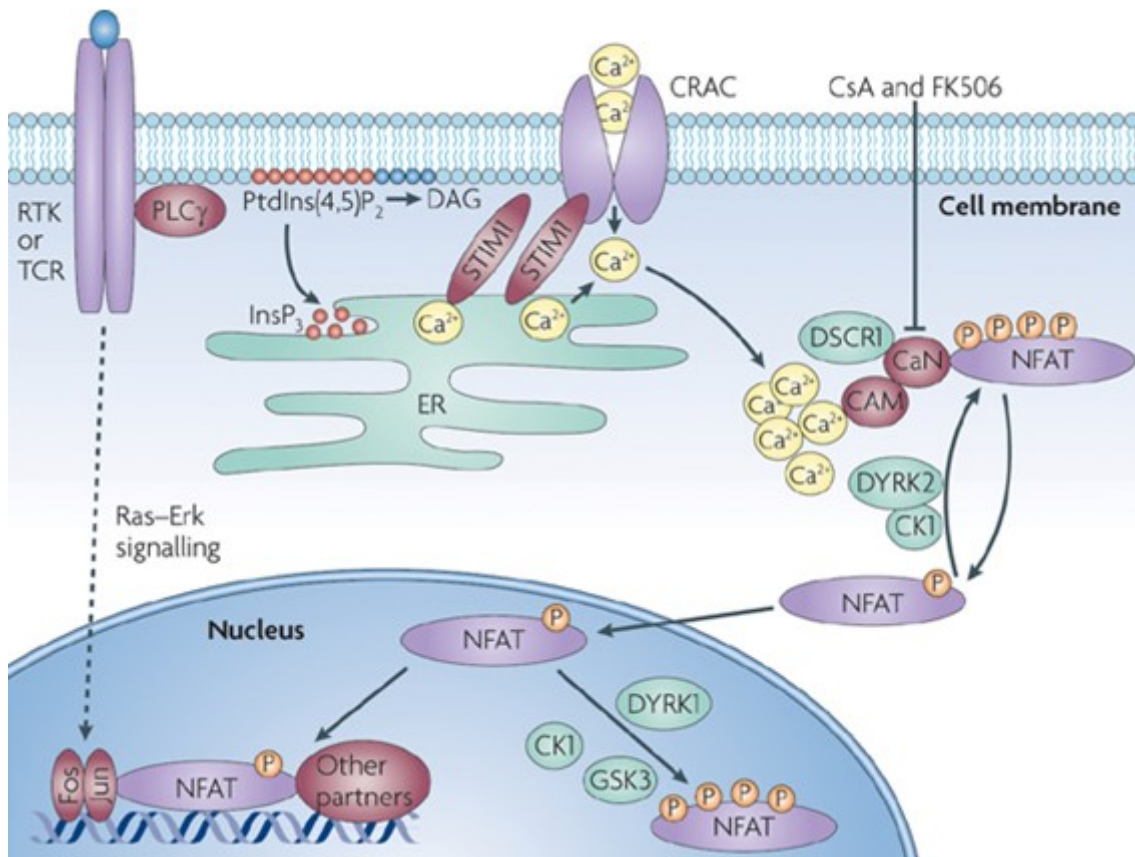


Abbildung 6: Aktivierung von NFAT [53]: Das Andocken von Substraten an Rezeptortyrosinkinase (RTK) und Immunrezeptoren führt zur Aktivierung von Phospholipase C γ (PLC γ), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PtdIns(4,5)P₂) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. InsP₃ führt zu einer Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), woraufhin sich Kalziumkanäle (CRACs) öffnen und für einen kontinuierlichen Kalziumeinstrom sorgen. Das Kalzium wird von Calmodulin (CAM), Calmodulin wiederum von der Phosphatase Calcineurin (CaN) gebunden. Eine von Calcineurin freigesetzte autoinhibierende Sequenz fördert die Dephosphorylierung von NFAT und damit dessen Translokation in den Kern. FK506 und Cyclosporin A (CsA) hemmen in Kombination mit weiteren Faktoren Calcineurin [53]. TCR: T-Zellrezeptor; STIM1: stromal interaction molecule 1; CK1: Casein-Kinase-1; DYRK2: dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 2; GSK-3: Glykogensynthasekinase, DSCR: Downsyndrome Candidate region 1.

Kalzium wiederum präpariert die Phosphatase Calcineurin, die NFAT dephosphoryliert und damit dessen Translokation in den Kern fördert, wo es bevorzugt an GGAAA-reiche DNA-Bereiche bindet [53, 54]. Letztere sind in vielen Promotor- und Enhancerregionen von Immunantwort-Genen wie z.B. IL-2, IL-4, TNF α und IFN γ zu finden [54].

Diese komplexe Signalkaskade zur Aktivierung von NFAT ist insofern von großem Interesse, als dass in der Klinik bereits Immunsuppressiva zur Anwendung kommen, die hier intervenieren. Dies sind insbesondere Ciclosporin A und FK506, welche in Zusammenspiel mit anderen Faktoren Calcineurin hemmen.

NFATC1-Expression in Tumoren

In der Familie der NFAT-Proteine scheint insbesondere das auf Chromosom 18 lokalisierte NFATC1 (nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1) (auch NFAT2) wichtige Prozesse auf zellulärer Ebene, wie etwa Proliferation und Apoptose, zu koordinieren [54]. Bereits 2003 beobachteten Neal und Clipstone, dass ein konstitutiv aktiviertes NFATC1 die Differenzierung immortalisierter Präadipozyten in reife Adipozyten inhibiert. Vielmehr fördert es dessen Transformation in einen Phänotypen, welcher schlussendlich Wachstumsfaktorautonomie erhält [52]. Nicht zuletzt beobachteten sie, dass konstitutiv aktiviertes NFATC1 in Mäusen zur Ausbildung von Tumoren führt und trugen somit einige Belege für das onkogene Potenzial des NFATC1-Proteins zusammen [52]. Zahlreiche weitere Forschungsergebnisse weisen auf eine Überexpression von NFATC1 in Tumorzellen hin, die sie als Folge einer konstitutiven Aktivierung sehen. Betroffen hiervon zeigen sich insbesondere Pankreaskarzinome, Kolorektale Karzinome, das Hepatozelluläre Karzinom sowie Krebserkrankungen der hämatopoetischen Zelllinien [54-57]. Diese NFATC1-positiven Tumorzellen zeigten sich in weiteren Analysen stark positiv für Calcineurin, was zu der These führte, dass der Ca²⁺/Calcineurin-Signalweg in diesen Tumorzellen hochaktiv ist.

Nicht zuletzt resultiert ein Knockdown von *NFATC1* in Tumorzellen von Hepatozellulären Karzinomen in einer signifikant reduzierten Proliferationsrate der Zellen, die u.a. durch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase der Zellen erklärt werden konnte [55]. Außerdem konnte beobachtet werden, dass aktiviertes *NFATC1*

zur Suppression von E-Cadherin, einem in der Wissenschaft allseits bekannten Protein mit der Funktion den Zell-Zell-Kontakt zu erhalten, und somit gleichsam zu einer erhöhten Invasivität der Tumorzellen führt [58].

NFATC1 und *c-myc*

C-myc stellt ein bedeutsames Protoonkogen dar, welches in vielen transformierten Zellen konstitutiv erhöht ist [59]. Dereguliertes *myc*-Protein hat nachweislich einen Einfluss auf Zellwachstum, Vaskulogenese und reduzierte Zelladhäsion und fördert daneben Metastasenbildung sowie Genominstabilität [60].

Im Jahr 2006 zeigte die Arbeit eines Forschungsteams aus Ulm ein konstitutiv aktiviertes NFATC1 in Pankreaskarzinomen, welches *c-myc* vermittelt ungehemmtes Zellwachstum auslöst [54]. Des Weiteren gelang ihnen, das direkte Binden von NFATC1 an ein Serum-responsives Element des *myc*-Promotors nachzuweisen, was zu einer transkriptionellen *c-myc*-Aktivierung führt [54]. Mittlerweile ist bekannt, dass dieses Binden eine p300¹-abhängige Histonacetylierung initiiert und dem *Ets-like gene (ELK-1)* ermöglicht, den Promotorbereich ebenso zu binden, um eine maximale Aktivierung des *c-myc*-Gens erreichen zu können [61]. Auch in Forschungen bezüglich Hepatozellulären Karzinomen fand man ein konstitutiv aktiviertes NFATC1, dessen Expression stark mit der von *c-myc* zusammenhing [55].

NFATC1 und COX-2

Eine Expression von Cyclooxygenase 2 (COX-2) ist in Tumorzellen von Lungen-, Kolon- und auch Brustkrebs zu finden [62]. Zudem zeigen Daten von 2001, dass eine gesteigerte Expression von COX-2 in transgenen Mäusen Mammakarzinome induzieren kann [63].

NFATC1 scheint dem Mechanismus der COX-2-vermittelten Tumorgenese Beitrag zu leisten. Nach aktueller Datenlage bindet dieses nach seiner Aktivierung zwei spezielle Bindungsstellen in der Promotorregion des COX-2-Gens und sorgt somit für dessen Induktion. Die Aktivierung des NFATC1 über eine Dephosphorylierung durch Calcineurin folgt einer Stimulation durch Bombesin, ein Gastric

¹ transkriptioneller Cofaktor

release-Peptid-(GRP)-Analogon, dessen Überexpression in Tumorzellen des Kolonkarzinoms bereits vorbeschrieben ist [64].

Die Rolle von COX-2 in der Tumorgenese wird gegenwärtig ausführlich erforscht. Erste Studien weisen darauf hin, dass selektive COX-2-Inhibitoren bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) für einen Regress bestehender Kolonpolypen sorgen [65].

1.4.6 PIEZO2

PIEZO2 (piezo-type mechanosensitive ion channel component 2) stellt ein in multiplen Geweben des menschlichen Organismus vorkommendes Chromosom 18-Gen dar, welches überdies auch in Tieren und Pflanzen zu finden ist. Es spielt eine Rolle in der Aktivierung von mechanisch aktivierten Kationenkanälen [66].

Neben seiner Funktion in der Mechanotransduktion im menschlichen Organismus beschäftigen sich gegenwärtige Forschungen mit einer möglichen genetischen Anfälligkeit von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen bezüglich des *PIEZO2*-Gens [67].

1.4.7 PIK3C3

Das auf Chromosom 18 lokalisierte *PIK3C3* (phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3) findet sich in der Literatur insbesondere im Zusammenspiel mit dem Mechanismus der Autophagie wieder. Letzterer scheint in vielen Krebszellen modifiziert zu sein. So deutet vieles darauf hin, dass die Autophagie einen Tumorsuppressor-Pfad darstellen könnte [68].

Als gesichert gilt ein Zusammenhang von *PIK3C3* mit der Autophagie in Hefen und *Drosophila*, wobei dieser mittlerweile auch für die Autophagie der Säugetiere angenommen wird [69]. Dennoch gilt es den genaueren Mechanismus bezüglich einer durch *PIK3C3* modifizierten Autophagie noch zu erforschen [70].

Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass *PIK3C3* womöglich eine Regulation des mTOR-Signalwegs ausüben könnte [69].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die Pathogenese neuroendokriner Tumoren des Ileums stellt einen bis dato nur unzureichend verstandenen Vorgang dar, den es in den nächsten Jahren und Jahrzehnten genauer zu erforschen gilt. Nichtsdestotrotz ergeben sich aus dem bisherigen Kenntnisstand Anhaltspunkte, deren vertiefende Analyse sich als vielversprechend erweisen könnte. Hierzu zählt im Besonderen der Chromosom 18-Verlust innerhalb entsprechender Tumorproben.

Ziel dieser Arbeit soll es sein, ein genaueres Verständnis der Pathogenese neuroendokriner Tumoren des Ileums zu erhalten. Hierfür erfolgte die Mutationsanalyse acht ausgewählter Targets an einem Tumorkollektiv ilealer neuroendokriner Tumoren. Nachdem der auffallend häufige Chromosom 18-Verlust eine Rolle der auf Chromosom 18 lokalisierten Gene innerhalb der Pathogenese impliziert, spiegeln sich überwiegend Chromosom 18-Gene in den ausgewählten Targets wider. Literaturrecherchen stuften insbesondere das *NFATC1*-Gen als besonders vielversprechend ein, was unter anderem auf vorbeschriebene Interaktionen mit *c-myc* und *COX2* zurückzuführen ist. Weiterhin kommen in der Klinik bereits Substanzen zum Einsatz, welche im *NFATC1*-Pathway intervenieren und dessen Aktivierung hemmen. Dies macht eine Rolle von *NFATC1* in der Pathogenese neuroendokriner Tumoren des Ileums umso wünschenswerter.

Ein Mutationsnachweis innerhalb der hier analysierten Targets wäre als großer Fortschritt in der bis dato nur spärlich verstandenen Pathogenese neuroendokriner Tumoren des Ileums zu bewerten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Chemikalien und Reagenzien

6 x Loading Dye	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Agencourt® AMPure®XP	Beckman Coulter (Krefeld, DE)
Agencourt® CleanSEQ®	Beckman Coulter (Krefeld, DE)
AmpliTaq Gold®	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
Biozym LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, DE)
dNTP-Mix	Qiagen (Hilden, DE)
Ethanol absolute for analysis EMSURE®	Merck (Darmstadt, DE)
Gel Red™ Nucleic Acid Stain	Biotium (Hayward, USA)
GeneRuler™ 1 kb plus DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, DE)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, DE)
MgCl ₂ 2,0 mM	Qiagen (Hilden, DE)
Xylol	VWR International (Darmstadt, DE)

2.1.2 Puffer

Tabelle 6: Überblick über die verwendeten Puffer

1 x Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer 54 g Tris ultrapure 28,4 g Borsäure EMSURE® 3,7 g Titriplex® III ad 5 l ddH ₂ O	Applichem (Darmstadt, DE) Merck (Darmstadt, DE) Merck (Darmstadt, DE)
10 x PCR Buffer	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
GenomeLab™ Separation Buffer	Beckman Coulter (Krefeld, DE)

2.1.3 Primer

Tabelle 7: Überblick über die verwendeten Primer

NFATc1 Exon 2.1	For	GCGGGCTACTTCCTCTCCT	221 bp
	Rev	AGGCACGAGGGGTCTCTGTA	
NFATc1 Exon 2.2	For	GTCCTCCCTAGCTCCAAACG	206 bp
	Rev	GGAGACACGCAGGGGAGACT	
NFATc1 Exon 2.3	For	GAGGCCTCCTCCTACGAGTC	203 bp
	Rev	AGCCAGCTCTCCTCAGTGAC	
NFATc1 Exon 2.4	For	TGCACACTGCTGGGTTC	248 bp
	Rev	GAGCTGGTGTACTGGGTGGT	
NFATc1 Exon 2.5alt	For	CTACTCACCCCACCACTCG	222 bp
	Rev	ACCTTGAGCGCCACTGAG	
NFATc1 Exon 2.5neu	For	ACCACCCAGTACACCAGCTC	140 bp
	Rev	ACCTTGAGCGCCACTGAG	
NFATc1 Exon 2.6	For	AGATGGCGTCCCTGTCAAGT	179 bp
	Rev	CCAGGTA CTGGT CGCAGAAG	
NFATc1 Exon 2.7	For	CCTCTTTCCAGCACATCAGG	227 bp
	Rev	TGACTCTCGTCCCCAGACAC	
NFATc1 Exon 3	For	TCCTCTGCTCTGTTCCCTTC	233 bp
	Rev	TTTGACCACAAAAGCACCAA	
NFATc1 Exon 4.1	For	TGCTGAGCAGGTGTTTTCTG	195 bp
	Rev	GGACTTTGGTGTGGAGAGG	
NFATc1 Exon 4.2	For	GGAAGACCGTGTCCACCAC	228 bp
	Rev	GGCTGTAAACCAAAAAGTGTCC	
NFATc1 Exon 5	For	AGCTGTGGGCTTTTGT TTTG	238 bp
	Rev	GACGGTTTCCTCCCCTGT	
NFATc1 Exon 6	For	ACTGCCCTCTCCTTCTGAT	190 bp
	Rev	AGATGGCCCCTGGTGAAG	
NFATc1 Exon 7	For	CCCACCACACAGAGTCACAG	175 bp
	Rev	CAGTGGCTCCAGCAGACC	
NFATc1 Exon 8	For	CTGATTGTGCCTCCTGTGTG	199 bp
	Rev	TTCACGGCTTACGGTTAGAAA	
CABYR	For	TGTGCCTGTGACTGAAGGAG	138 bp

	Rev	TTGGGACTAACTCGTGGTGA	
PIK3C3	For	TTTCCTTGCTTGTGTAATAATTGTA	150 bp
	Rev	TGGTTGGTGGATAACTCACA	
ERCC4	For	GCTCGAGCAAGGGTTTATCA	157 bp
	Rev	TGCACTTTAAATTTCCATACCAAA	
PIEZO2	For	CATTGTCTCTGGTGAGCGATA	187 bp
	Rev	TGGGAAATTTGTCCGTGAAT	
ERBB2	For	CCTGCCCTCTGAGACTGATG	153 bp
	Rev	GTGTCTCTGCCACTCCCTCT	
MSH6	For	AGGGGGTGATGGTCCTATGT	161 bp
	Rev	GCTCCTCTTCCTCACAGCCTA	
NFATC1	For	AGGAAGAACACACGGGTACG	188 bp
	Rev	ACGAACGAAAAGCTGAGAGC	
β -Actin	For	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	116 bp
	Rev	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
M13	For	TGTAAAACGACGGCCAGT	35 bp
	Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	
AF4/X3U		GGAGCAGCATTCCATCCAGC	600 bp
AF4/X3L		CATCCATGGGCCGGACATAA	
AF4/X11U		CCGCAGCAAGCAACGAACC	400 bp
AF4/X11L		GCTTTCCTCTGGCGGCTCC	
PLZF/X1U		TGCGATGTGGTCATCATGGTG	300 bp
PLZF/X1L		CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC	
RAG1/X2U		TGTTGACTCGATCCACCCCA	200 bp
RAG1/X2L		TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA	
TBXAS1/X9U		GCCCGACATTCTGCAAGTCC	100 bp
TBXAS1/X9L		GGTGTGCGCGGAAGGGTT	

2.1.4 Gebrauchsfertige Kits

Tabelle 8: Überblick über die verwendeten Kits

GenomeLab™ DTCS-Quick Start Kit	Beckman Coulter (Krefeld, DE)
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue)	Roche (Grenzach-Wyhlen, DE)

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 9: Überblick über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Thermowell® 96 Well PCR Plate	Corning Incorporated (Corning, USA)
ART Aerosol Resistant Tips 20E, 100E	Molecular BioProducts (San Diego, USA)
SafeGuard Filter Tips 10 µl, 1000 µl	PEQLAB (Erlangen, DE)
Safe Seal-Tips professional 10µl	Biozym (Hessisch Oldendorf, DE)
PCR SingleCap 8er-Soft Strips 0,2 ml	Biozym (Hessisch Oldendorf, DE)
Multiply®-µStrip pro 8-strip	SARSTEDT (Nümbrecht, DE)
Safe-lock Tubes 1,5 ml/2,0 ml	Eppendorf (Hamburg, DE)
Ultratip 10 µl, 200 µl	Greiner bio-one (Frickenhausen, DE)

2.1.6 Geräte

Tabelle 10: Überblick über die verwendeten Geräte

Genetouch Thermal Cycler	Biozym (Hessisch Oldendorf, DE)
GeneAMP® PCR System 9700	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, DE)
FlexCycler	Analytikjena (Jena, DE)
Gelkammer Midi	Armin Baack Labortechnik (Schwerin, DE)
MagNA Pure LC 2.0	Roche (Grenzach-Wyhlen, DE)
Magnetplatte	Alpaqua (Beverly, USA)
Nanodrop 2000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
GenomeLab™ GeXP	Beckman Coulter (Krefeld, DE)

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung der Gewebeproben

Als Untersuchungsmaterial dienten formalinfixierte in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeproben neuroendokriner Tumoren des Ileums. Diese stammen aus den Universitätskliniken Düsseldorf, Marburg, München und Tübingen. Grundlage der Tumorsammlung bildeten 65 sporadische neuroendokrine Tumoren des Ileums. Aufgrund deren teilweise bereits erfolgter Metastasierung standen für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen weitere 51 Tumorproben aus Lymphknoten- sowie Fernmetastasen zur Verfügung, sodass sich insgesamt ein Tumorkollektiv von 116 Tumorproben ergab.

Die Unterteilung der Tumorproben in drei Kohorten erfolgte anhand einer TNM-Klassifikation. Hierunter versteht man die Stadieneinteilung maligner Neubildungen nach Tumorgröße (T), Befall von Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M) (vgl. Tabellen 11 und 12).

Tabelle 11: Vorschlag einer TNM-Klassifikation für NET des Dünndarms [8]

Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor infiltriert Mukosa oder Submukosa und ≤ 1 cm
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria oder > 1 cm
T3	Tumor infiltriert die Subserosa (bei Jejunum- und Ileum-NET) bzw. Pankreas oder Retroperitoneum (bei Duodenum- und Papille-NET)
T4	Tumor infiltriert Peritoneum oder andere Organe
Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 12: Einteilung der 65 Primärtumoren in Kohorten anhand der TNM-Klassifikation

Kohorte	TNM-Klassifikation	Fallanzahl
1	T1-T3 N0 M0	23
2	T1-T4 NX, N1 M0	22
3	T1-T4 NX, N1 M1	20

■ Kohorte 1 ■ Kohorte 2 ■ Kohorte 3

Zusätzlich lagen 62 entsprechende Normalgewebeproben vor, aus denen ebenfalls DNA extrahiert wurde.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Aus den 116 Tumorgeweben sowie den dazugehörigen 62 Normalgeweben erfolgte die Anfertigung 3 µm dicker Schnitte, welche mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt wurden. Hämatoxylin färbte dabei die Kerne blau, während Eosin das Zytoplasma rot färbte. Zur Gewinnung von Tumor- bzw. Normalgewebe wurden die Tumorareale bzw. entsprechend das Normalgewebsareal markiert.

Leerschnitte

Für jede der Proben wurden 8 µm dicke Leerschnitte angefertigt. Die Anzahl der Anfertigungen war abhängig von der Größe des Tumor- bzw. Normalgewebeareals des HE-Schnittes und lag zwischen fünf und 20. Diese konnten im nächsten Schritt mit dem markierten HE-Schnitt in Kongruenz gebracht werden, um so das Tumor- bzw. Normalgewebeareal identifizieren zu können.

2.2.2 Nukleinsäureextraktion

Aus den 116 Gewebeproben wurde im folgenden Schritt die DNA extrahiert, um weitere Untersuchungen an dieser zu ermöglichen.

Für einen Teil der untersuchten Fälle war dies bereits von Kirsten Oppek im Rahmen ihrer medizinischen Promotionsarbeit durchgeführt worden [71].

Makrodissektion der Leerschnitte und Verdau

Zuerst wurden alle Leerschnitte entparaffiniert, indem diese zweimal für jeweils zehn Minuten in 100 % Xylol und darauffolgend zweimal für jeweils drei Minuten in 100 % Isopropanol eingelegt wurden. Nach deren vollständiger Trocknung erfolgte ihr Abgleich mit den HE-Schnitten. Das zu extrahierende Gewebe war dabei mithilfe eines mit Alkohol befeuchteten Skalpells vom Objektträger abzukratzen und in ein Tube mit 100 % Ethanol zu geben. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm entstanden Pellets am Boden der Tubes, der Überstand wurde abpipettiert. Der Restalkohol kondensierte während Inkubation bei 55°C.

Es folgte die Zugabe von 100 µl Lysepuffer und 25 µl Proteinase K sowie die Inkubation über Nacht im Thermomixer bei 55°C und 300 rpm. Am nächsten Tag erfolgte erneut die Zugabe von 10µl Proteinase K, sowie eine erneute Inkubation im Thermomixer für zwei Stunden. Der danach durch Zentrifugation gewonnene Überstand konnte im MagNA Pure LC weiterverarbeitet werden.

Ein Sonderfall stellten die sogenannten Dickschnitte dar. Dies sind Gewebsschnitte, welche keine Makrodissektion erfordern, da der ganze Schnitt ausschließlich das gewünschte Gewebe enthält. Zur Entparaffinierung erfolgte die zweimalige Zugabe von 100 % Xylol und 100 % Ethanol, wobei die Proben nach den einzelnen Zugaben gevortext, abzentrifugiert sowie der Überstand abgenommen wurde. Anschließend wurden die Gewebepellets im Thermomixer bei 55°C getrocknet. Es folgte der Verdau der Proben mit Proteinkinase K, der dem der makrodissezierten Proben entsprach.

MagNA Pure LC 2.0

Alle 178 Proben wurden mithilfe des MagNA Pure LC 2.0 extrahiert. Dessen Prinzip basiert auf der Anwendung spezieller Magnetbeads, an deren Oberfläche die DNA bindet. Es folgen verschiedene Waschschriffe zur stetigen Erhöhung des Reinheitsgrades der DNA und die Elution in Puffer (vgl. Abbildung 7) [72].

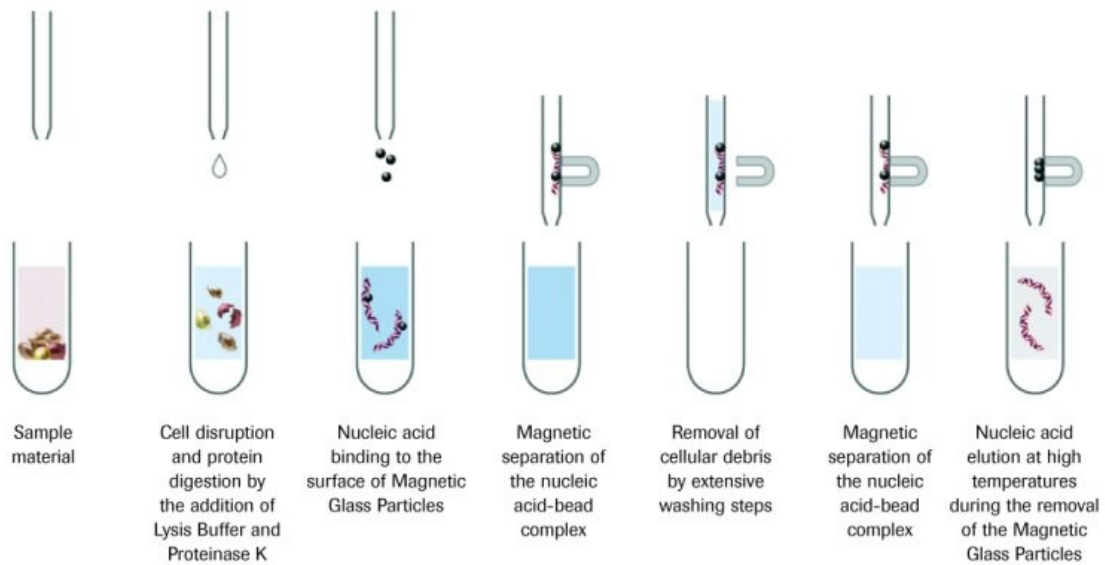


Abbildung 7: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion mit dem MagNA Pure LC 2.0 mit einem internen Verdau im Gerät [72]

2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Da bei der Qualitäts-Polymerasekettenreaktion (Q-PCR) sowie der anschließenden PCR eine determinierte Menge an genomischer DNA eingesetzt wurde, stellte der nächste Schritt die Bestimmung der DNA-Konzentration der extrahierten Proben mittels des Nanodrop 2000 dar. Dieser sogenannte UV/Vis-Spektrometer detektiert die konzentrationsabhängige Absorption elektromagnetischer Wellen, die bei Bestrahlung von Nukleinsäuren mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge beobachtet wird.

2.2.4 Qualitäts-Polymerasekettenreaktion und Gelbild

Da aus FFPE-Gewebe extrahierte DNA erfahrungsgemäß einen hohen Grad an Degradierung aufweist, galt es bei der Qualitäts-Polymerasekettenreaktion (Q-PCR) diesen Degradierungsgrad zu ermitteln. Der erste Schritt bestand hierbei aus der Durchführung einer PCR, gefolgt von einer Auftrennung der Produkte mittels Gelelektrophorese.

Die PCR stellt eine Methode zur Amplifikation – der gezielten Vervielfältigung von DNA – dar, welche auf einem immerzu wiederkehrenden Zyklus beruht. Die

Durchführung einer PCR erforderte die Herstellung eines Reaktionsgemisches. Dies entsprach für die Qualitäts-PCR pro Gewebeprobe

ddH ₂ O	16,20 µl
Primer-Mix	2,00 µl
dNTP 0,2 mM	1,00 µl
MgCl ₂ 2,0 mM	2,00 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl,

wobei der Primer-Mix die folgenden Primer enthielt: AF4/X3U bzw. AF4/X3L (2,5 pmol), AF4/X11U bzw. AF4/X11L (1,25 pmol), PLZF/X1U bzw. PLZF/X1L (1,25 pmol), RAG1/X2U bzw. RAG1/X2L (1,25 pmol) und TBXAS1/X9U bzw. TBXAS1/X9L (1,25 pmol) [73].

Die Taq-Polymerase stellt ein Enzym dar, welches bei einer bestimmten Temperatur unter Zuhilfenahme der Desoxynukleotide (dNTPs) einen komplementären Strang zur initialen DNA bildet. Sie beginnt dabei am Ende des sogenannten Primers. Ein Primer stellt ein unter Kenntnis des zu amplifizierenden Bereichs ausgewähltes Oligonukleotid dar, das die DNA außerhalb der Enden des zu sequenzierenden Bereiches komplementär bindet.

Das Reaktionsgemisch lief unter dem folgenden PCR-Programm:

95 °C	45 min	} 37 Zyklen
60 °C	45 sek	
72 °C	60 sek	
72 °C	7 min	
12 °C	hold.	

Der Zyklus einer PCR besteht im Wesentlichen aus drei Schritten [74]:

1. Denaturierung: Durch Erhitzen auf 95°C trennen sich die komplementären DNA-Stränge im Reaktionsgemisch
2. Annealing: Durch Herabsetzen der Temperatur auf 55-60 °C (je nach verwendetem Primer) beginnen die Primer die komplementären Bereiche der Einzelstränge zu binden

3. Elongation: Bei 72°C verlängern die Polymerasen den Matrizenstrang vom Primerende aus; zugleich brechen falsch verknüpfte Basenpaare auf

Die neu entstandenen DNA-Stränge können wiederum Primer binden und der Zyklus beginnt von neuem, sodass je nach Zyklusanzahl n 2^n DNA-Fragmente entstehen. Die Anzahl der Zyklen kann frei gewählt werden und bewegt sich in den meisten Fällen zwischen 35 und 45 Zyklen.

Je nach verwendeten Primern müssen diesen die einzelnen Annealing-Temperaturen angepasst werden.

Im nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Zu Beginn erfolgte die Herstellung eines 1,5 %-igen Agarosegels. Für 150 ml Gel wurden dabei 2,25 g Agarose in 150 ml 1 x TBE-Puffer aufgekocht und mit 15 µl Gel Red, einem Fluoreszenzfarbstoff, versetzt. Dieses Gemisch ließ man anschließend im Gelschlitten aushärten. Im Folgenden wurden die Proben mit 6 x Loading Dye gemischt und in die Geldaschen gegeben. Der Loading Dye bewirkt, dass die DNA-Proben sich nach unten in die Taschen senken und nicht in den das Gel umgebenden 1 x TBE-Puffer diffundieren. Nach Anschluss an den Stromkreis wanderte die DNA, bedingt durch ihre negative Ladung, im elektrischen Feld in Richtung der Kathode. Je kleiner die DNA-Fragmente waren, desto höher erwies sich die Laufgeschwindigkeit. Bei UV-Bestrahlung fluoreszierte der Gel-Red-DNA-Komplex. Der Marker an erster Stelle des Fluoreszenzbildes gibt hierbei Aufschluss über die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente.

2.2.5 DNA-Sequenzierung

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das hierfür notwendige Reaktionsgemisch entsprach pro Probe

ddH ₂ O	18,7 µl
10 x PCR-Buffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
<i>Forward</i> -Primer	0,5 µl
<i>Reverse</i> -Primer	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl.

Dieses wurde sodann mit 50 ng DNA gemischt und lief hauptsächlich unter dem folgenden PCR-Programm (alle weiteren Programme finden sich im Anhang):

95 °C	5 min	
94 °C	45 sek	} 40 Zyklen
56 °C	45 sek	
72 °C	45 sek	
72 °C	10 min	
12 °C	hold	

Gelelektrophorese

Im Folgenden wurden die PCR-Produkte mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Hiermit konnte zum einen gezeigt werden, dass die PCR funktionierte. Zum anderen konnte mithilfe der Negativkontrolle eine etwaige Verunreinigung ausgeschlossen werden. Zusätzlich sollten anhand der Bandenstärke für jede einzelne Probe die Volumina für die weiteren Schritte bestimmt werden.

Aufreinigung mit Agencourt® AMPure® XP

Als nächstes wurden die PCR-Produkte mithilfe des Agencourt® AMPure® XP Reagenz aufgereinigt. Diese Lösung enthält spezielle Magnetbeads, welche die PCR-Amplikons binden. Im magnetischen Feld konnten die Amplikons sodann von den restlichen Bestandteilen der DNA-Produkte wie beispielsweise nicht integrierten dNTPs, Primerdimeren, Salzen und anderen Bestandteilen separiert und weiterhin konzentriert werden. Es folgte ein Waschen der PCR-Amplikons und deren Elution in bidestilliertem Wasser [75] (vgl. Abbildung 8). Die einzusetzenden Volumina an PCR-Produkt und Agencourt® AMPure® XP ergaben sich aus der zuvor durchgeführten Elektrophorese. Bei gewöhnlich dicken Banden im Gelbild waren dies 10 µl DNA und 18 µl AMPure® XP. Bei sehr dünnen Banden konnten die Reagenzien – entsprechend eines Verhältnisses von 1:1,8 – auf bis zu 20 µl DNA und 36 µl AMPure® XP erhöht werden.

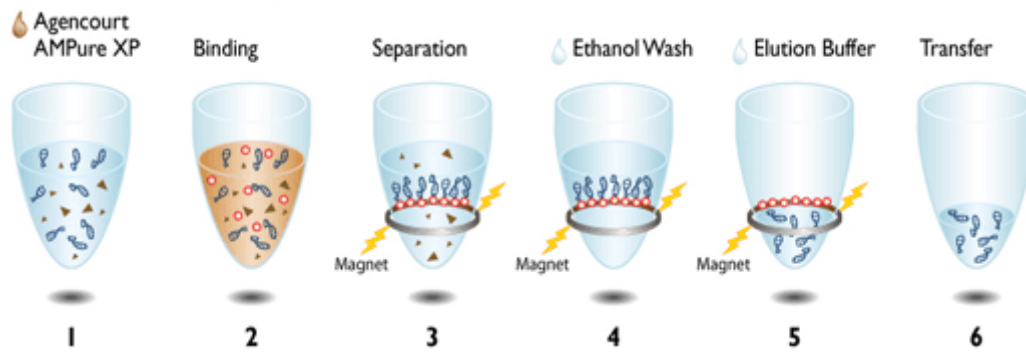


Abbildung 8: Aufreinigung mit Agencourt® AMPure® XP im Detail [75]: Zugabe von Agencourt® AMPure® XP zum PCR-Produkt (1). Während fünfminütiger Inkubation Binden der PCR-Amplikons an die Magnetbeads (2). Trennen der PCR-Amplikons von den anderen Bestandteilen durch waagrechtes Auflegen auf die Magnetplatte (3). Die gesammelten Beads mithilfe des magnetischen Felds weiter in Richtung Cupöffnung schieben, Überstand entfernen. Zweimaliges Waschen mit jeweils 200 µl Ethanol 70 % für drei Minuten (4). Wiederabnahme des Überstandes, Entfernung der Tubes von der Magnetplatte. Beads trocknen lassen. Elution der PCR-Amplikons von den Magnetbeads in 40 µl ddH₂O (5), Transfer in ein neues Tube (6).

Sequenzierreaktion

Der nächste Schritt stellte die eigentliche Sequenzierreaktion dar. Die in dieser Arbeit angewandte Technik entspricht einer modifizierten Sanger-Methode: Um den Umstand zu umgehen, vier unterschiedliche Reaktionsansätze herstellen zu müssen, werden die unterschiedlichen dNTPs fluoreszenzmarkiert. Somit muss lediglich ein Reaktionsgemisch hergestellt werden. Letzteres setzte sich pro Probe wie folgt zusammen:

DTCS-Mix	2 µl
Primer (<i>Forward</i> oder <i>Reverse</i>)	1 µl
aufgereinigte DNA	10 µl.

Das PCR-Programm stellte sich wie folgt dar:

96 °C	20 sek	} 40 Zyklen
50 °C	20 sek	
60 °C	4 min.	

Anstelle einer konventionellen Gelelektrophorese erfolgte die Analyse der Basensequenz mittels automatisierter Kapillarelektrophorese (siehe unten).

An dieser Stelle der Arbeit verdoppelte sich das Spektrum an durchzuführenden PCRs. Jede Probe wurde in diesem Schritt einmal mit einem *Forward*- und ein weiteres Mal mit einem *Reverse*-Primer versetzt, sodass schlussendlich jede Sequenz in beide Richtungen – also sowohl von 3' nach 5' wie auch von 5' nach 3' – vorlag. Etwaige Artefakte oder Mutationen konnten daher mithilfe der jeweils anderen Sequenz verifiziert oder falsifiziert werden.

Aufreinigung mit Agencourt® CleanSEQ®

Der Sequenzierreaktion folgte eine erneute Aufreinigung (vgl. Abbildung 9) [76]. Unter Zugabe von Agencourt® CleanSEQ® und Ethanol band die DNA die Magnetbeads. Mithilfe eines magnetischen Feldes konnten die Sequenzierprodukte von den übrigen Bestandteilen separiert werden. Erneutes Waschen mit Ethanol sowie folgend eine Elution in einer Sample Loading Solution (SLS) stellen die letzten Schritte dar. Anschließend wurde die Lösung in eine 96-Well-Platte transferiert.

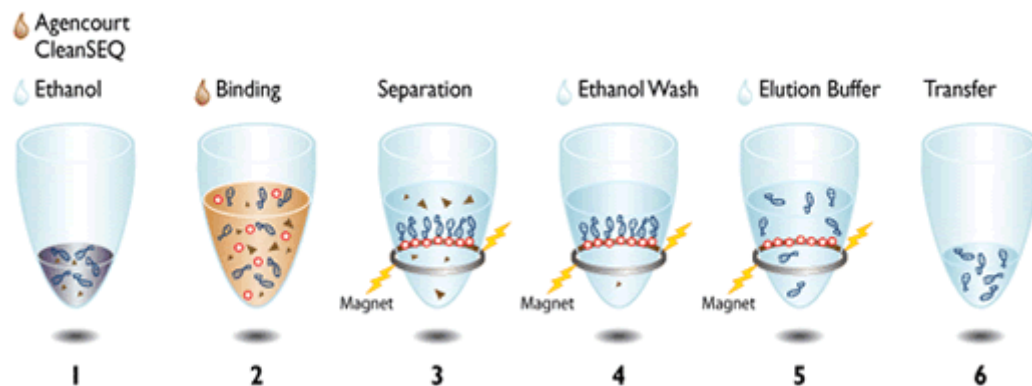


Abbildung 9: CleanSeq-Aufreinigung im Detail [76]: Zugabe von 10 μ l Agencourt® CleanSeq®-Reagenz und 42 μ l Ethanol 85 % (1). Binden der Sequenzierprodukte an die Magnetbeads (2). Übertragung der Tubes in die Magnetplatte. Separation der Sequenzprodukte von anderen Bestandteilen während dreiminütiger Inkubation (3). Entfernung des Überstands. Waschen mit 100 μ l Ethanol 85 % (4), erneut Überstand entfernen, sofortige Elution der Magnetbeads in Sample Loading Solution (5). Transfer in 96-Wellplatte (6). Beschichtung mit Tropfen Öl.

Sequenzierung am GeXP®-Sequenzier

Die 96-Wellplatte wurde in den GeXP®-Sequenzier überführt und die einzelnen DNA-Fragmente mit ihren fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTPs) mittels Kapillarelektrophorese separiert. Letztere wurden hierbei mittels Laser angeregt und emittierten Licht einer bestimmten Wellenlänge. Diese unterschiedlichen Wellenlängen konnten nun detektiert werden und wurden von der Software direkt als DNA-Sequenz wiedergegeben [77, 78].

2.2.6 Exomsequenzierung fünf ausgewählter Tumoren

Parallel zur DNA-Gewinnung aus Proben des Kollektivs spielte sich die Exomsequenzierung fünf ausgewählter neuroendokriner Tumoren des Ileums durch die CeGaT GmbH ab. Im Gegensatz zum FFPE-Gewebe des Tumorkollektivs stellte hierbei Kryogewebe das Untersuchungsmaterial dar. Die Sequenzierung erfolgte mittels *Next Generation Sequencing* auf dem SOLiD 5500 xl. Die Eigenschaften der für die Exomsequenzierung ausgewählten Tumorproben finden sich in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Eigenschaften der für die Exomsequenzierung ausgewählten ilealen NET

Probenbezeichnung	Staging	Chromosom 18-Status
S92.1	T1N1M1	1
S92.2	Unbekannt	Mosaik
S92.3	Unbekannt	1
S92.4	T4N1M1	1
S92.5	T3N1MX	1

Im Verlauf des Projektes schloss sich die Exomsequenzierung der entsprechenden fünf Normalgewebeproben an, um nicht-somatische Mutationen ausschließen zu können und damit die anschließende Validierung per Sanger-Sequenzierung zu erleichtern.

Zur Validierung der ausgewählten Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung stand wiederum Kryogewebe-DNA zur Verfügung.

2.2.7 Vorabanalysen an ausgewählten Targets

Aus dem in der Exomsequenzierung detektierten Pool an DNA-Veränderungen wurden 8 Targets für die weiteren Analysen ausgewählt. Diese ausgewählten DNA-Veränderungen wurden sodann zum einen mittels Prädiktionsprogrammen auf ihre etwaige Auswirkung auf den menschlichen Organismus eingestuft. Entsprechende Programme stellten SIFT² (Scale-invariant feature transform) und PolyPhen-2³ (Polymorphism Phenotyping v2) dar. Zum anderen schloss sich diesem Schritt eine detaillierte Literaturrecherche hinsichtlich jeder der Mutationen, aber auch zu den entsprechenden Genen an (vgl. Kapitel 1.4).

Weitere Analysen der einzelnen Gene, speziell deren Strukturanalyse, erfolgte mithilfe der Datenbank NCBI⁴ (National Center for Biotechnology Information) Insbesondere mit Blick auf die vielversprechende SNV im NFATC1-Gen erfolgte eine intensive Strukturanalyse eben dieses Gens. Diese lieferte Hinweise über mögliche für die Tumorgenese relevante Domänen. Hauptaugenmerk lag dabei auf Phosphorylierungsstellen, DNA-Bindungsstellen, der Calcineurin-Bindungsstelle, der Transaktivierungsdomäne A, dem Kernlokalisierungssignal sowie dem Kernexportsignal.

² <http://sift.jcvi.org/>

³ <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3 Ergebnisse

3.1 Präparation der Gewebeprobe

3.1.1 HE-Schnitte

Um das Tumorareal der HE-Schnitte mit Gewissheit eingrenzen zu können und damit eine exakte Markierung des für die Makrodissektion notwendigen Areals zu gewährleisten, wurde jeder der 116 Schnitte mikroskopisch untersucht (vgl. Abbildung 10). Dabei konnte für jedes Präparat die Diagnose eines neuroendokrinen Tumors verifiziert werden.

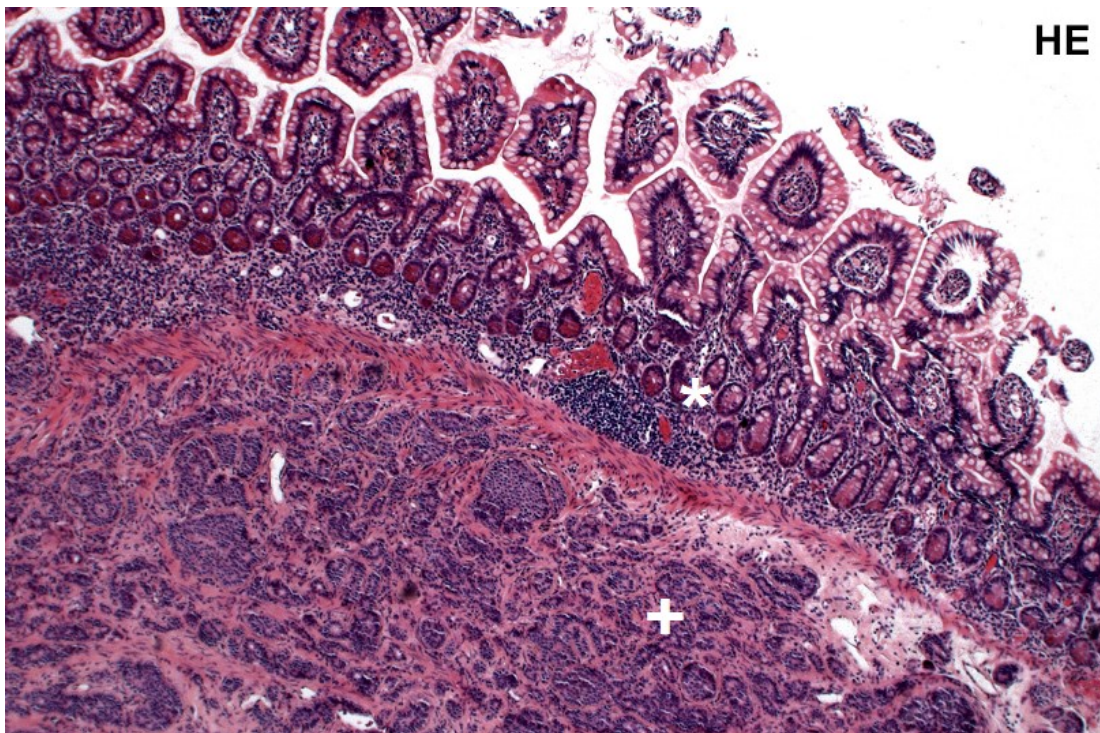


Abbildung 10: Hämatoxylin-Eosin (HE)-Schnitt eines neuroendokrinen Tumors des Ileums (* normale Dünndarmschleimhaut, + Tumorzellnester neuroendokriner Zellen)

3.1.2 Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA

Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen der extrahierten Tumor-DNA sind in Abbildung 11 dargestellt. Der Großteil der Konzentrationen fand sich innerhalb einer Spanne von 21-60 ng/ μ l. Im Vergleich hierzu stellte sich bei der

Ergebnisse

Konzentrationsbestimmung der Normalgewebs-DNA ein höherer Anteil an Proben schwächerer Konzentration dar (vgl. Abbildungen 11B und 12), was insbesondere an den stark tumordurchsetzten Gewebsschnitten lag. Nichtsdestotrotz war der Anteil der Proben innerhalb einer Konzentrationsspanne von 21-60 ng/μl vergleichbar mit denen der Tumorproben (43,1 % vs. 50,0 %).

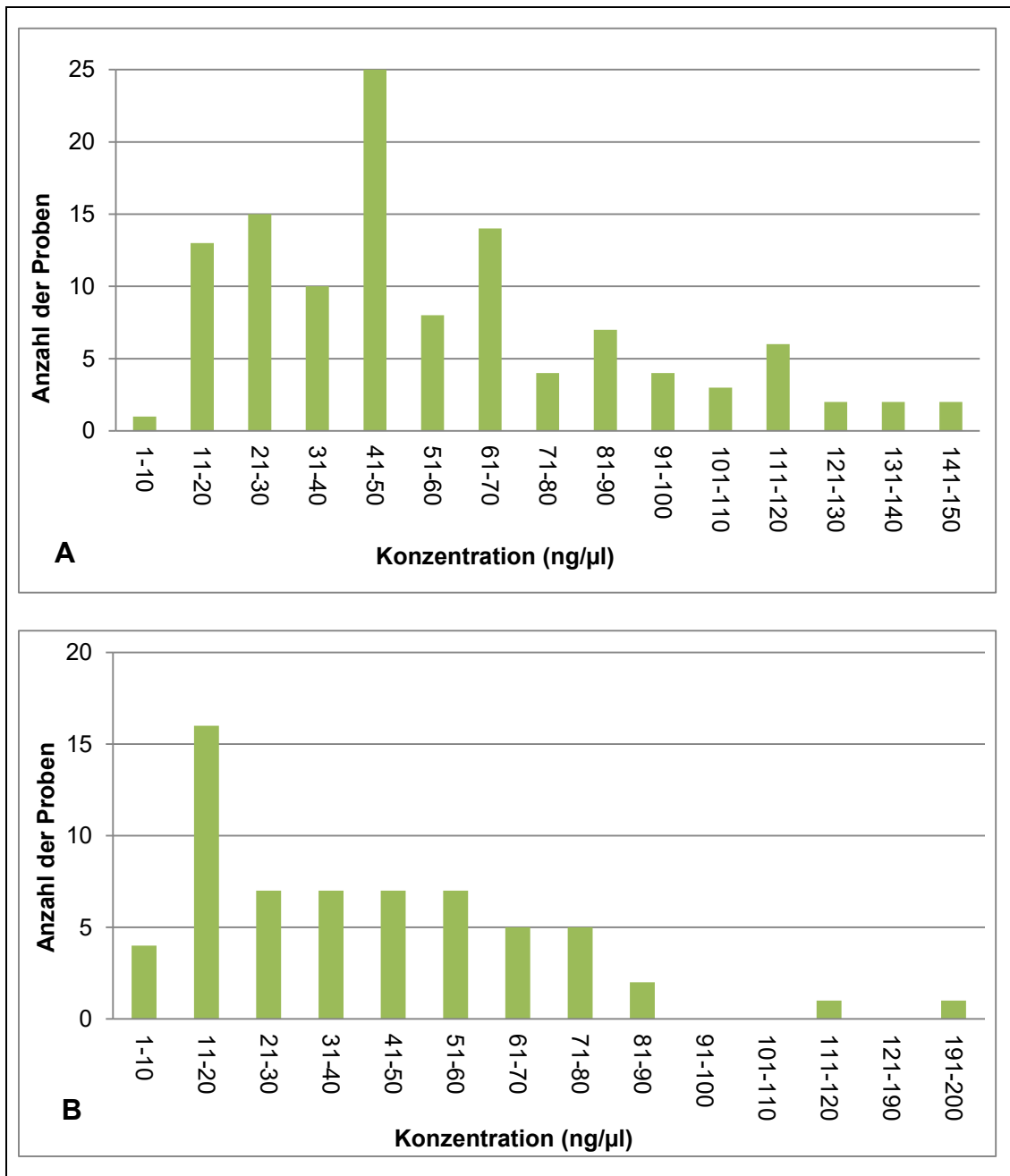


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der Tumor-DNA-Konzentrationen, n = 116 (A) und der Normalgewebs-DNA-Konzentrationen, n = 62 (B)

Einige DNA-Konzentrationen konnten im Verlauf durch erneute Makrodissektion sowie den zusätzlichen Verdau von Dickschnitten optimiert werden.

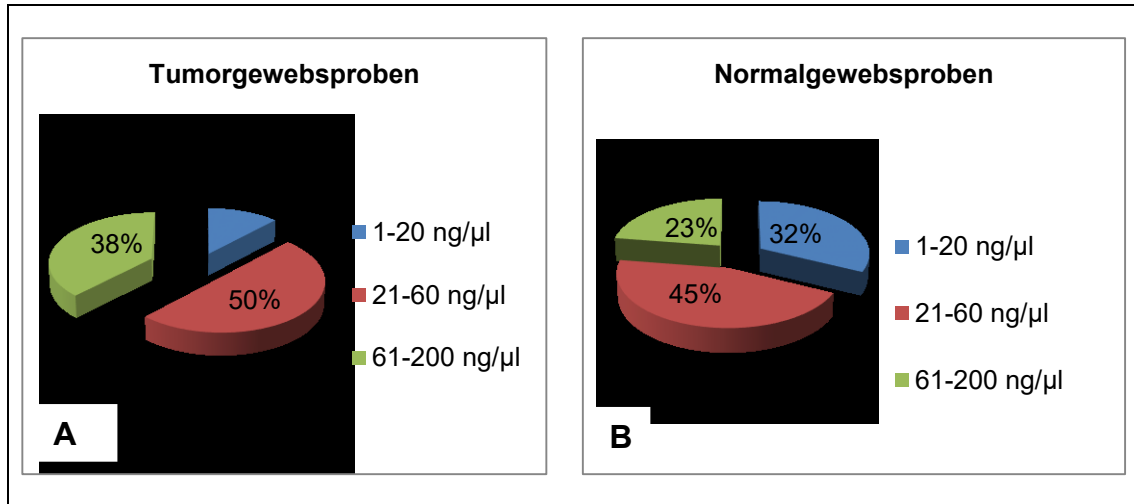


Abbildung 12: Vergleich der Konzentrationshäufigkeiten von Tumorgewebe (A; n = 116) und Normalgewebe (B; n = 62)

3.2 Ergebnisse der Qualitäts-PCR

Die Auswertung der Qualitäts-PCR spiegelt ein sehr heterogenes Bild wider (vgl. Abbildung 13). Mit 64,7 % wies der Großteil der Tumorgewebsproben eine Qualität von 200 Basenpaaren (bp) oder mehr auf. Ein Drittel der Tumorgewebsproben zeigte eine DNA-Qualität von 100 bp und wurden aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Die Normalgewebsproben verhielten sich ähnlich den Tumorgewebsproben. In 61,3 % der Fälle fand sich eine DNA-Qualität von 200 bp und mehr, indes zeigte etwas mehr als ein Drittel (37,1 %) lediglich eine 100bp-Bande im Gelbild.

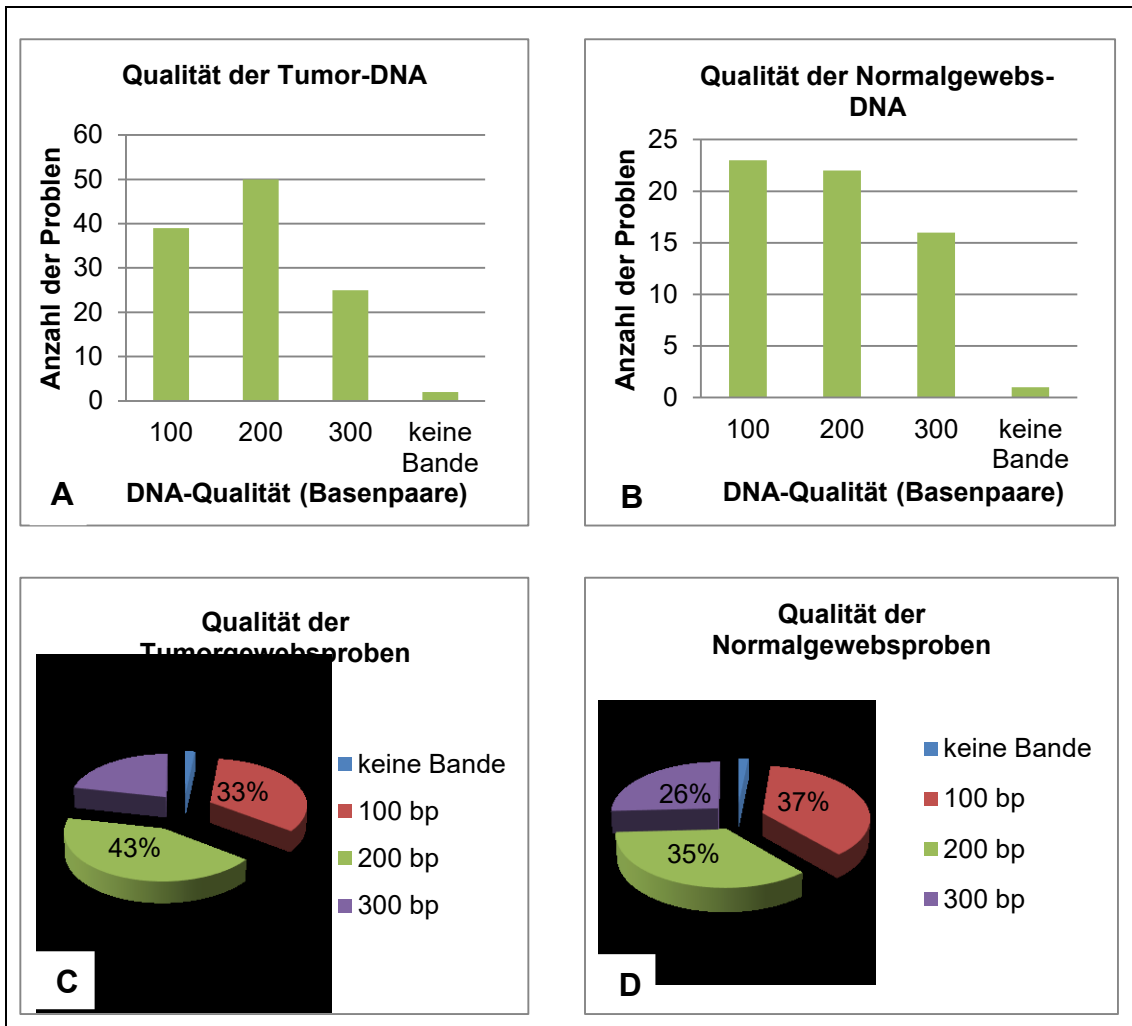


Abbildung 13: Vergleich der DNA-Qualität von Tumorgewebe (A und C; n = 116) und Normalgewebe (B und D; n = 62)

3.3 Auswahl der zu analysierenden Tumorproben

Die Auswahl der im Weiteren zu analysierenden Tumorproben orientierte sich insbesondere an DNA-Konzentration und DNA-Qualität einzelner Proben. Außerdem sollte die Kohorte sowohl Proben mit Chromosom 18-Verlust als auch Proben ohne Chromosom 18-Verlust beinhalten. Zuletzt erfolgte das Einbeziehen einer bestimmten Anzahl von gepaarten Proben aus Primarius und entsprechender Metastase. Aufbauend auf diesen Kriterien ergab sich die Auswahl der in Tabelle 14 aufgeführten Tumorproben.

Ergebnisse

Tabelle 14: Übersicht über die ausgewählten Tumorproben

Probe	Tumorart	DNA-Konzentration (ng/µl)	DNA-Qualität (maximal sichtbare Bande)	Chromosom 18-Anzahl	Kohorte
I 002a	Primarius	67,7	200 bp	1	2
I 003	Primarius	50,0	200 bp	2	1
I 005b	LK-Metastase	46,4	200 bp	1	3
I 013b	Primarius	39,9	200 bp	2	1
I 016b	LK-Metastase	20,7	200 bp	2	2
I 024a	Primarius	47,7	300 bp	1	2
I 026c	Primarius	14,6	200 bp	2	1
I 027c	LK-Metastase	81,9	200 bp	2	2
I 029c	LK-Metastase	138,9	200 bp	2	2
I 030c	LK-Metastase	105,2	300 bp	1	2
I 032a	Primarius	43,7	300 bp	2	2
I 052c	Primarius	65,4	300 bp	30:70*	3
I 052f	Fernmetastase	20,9	300 bp	30:70*	3
I 055a	Primarius	63,6	200 bp	1	1
I 061b	LK-Metastase	39,6	300 bp	1	2
I 063c	LK-Metastase	113,7	300 bp	1	3
I 064a	Primarius	51,4	300 bp	1	1
I 066a	Primarius	55,1	200 bp	1	2
I 092	Primarius	23,2	200 bp	2	1
I 093a	LK-Metastase	37,8	300 bp	1	3
I 099b	Primarius	86,4	200 bp	2	3
I 100c	Primarius	35,2	200 bp	1	2
I 101	Primarius	40,5	200 bp	2	1
I 104b	LK-Metastase	46,4	200 bp	1	2
I 105a	Primarius	37,2	300 bp	1	3
I 105b	Fernmetastase	40,6	300 bp	1	3
I 106a	Primarius	75,7	300 bp	60:40*	3
I 106d	Fernmetastase	47,9	300 bp	60:40*	3
I 107a	Primarius	42,5	200 bp	1	2
I 117a	Primarius	16,9	200 bp	1	3

Ergebnisse

I 117b	Fernmetastase	53,7	300 bp	1	3
I 142a	Primarius	22,6	200 bp	1	3
I 142c	Fernmetastase	27,0	200 bp	1	3
I 169a	Fernmetastase	44,6	200 bp	1	3
I 169b	Primarius	89,3	200 bp	1	3
I 185a	Fernmetastase	67,0	300 bp	NA	3
I 185c	Primarius	106,7	300 bp	NA	3
I 198a	Fernmetastase	107,2	300 bp	65:35*	3
I 198b	Primarius	117,4	300 bp	65:35*	3
I 198c	LK-Metastase	27,8	300 bp	65:35*	3

LK: Lymphknoten *Bp: Basenpaare*

* Verhältnis von Zellen mit einem Chromosom 18 zu Zellen mit zwei Chromosomen 18

3.4 Exomsequenzierung

Der Schwerpunkt dieser zu Beginn der Arbeit durchgeführten Exomsequenzierung fünf ausgewählter ilealer NET sowie ihrer entsprechenden Normalgewebeproben lag auf *single nucleotide variations* (SNV). Hierunter versteht man die Substitution einer einzelnen Base im DNA-Strang durch eine andere. Diese Substitutionen können synonym sein, d.h. das Basentriplett codiert immer noch für dieselbe Aminosäure und hat keinen Effekt auf die Proteintranslation. Sobald die Basensubstitution jedoch zu einem Aminosäureaustausch führt, kann dies zu einer negativen Veränderung der Proteineigenschaften führen; in diesem Fall spricht man von einem nicht-synonymen Austausch. Letzterer kann dabei entweder zu einem vorzeitigen Kettenabbruch der Aminosäurekette (*Nonsense-SNV*) oder aber zu einem veränderten Protein (*Missense-SNV*) führen. SNV scheinen nach allgemeinem Verständnis in der Ausbildung von Tumoren vielversprechend, da sie im Falle einer nicht-synonymen SNV zu einem Funktionalitätsverlust bestimmter Proteine führen können.

Die zu Beginn der Arbeit durchgeführte Exomsequenzierung lieferte insgesamt mehr als 590 somatische SNV. Die Auswahl der fortan zu untersuchenden Targets beruhte auf bisherigen Kenntnissen bezüglich deren onkologischen Zusammenhangs sowie auf dem bereits beschriebenen Wissen über den Mechanismus

der Tumorgenese ilealer NET. Hauptaugenmerk lag dabei auf Chromosom 18-Genen. Die Frequenz einzelner SNV innerhalb der fünf Tumoren sowie vorbestehende Prädiktionsaussagen über deren mögliche Auswirkungen auf den Organismus stellten sich als zweitrangig dar. Die basierend auf diesen Merkmalen ausgewählten Targets sind Tabelle 15 zu entnehmen. Das *PIK3C3*-Gen stellte insoweit eine Besonderheit dar, als dass es zwei direkt hintereinander liegende SNV aufwies. Im *PIEZO2*-Gen war in der Exomsequenzierung keine SNV, sondern eine Deletion dreier Basen nachgewiesen worden.

Für die weiteren Analysevorgänge standen demzufolge neun zu untersuchende Genabschnitte zur Verfügung, die gegebenenfalls auf weitere Regionen des Gens ausgeweitet werden konnten.

Tabelle 15: Übersicht über die für die Mutationsanalyse ausgewählten Targets

Gen	Lokalisation	Tumor	SNV
<i>CABYR</i>	Chr18:g. 21736417A>G	S92.5 Exon 4	p.I318V
<i>ERBB2</i>	Chr17:g.37883791C>T	S92.1 Exon 26	p.P1135S
<i>ERCC4</i>	Chr16:g.14026096T>A	S92.5 Exon 6	p.S352R
<i>MSH6</i>	Chr2:g.48030631C>T	S92.5 Exon 5	p.P1082L
<i>NFATC1</i>	Chr18:g.77211057C>T	S92.5 Exon 5	p.R552C
<i>PIEZO2</i>	Chr18:g.10671606TTCT>T	S92.2 Exon 52	NA
<i>PIK3C3</i>	Chr18:g.39576604T>A	S92.5 Exon 9	NA
<i>PIK3C3</i>	Chr18:g.39576605A> T	S92.5 Exon 9	p.I299F
<i>LAMA3</i>	Chr18:g.21407328C>G	S92.1, S92.2, S92.4, jeweils Exon 23	p.A907G

3.5 Validierung der Exomsequenzierung

Mittels Sanger-Sequenzierung konnten fünf der ausgewählten SNV validiert werden. Hierunter fanden sich die SNV der folgenden Gene: *CABYR*, *ERBB2*, *MSH6*, *NFATC1*, *PIEZO2*. Abbildung 14 zeigt die zu Beginn der Validierung erhaltenen Gelbilder, welche Auskunft darüber geben, ob die Auswahl der Primer für die jeweiligen Targets erfolgreich war.

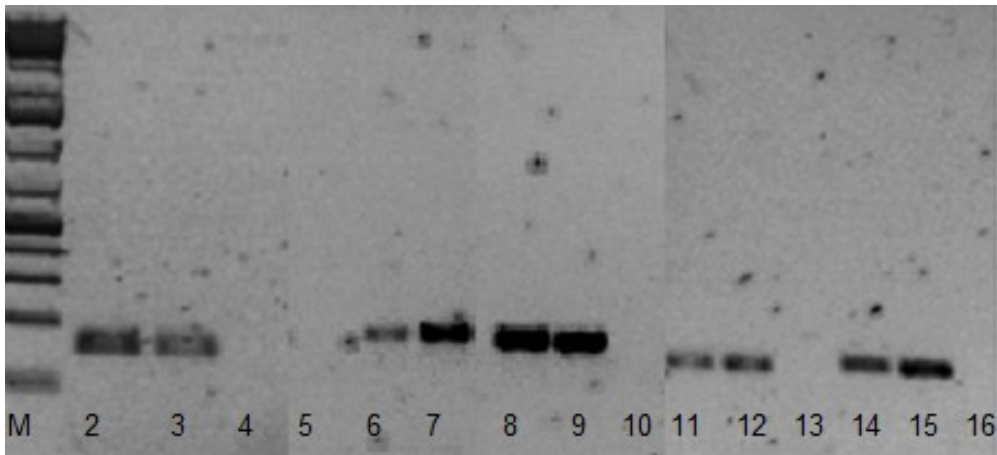


Abbildung 14: PCR-Produkte zu Beginn der Validierung der SNV

M: Marker	2: CABYR Tumorgewebe S92.5
3: CABYR Normalgewebe S92.5	4: Negativkontrolle CABYR
5: PIEZO2 Negativkontrolle	6: PIEZO2 Tumorgewebe S92.2
7: PIEZO2 Normalgewebe S92.2	8: NFATC1 Tumorgewebe S92.5
9: NFATC1 Normalgewebe S92.5	10: NFATC1 Negativkontrolle
11: MSH6 Tumorgewebe S92.5	12: MSH6 Normalgewebe S92.
13: MSH6 Negativkontrolle	14: ERBB2 Tumorgewebe S92.1
15: ERBB2 Normalgewebe S92.1	16: ERBB2 Negativkontrolle

Die SNV p.A907G im *LAMA3*-Gen war durch Maike Hoffmeister bereits im Vorfeld validiert worden und erwies sich als Artefakt.

3.6 Analyse der ausgewählten Targets am Kollektiv

3.6.1 Mutationsanalyse CABYR

Das *CABYR*-Gen mit seinen sechs Exons ist auf dem langen Arm von Chromosom 18 lokalisiert. Die in der Exomsequenzierung detektierte SNV findet sich in Exon 4 und führt zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Valin an der Stelle 318 (p.I318V). Weitere Eigenschaften dieser SNV finden sich in Tabelle 16.

Tabelle 16: Eigenschaften von p.I318V im CABYR-Gen

Chromosom	18
Position	21736417
Referenz	A
Genotyp	G
Heterozygote Mutation?	Ja
Funktionelle Konsequenz	Nicht-synonym
Aminosäurenposition	318
Referenz-Aminosäure	I
Genotyp-Aminosäure	V
Prädiktion	
SIFT	Tolerabel
PolyPhen-2	Benigne

Für das *CABYR*-Gen sind in der Tumordatenbank COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer⁵) 55 Mutationen in insgesamt 23.780 Tumorproben aufgeführt (Stand: 24.05.2015). P.I318V ist dort nicht vorbeschrieben. In der Datenbank ebenfalls aufgelistet sind Untersuchungen bezüglich *copy number variations* (CNV). Für *CABYR* ist eine deutliche Dominanz an Gewinnen (Ratio = 3,0) im Vergleich zu Verlusten des Gens beschrieben.

Nach erfolgreicher Validierung von p.I318V erfolgte die Analyse des entsprechenden Bereiches von Exon 4 an 25 ausgewählten Tumorproben aus dem Kollektiv (vgl. Abbildung 15 und Tabelle 17), jedoch ohne p.I318V hierin nachweisen zu können.

Weitere Sequenzen des *CABYR*-Gens sowie die in diesem Teil der Arbeit nicht abgebildeten Sequenzen der restlichen Targets sind dem Anhang zu entnehmen.

⁵ <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>

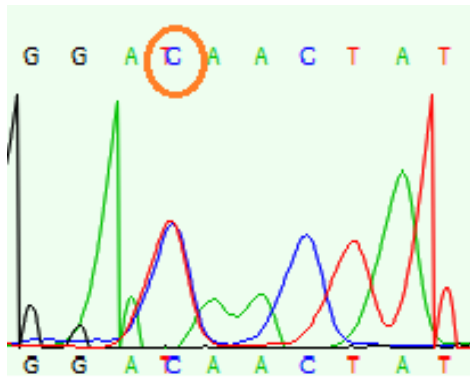


Abbildung 15: Validierung der Mutation p.I318V im *CABYR*-Gen von Tumor S92.5 in der reverse-Sequenz: an der cDNA-Stelle c.1104 findet sich ein Basenaustausch von T → C.

Tabelle 17: Zusammensetzung der für die Analyse des *CABYR*-Gens ausgewählten 25 Tumorproben

Kohorte	TNM-Klassifikation
1	T1-T3 N0 M0
2	T1-T4 NX, N1 M0
3	T1-T4 NX, N1 M1

Kohorte	Percentage
Kohorte 1	24%
Kohorte 2	48%
Kohorte 3	28%

3.6.2 Mutationsanalyse *ERBB2*

Das auf Chromosom 17 lokalisierte *ERBB2*-Gen findet sich auf dessen langem Arm und umfasst 30 Exons. Die in der Exomsequenzierung detektierte SNV findet sich im Exon 26 und führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin an der Stelle 1135 (p.P1135S). Weitere Eigenschaften von p.P1135S finden sich in Tabelle 18.

Tabelle 18: Eigenschaften von p.P1135S im *ERBB2*-Gen

Chromosom	17
Position	37883791

Referenz	C
Genotyp	T
Heterozygote Mutation?	Ja
Funktionelle Konsequenz	Nicht-synonym
Aminosäurenposition	1135
Referenz-Aminosäure	P
Genotyp-Aminosäure	S
Prädiktion	
SIFT	Schädigend
PolyPhen-2	Variation unbekannt

Laut COSMIC ließen sich in bisherigen Studien in insgesamt 46.492 Tumorproben 602 Mutationen im *ERBB2*-Gen finden (Stand: 24.05.2015). Die in der Exomsequenzierung detektierte Mutation p.P1135S ist jedoch nicht aufgelistet.

P.P1135S im *ERBB2*-Gen ließ sich im Tumorgewebe per Sanger-Sequenzierung validieren, allerdings wurde die Variation ebenso im Normalgewebe gefunden (vgl. Abbildung 16). P.P1135S muss demnach als Keimbahnmutation eingeordnet werden. Es erfolgten keine weiteren Analysen in Bezug auf das *ERBB2*-Gen.

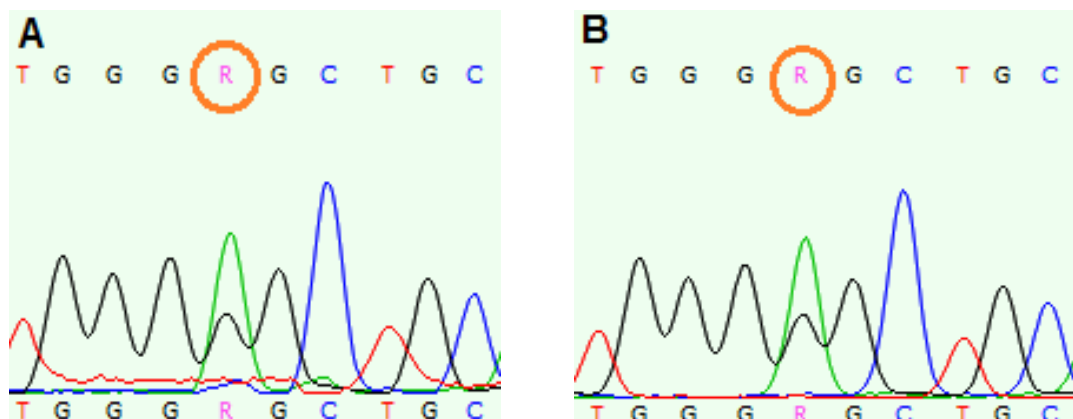


Abbildung 16: Validierung der Mutation p.P1135S im *ERBB2*-Gen von Tumor S92.1 (A) wie auch im entsprechenden Normalgewebe (B) (jeweils reverse-Sequenz): an der cDNA-Stelle c.3403 findet sich ein Basenaustausch von G → A.

3.6.3 Mutationsanalyse ERCC4

Das *ERCC4*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 und weist elf Exons auf. Die mittels Exomsequenzierung nachgewiesene SNV findet sich in Exon 6 und führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Threonin an der Stelle 352 (p.S352R). Weitere Eigenschaften der SNV finden sich in Tabelle 19.

Tabelle 19: Eigenschaften von Mutation p.S352R im *ERCC4*-Gen

Chromosom	16
Position	14026096
Referenz	T
Genotyp	A
Heterozygote Mutation?	Ja
Funktionelle Konsequenz	Nicht-synonym
Aminosäurenposition	352
Referenz-Aminosäure	S
Genotyp-Aminosäure	R
Prädiktion	
SIFT	Schädigend
PolyPhen-2	Wahrscheinlich schädigend

Ogleich sich p.S352R nicht in der Tumordatenbank COSMIC wiederfinden lässt, sind bis zum jetzigen Zeitpunkt in insgesamt 24.478 Tumorproben 157 Mutationen innerhalb des *ERCC4*-Gens beschrieben (Stand 24.05.2015). Im Hinblick auf CNV sind bis dato deutlich häufiger Gengewinne als Genverluste beschrieben.

P.S352R wurde bei erfolgloser Validierung mittels Sanger-Sequenzierung als Artefakt interpretiert. Von weiteren Analysen wurde abgesehen.

3.6.4 Mutationsanalyse *MSH6*

Das *MSH6*-Gen, bestehend aus zehn Exons, ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert. Die in Exon 5 detektierte Mutation stellt eine SNV dar, die einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin an der Stelle 1082 bedingt (p.P1082L). Weitere Eigenschaften von p.P1082L finden sich in Tabelle 20.

Tabelle 20: Eigenschaften von p.P1082L im *MSH6*-Gen

Chromosom	2
Position	48030631
Referenz	C
Genotyp	T
Heterozygote Mutation?	Ja
Funktionelle Konsequenz	Nicht-synonym
Aminosäurenposition	1082
Referenz-Aminosäure	P
Genotyp-Aminosäure	L
Prädiktion	
SIFT	Schädigend
PolyPhen-2	Variation unbekannt

Die Mutation p.P1082L ist in der Tumorbank COSMIC bereits als somatische Mutation in einer Dickdarmkarzinomprobe vorbeschrieben. Insgesamt findet sich im *MSH6*-Gen bis zu diesem Zeitpunkt 391 Mutationen in insgesamt 26.462 Tumorkproben (Stand 24.05.2015). Bezüglich CNV zeigt sich eine deutliche Dominanz an Amplifikationen (Ratio = 6,8) im Vergleich zu Genverlusten.

Nach erfolgreicher Validierung war p.P1082L auch im Normalgewebe nachzuweisen, sodass sie als Keimbahnmutation eingeordnet werden musste (vgl. Abbildung 17) und keine weiteren Analysen bezüglich dieses Gens stattfanden.

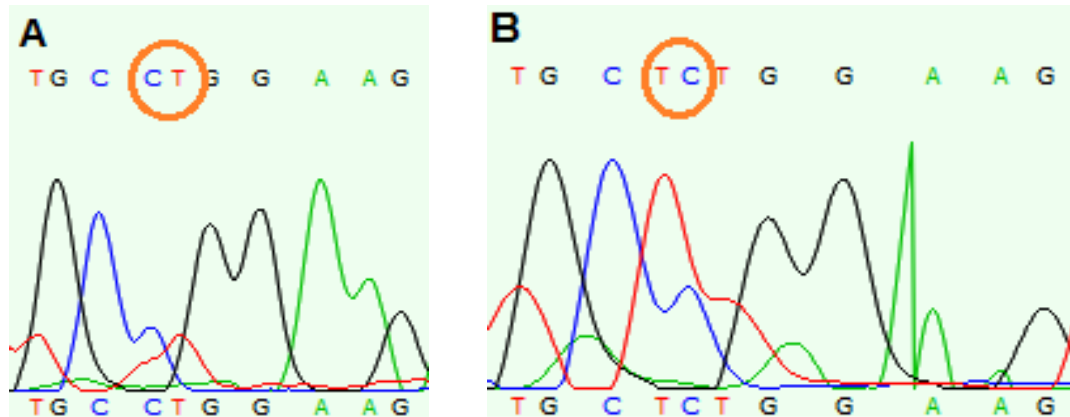


Abbildung 17: Validierung der Mutation p.P1082L im *MSH6*-Gen von Tumor S92.5 (A) wie auch im entsprechenden Normalgewebe (B) (jeweils *forward*-Sequenz): an der *cDNA*-Stelle c.3245 findet sich ein Basenaustausch von C → T.

3.6.5 Mutationsanalyse *NFATC1*

Das *NFATC1*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 18 lokalisiert und beinhaltet acht Exons. Die in der Exomsequenzierung detektierte SNV ist innerhalb von Exon 5 zu finden und bedingt einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein an der Stelle 552 (p.R552C). Weitere Eigenschaften dieser Mutation finden sich in Tabelle 21.

Tabelle 21: Eigenschaften von p.R552C im *NFATC1*-Gen

Chromosom	18
Position	77211057
Referenz	C
Genotyp	T
Heterozygote Mutation?	Ja
Funktionelle Konsequenz	Nicht-synonym
Aminosäurenposition	552
Referenz-Aminosäure	R
Genotyp-Aminosäure	C
Prädiktion	
SIFT	Schädigend
PolyPhen-2	Variation unbekannt

In COSMIC sind mit Bezug auf *NFATC1* 238 Mutationen in insgesamt 23.940 Tumorproben aufgeführt (Stand: 24.05.2015), wobei p.R552C nicht vorbeschrieben ist. Hinsichtlich CNV zeigen die analysierten Tumorproben deutlich häufiger einen Genverlust dieses auf Chromosom 18 lokalisierten Gens als eine Genamplifikation (Ratio = 8,6).

Nach erfolgreicher Validierung von p.R552C im *NFATC1*-Gen (vgl. Abbildung 18) erfolgte die Analyse aller als relevant eingestuften DNA-Regionen des Gens an 30 ausgewählten Tumorproben aus dem Kollektiv (vgl. Tabelle 22).

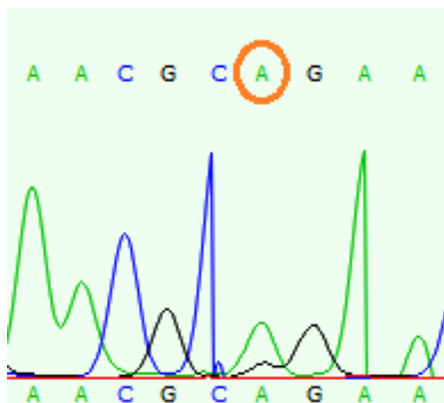
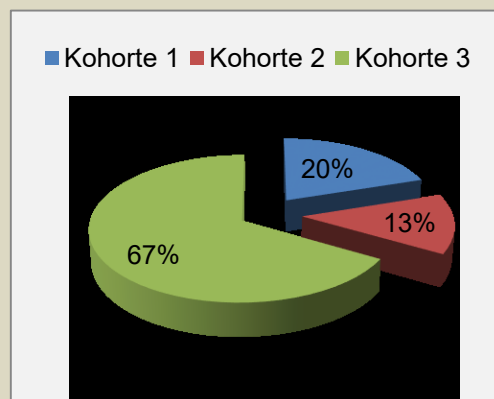


Abbildung 18: Validierung der Mutation p.R552C im *NFATC1*-Gen in Tumor S92.5 in der reverse-Sequenz: an der cDNA-Stelle c.1720 findet sich ein Basenaustausch von G → A.

Tabelle 22: Zusammensetzung der für die Analyse des *NFATC1*-Gens ausgewählten 30 Tumorproben

Kohorte	TNM-Klassifikation
1	T1-T3 N0 M0
2	T1-T4 NX, N1 M0
3	T1-T4 NX, N1 M1



Unter Verwendung von 15 Primern (vgl. Tabelle 7) konnten alle im Vorfeld als vielversprechend eingestuften Domänen im Gen abgedeckt werden (vgl. Kap. 2.2.7). Abbildung 19 stellt dabei ein exemplarisches Gelbild von 28 PCR-Produkten mit den Primern NFATC1 Ex 2.7 und NFATC1 Ex 2.5n dar.

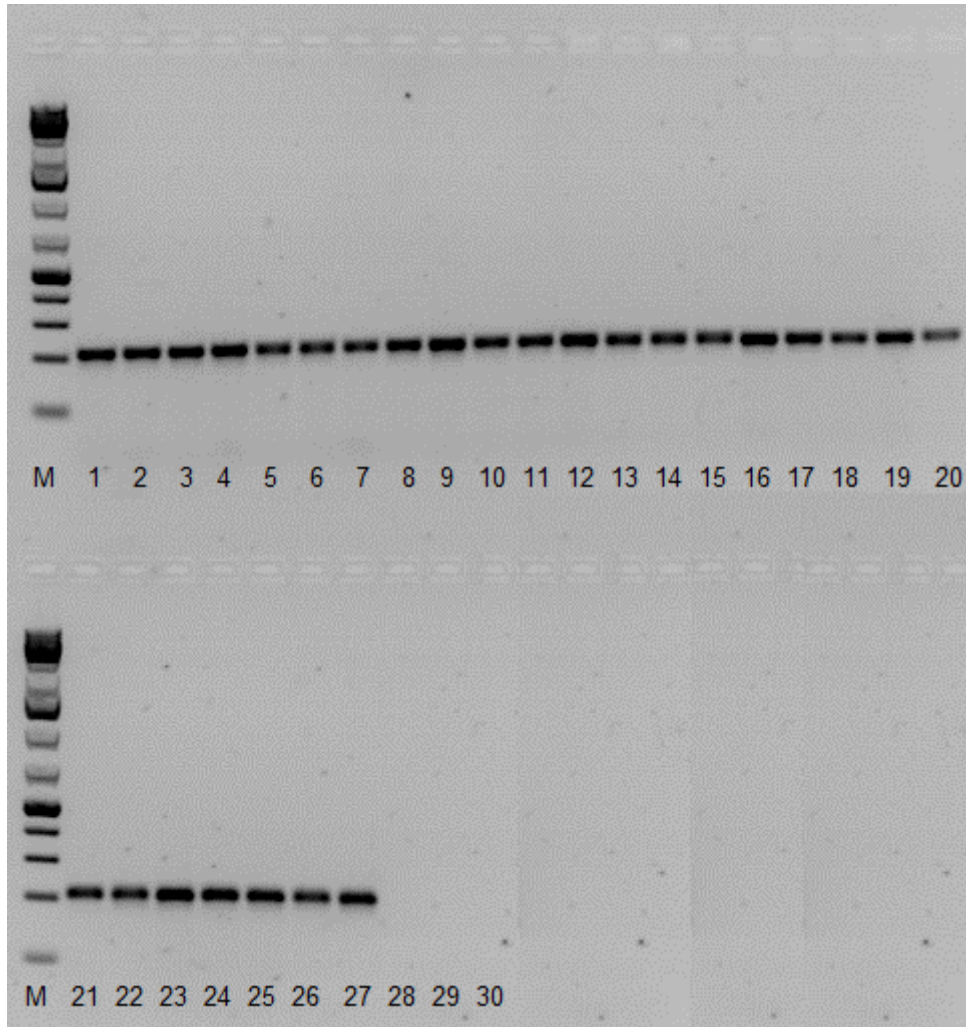


Abbildung 19: Gelbild von 28 PCR-Produkten mit den Primern NFATC1 Ex 2.7 (1-27) und NFATC1 2.5n (28)

<i>M: Marker</i>	<i>1: I003</i>	<i>2: I013b</i>	<i>3: I055a</i>	<i>4: I064a</i>
<i>5: I092</i>	<i>6: I101</i>	<i>7: I099b</i>	<i>8: I105a</i>	<i>9: I106a</i>
<i>10: I005b</i>	<i>11: I016b</i>	<i>12: I061b</i>	<i>13: I063c</i>	<i>14: I093a</i>
<i>15: I104b</i>	<i>16: I030c</i>	<i>17: I117b</i>	<i>18: I142a</i>	<i>19: I142c</i>
<i>20: I169b</i>	<i>21: I169a</i>	<i>22: I185c</i>	<i>23: I185a</i>	<i>24: I052f</i>
<i>25: I198a</i>	<i>26: I105b</i>	<i>27: I106d</i>	<i>28: I101</i>	
<i>29: Negativkontrolle NFATC1 Ex 2.7</i>				
<i>30: Negativkontrolle NFATC1 Ex 2.5n</i>				

P.R552C fand sich in keiner der 30 Tumorproben wieder. Indessen konnte im Primärtumor I105a eine weitere Mutation detektiert werden, welche in Exon 2 einen Aminosäureaustausch von Leucin nach Valin an der Stelle 344 bedingt (vgl. Abbildung 20A). Zwei Wiederholungen bestätigten p.L344V. In der zugehörigen Fernmetastase konnte p.L344V ebenfalls detektiert werden (vgl. Abbildung 20B).

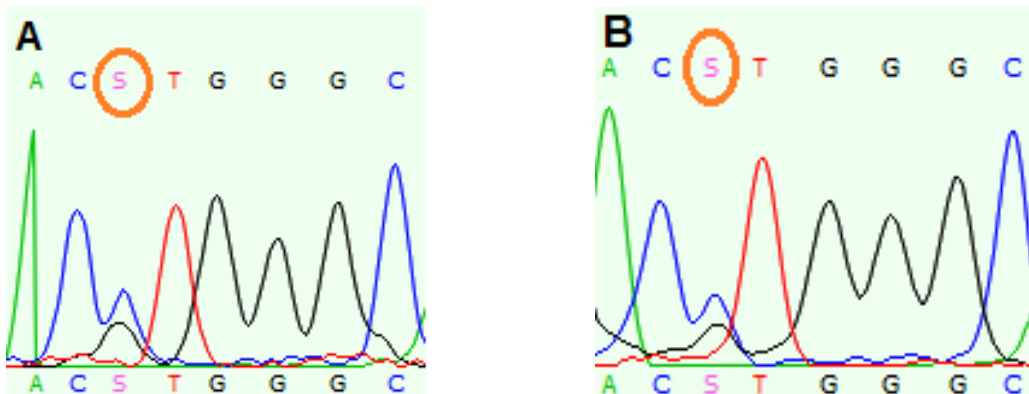


Abbildung 20: Mutation p.L344V in den *forward*-Sequenzen von Tumorprobe I105a (A) und I105b (B) im *NFATC1*-Gen: an cDNA-Stelle c.1030 findet sich ein Basenaustausch von C → G.

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung des dazugehörigen Normalgewebes, um eine Einordnung als somatische Mutation oder aber als Keimbahnmutation treffen zu können. Hierbei war p.L344V auch im Normalgewebe nachzuweisen (vgl. Abbildung 21), sodass p.L344V als Keimbahnmutation aufgefasst wurde.

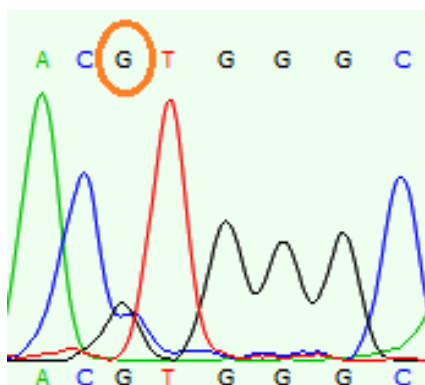


Abbildung 21: Im Normalgewebe I105 findet sich die Mutation p.L344V im *NFATC1*-Gen mit einem Basenaustausch von C → G an cDNA-Stelle c.1030 (*forward*-Sequenz)

Auffällig zeigte sich in der Mutationsanalyse des *NFATC1*-Gens die regelmäßige Detektion synonyme Substitutionen. Mehr als die Hälfte aller Tumorproben wiesen zwei oder mehr synonyme Substitutionen auf. Lediglich vier der 30 Proben waren ohne synonyme Substitution (vgl. Abbildung 22).

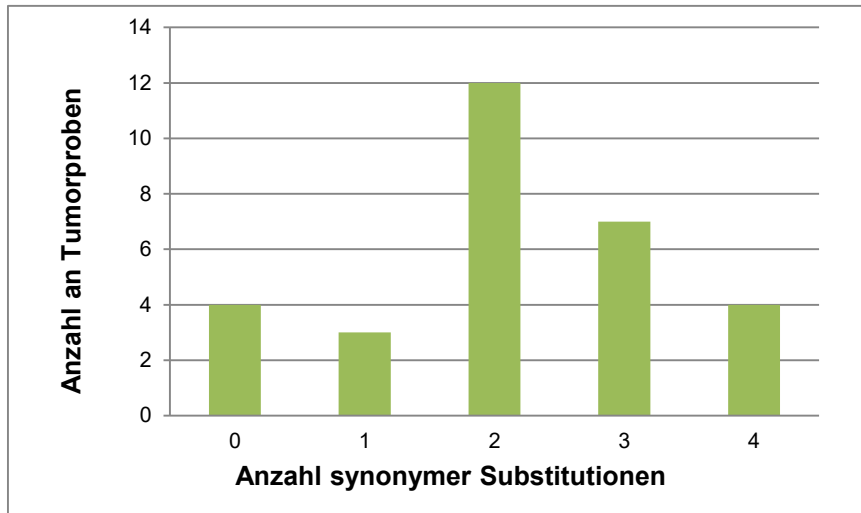


Abbildung 22: Anzahl synonyme Mutationen pro Tumorprobe

Schließlich konnten innerhalb der Analysen aller als relevant eingestuft DNA-Regionen des *NFATC1*-Gens 61 synonyme Substitutionen detektiert werden, deren Häufigkeiten Abbildung 23 zu entnehmen sind.

Zusammenfassend ergab die Mutationsanalyse des *NFATC1*-Gens zwei nicht-synonyme Mutationen und 61 synonyme Substitutionen. Die somatische SNV p.R552C fand sich in einer aus 35 Tumorproben, darunter 27 Primärtumoren und acht Metastasen. Weiterhin erfolgte der Nachweis der Mutation p.L344V, welche sich im weiteren Verlauf als Keimbahnmutation herausstellte.

Innerhalb der detektierten synonymen Substitutionen machten p.P249P, p.L399L, p.S604S sowie p.P649P den größten Anteil aus.

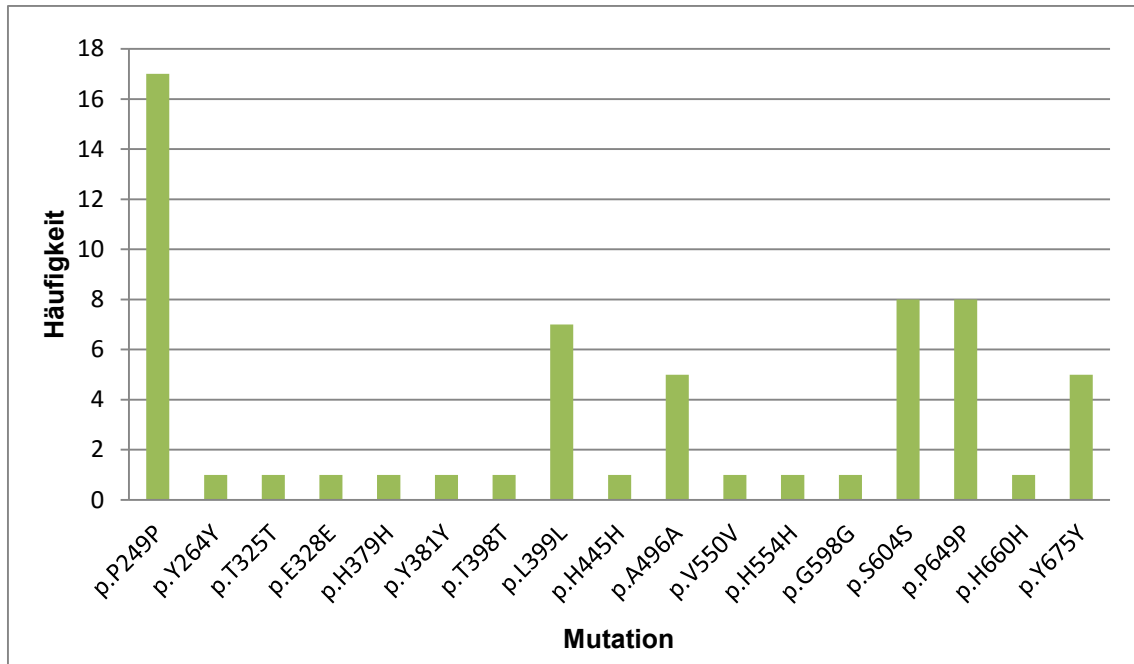


Abbildung 23: Überblick über alle im *NFATC1*-Gen detektierten synonymen Substitutionen und ihre Häufigkeit

3.6.6 Mutationsanalyse *PIEZO2*

Das *PIEZO2*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 18 lokalisiert und weist 52 Exons auf. Die in der Exomsequenzierung detektierte Mutation fand sich im letzten Exon. Diese stellt eine Deletion an den Positionen 10671600-10671602 dar, die einen Verlust der Aminosäure Glutaminsäure zur Folge hat. Weitere Eigenschaften dieser Mutation finden sich in Tabelle 23.

Tabelle 23: Eigenschaften der InDel-Mutation an Stelle 10671600-10671602 im *PIEZO2*-Gen

Chromosom	18
Position	10671600-10671602
Referenz	TTCT
Genotyp	T
Heterozygote Mutation?	Ja
Aminosäurenposition	2727 + 2728
Referenz-Aminosäuren	ED
Genotyp-Aminosäuren	D

Prädiktion	
SIFT	Deleterious
PolyPhen-2	NA

In der Tumordatenbank COSMIC findet sich im *PIEZO2*-Gen bislang (Stand 24.05.2015) 28 Mutationen in 23.690 Tumorproben. Deletionen und Insertionen sind nicht vorbeschrieben. Die in der Exomsequenzierung detektierte Mutation an Position 10671600-10671602 ist bisher in Bezug auf Malignome nicht bekannt. Hinsichtlich CNV zeigt sich eine Dominanz an Gengewinnen.

In der Validierung mittels Sanger-Sequenzierung konnte die Deletion an Stelle 10671600-10671602 erneut nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 24). Da es sich bei dieser Deletion von drei Basen jedoch nicht um eine *frameshift*-Mutation handelt, das Leseraster also nicht verschoben wird, und das Gen des Weiteren bis zu diesem Zeitpunkt in nur sehr vager Weise mit der Pathogenese von Tumoren in Zusammenhang gebracht werden kann, wurde die Analyse des *PIEZO2*-Gens nicht weiter vertieft.

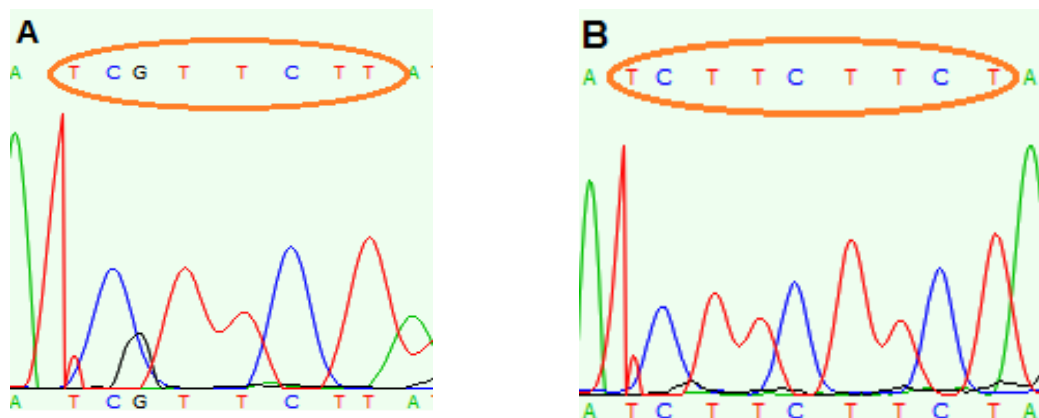


Abbildung 24: Validierung der Deletion Stelle 10671600-10671602 im *PIEZO2*-Gen im Tumor S92.2 (A) im Vergleich zum Normalgewebe (B) (*forward*-Sequenzen): im Tumorgewebe fehlen die Basen TCT, die vom Programm ermittelte Base G stellt ein Artefakt dar.

3.6.7 Mutationsanalyse *PIK3C3*

Das *PIK3C3*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 18 lokalisiert und weist 25 Exons auf. Beide in der Exomsequenzierung detektierten SNV finden

sich in Exon 9. Erstere SNV befindet sich direkt an der Spleißstelle. Die zweite SNV bedingt einen Austausch von Isoleucin zu Phenylalanin an der Stelle 299. Weitere Eigenschaften dieser Mutationen finden sich in Tabellen 24 und 25.

Tabelle 24: Eigenschaften der an der Spleißstelle befindlichen Mutation im *PIK3C3*-Gen

Chromosom	18
Position	39576604
Referenz	T
Genotyp	A
Heterozygote Mutation?	Ja
Funktionelle Konsequenz	Spleißstelle
Aminosäurenposition	298
Referenz-Aminosäure	-
Genotyp-Aminosäure	-
Prädiktion	
SIFT	tolerabel
PolyPhen-2	NA

Tabelle 25: Eigenschaften von Mutation p.I299F im *PIK3C3*-Gen

Chromosom	18
Position	39576605
Referenz	A
Genotyp	T
Heterozygote Mutation?	Ja
Funktionelle Konsequenz	Nicht-synonym
Aminosäurenposition	299
Referenz-Aminosäure	I
Genotyp-Aminosäure	F
Prädiktion	
SIFT	Schädigend
PolyPhen-2	Wahrscheinlich schädigend

In COSMIC sind mit Bezug auf das *PIK3C3*-Gen 191 Mutationen in 24.654 Tumormustern aufgeführt (Stand 24.05.2015). Beide in der Exomsequenzierung detektierten SNV sind darin nicht vorbeschrieben. Bezüglich CNV zeigt sich ein ausgeglichenes Verhältnis von Genamplifikationen zu Genverlusten.

Beide Mutationen im *PIK3C3*-Gen konnten mittels Sanger-Sequenzierung falsifiziert werden. Der Grund hierfür liegt höchstwahrscheinlich darin, dass die für die Exomsequenzierung gewählte Methode SOLiD in der Sequenzierung von „*adjacent SNPs*“ Schwachpunkte aufzeigt. Dadurch, dass bei dieser Technik immer zwei Basen auf einmal ligiert werden, kann es bei Falscheinbau häufiger zu dem Phänomen der sog. „*adjacents SNPs*“ kommen. Letzteres besagt, dass zwei direkt benachbarte Basen falsch eingebaut werden.

Demnach ist anzunehmen, dass beide in der Exomsequenzierung detektierten SNVs im *PIK3C3*-Gen Artefakte darstellen, weshalb auf weitere Analysen im *PIK3C3*-Gen verzichtet wurde.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Gene zu ermitteln, die für die Pathogenese neuroendokriner Tumoren des Ileums als relevant eingestuft werden können. Grundlage hierfür bildete die Exomsequenzierung fünf neuroendokriner Tumoren des Ileums, welche mehr als 590 somatische *single nucleotide variations* (SNV) ergab. Intensive Literaturrecherchen bezüglich einzelner Chromosomen und Gene, insbesondere bezüglich ihres bisherigen Kontextes in der Tumorgenese, konnten den Pool vielversprechender Targets schmälern. Die endgültige Wahl der zu analysierenden Gene beruhte auf bisher beschriebenen, voneinander unabhängigen Forschungsergebnissen, die dem Chromosom 18-Verlust eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Ausbildung neuroendokriner Tumoren des Ileums zuschreiben. Daten bezüglich der Häufigkeit eines Chromosom 18-Verlustes in NET des Ileums schwanken zwischen 74 % und 100 % aller untersuchten Tumorproben, wobei hier nicht unterschieden wird zwischen segmentalen *Copy Number Variations* (CNV) oder dem Verlust des gesamten Chromosoms [13-15]. Diese hohen Zahlen lassen Chromosom 18 als Träger wichtiger Tumorsuppressorgene vermuten, welche durch ein zweites Ereignis, wie beispielsweise einem Einzelbasenaustausch, in ihrer Funktion gestört werden könnten (vgl. Second hit-Hypothese von Knudson [79]). In der Literatur finden sich zudem Hinweise darauf, dass sich eben diese relevanten Tumorsuppressorgene in einem Gencluster weiter distal der Chromosomen-Region 18q21 befinden könnten [12].

Diese Arbeit deckt fünf aus insgesamt sechs der mittels Exomsequenzierung detektierten SNV innerhalb von Chromosom 18-Genen ab und analysiert darüber hinaus drei weitere, nicht auf Chromosom 18 lokalisierte Gene. Die sechste SNV innerhalb eines Chromosom 18-Gens, p.A907G im *LAMA3*-Gen, war in Voruntersuchungen durch die Arbeitsgruppe bereits untersucht worden.

Die in dieser Arbeit analysierten Chromosom 8-Gene stellen *PIEZO2*, *PIK3C3*, *CABYR* und *NFATC1* dar. P.A907G des *LAMA3*-Gens auf Chromosom 18 war zu diesem Zeitpunkt bereits im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durch Maike Hoffmeister validiert worden und erwies sich als Artefakt.

Die Deletion an den Positionen 10671600-10671602 im *PIEZO2*-Gen stellte sich nach erfolgreicher Validierung zwar als somatisch heraus, aufgrund fehlender oder lediglich vager Hinweise auf ein Mitwirken in der Tumorgenese schien eine weitere Bearbeitung dessen jedoch nicht sinnvoll, zumal es sich bei dieser Deletion nicht um einen sog. *frameshift*-Deletion handelte [66, 67].

Im Gegensatz hierzu findet sich das *PIK3C3*-Gen in der Literaturrecherche häufiger im Kontext der Pathogenese solider Tumoren wieder. Vielversprechend ist insbesondere die Tatsache, dass das PIK3C3-Protein eine wichtige Rolle im Mechanismus der Autophagie spielt, einem in Tumorzellen häufig modifizierten Mechanismus. Darüber hinaus übt es bei seiner Alteration möglicherweise eine veränderte Regulation des mTOR-Signalwegs aus [68-70]. Prädiktionsprogramme bezüglich der beiden *PIK3C3*-Mutationen stuften insbesondere die SNV p.I299F als potentiell schädigend ein, die an der Spleißstelle befindliche weitere Mutation im *PIK3C3*-Gen dagegen als tolerabel. Die mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführte Validierung konnte keine der beiden Mutationen bestätigen. Der Grund hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der Art und Weise der bei der Exomsequenzierung verwendeten SOLiD-Sequenzieretechnik begründet, bei der es häufiger zu dem Phänomen der sog. „*adjacents SNPs*“, dem falschen Einbau zweier benachbarter Basen, kommen kann. Beide in der Exomsequenzierung detektierten Mutationen sind daher am ehesten als Artefakte zu interpretieren.

Literatur- und Datenbankrecherchen mit Bezug auf das *CABYR*-Gen lieferten ambivalente Ergebnisse. So ist CABYR in zahlreichen soliden Tumoren als überexprimiert beschrieben [36, 37]. Zusätzlich konnte eine Interaktion der Isoform CABYR-a mit dem glykolyisierenden Enzym α -Enolase nachgewiesen werden, welches insbesondere in der Tumorgenese großzelliger Bronchialkarzinome eine Rolle spielt, aber auch in Tumoren von Brust und Prostata überexprimiert ist [38, 39]. Dem gegenüber standen zum einen die Tatsache, dass diese Genlokalisierung (18q11.2) nicht der durch Löllgen et. al. beschriebenen tumorrelevanten Lokalisation 18q21 entspricht und zum anderen Prädiktionsprogramme diese Mutation übereinstimmend als tolerabel einstufen [12]. Nichtsdestotrotz erfolgte nach erfolgreicher Validierung die Analyse der Mutation p.I318V an weiteren 25 Tumorproben. In keiner dieser Proben konnte die SNV p.I318V nachgewiesen

werden, sodass für p.I318V im Gesamten eine Mutation in 30 untersuchten Tumormproben zu verzeichnen ist. Mit dieser geringen Häufigkeit scheint p.I318V für die Pathogenese neuroendokriner Tumoren des Ileums weniger von Bedeutung zu sein. Dennoch sollte letztere SNV sowie das gesamte *CABYR*-Gen ob der hier dargelegten Ergebnisse nicht völlig vernachlässigt werden. So wird beispielsweise in der Diagnostik nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome (NSCLC) heute in vielen Zentren routinemäßig die Mutationsanalyse u.a. des *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase* (ALK)-Gens durchgeführt, wo sich in 2 bis 5 % der Tumormproben ein Rearrangement findet und eine spezielle Behandlung mit Crizotinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, indiziert ist [80]. Zu beachten gilt ebenso, dass das in dieser Arbeit untersuchte Tumorkollektiv nur einen geringen Anteil aller ilealer NET abbildet, sodass sich die Häufigkeitsaussagen in dieser Arbeit schwer bewerten lassen und dies weitere Analysen notwendig macht.

Des Weiteren wurden die 25 ausgewählten Tumormproben in dieser Arbeit speziell auf p.I318V im *CABYR*-Gen untersucht, sodass weitere Mutationen innerhalb der nicht analysierten Regionen des Gens außer Acht gelassen wurden. Zukünftige Sequenzierungen des gesamten *CABYR*-Gens sowie Untersuchungen auf eine mögliche Überexpression von *CABYR* in neuroendokrinen Tumoren des Ileums scheinen also zweckmäßig. Zudem ist bis zu diesem Zeitpunkt eine Rolle des in den meisten Geweben exprimierten glykolyisierenden Enzyms α -Enolase in der Tumorgenese ilealer NET nicht vorbeschrieben. Eine Expressionsanalyse dieses Proteins innerhalb neuroendokriner Tumoren des Ileums stellt einen weiteren Ansatz für zukünftige Projekte dar.

Für das ebenfalls auf Chromosom 18 lokalisierte *NFATC1*-Gen finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise auf ein Mitwirken in der Pathogenese verschiedener Tumoren, so beispielsweise dessen Überexpression in Pankreaskarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, dem Hepatozellulären Karzinom und in Krebserkrankungen der hämatopoetischen Zelllinien [54-57]. Weitere Hinweise über Interaktionen mit dem Protoonkogen *c-myc* und dem Enzym COX-2 sowie die Beobachtung von durch konstitutiv aktiviertem *NFATC1* induzierten Mäusetumoren bestärken diese Annahme [52, 54, 55, 61]. Zusätzlich stuft das Prädiktionspro-

gramm SIFT (vgl. Kapitel 2.2.7) die in der Exomsequenzierung detektierte Mutation p.R552C als schädigend ein. Interessanterweise liegt p.R552C im *NFATC1*-Gen auf Chromosom 18 genau an der Stelle, an der das Team um Löllgen die für die Pathogenese ilealer NET relevanten Gene vermutet, nämlich an Stelle 18q23 und demnach weiter distal der Region 18q21 [12]. Nach erfolgreicher Validierung von p.R552C mittels Sanger-Sequenzierung erfolgte die Analyse aller im Gen befindlichen relevanten Regionen an 30 ausgewählten Tumorproben aus Primärtumor wie auch Metastasen. Diese umfassten Phosphorylierungsstellen, DNA-Bindungsstellen, Kernlokalisierungssignal und Kernexportsignal, die Calcineurin-Bindungsstelle und die Transaktivierungsdomäne A. Die durchgeführten Sequenzanalysen konnten p.R552C in keiner weiteren Tumorprobe nachweisen, detektierten jedoch die Mutation p.L344V in zwei gepaarten Tumorproben – Primarius und Fernmetastase. Bei der Analyse des entsprechenden Normalgewebes war diese SNV auch hier nachzuweisen, sodass bei p.L344V von einer Keimbahnmutation ausgegangen werden muss.

Somit konnten in Analysen am *NFATC1*-Gen in 27 Patientenproben zwei Mutationen nachgewiesen werden, zum einen die Keimbahnmutation p.L344V, zum anderen die somatische Mutation p.R552C. Beide Mutationen sind nicht als SNP (*single nucleotide polymorphism*) vorbeschrieben⁶. SNP stellen vererbte genetische Varianten dar, in welchen – ähnlich den SNV – ein Basenpaar ausgetauscht ist und deren Krankheitswert abschließend nicht sicher bewertet werden kann [81]. Im Unterschied zu SNV sind SNP in der Population regelmäßig vertreten mit einer Häufigkeit i.d.R. über 1 % [81].

Auffällig zeigte sich in der Mutationsanalyse des *NFATC1*-Gens zudem die regelmäßige Detektion synonyme Substitutionen. Von den insgesamt 61 synonymen Mutationen waren in nahezu jeder der 30 mittels Sanger-Sequenzierung untersuchten Tumorproben (in 86,7 %) einzelne oder auch mehrere synonyme Mutationen vertreten. Eine dieser 61 Mutationen (p.H554H) findet sich in der Tumorbank COSMIC wieder und konnte in der Gewebeprobe eines Ovarialkarzinoms nachgewiesen werden. Diese synonymen Mutationen sind jedoch keineswegs als uninteressant einzustufen. So erhielten letztere in den vergangenen

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

Jahren zunehmend Zugeständnisse bezüglich einer möglichen Rolle innerhalb der Pathogenese solider Tumoren. Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass synonyme Mutationen ein aberrantes mRNA-Splicing bedingen könnten [82]. Zudem besteht der Verdacht, synonyme Mutationen führten zu einer veränderten Proteinexpression und damit einhergehend zu veränderter Enzymaktivität, indem sie die Stabilität der mRNA beeinflussten [83, 84]. Im Jahr 2007 gelang Komar der Nachweis, dass synonyme Mutationen die Proteinkonformation und damit deren Aktivität und Substratspezifität verändern könnten [85].

Die Ergebnisse bezüglich nicht-synonymer SNV innerhalb des *NFATC1*-Gens sind ähnlich denen des *CABYR*-Gens einzuordnen. Die Detektion einer somatischen nicht-synonymen Substitution in 27 Patienten lässt für *NFATC1* nicht primär eine zentrale Rolle in der Pathogenese ilealer NET vermuten. Die Tatsache, dass in der Klinik mit Ciclosporin A und FK506 jedoch bereits effektive Inhibitoren des *NFATC1*-Aktivierungspfad zum Einsatz kommen, macht eine mögliche Rolle des *NFATC1*-Gens innerhalb der Pathogenese ilealer NET umso wünschenswerter.

Ein wichtiger Bestandteil weiterer Forschungen am *NFATC1*-Gen bestünde zum einen darin, die Mutationsanalyse auf ein größeres Kollektiv auszuweiten. Zum anderen bietet es sich aufgrund gegenwärtiger Hinweise bezüglich der Auswirkungen synonyme Substitutionen auf den Organismus an, sich mit den Proteinen der in dieser Arbeit detektierten synonymen Substitutionen zu beschäftigen, um etwa Konformationsänderungen oder Enzymaktivitätsänderungen ausfindig machen zu können.

Alle sechs mittels Exomsequenzierung detektierten somatischen Mutationen innerhalb von Chromosom 18-Genen dürfen somit als validiert und am Kollektiv analysiert gelten.

Weitere, über das Chromosom 18 hinausgehende Mutationsanalysen dieser Arbeit beschäftigten sich mit den Genen *ERBB2*, *ERCC4* sowie *MSH6*. Trotz der Tatsache, dass ihre Lokalisation nicht der vielversprechenden Lokalisation auf Chromosom 18 entspricht, stellten insbesondere die Gene *ERBB2* und *MSH6* interessante Kandidaten dar, da sie sich bereits mehrfach mit der Pathogenese verschiedener solider Tumoren in Verbindung bringen ließen.

ERCC4 rückte aufgrund seiner Funktion innerhalb des DNA-Reparatursystems sowie der Einstufung der Prädiktionsprogramme als potentiell schädigend ins Interesse. Bei erfolgloser Validierung wurde die SNV p.S352R jedoch als Artefakt interpretiert.

ERBB2, besser bekannt als *HER2*, zeigt sich neben seiner herausragenden Rolle in Therapie und Prognose des Mammakarzinoms in vielen verschiedenen Malignomen überexprimiert und amplifiziert [41]. Hierzu gehören u.a. das Magenkarzinom, Karzinome des gastroösophagealen Übergangs, Urothelkarzinome, Lungen- und Dickdarmkrebs sowie wenige Adenokarzinome des Dünndarms [40-43]. Nicht zuletzt die Tatsache, dass in der Klinik bereits effektive Antikörper gegen *HER2* zur Anwendung kommen, steigerte das Interesse an diesem Target. Nach erfolgreicher Validierung konnte p.P1135S im *ERBB2*-Gen jedoch auch im Normalgewebe der entsprechenden Probe nachgewiesen werden, was p.P1135S als Keimbahnmutation einordnen lässt.

Das nunmehr letzte untersuchte Target stellt *MSH6* dar, ein in bis zu 20 % aller Lynch-Syndrome mutiertes Gen, das bei Mutation mit einer erhöhten Inzidenz multipler solider Tumoren einhergeht [47-49]. Die hierin detektierte Mutation p.P1082L war in der Tumorbank COSMIC bereits als somatische Mutation innerhalb eines Dickdarmkarzinoms vorbeschrieben. Bei Nachweis von p.P1082L auch im Normalgewebe des entsprechenden ilealen NET muss diese SNV als Keimbahnmutation gewertet werden.

Abschließend ergeben sich aus dieser Arbeit verschiedene Anhaltspunkte bezüglich der Pathogenese ilealer neuroendokriner Tumoren, die Grundlage weiterer Forschungsprojekte in diesem Bereich bilden könnten. Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der hier analysierten SNV innerhalb der Gene *CABYR*, *ERBB2*, *ERCC4*, *MSH6*, *NFATC1*, *PIEZO2* und *PIK3C3* geben kein sicheres Indiz auf ein Mitwirken in der Pathogenese neuroendokriner Tumoren des Ileums. Dennoch erscheinen insbesondere hinsichtlich *CABYR* und *NFATC1* zusätzliche Analysen weiterer Regionen im Gen aber auch Analysen der zugehörigen Proteine als sinnvoll.

Schließlich stellt sich die Frage, ob schlichtweg das eine zentrale, für die Pathogenese ilealer NET verantwortliche Gen noch nicht gefunden wurde oder ob nicht vielmehr die Kombination verschiedener Mutationen innerhalb dieser so bedeutenden Chromosom 18-Gene die Pathogenese ilealer NET ausmacht, wie durch Cunningham et al. bereits vermutet [13]. Weiterhin stellen die im *NFATC1*-Gen detektierte Keimbahnmutation p.L344V sowie die weiterhin detektierten Keimbahnmutationen einen Hinweis darauf dar, dass nicht nur somatische Mutationen für die Pathogenese ilealer NET in Verantwortung gezogen werden können. Eine Mutation in der frühen Embryogenese oder sogar eine erbliche Komponente können gleichsam diskutiert werden. Nicht zuletzt gilt es, weiterhin die Kenntnisse über die Auswirkungen synonymmer Substitutionen zu vertiefen, um deren Einfluss auf Proteinkonformation und Enzymaktivität erfassen zu können.

Für zukünftige Projekte bezüglich der Pathogenese ilealer neuroendokriner Tumoren bleibt zum einen, den bisherigen Blick von somatischen Mutationen auf Keimbahnmutationen zu erweitern. Zum anderen sollte die Auswahl der zu analysierenden Gene möglichst breit und ausgedehnt erfolgen, um ein mögliches Zusammenspiel verschiedener Mutationen innerhalb der Pathogenese ilealer neuroendokriner Tumoren erfassen zu können.

5 Zusammenfassung

Neuroendokrine Tumoren des Ileums stellen Tumoren dar, die sich aus dem diffusen endokrinen System des Gastrointestinaltrakts heraus entwickeln und im Ileum zu finden sind. Wenngleich ihre Prävalenz insbesondere im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen gering ist, zeigt ihre Inzidenz doch eine steigende Entwicklungstendenz. Diese Entwicklung stellt lediglich einen Grund dar, warum es wichtig erscheint, sich mit der Pathogenese ilealer NET auseinanderzusetzen. Ein weiterer Grund hierfür sind die häufig erst spät auftretenden Symptome, die meist bereits auf eine Metastasierung oder zumindest ein lokal infiltratives Wachstum hinweisen und damit die Überlebenswahrscheinlichkeit erheblich senken.

Die Pathogenese ilealer neuroendokriner Tumoren ist bis dato nur sehr spärlich verstanden. Unumstritten stellt sich jedoch die Bedeutsamkeit des Chromosom 18 hierin dar, welches in 74 % bis 100 % aller untersuchter Tumorproben Verluste aufweist [13-15]. Zahlreiche Vorarbeiten haben sich bereits mit für die Tumorgenese im Allgemeinen wichtigen Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise *TP53*, *p16^{NK4a}* sowie *Smad4/DPC4* im Kontext ilealer NET beschäftigt, ohne hierin jedoch Mutationen nachweisen zu können. In dieser Arbeit gilt es, gezielt die Chromosom 18-Gene zu untersuchen, die sich in einer kompletten Exomsequenzierung fünf neuroendokriner ilealer Tumoren als mutiert erwiesen. Zudem wurden drei weitere Gene untersucht, die genauso in der Exomsequenzierung Mutationen aufwiesen und aufgrund intensiver Literaturrecherchen als vielversprechend eingestuft werden konnten. Schwerpunkt der Exomsequenzierung lag dabei auf *single nucleotide variations* (SNV), die nach allgemeinem Verständnis in der Ausbildung von Tumoren vielversprechend erscheinen, da sie im Falle einer nicht-synonymen SNV zu einem Funktionalitätsverlust bestimmter Proteine führen können.

Unter den Chromosom 18-Kandidaten fanden sich sechs SNV innerhalb von fünf Genen, wobei sich eines dieser Targets, eine SNV im *LAMA3*-Gen, in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits als Artefakt erwiesen hatte. Auch zwei im *PIK3C3*-Gen detektierte Mutationen sowie die SNV p.S352R im *ERCC4*-Gen mussten

nach erfolgloser Validierung als Artefakte interpretiert werden. Zwei weitere Targets der Gene *ERBB2* auf Chromosom 17 und *MSH6* auf Chromosom 2 stellten sich als Keimbahnmutationen heraus. Das auf Chromosom 18 lokalisierte *PIEZO2*-Gen, welches eine Deletion dreier Basen aufwies, wurde trotz erfolgreicher Validierung nicht weiter analysiert. Das Fehlen einer Leserasterverschiebung als Folge der Deletion sowie sein bislang fehlender Kontext in der Tumorgenese im Allgemeinen ließen *PIEZO2* als weniger bedeutsam einstufen. Die letzten beiden Targets der Chromosom 18-Gene *CABYR* und *NFATC1* erwiesen sich beide als somatische Mutationen und wurden folglich an einem ausgewählten Kollektiv untersucht. Allerdings konnten keine weiteren somatischen Mutationen detektiert werden. Lediglich im *NFATC1*-Gen gelang zum einen der Nachweis einer weiteren Mutation, die sich im Verlauf als Keimbahnmutation p.L344V herausstellte, sowie zum anderen die Detektion multipler synonyme Substitutionen.

Zusammenfassend scheint keines der in dieser Arbeit analysierten Targets eine zentrale Rolle in der Pathogenese neuroendokriner Tumoren des Ileums zu spielen. Für *CABYR* und *NFATC1* könnten sich jedoch Analysen an einem größeren Kollektiv sowie weitere Untersuchungen insbesondere auf Proteinebene als vernünftig erweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass nicht nur somatische Mutationen an der Pathogenese ilealer NET beteiligt sein könnten, sondern möglicherweise auch Keimbahnmutationen hierzu beitragen. Zudem könnte dieser Tumorgenese vielmehr ein Zusammenspiel verschiedener mutierter Gene zugrunde liegen als lediglich eine einzelne Mutation mit zentraler Rolle.

Das Verständnis um die Pathogenese ilealer NET bleibt unergiebig. Nichtsdestotrotz ergeben sich Ausgangspunkte, auf denen weitere Forschungen in diesem Gebiet basieren könnten, um längerfristig die Therapie und Prognose neuroendokriner Tumoren des Ileums verbessern zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Modlin IM, Ö.K., Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruszniewski P, Sundin A, *Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*. *Lancet Oncology*, 2008. **9**(1): p. 61-72.
2. Massironi S, S.V., Peracchi M, Ciafardini C, Spampatti MP, Conte D, *Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system*. *World Journal of Gastroenterology*, 2008. **14**(35): p. 5377-5384.
3. Wiedenmann B, J.M., Ahnert-Hilger G, Riecken E, *Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system*. *Journal of Molecular Medicine*, 1998. **76**(9): p. 637–647.
4. Begum N, M.S., Plöckinger U, Anlauf M, Rinke A, Pöpperl G, Lehnert H, Izbicki JR, Krausch M, Vashist YK, Raffel A, Bürk CG, Hoffmann J, Goretzki P, Pape UF et al., *Neuroendokrine Tumoren des Verdauungstrakts – Daten des deutschen NET-Registers*. 2012, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart/New York.
5. Klöppel, G., *Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms*. *Endocrine-Related Cancer*, 2011. **18**: p. S1-S16.
6. Scherübl H, S.C., Steinberg J, Stölzel U, Pohl J, Dralle H, Klöppel G, *Neuroendokrine Tumoren des Dünndarms nehmen zu: frühe Tumoren und deren Management*, in *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2010. p. 406-413.
7. Klimstra DS, M.I., Coppola D, Lloyd RV, Suster S, *The Pathologic Classification of Neuroendocrine Tumors: A Review of Nomenclature, Grading, and Staging Systems*. *Pancreas*, 2010. **39**(6): p. 707-712.
8. Scherübl H, F.S., Zeitz M, *Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts: Diagnostik und Therapie*, in *Deutsches medizinisches Wochenschriften*. 2003. p. 81-83.
9. Eriksson B, K.G., Krenning E, Ahlman H, Plöckinger U, Wiedenmann B, Arnold R, Auernhammer C, Körner M, Rindi G, Wildi S, *Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Tumors – Well-Differentiated Jejunal-Ileal Tumor/Carcinoma*. *Neuroendocrinology*, 2008. **87**: p. 8–19.
10. Öberg, K., *Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors)*, in *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*. 2009. p. 72–78.
11. Wang GG, Y.J., Worah S, White JA, Luna R, Wu T, Hamilton SR, Rashid A, *Comparison of genetic alterations in neuroendocrine tumors: frequent loss of chromosome 18 in ileal carcinoid tumors*. *Modern Pathology*, 2005. **18**(8): p. 1079–1087.
12. Löllgen R, H.O., Szabo E, Westin G, Åkerström G, *Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors*. *International Journal of Cancer*, 2001. **92**(6): p. 812–815.

13. Cunningham JL, S.T., Sjöblom T, Westin G, Dumanski JP, Janson ET, *Common Pathogenetic Mechanism Involving Human Chromosome 18 in Familial and Sporadic Ileal Carcinoid Tumors*. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2011. **50**(2): p. 82-94.
14. Andersson E, S.C., Stenman G, Ahlman H, Nilsson O, *High-resolution genomic profiling reveals gain of chromosome 14 as a predictor of poor outcome in ileal carcinoids*. *Endocrine-Related Cancer*, 2009. **16**(3): p. 953–966.
15. Kulke MH, F.E., Chiang DY, Phillips J, Zahrieh D, Glickman JN, Shivdasani RA, *High-Resolution Analysis of Genetic Alterations in Small Bowel Carcinoid Tumors Reveals Areas of Recurrent Amplification and Loss*. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2008. **47**(7): p. 591-603.
16. Öberg, K., *The Genetics of Neuroendocrine Tumors*. *Seminars in Oncology*, 2013. **40**(1): p. 37-44.
17. Hong NA, C.D., Mitchell J, Ortiz BD, Hsieh SN, Winoto A, *A Targeted Mutation at the T-Cell Receptor α /d Locus Impairs T-Cell Development and Reveals the Presence of the Nearby Antiapoptosis Gene *Dad1**. *Molecular and Cellular Biology*, 1997. **17**(4): p. 2151–2157.
18. Ortiz BD, H.F., Cado D, Santoso B, Winoto A, *Function and Factor Interactions of a Locus Control Region Element in the Mouse T Cell Receptor- α /*Dad1* Gene Locus*. *The Journal of Immunology*, 2001. **167**(7): p. 3836-3845.
19. Su M, M., Wang C, Chen C, Hu R, Wang T, Kao H, Jeng Y, Yuan R, *Nuclear Translocation of b-Catenin Protein but Absence of b-Catenin and APC Mutation in Gastrointestinal Carcinoid Tumor*. *Annals of Surgical Oncology*, 2006. **13**(12): p. 1604–1609.
20. Fujimori M, I.S., Shimizu Y, Okajima M, Asahara T, *Accumulation of b-Catenin Protein and Mutations in Exon 3 of b-Catenin Gene in Gastrointestinal Carcinoid Tumor*. *Cancer Research*, 2001. **61**(18): p. 6656-6659.
21. Chan AO, K.S., Bedeir A, Issa J, Hamilton SR, Rashid A, *CpG island methylation in carcinoid and pancreatic endocrine tumors*. *Oncogene*, 2003. **22**: p. 924–934.
22. Arnold CN, S.A., Schmitt-Gräff A, Arnold R, Blum HE, *Analysis of molecular pathways in sporadic neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system*. *International Journal of Cancer*, 2007. **120**(10): p. 2157–2164.
23. Erikssona B, Ö.K., Stridsberg M, *Tumor Markers in Neuroendocrine Tumors*, in *Digestion*. 2000. p. 33–38.
24. Janson ET, H.L., Stridsberg M, Eriksson B, Theodorsson E, Wilander E, Öberg K, *Carcinoid tumors: Analysis of prognostic factors and survival in 301 patients from a referral center*. *Annals of Oncology*, 1997. **8**(7): p. 685-690.
25. Ramage JK, D.A., Ardill J, Bax N, Caplin M, Grossman A, Hawkins R, McNicol AM, Reed N, Sutton R, Thakker R, Aylwin S, Breen D, Britton K, Buchanan K, Corrie P, Gillams A, Lewington V, McCance D, Meeran K, Watkinson A, *Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours*, in *Gut*. 2005. p. 6-32.

26. Öberg, K., *Diagnostic work-up of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*, in *Clinics*. 2012. p. S109-112.
27. Modlin IM, K.M., Latich I, Zikusoka MN, Shapiro MD, *Current Status of Gastrointestinal Carcinoids*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(6): p. 1717-1751.
28. Öberg K, Å.G., Rindi G, Jelic S, *Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Annals of Oncology*, 2010. **21**: p. 223–227.
29. Rinke A, M.H., Schade-Brittinger C, Klose K, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape U, Bläker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold R, *Placebo-Controlled, Double-Blind, Prospective, Randomized Study on the Effect of Octreotide LAR in the Control of Tumor Growth in Patients With Metastatic Neuroendocrine Midgut Tumors: A Report From the PROMID Study Group*. *Journal of clinical oncology*, 2009. **27**(28): p. 4656-4663.
30. Kwekkeboom DJ, d.H.W., Kam BL, van Eijck CH, van Essen M, Kooij PP, Feelders RA, van Aken MO, Krenning EP, *Treatment With the Radiolabeled Somatostatin Analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]Octreotate: Toxicity, Efficacy, and Survival*. *Journal of Clinical Oncology*, 2008. **26**(13): p. 2124-2130.
31. Plöckinger U, R.G., Arnold R, Eriksson B, Krenning EP, de Herder WW, Goede A, Caplin M, Öberg K, Reubi JC, Nilsson O, Delle Fave G, Ruszniewski P, Ahlman H, Wiedenmann B, *Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Gastrointestinal Tumours: A Consensus Statement on Behalf of the European Neuroendocrine Tumour Society (ENETS)*. *Neuroendocrinology*, 2004. **80**(6): p. 394–424.
32. Sarmiento JM, H.G., Rubin J, Ilstrup DM, Nagorney DM, Que FG, *Surgical Treatment of Neuroendocrine Metastases to the Liver: A Plea for Resection to Increase Survival*. *Journal of The American College of Surgeons*, 2003. **197**(1): p. 29-37.
33. Norton, J., *Surgical treatment of neuroendocrine metastasis*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2005. **19**(4): p. 577–583.
34. Gaujoux S, G.M., Tang L, Klimstra D, Brennan MF, D'Angelica M, DeMatteo R, Allen PJ, Jarnagin W, Fong Y, *Synchronous Resection of Primary and Liver Metastases for Neuroendocrine Tumors*. *Annals of Surgical Oncology*, 2012. **19**(13): p. 4270–4277.
35. Brix, J., *Die Rolle des Chromosom 18 Verlustes für neuroendokrine Tumore des Ileums*. 2015: Universitätsbibliothek Tübingen.
36. Li H, F.L., Xiao X, Shen L, *The expression and effects the CABYR-c transcript of CABYR gene in hepatocellular carcinoma*. *Bull Cancer*, 2012. **99**(3): p. 26-33.
37. Tseng YT, H.J., Chen CY, Lin NT, Chong PC, Yang CY, *Expression of the sperm fibrous sheath protein CABYR in human cancers and identification of -enolase as an interacting partner of CABYR-a*. *Oncology Reports*, 2011. **25**(4): p. 1169-1175.
38. Hsiao KC, S.N., Fang HL, Huang TS, Kuo CC, Chu PY, Hung YM, Chou SW, Yang YY, Chang GC, Liu KJ, *Surface α -enolase promotes*

- extracellular matrix degradation and tumor metastasis and represents a new therapeutic target*, in *PLoS One*. 2013. p. 1-15.
39. Georges E, B.A., Prinos P, *RNAi-mediated knockdown of α -enolase increases the sensitivity of tumor cells to antitubulin chemotherapeutics*. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011. **2**(4): p. 303-308.
40. Hechtman JF, P.A., *HER2/neu gene amplification and protein overexpression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: a review of histopathology, diagnostic testing, and clinical implications*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2012. **136**(6): p. 691-697.
41. Slamon DJ, C.G., Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL, *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. *Science*, 1987. **235**(4785): p. 177-182.
42. Chua TC, M.N., *Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes - a systematic review*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(12): p. 2845-2856.
43. Gu MJ, H.S., Jung SJ, *HER2 protein expression and HER2 gene amplification are infrequent in small intestinal carcinomas*. *Virchows Archiv*, 2013. **462**(6): p. 603-607.
44. Chu H, Z.Q., Wang S, Wang M, Xu M, Gao Y, Luo D, Tan Y, Gong W, Zhang Z, Wu D., *Tagging SNPs in the ERCC4 gene are associated with gastric cancer risk*. *Gene*, 2013. **521**(1): p. 50-54.
45. Yu H, L.Z., Huang YJ, Yin M, Wang LE, Wei Q, *Association between Single Nucleotide Polymorphisms in ERCC4 and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck*. *PLoS One*, 2012. **7**(7).
46. Osorio A, B.M., Fernández V, Barroso A, de la Hoya M, Caldés T, Lasa A, Ramón Y Cajal T, Santamariña M, Vega A, Quiles F, Lázaro C, Díez O, Fernández D, González-Sarmiento R, Durán M, Piqueras JF, Marín M, Pujol R, Surrallés J, Benítez J, *Evaluation of Rare Variants in the New Fanconi Anemia Gene ERCC4 (FANCC) as Familial Breast/Ovarian Cancer Susceptibility Alleles*. *Human Mutation*, 2013. **34**(12): p. 1615-1618.
47. Southey MC, J.M., Mead L, Whitty J, Trivett M, Tesoriero AA, Smith LD, Jennings K, Grubb G, Royce SG, Walsh MD, Barker MA, Young JP, Jass JR, St John DJ, Macrae FA, Giles GG, Hopper JL, *Use of molecular tumor characteristics to prioritize mismatch repair gene testing in early-onset colorectal cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(27): p. 6524-6532.
48. Barnetson RA, T.A., Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, Campbell H, Dunlop MG, *Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2006. **354**(26): p. 2751-2763.
49. Baglietto L, L.N., Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB, Vriends AH and C.N. Dutch Lynch Syndrome Study Group, Barnetson RA, Farrington SM, Tenesa A, Hampel H, Buchanan D, Arnold S, Young J, Walsh MD, Jass J, Macrae F, Antill Y, Winship IM, Giles GG, Goldblatt J, Parry S, Suthers G, Leggett B, Butz M, Aronson M, Poynter JN, Baron

- JA, Le Marchand L, Haile R, Gallinger S, Hopper JL, Potter J, de la Chapelle A, Vasen HE, Dunlop MG, Thibodeau SN, Jenkins MA, *Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers*. Journal of the National Cancer Institute, 2010. **102**(3): p. 193-201.
50. Shaw J, U.P., Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crbtree GR, *Identification of a Putative Regulator of Early T Cell Activation Genes*. Science, 1988. **241**(4862): p. 202-205.
51. Crabtree GR, O.E., *NFAT Signaling: Choreographing the Social Lives of Cells*. Cell, 2002. **109**: p. S67–79.
52. Clipstone NA, N.J., *A Constitutively Active NFATc1 Mutant Induces a Transformed Phenotype in 3T3-L1 Fibroblasts*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(19): p. 17246–17254.
53. Mancini M, T.A., *NFAT Proteins: Emerging Roles in Cancer Progression*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(11): p. 810–820.
54. Buchholz M, S.A., Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V, *Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca2p/calcineurin signaling pathway*. The EMBO Journal, 2006. **25**(15): p. 3714–3724.
55. Wang S, K.X., Cao S, Cheng H, Wang D, Geng J, *Calcineurin/NFATc1 Pathway Contributes to Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma*. Digestive Diseases and Sciences, 2012. **57**(12): p. 3184–3188.
56. Pham LV, T.A., Li C, Bueso-Ramos C, Ford RJ, *An epigenetic chromatin remodeling role for NFATc1 in transcriptional regulation of growth and survival genes in diffuse large B-cell lymphomas*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3899-3906.
57. Duque J, F.M., Iñiguez MA, *Expression and Function of the Nuclear Factor of Activated T Cells in Colon Carcinoma Cells*. The Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(10): p. 8686–8693.
58. Oikawa T, N.A., Onishi N, Yamada T, Matsuo K, Saya H, *Acquired Expression of NFATc1 Downregulates E-Cadherin and Promotes Cancer Cell Invasion*. Cancer Research, 2013. **73**(16): p. 5100-5109.
59. Campisi J, G.H., Pardee AB, Dean M, Sonenshein GE, *Cell-Cycle Control of c-myc but Not c-ras Expression Is Lost Following Chemical Transformation*. Cell, 1984. **36**(2): p. 241-247.
60. Adhikary S, E.M., *Transcriptional Regulation and Transformation by myc Proteins*. Nature Reviews, 2005. **6**(8): p. 635-645.
61. Köenig A, L.T., Schlegemann K, Reutlinger K, Wegele J, Adler G, Singh G, Hofmann L, Kunsch S, Büch T, Schäfer E, Gress TM, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V, *NFAT-Induced Histone Acetylation Relay Switch Promotes c-Myc-Dependent Growth in Pancreatic Cancer Cells*. Gastroenterology, 2010. **138**(3): p. 1189–1199.
62. Soslow RA, D.A., Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT, *COX-2 Is Expressed in Human Pulmonary, Colonic and Mammary Tumors*. Cancer, 2000. **89**(12): p. 2637-2645.
63. Liu CH, C.S., Narko K, Trifan OC, Wu M, Smith E, Haudenschild C, Lanei TF, Hla T, *Overexpression of Cyclooxygenase-2 Is Sufficient to Induce Tumorigenesis in Transgenic Mice*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(21): p. 18563–18569.

64. Corral RS, I.M., Duque J, López-Pérez R, Fresno M, *Bombesin induces cyclooxygenase-2 expression through the activation of the nuclear factor of activated T cells and enhances cell migration in Caco-2 colon carcinoma cells*. *Oncogene*, 2007. **26**(7): p. 958–969.
65. Sinicrope FA, G.S., *Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2004. **23**(1-2): p. 63–75.
66. Coste B, M.J., Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A, *Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels*. *Science*, 2010. **330**(6000): p. 55-60.
67. Ahn MJ, W.H., Lee J, Lee ST, Sun JM, Park YH, Ahn JS, Kwon OJ, Kim H, Shim YM, Kim J, Kim K, Kim YH, Park JY, Kim JW, Park K, *The 18p11.22 locus is associated with never smoker non-small cell lung cancer susceptibility in Korean populations*. *Human Genetics*, 2012. **131**(3): p. 365-372.
68. Mizushima N, L.B., Cuervo AM, Klionsky DJ, *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. *Nature*, 2008. **451**(7182): p. 1069-1075.
69. Jaber N, D.Z., Chen JS, Catanzaro J, Jiang YP, Ballou LM, Selinger E, Ouyang X, Lin RZ, Zhang J, Zong WX, *Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(6): p. 2003-2008.
70. Jaber N, D.Z., Lin RZ, Zhang J, Zong WX, *Mammalian PIK3C3/VPS34: The key to autophagic processing in liver and heart*. *Autophagy*, 2012. **8**(4): p. 707-708.
71. Oppek, K., *Mutationsanalyse neuroendokriner Tumoren des Mitteldarms*. 2014: Universitätsbibliothek Tübingen.
72. Roche, *Versatile Nucleic Acid Purification: Accelerate your LabWorkflow*. 2012.
73. van Dongen JJ, L.A., Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA, *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. *Leukemia*, 2003. **17**(12): p. 2257-2317.
74. Saiki R, G.D., Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H, *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science* 1988. **239**(4839): p. 487-491.
75. Corporation, A.B., *AGENCOURT® AMPURE® XP: PCR Purification*. 2009.
76. Corporation, A.B., *Agencourt® CleanSEQ®: Dye-Terminator Removals (ET Terminators)*. 2006.
77. Shendure J, J.H., *Next-generation DNA sequencing*. *Nature Biotechnology*, 2008. **26**(10): p. 1135-1145.
78. Smith LM, S.J., Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SBH, Hood LE, *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. *Nature*, 1986. **321**(6071): p. 674-679.

79. AG, K., *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971. **68**(4): p. 820-823.
80. Gridelli C, P.S., Sgambato A, Casaluca F, Adjei AA, Ciardiello F, *ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC*. Cancer Treatment Reviews, 2014. **40**(2): p. 300-306.
81. Carlson, B., *SNPs — A Shortcut to Personalized Medicine*, in *Genetic Engineering & Biotechnology News (Mary Ann Liebert, Inc.) Medical applications are where the market's growth is expected*. 2008.
82. Cartegni L, C.S., Krainer AR, *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing*. Nature Reviews Genetics, 2002. **3**(4): p. 285-298.
83. Nackley AG, S.S., Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, Maixner W, Diatchenko L, *Human Catechol-O-Methyltransferase Haplotypes Modulate Protein Expression by Altering mRNA Secondary Structure*. Science, 2006. **314**(5807): p. 1930–1933.
84. Sauna ZE, K.-S.C., *Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease*. Nature Reviews Genetics, 2011. **12**(10): p. 683-691.
85. Komar, A., *Silent SNPs: impact on gene function and phenotype*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(8): p. 1075-1080.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, Laura Stoß, an Eides statt, dass ich den wesentlichen Anteil der Dissertationsschrift „Mutationsanalyse neuroendokriner Tumoren des Ileums“ geleistet habe.

Die Anteile an der Arbeit waren wie folgt:

Prof. Dr. med. Bence Sipos: Konzeption des Projekts

Dr. rer. nat. Jan Sperveslage und Maike Hoffmeister: Betreuung der Arbeit

Universitätskliniken Düsseldorf, Marburg, München und Tübingen: Bereitstellung der Gewebeproben

CeGaT GmbH Tübingen: Exomsequenzierung fünf ausgewählter Tumor- und Normalgewebeproben

Dr. med. Johannes Brix: immunhistochemische Voruntersuchungen sowie FISH-Voruntersuchungen (Abbildungen 4 und 5)

Dr. med. Kirsten Oppek: Nukleinsäure-Extraktion aus 147 Gewebeproben

Maike Hoffmeister: Validierung der SNV p.A907G im *LAMA3*-Gen

Laura Stoß: Nukleinsäure-Extraktion aus 31 Proben, Validierung der SNV der Gene *CABYR*, *ERBB2*, *ERCC4*, *MSH6*, *NFATC1*, *PIEZO2*, *PIK3C3*, Untersuchung der entsprechenden Normalgewebe, Analyse der SNV p.I318V im *CABYR*-Gen an 25 Tumorproben aus dem Kollektiv, Analyse aller als relevant eingestuften Regionen des *NFATC1*-Gens an 30 Proben aus dem Kollektiv

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Begleitung und Unterstützung vieler Menschen meines Umfeldes nicht zustande gekommen. Daher möchte ich hier die Gelegenheit nutzen, meinen Dank zum Ausdruck zu bringen.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Bence Sipos, der mir mit seinem Fachwissen stets zur Seite stand.

Ich danke meinen Kollegen und Mitarbeitern, die mich im Labor stets willkommen hießen, mit ihrer fröhlichen Art eine gemütliche Arbeitsatmosphäre schufen und mich an den richtigen Stellen zu einer kurzen Pause ermutigten.

Mein größter Dank gilt meinen Betreuern Maike Hoffmeister und Jan Sperveslage, die sich immer als wertvolle Ansprechpartner erwiesen. Jede meiner Fragen und Anregungen wurde intensiv bearbeitet, beantwortet, berücksichtigt und umgesetzt. Selbst dann, als sich für ihre eigene Arbeit kaum Zeit fand, haben sie doch immer Zeit für mich und meine Arbeit gefunden. Zudem waren sie mir ein Vorbild darin, was es heißt, sich täglich mit Freude und Begeisterung in die Forschung einzubringen.

Zuletzt möchte ich Daniel danken, der mir während des gesamten Projektes den Rücken freihielt und stärkte.

Anhang

PCR-Programme

Tabelle 26: PCR-Programm für Primer CABYR

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 40 Zyklen
56 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	10 Minuten	
12 °C	Hold	

Tabelle 27: PCR-Programm für Primer ERBB2

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 40 Zyklen
58 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	10 Minuten	
12 °C	Hold	

Tabelle 28: PCR-Programm für Primer ERCC4

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 40 Zyklen
58 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	10 Minuten	
12 °C	Hold	

Tabelle 29: PCR-Programm für Primer MSH6

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 40 Zyklen
58 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	

72 °C	10 Minuten
12 °C	Hold

Tabelle 30: PCR-Programm für die Primer NFATC1 Exon 2.1, Exon 2.2, Exon 2.3, Exon 2.4, Exon 2.5alt, Exon 3, Exon 4.1, Exon 4.2, Exon 5, Exon 6, Exon 7, Exon 8

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 40 Zyklen
58 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	5 Minuten	
12 °C	Hold	

Tabelle 31: PCR-Programm für den Primer NFATC1 Exon 2.5neu

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 45 Zyklen
58 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	5 Minuten	
12 °C	Hold	

Tabelle 32: PCR-Programm für den Primer NFATC1 Exon 2.6

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 48 Zyklen
56 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	5 Minuten	
12 °C	Hold	

Tabelle 33: PCR-Programm für den Primer NFATC1 Exon 2.7

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 50 Zyklen
55 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	

72 °C	5 Minuten
12 °C	Hold

Tabelle 34: PCR-Programm für Primer PIEZO2

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 40 Zyklen
58 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	10 Minuten	
12 °C	Hold	

Tabelle 35: PCR-Programm für Primer PIK3C3

95 °C	5 Minuten	
94 °C	45 Sekunden	} 40 Zyklen
56 °C	45 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	10 Minuten	
12 °C	Hold	

DNA-Leiter

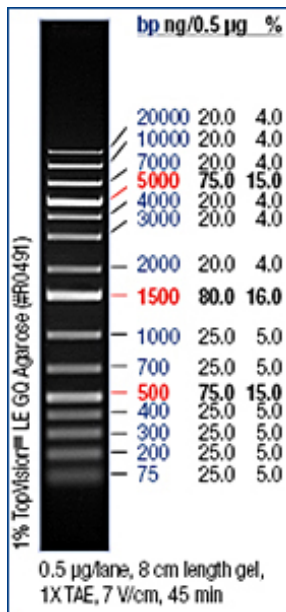


Abbildung 25: GeneRuler 1kb DNA Ladder von Fermentas

Sequenzen

CABYR-Gen

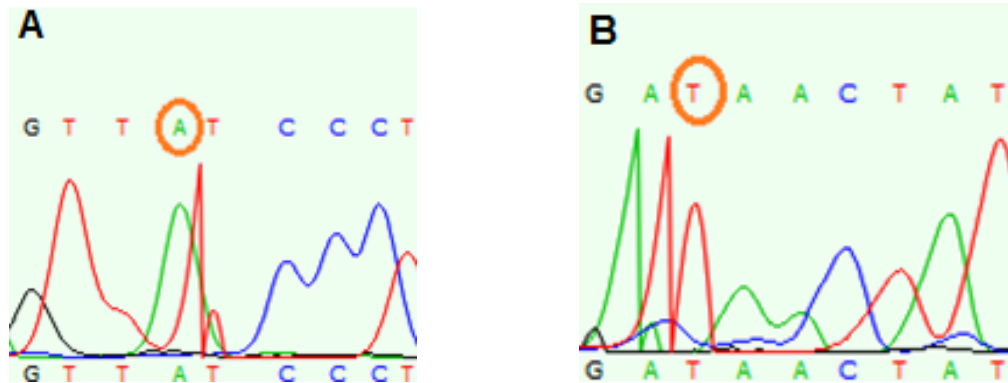


Abbildung 26: Analyse des entsprechenden Normalgewebes des Tumors S.92.5 auf p.I318V im CABYR-Gen in der *forward*-Sequenz (A) sowie der *reverse*-Sequenz (B): es findet sich kein Basenaustausch von A → G an der cDNA-Stelle c.1104 (A) bzw. T → C an der Stelle 1104 (B).

ERBB2-Gen

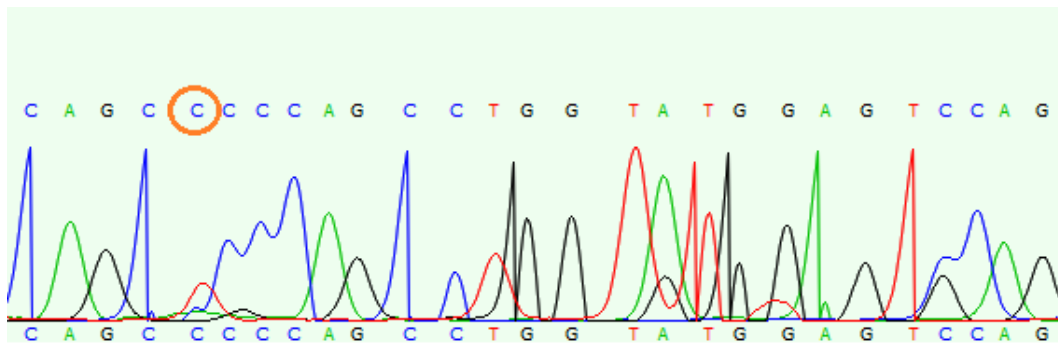


Abbildung 27: Analyse des entsprechenden Normalgewebes des Tumors S.92.1 auf p.P1135S im ERBB2-Gen in der *forward*-Sequenz: an der cDNA-Stelle c.3403 findet sich ein Basenaustausch von C → T (es ist ein deutlicher T-Peak zu beobachten, der vom Programm nicht erkannt wurde).

NFATC1-Gen

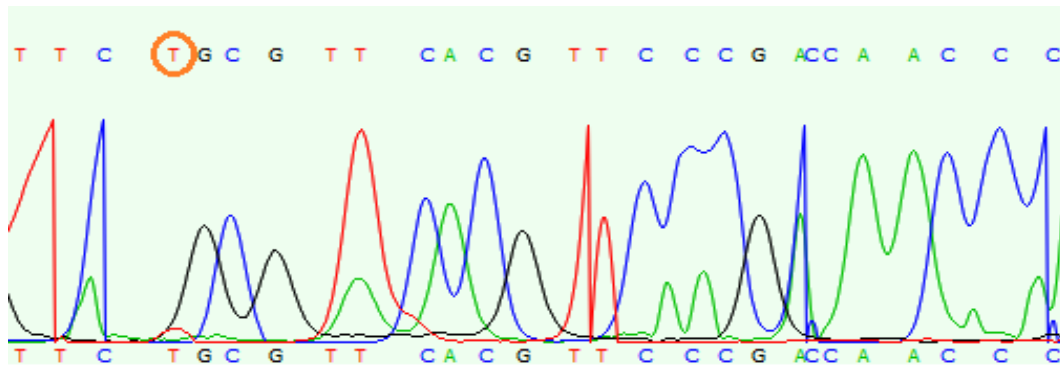


Abbildung 28: Analyse des Tumors S92.5 auf die Mutation p.R552C im *NFATC1*-Gen in der *forward*-Sequenz: an *cDNA*-Stelle c.1720 findet sich ein Basenaustausch von C → T.

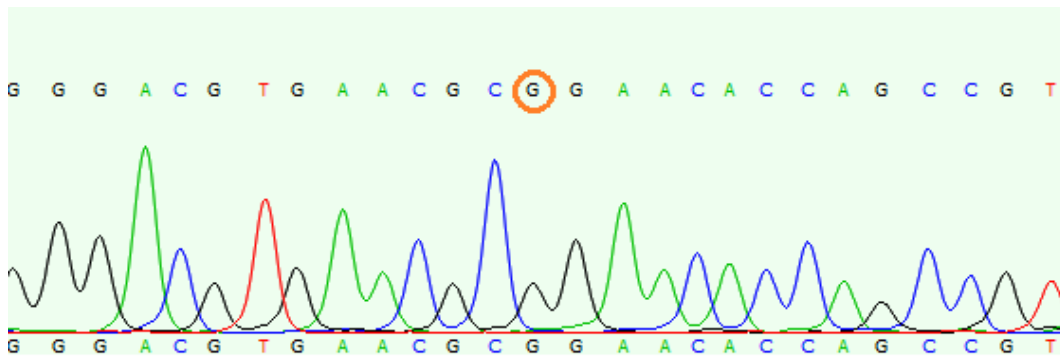


Abbildung 29: Analyse des dem Tumor S92.5 entsprechenden Normalgewebes auf die Mutation p.R552C im *NFATC1*-Gen in der *reverse*-Sequenz: an *cDNA*-Stelle c.1720 findet sich kein Basenaustausch von G → A.

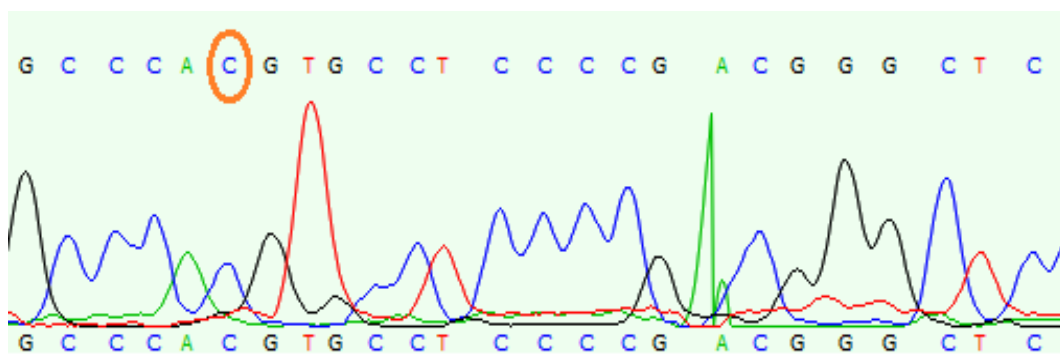


Abbildung 30: Analyse von p.L344V an der Normalgewebprobe I105 im *NFATC1*-Gen (*reverse*-Sequenz): an der *cDNA*-Stelle c.1030 findet sich ein Basenaustausch von G → C.

PIEZO2-Gen

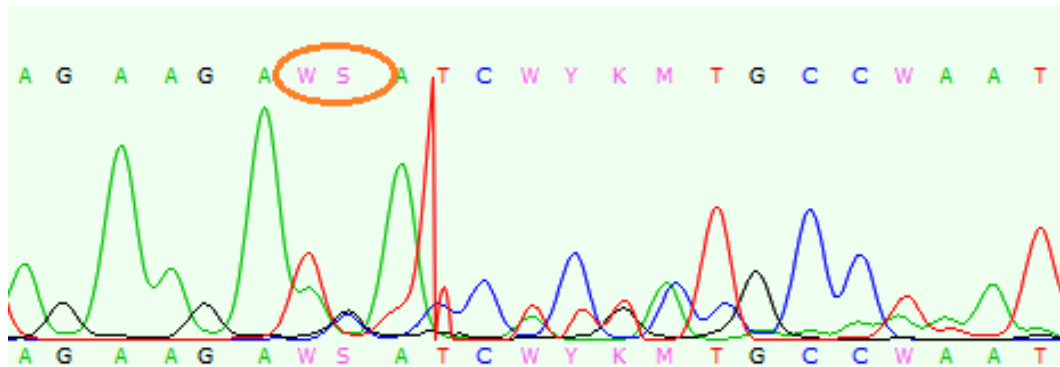


Abbildung 31: Tumor S92.2 zeigt eine Deletion der Basen AGA an den Stellen 10671600-10671602 in der reverse-Sequenz im *PIEZO2*-Gen

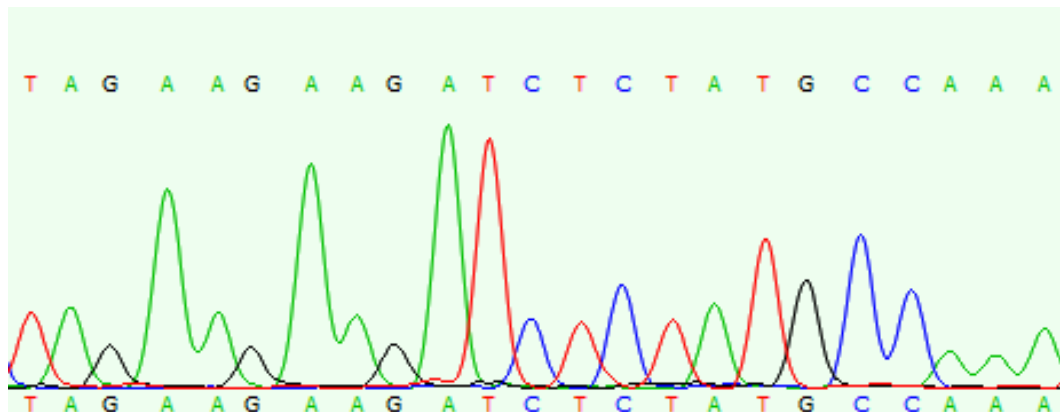


Abbildung 32: Im entsprechenden Normalgewebe von Tumor S92.2 sind die Basen AGA nachzuweisen, es kann keine Deletion an Stelle 10671600-10671602 im *PIEZO2*-Gen detektiert werden (reverse-Sequenz)

PIK3C3-Gen

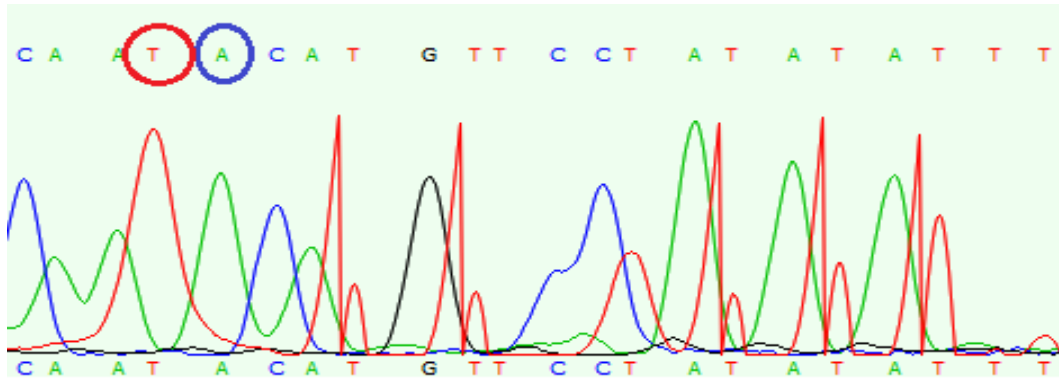


Abbildung 33: Analyse der mittels Exomsequenzierung detektierten Mutationen an den cDNA-Stellen c.980 und c.981 am Tumor S.92.5 im *PIK3C3*-Gen (reverse-Sequenz) : an den cDNA-Stellen c.980 (blau) und c.981 (rot) findet sich kein Basenaustausch von A → T (blau) bzw. von T → A (rot).

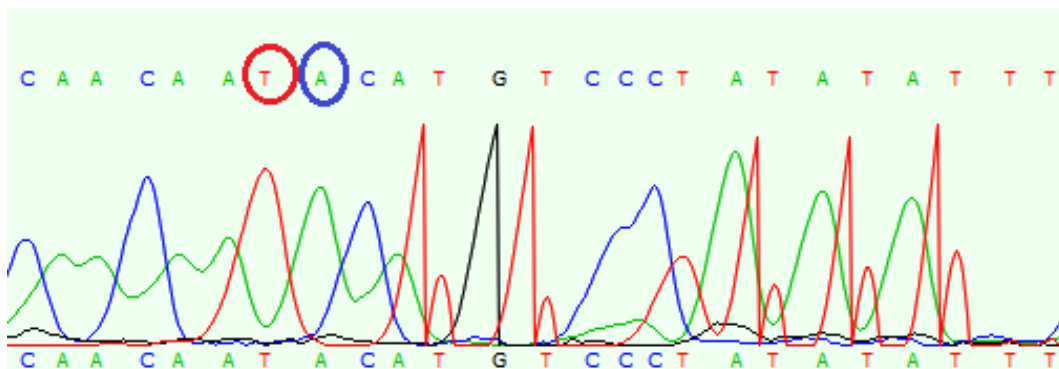


Abbildung 34: Analyse der mittels Exomsequenzierung detektierten Mutationen an den Stellen c.980 und c.981 am entsprechenden Normalgewebes von Tumor S.92.5 im *PIK3C3*-Gen (reverse-Sequenz) : an den cDNA-Stellen c.980 (blau) und c.981 (rot) findet sich kein Basenaustausch von A → T (blau) bzw. von T → A (rot).