

**Mutationen der Gene *C-KIT* und *CTNNB1* in
extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen, untersucht
anhand eines internationalen Probenkollektivs aus
Singapur, Peru und Deutschland**

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

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

vorgelegt von

Hölzl, Florian Michael

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Augenieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Schlüsselworte	7
1. Einleitung	8
1.1. Übersicht	8
1.2. Geschichte und Grundlagen	10
1.3. Epidemiologie, klinische Präsentation und Makroskopie	12
1.4. Mikroskopie	17
1.5. Immunphänotyp	18
1.6. KIT-Protein und <i>C-KIT</i>	20
1.7. β -Catenin und <i>CTNNB1</i>	21
1.8. Ziele und Fragestellungen	23
2. Material und Methoden	26
2.1. Proben	26
2.2. Mikroskopie und Immunhistochemie	26
2.3. In-situ-Hybridisierung	27
2.4. Immunhistochemie	31
2.5. DNA-Extraktion	33
2.6. PCR, Übersicht	37
2.7. Qualitäts-PCR	40
2.8. Amplifikations-PCR	43
2.9. Gelelektrophorese der Amplifikate	47
2.10. Aufreinigung mit AMPure®	48
2.11. Sequenz-PCR	49
2.12. Aufreinigung mit CleanSEQ®	50
2.13. Sequenzierung	52
2.14. Auswertung der Sequenzierung	53
2.15. Statistische Auswertung und Datenbankabgleiche	56

3. Ergebnisse	58
3.1. Charakterisierung des eingeschlossenen Probenkollektivs	58
3.2. Mikroskopie und Immunhistochemie	60
3.3. Qualitäts-PCR	62
3.4. Primer-Auswahl	68
3.5. Analyseerfolg	69
3.6. Beispielhafte Darstellung der Sequenzierungsauswertung	71
3.7. Ergebnisse der Sequenzierung	73
3.8. Zusammenfassung und statistische Auswertung der Ergebnisse	81
3.8.1. Tabellarische Darstellung	81
3.8.2. Ergebnisse nach Exon, Lokalisation und Herkunft	86
3.8.3. Globale Mutationsraten über alle Gene und Exons	91
3.8.4. Länderspezifische Mutationsraten über alle Gene und Exons	91
3.8.5. Länderspezifische Mutationsraten nach Genen und Exons	92
3.8.6. Lokalisationsspezifische Mutationsraten	93
3.8.7. Konfidenzintervalle der Mutationsraten	94
4. Diskussion	98
4.1. Beschreibung des NK-/T-Zell-Lymphoms	98
4.2. Genetische Veränderungen des NKTCLs (sine <i>C-KIT</i> und <i>CTNNB1</i>) ..	99
4.2.1. Allgemein	99
4.2.2. FAS	99
4.2.3. p53	100
4.2.4. NF- κ B	100
4.2.5. BIRC5	100
4.2.6. PDGFR α	101
4.2.7. JAK-STAT Pathway	101
4.2.8. Epigenetik, CADM1 und DAL-1	102
4.3. Genetische Veränderungen des NKTCLs (<i>C-KIT</i> und <i>CTNNB1</i>)	102
4.3.1. <i>C-KIT</i>	102
4.3.2. <i>CTNNB1</i>	104

4.4. Bezug zur Fragestellung	105
4.5. Diskussion der eigenen Ergebnisse	105
4.5.1. Kollektiv	106
4.5.2. Histologie und Immunhistochemie	106
4.5.3. Unterschiede in der DNA-Qualität	107
4.5.4. Lokalisation	111
4.5.5. Gesamtmutationsraten	112
4.5.6. <i>C-KIT</i>	113
4.5.6.1. <i>C-KIT</i> bei extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen	113
4.5.6.2. <i>C-KIT</i> bei gastrointestinalen Stromatumoren	117
4.5.6.3. <i>C-KIT</i> bei Melanomen	119
4.5.6.4. <i>C-KIT</i> bei Seminomen	120
4.5.6.5. <i>C-KIT</i> bei Mastozytose	120
4.5.7. <i>CTNNB1</i>	122
4.5.7.1. <i>CTNNB1</i> bei extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen	122
4.5.7.2. <i>CTNNB1</i> bei Leberkrebs	123
4.5.7.3. <i>CTNNB1</i> bei Lungenkrebs	124
4.5.7.4. <i>CTNNB1</i> bei kolorektalen Karzinomen	125
4.5.7.5. <i>CTNNB1</i> bei Desmoid-Tumoren	126
4.6. Therapeutischer Ausblick	127
4.7. Limitationen	128
5. Zusammenfassung	130
6. Literaturverzeichnis	132
Erklärung zum Eigenanteil	138
Danksagung	139

Abkürzungsverzeichnis

*	laut COSMIC vorbeschriebene Mutationen
°	laut COSMIC nicht vorbeschriebene Mutationen
Ø	ready-to-use, keine Verdünnung
AP:	Annealing-Phase
B/bwd:	Backward
CADM1:	Cell Adhesion Molecule 1
CCND1:	Cyclin D1
DAL-1:	Band 4.1-like Protein 3
DNA-L:	DNA-Ladder
E:	endständige Primer
EBV:	Epstein-Barr-Virus
F/fwd:	Forward
gescheitert:	Amplifikation und Auswertung vollständig gescheitert
GIST:	Gastrointestinaler Stromatumor
GIT:	Gastrointestinaltrakt
Gra.-B:	Granzym-B
JAK:	Janus-Kinase
L:	Leerwert
l:	large cells
LK:	Lymphknoten
LMG:	Letales Mittellinien-Granulom
Lok.:	Lokalisation des Tumors
m:	medium-sized cells
N/A:	not available
NCAM-1:	Neural Cell Adhesion Molecule 1
n. d.:	nicht durchgeführt bzw. nicht vorliegend
neg.:	negativ
neg.*:	schwach reaktiv, positiv in Mastzell-Kontrolle
Nek.:	Nekrosen
NF-κB:	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells
NK:	Natural Killer

NKTCL:	Extranodales NK-/T-Zell-Lymphom
NNH:	Nasennebenhöhle
n. v.:	nicht verwertbar
P:	Probe
PDGFC:	Platelet-derived Growth Factor C
PDGFR α :	Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha
pos.:	positiv
PT-LPD:	post-transplantation lymphoproliferative disorder
Q:	DNA-Qualität
S:	Segment
s:	small cells
S1/S2:	Teilsegment 1 bzw. 2
SCF:	Stammzellefaktor
schlecht:	Schlechte Qualität der Sequenzierung
Seg.:	Teilsegment
SH:	Schleimhaut
SIRS:	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
STAT:	Signal Transduction And Transcription Protein
TIA-1:	T-cell intracellular antigen-1
ÜP:	überlappende Primer
VCAM1:	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VS:	Verdünnungsstufe
WT:	Weichteile
wt:	Wildtyp
Zyt.:	Zytologie

Schlüsselworte

C-KIT, KIT-Protein, *CTNNB1*, β -Catenin, Mutation, extranodales NK-/T-Zell-Lymphom, NKTCL.

1. Einleitung

1.1. Übersicht

Das extranodale NK-/T-Zell-Lymphom (NKTCL) ist eine hochaggressive Tumorentität, die durch ausgedehnte Nekrosen, Gewebsdestruktion und Gefäßschädigungen charakterisiert ist. Es betrifft häufig den oberen Respirationstrakt, hat jedoch eine starke Tendenz zur Metastasierung, was neben lokaler Destruktion betroffener Gewebe und angrenzender Strukturen eine erfolgreiche Therapie häufig erschwert. Ein besseres Verständnis der Pathogenese und typischer assoziierter Mutationen wird benötigt um effektivere Therapiestrategien für diese tödliche Erkrankung zu entwickeln.

In westlichen Populationen eher selten, betrifft das NKTCL insbesondere Menschen asiatischer und süd- oder mittelamerikanischer Abstammung. Die ursprüngliche Zelllinie ist derzeit nicht abschließend geklärt, mit hoher Wahrscheinlichkeit stammt die Entität in den meisten Fällen aber von Natural Killer-Zellen (NK-Zellen) ab.

Wir führten bei Gewebeproben mit der Diagnose "extranodales NK-/T-Zell-Lymphom" aus einem internationalen Kollektiv mit genetisch verschiedenartiger Zusammensetzung neben mikroskopischen und immunhistochemischen Untersuchungen insbesondere molekulargenetische Sequenzanalysen auf Mutationen in den Exons 9, 11 und 17 des *C-KIT* Gens durch. Abgeleitet von vorbeschriebenen Raten für andere Tumoren erwarteten wir in ca. 30% der Fälle Mutationen in diesen Genabschnitte nachzuweisen.

Beim *C-KIT* Gen handelt es sich um ein Protoonkogen, welches für den an der Zellproliferation beteiligten Tyrosinkinase-Rezeptor KIT kodiert. Dieses Enzym ist im Gesunden unter anderem für die Zellproliferation von hämatopoetischen Stammzellen, bei Mastzellen, in der Angiogenese und für Schrittmacherzellen der Darmperistaltik (Cajal-Zellen) von Bedeutung.

Mutationen des Protoonkogens finden sich neben dem NKTCL insbesondere auch bei gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs), Melanomen und Hodentumoren.

Darüber hinaus wurde in unserem Probenkollektiv das Exon 3 Gens *CTNNB1* untersucht, das für das β -Catenin-Protein kodiert.

Beim β -Catenin handelt sich um eine Struktur, die für die Ausbildung von Zell-zu-Zell-Adhäsionen und als Transkriptionsfaktor in der Zellproliferation besonders von Bindegewebs- und zahlreichen weiteren Zellen eine große Rolle spielt. Exon 3 des *CTNNB1* Gens gilt als typische Lokalisation von Mutationen, welche zur Stabilisierung und Akkumulation des Proteins führen. Dies bewirkt durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor die onkogene Aktivierung des Wnt Signalling Pathways in einer Vielzahl verschiedener Tumoren.

In Anbetracht der beschriebenen fast universellen Assoziation des NKTCL mit Epstein-Barr-Virus (EBV), wurden lediglich EBV-positive Proben in die Studie eingeschlossen. Andere als NKTCLs diagnostizierte bzw. verdächtige Gewebeproben wurden dagegen ausgeschlossen.

In vorangegangenen Untersuchungen wurden gewisse Ähnlichkeiten mit GISTs der Mutationen im *C-KIT* Protoonkogen gezeigt. Als häufigste Lokalisation wurde entsprechend der typischen Mutationsstellen bei GISTs auch hier Exon 11 vermutet. Mutationen bei NKTCLs im Exon 3 des *CTNNB1* Gens wurden in ca. einem Fünftel der Fälle beschrieben.

Weitere bekannte Mutationen bei NKTCLs, die in dieser Arbeit aber nicht näher untersucht wurden, betreffen Gene des p53 Pathways, die zu einer überschießenden Zellproliferation durch Verlust der Tumorsuppression führen, sowie Mutationen im Fas Gen, welches für die Regulation der Apoptose von Bedeutung ist. Auch STAT-Proteine, Transkriptionsfaktoren, die mit Hilfe von Janus-Kinasen aktiviert werden, können eine Rolle spielen.

Weitere Forschungen zu Mutationen, die mit dieser Tumorentität assoziiert sind, sind zum verbesserten Verständnis ihres Ursprungs, der Pathophysiologie und für zukünftige Therapieoptionen von großem Interesse. Die vorliegende Studie sollte zur Grundlagenforschung auf diesem Gebiet beitragen.

1.2. Geschichte und Grundlagen

Als makroskopische Läsionen wurden extranodale, speziell nasale NK-/T-Zell-Lymphome (NKTCL) zum ersten Mal von McBride im Jahre 1897 gemeinsam mit anderen, klinisch ähnlich imponierenden, aber später histologisch differenzierbaren Erkrankungen beschrieben. Sie manifestieren sich oft als rapide und progressiv-destruktive Schädigung von Nase, Gaumen und Gesichtsregion in Form nekrotischer Granulome entlang der Gesichtsmittellinie [1,2,3,4].

Eine Vielzahl verschiedener Namen und deskriptiver Begriffen folgte; einige davon können auch heute noch sporadisch angetroffen werden: Im Jahre 1922 berichtete Stewart von zehn klinischen Fällen progressiv-destruktiver Erkrankungen im Mittelbereich des Gesichts. Dies schlug sich in den Begriffen Stewart-Syndrom und Stewart-Granulom nieder [1].

Aufgrund des aggressiven und meist tödlichen Verlaufs wurde diese Krankheitsentität von Williams im Jahre 1949 auch das Lethal Midline Granuloma (LMG) getauft [1,3,5,6].

Weitere Synonyme wie Granuloma gangrenescens, angiozentrisches T-Zell-Lymphom, angiozentrische immunproliferative Läsion oder lymphomatoide Granulomatose kommen ebenfalls vor [1,3,7].

Die Begriffe polymorphe Retikulose und maligne Mittellinien-Retikulose basieren unter anderem auf histologischen Befunden. So wiesen Proben häufig eine Vielzahl reaktiver, inflammatorischer Zellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen auf. Diese Zellanreicherungen können gelegentlich die eigentliche, zugrundeliegende maligne Erkrankung als chronische Entzündung maskieren [1,3,5].

Der Überbegriff LMG und seine zahlreichen Synonyme bezeichnen demnach eine Gruppe sehr verschiedener Erkrankungen. Um NKTCLs von anderen malignen Lymphomen, der Wegener-Granulomatose und weiteren LMG-Erkrankungen zu differenzieren, ist daher die Zusammenschau von histologischer Diagnostik und klinischen Befunden nach wie vor von großer Bedeutung.

Auch andere Krebserkrankungen oder lokale Inflammationen, z. B. ausgelöst durch Tuberkulose, können zu Symptomen führen, die klinisch keine Unterscheidung innerhalb der größeren Befundklasse LMG erlauben [1,3,4].

Ohne immunhistochemische Analysen auf die Muster von Proteinexpressionen, ohne auf In-situ-Hybridisierung basierenden Nukleinsäure-Nachweisen oder molekulargenetischen Methoden wie Sequenzierungen zur Untersuchung der zugrundeliegenden Ursachen war eine Differenzierung zwischen den sehr verschiedenartigen Krankheiten, die unter den Begriff LMG fallen, oft nicht sicher möglich [1].

Obgleich NKTCLs als Unterkategorie des LMG aufgrund ihrer möglichen Dissemination und ihres histologisch-polymorphen Zellproliferationsmusters als eine Variante maligner Lymphome betrachtet wurden, wurde ihre wahrscheinlichste, ursprüngliche Zelllinie lange Zeit nicht bestimmt. Erst mit dem Nachweis positiver Immunreaktivität gegenüber dem NK-Zell-Marker CD56 durch Ng et al. 1987 wurde die Identifizierung des NKTCL und die Differenzierung gegenüber anderen klinisch ähnlich imponierenden Krankheiten besser. In der Folge haben weitere Studien diesen Befund zusätzlich untermauert [3,5].

CD56, auch Neural Cell Adhesion Molecule 1 (NCAM-1) genannt, ist ein Adhäsionsmolekül und typischer Marker von NK-Zellen. Positivität für NCAM-1 gilt heute als ein wichtiger, meist exprimierter Marker dieser malignen Erkrankung [1], ist jedoch nicht spezifisch für NKTCLs [8]. Die Erkrankung zeigt ein besonderes Disseminationsverhalten; darauf wird anschließend genauer eingegangen. Interessanterweise sind jedoch die Lokalisationen, zu denen das NKTCL typischerweise disseminiert, selbst in der Regel hoch CD56-positiv. Die Ausbreitung zu diesen Lokalisationen mag durch homophile Bindungen zwischen NCAM-1 Proteinen zirkulierender Tumorzellen und des Zielgewebes erklärbar sein [9].

Trotz der Fortschritte in der Identifizierung von NKTCLs und der Differenzierung gegenüber anderen Krankheitsentitäten bleibt es weiterhin schwierig, zwischen NK- und zytotoxischen T-Zell-Aspekten der Tumore zu unterscheiden [9], nicht

zuletzt weil eine Minderzahl der beschriebenen NKTCLs CD56-negativ sind, also diesen typischen NK-Zell-Marker nicht exprimieren.

Es ist möglich, dass die Kategorie der NKTCLs in Zukunft weiter in Subkategorien aufgeteilt wird oder bestimmte Krankheitsentitäten daraus entfernt und stattdessen in eine eigene Kategorie eingeordnet werden, die besser ihre ursprüngliche Zelllinie widerspiegelt. In Anbetracht der relativen Seltenheit dieser Krankheitsentität und der Schwierigkeiten bei der Probenentnahme aus dem häufig ausgeprägt nekrotischen Gewebe bleibt es aber relativ schwierig, entscheidende Erkenntnisse über die bei ihr auftretenden molekulargenetischen Veränderungen zu gewinnen.

1.3. Epidemiologie, klinische Präsentation und Makroskopie

Extranodale NK-/T-Zell-Lymphome (NKTCLs) sind eine weltweit eher seltene Tumorentität, nehmen aber einen oft hochaggressiven Verlauf [3,9,10]. Sie betreffen überwiegend Erwachsene mit einem Altersmedian von 50 Lebensjahren und einer signifikanten Präferenz von 2:1 bis 3:1 für das männliche Geschlecht [4,6,7,8,9,11].

Darüber hinaus besitzt die Erkrankung eine charakteristische geografische Verteilung: Es tritt sehr selten in westlichen Populationen [10] mit weniger als 1,5% aller Non-Hodgkin-Lymphome, bzw. mit weniger als 1% aller Lymphome insgesamt auf [1,3,11]. Während die Prävalenz in afrikanischen Populationen schwer einzuschätzen, aber soweit bekannt sehr gering ist [4], ist sie in asiatischen Populationen und bei Nachkommen süd- und mittelamerikanischer Ureinwohner mit 6% deutlich höher [3,6,7,9,10,11]. In einer Studie aus Hong Kong war das NKTCL mit 7,2% aller extranodalen Lymphome vertreten [3].

Als Ursache für dieses Verteilungsmuster wird postuliert, dass von mongolischen Bevölkerungsgruppen abstammende Populationen ein höheres Risiko für diese Tumorentität miteinander teilen. Darunter fallen nicht nur ostasiatische Gruppen sondern auch Teile der peruanischen Bevölkerung [12].

In diesem Zusammenhang sind weitere Studien mit Fällen außerhalb Asiens von Interesse, insbesondere in Bezug auf geografisch unterschiedlich verteilte

genetische und umweltbedingte Faktoren mit möglichem Einfluss auf das Verteilungsmuster.

Unabhängig von diesen geografischen Faktoren können NKTCLs auch Patienten betreffen, welche beispielsweise post Transplantation oder aufgrund einer Infektion mit humanem Immundefizienz-Virus (HIV) an einer Immunsuppression leiden [7,9].

Entsprechend ihrer Bezeichnung sind bei NKTCLs die Lymphknoten größtenteils nicht primär betroffen [6,7,9]. Sie tendieren zur Manifestation in und an der Schleimhaut der Nasenhöhle oder anderer Regionen des oberen Respirationstraktes wie Nasopharynx, Gaumen und Nasennebenhöhlen [4,6,13]. Ihr Wachstum ist gekennzeichnet durch ulzerative, lokal destruktive Schädigungen des Gewebes und fortschreitende Knochenerosionen. Sie können auch mit angioinvasivem Wachstum oder als solide Raumforderungen imponieren [1,3,7,9,13]. Gelegentlich treten sekundäre Einblutungen und Infektionen im nekrotisierenden Gewebe auf [4]. Primäre und sekundäre Augenhöhlenbeteiligung sind ebenfalls beschrieben [1,7].

Das lokale Wachstum kann daher mit verschiedenen Symptomen auffällig werden wie Epistaxis, nasaler Obstruktion oder ulzerativen, auch stark ausgedehnten Läsionen, welche insbesondere Strukturen des Mittelgesichts betreffen [1,4,7,9,11]. Ein Großteil der Fälle (60-90%) weist ein solides Wachstum nasal und/oder pharyngeal auf [10]. Perforation und Zerstörung des Nasenseptums oder in der Gaumenregion treten besonders bei fortschreitender Krankheit auf, was die charakteristischen Mittelgesichtsschädigungen zur Folge hat, auf deren Basis das NKTCL auch als letales Mittelgesichtsgranulom (LMG) bezeichnet wurde [1].

Weitere assoziierte Symptome sind nasale Verkrustungen, eitriger Nasenausfluss, Rötung und Schwellung der Weichteile des Gesichts und Ulzerationen der Schleimhäute. Bei Augenhöhlenbeteiligung wurden auch Symptome wie Uveitis, Vitritis und mechanische Einschränkungen der Augenbewegung beschrieben [1].

NKTCLs treten seltener in extranasalen/-pharyngealen Lokalisationen auf, wie beispielsweise im Gastrointestinaltrakt, der Haut, in Lunge, Milz, den Hoden oder in Weichteilgeweben [3,5,6,7,8,9,13,14]. Das Knochenmark ist vergleichsweise selten betroffen mit weniger als 10% der Fälle. Selten wurde entgegen der Bezeichnung der Entität die primäre Lymphknoten-Manifestation ohne Beteiligung extranodaler Lokalisationen berichtet [1,7,9]. Die Lymphknoten können auch sekundär im Rahmen einer systemischen Dissemination betroffen sein [7].

Bislang konnten keine signifikanten Alters- oder Geschlechtsunterschiede im Auftreten von nasalen/pharyngealen gegenüber extranasalen/-pharyngealen Manifestationen belegt werden [13]. Allerdings geht extranasales/-pharyngeales Wachstum im Allgemeinen mit schlechterem Verlauf, Ansprechen auf Therapie und klinischem Outcome einher [4]. Insbesondere wenn die Haut mit betroffen ist, typischerweise in Form von knotigen und ulzerativen Läsionen oder Plaques [7,9], kann dies ein Zeichen für ausgedehnte systemische Dissemination und Metastasierung auch zu inneren Organen sein, die meist einen rasch letalen Ausgang zur Folge haben [1].

Transmurale intestinale Läsionen treten auf Grund der assoziierten ausgeprägten Gewebenekrose oft als Perforationen oder tiefe Ulzera in Erscheinung [9], während die Erkrankung bei betroffenen Weichteilgeweben häufig als solide Raumforderung imponiert [7]. Weiterhin treten infolge einer extranasalen/-pharyngealen Erkrankung häufiger Zytopenien auf als dies bei der nasalen/pharyngealen Manifestationsform der Fall ist [6].

Die genannten extranasalen Lokalisationen sind es auch, zu denen die nasale oder pharyngeale Form des NKTCLs im Fortschreiten der Krankheit typischerweise disseminiert. Dies könnte mit den hohen Expressionsraten von CD56 in diesen Geweben zusammenhängen, möglicherweise auf Grund homophiler Bindungen zwischen den NCAM-1-Proteinen der Tumorzellen und der Gewebezellen vor Ort [9].

Der nasale Typ des NKTCLs wird meist relativ früh im Krankheitsverlauf diagnostiziert: Etwa 70% der Fälle fallen zum Zeitpunkt der Diagnose in die

Stadien I oder II. Hier sind bei der Diagnosestellung das Ausmaß der lokalen Tumordinvasion und die möglicherweise mit betroffenen Strukturen und nahegelegenen Organen ein wichtiger prognostischer Faktor [1,9].

Der extranasale/-pharyngeale Typ ist dagegen besonders aggressiv und wird häufig erst im Stadium III oder IV diagnostiziert; es zeigt sich eine hohe Rate an systemischer Dissemination und das Tumorgewebe tendiert zu einer höheren und generalisierten Resistenz gegen Chemotherapeutika. Dementsprechend hat diese Form des NKTCLs eine besonders schlechte Prognose [1,6,7,9,11,13].

Im disseminierten Stadium kann das NKTCL mit Symptomen wie hohem Fieber von 40 °C und mehr, Gewichtsverlust, Schwäche, Abgeschlagenheit und einem reduzierten Allgemeinzustand einhergehen. Darüber hinaus können die Hämatopoese, also die Bildung neuer Blutzellen, aber auch die Leberfunktion und Koagulation des Blutes eingeschränkt sein, was schließlich zu einer Panzytopenie bzw. zu Blutungen oder auch disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) führen kann.

Dem vermehrten Zelltod und -turnover entsprechend wird vermehrt intrazelluläre Laktatdehydrogenase in den Blutkreislauf freigesetzt mit deutlich ansteigenden Messwerten. Insbesondere im Spätstadium können die Symptome stark denen einer Sepsis oder eines systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) ähneln [1,4,9].

Auf Grund der typischen Tumorlokalisationen im Gesichts-, Kopf- und Nackenbereich ist eine adäquate Therapie z. B. durch die Nähe zur Augenhöhle verkompliziert. Lokalrezidive treten in etwa 50% der Fälle auf und sind durch die umliegenden Organe besonders problematisch [1,4]. Frühstadien der Erkrankung reagieren meist gut auf Strahlentherapie, während Spätstadien oft mit einer Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie behandelt werden, da Chemotherapie allein nur schlechte Erfolgsraten gezeigt hat [1,4]. Insgesamt verstirbt ein Großteil der Patienten ohne adäquate Therapie innerhalb von 3 bis 12 Monaten (Median: 7,8 Monate [13]).

Die 5-Jahres-Überlebensraten für die Krankheitsentität als Ganzes variieren stark von 38-85% [4]. Speziell auf Stadium I und II bezogen liegen die 5-Jahres-Überlebensraten nach verschiedenen Berichten bei ca. 50% [1,10,13]. Die disseminierte Erkrankung tendiert zu einem letalen Ausgang innerhalb von Wochen bis wenigen Monaten nach Diagnosestellung; die 5-Jahres-Überlebensraten für fortgeschrittene Erkrankungsstadien liegen nur bei 10% [1,9]. Für nasale und pharyngeale Manifestationen wurden 5-Jahres-Überlebensraten von 54%, bzw. nur 20% beschrieben [13]. Dies hängt vermutlich mit den erwähnten typischen Unterschieden in Diagnosezeitpunkt und Disseminationsstatus je nach primärer Tumorlokalisation und den entsprechenden Unterschieden im Stadium zusammen.

Außer den beschriebenen klinischen Aspekten spielt auch die serologische Diagnostik eine wichtige Rolle bei Identifikation und Monitoring von NKTCLs: Ein erhöhter Titer von IgG-Antikörpern gegen das virale Kapsid-Antigen (VCA) des Epstein-Barr-Virus (EBV) kann bereits im lokalisierten Stadium der Erkrankung nachweisbar sein; besonders das disseminierte Stadium weist sehr stark erhöhte Werte auf [1,4,13]. Der EBV-DNA-Titer erlaubt eine Aussage zur Krankheitsaktivität, da höhere Werte mit schlechterem Ansprechen auf Therapie und niedrigeren Überlebensraten korrelieren [7,13].

Dies ist besonders wichtig, da das NKTCL bei 90-100% der Fälle mit einem EBV-Nachweis assoziiert ist, unabhängig von der geografischen oder ethnischen Herkunft der Patienten [3,4,5,7,8,9,10,11,15]. Entsprechend ist EBV-Positivität in der WHO-Definition ein erforderliches Kriterium für die Diagnose eines NKTCL [7]. Welche Rolle EBV beim Auftreten und im Progress dieser Erkrankung genau spielt, ist derzeit nicht vollständig geklärt, aber eine ätiologische Verbindung ist wahrscheinlich, wie von Harabuchi et al. 1990 berichtet und von anderer Seite bestätigt [3,11,13,16]. Die EBV-Subtypen A und B sind geografisch unterschiedlich verteilt; der Subtyp A ist vor allem in Asien vertreten [3]. Die Assoziation von NKTCLs mit EBV ist ihrerseits in fast allen Fällen mit Viren des Subtyps A beschrieben [7].

Einige Case-Control-Studies berichteten auch vom möglichen kausalen Zusammenhang des NKTCLs mit Expositionen zu Pestiziden und chemischen

Lösungsmitteln. Ein verantwortlicher Mechanismus könnte die Aktivierung latenter EBV-Infektionen durch diese Reize darstellen. Die Exposition zu den genannten Substanzen korreliert mit erhöhten Antikörpertitern gegenüber EBV [3]. Ein erster Fall von familiär auftretendem NKTCL, bei dem ein Vater und eines seiner sechs Kinder betroffen waren, wurde ebenfalls mit einem ausgeprägten Pestizid-Einsatz verknüpft [3,9].

Mikroskopisch festgestellt werden kann die typische EBV-Positivität in Tumorzellen mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung, unter Verwendung einer EBER Sonde [1,6,9]. Auch das Ausmaß einer Dissemination und die mögliche Progression der Erkrankung können weiter abgeklärt werden, indem Knochenmarks- oder Leberbiopsien auf EBER-positive Zellen hin untersucht werden; ein positiver Befund spricht für entsprechende Organbeteiligung [1].

Die Unterscheidung von der Wegener-Granulomatose, die ebenfalls unter LMG fällt und in westlichen Populationen deutlich häufiger als das NKTCL auftritt, ist mit typischen serologischen Markern wie p-ANCA und c-ANCA in Zusammenschau mit der histologischen Evaluation von Gewebeproben und gegebenenfalls molekularbiologischen Untersuchungen möglich [1].

1.4. Mikroskopie

Extranodale NK-/T-Zell-Lymphome (NKTCL) zeigen meist vergleichbare, zueinander ähnliche histologische Merkmale, unabhängig von ihrer Lokalisation [7]. Lokal progressive Gewebedestruktionen, Nekrosen und diffuse Invasion oder Gewebeporationen sind häufig [4,6]. Besonders wenn Schleimhäute betroffen sind, finden sich Ulzerationen. Schleimhautdrüsen werden von Tumorzellen verschoben und ausgedünnt oder komplett verdrängt [7,9].

Angiozentrisches Wachstum ist typisch, häufig mit Invasion und Zerstörung der assoziierten Blutgefäße oder mit Gefäßverschluss [4,6,8,9,13]. Fibröse Veränderungen sind häufig an den Gefäßen sichtbar, auch ohne klar erkennbare, nahegelegene Angioinvasion [1,5,7]. Ausgedehnte und zunehmende Koagulationsnekrosen in Folge von Gefäßverschlüssen und Ischämien sind weit verbreitet [1,7,9,14].

Die Tumorzellen selbst können eine sehr starke Zellpolymorphie aufweisen [4,6]. Kleine bis mittelgroße Zellen sind typisch, aber es können auch große oder ausgeprägt anaplastische Varianten ebenso wie verschiedene Mischungen von Zellmorphologien auftreten: Die Nuklei der Zellen sind in der Regel extrem irregulär und weisen granuliertes Chromatin auf [1,7,9]. Häufig sichtbar sind mitotische Figuren, Zellüberreste in Form apoptotischer Körperchen, Karyopyknose (Kernschrumpfung und Verdichtungen) sowie Karyorrhexis (Kernzertrümmerung im Rahmen des Zelltods). Diese Zeichen treten beim erhöhten Zellturnover auf, also dem raschen Absterben und neuen Wachstum und Austausch von Zellen [7,9]. Das Zytoplasma erscheint typischerweise blass bis völlig klar und ist nur dünn ausgeprägt [7,9] kann allerdings auch Granula aufweisen [6].

Desweiteren sind die Tumorzellen häufig vermengt mit reaktiven Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, was die zugrundeliegende Krebserkrankung unter Umständen als eine chronische und progressiv-nekrotische Entzündung maskieren kann [1,4,5,7,9].

1.5. Immunphänotyp

Immunphänotypisch sind die meisten extranodalen NK-/T-Zell-Lymphome (NKTCL) positiv für CD2, ein Adhäsionsmolekül, das auch normale NK- und T-Zellen exprimieren [4,17].

Die Zelloberfläche ist meist negativ für CD3, einen Korezeptor zur T-Zell-Aktivierung. Zytoplasmatisches CD3 ϵ , eine Teilkette dieses Korezeptors, ist bei immunhistochemischen Untersuchungen paraffinierter Proben dagegen praktisch immer positiv [4,6,9,10,13].

Die Marker CD4 (typisch für T-Helferzellen) und CD5 (ein Pan-T-Zellmarker) sind dagegen bei NKTCLs meist negativ. CD7 und CD8 sind ebenfalls T-Zell-assoziierte Antigene und bei normalen NK-Zellen meist positiv [17]. Besonders CD8 ist bei NKTCLs dagegen meist negativ [9]. Auch für den NK-Zell-Marker CD16 sind die Tumorzellen in der Regel negativ. B-Zell- und myeloische Antigene werden generell nicht exprimiert [9].

NKTCLs sind andererseits meist stark positiv für CD56 [4,6,10,11,13]. Hierbei handelt es sich um einen typischen NK-Zell-Marker und ein Adhäsionsmolekül. CD56 ist jedoch nicht spezifisch für diese Zelllinie und Tumorentität; auch periphere T-Zell-Lymphome können es beispielsweise exprimieren [7,8,9]. Anders als bei EBV-Negativität kann auch in Fällen, bei denen der Tumor die Expression von CD56 verloren hat, noch die Diagnose eines NKTCLs gestellt werden, sofern die klinischen und histologischen Merkmale hierzu passen [4,17]. CD57, ein weiterer NK-Zell-Marker, ist fast immer negativ bei NKTCLs. Für die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung ist allerdings wichtig, dass unter Umständen auch normale NK-Zellen ein verändertes Expressionsmuster von CD2, CD7, CD16 und CD56 aufweisen können [17].

NKTCLs exprimieren meist Granzym-B, TIA-1 (T-cell intracellular antigen-1), Perforin oder andere zytotoxische Proteine. Diese aggressiven Substanzen leiten in fremdantigenpräsentierenden Zellen die Apoptose ein und tragen zusätzlich zur ischämischen Gewebeschädigung und progressiven Nekrotisierung bei, die für NKTCLs so typisch sind. Sie werden neben NK-Zellen auch von zytotoxischen T-Zellen freigesetzt [1,4,7,8,9,10,13,18]. T-Zell-Rezeptor-Gen-Rearrangements, die eher auf T-Zellen als ursprüngliche Zelllinie hinweisen würden, wurden dagegen bei NKTCLs nur selten beschrieben. Während der Großteil der diagnostizierten NKTCLs damit wohl auf NK-Zellen zurückgeht, zeigt sich in wenigen Fällen also ein Phänotyp, der besser mit zytotoxischen T-Zellen vereinbar ist [1,5,7,9].

Weiterhin sind Proteine mit EBV-assoziiierter Expression zur Kategorisierung von Tumoren nach dem Latenztyp ihrer EBV-Infektion relevant: Latent infizierte Zellen können eine Lymphoblasten ähnliche Zellmorphologie und uneingeschränktes Wachstum in Zellkulturen aufweisen. Sie tragen zahlreiche Kopien des EBV-Genoms in sich, exprimieren jedoch nur einen Teil davon in bestimmten Mustern, den Latenztypen [19,20].

Die Latenztypen I bis III sind gemeinsam durch die Expression von EBNA-1 (EBV-associated nuclear antigen 1) gekennzeichnet, welches die Replikation der im Kern der Wirtszelle lokalisierten viralen DNA stimuliert [19]. Speziell der Latenztyp II, zu dem die NKTCLs zählen, ist darüber hinaus durch die

Expression von LMP-1 und LMP-2 gekennzeichnet, wobei die Expression von LMP-1 variabel ist [21]. Diese Membranproteine induzieren zum einen die Veränderungen der Zellmorphologie, zum anderen fördern sie das vermehrte Zellwachstum durch eine Imitation zellulärer Signalkaskaden [19,20]. Es wird vermutet, dass LMP-Proteine in vivo bei der Aufrechterhaltung der latenten Infektion bzw. bei deren Reaktivierung von Bedeutung sind [20].

1.6. KIT-Protein und *C-KIT*

Das KIT-Protein, auch CD117 oder Stammzellfaktor-Rezeptor genannt, ist eine Transmembranrezeptor-Tyrosinkinase und wird durch das *C-KIT* Protoonkogen kodiert. Es ist an der Hämatopoese (Blutzellen), Gametogenese (Keimzellen) und der Differenzierung von Melanozyten beteiligt [3,22,23,24,25,26]. Entsprechend kann es vor allem in frühen hämatopoetischen Stammzellen, Mastzellen, Keimzellen und Melanozyten nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird KIT-Protein von interstitiellen Cajal-Zellen, Schrittmacherzellen für die Peristaltik des Gastrointestinaltrakts, exprimiert [8,23,24,25,26].

Das KIT-Protein fördert zusammen mit dem Stammzellfaktor (SCF) die Zellproliferation und hemmt die Apoptose [3,22,24]. Aktivierende Mutationen im *C-KIT* Protoonkogen können in hohen Expressionsraten des KIT-Proteins resultieren und gelten als molekulargenetisches Schlüsselereignis bei gastralen, oberen intestinalen und omentalen gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs). Die vermehrte Expression des KIT-Proteins wird mit Hilfe von Färbungen mit markierten Antikörpern sichtbar gemacht [8,22].

Aktivierende Mutationen finden sich bei GISTs überwiegend im Exon 11 des *C-KIT* Gens in der Codonregion 550 bis 560, typischerweise in Form von in-frame Deletionen, Punktmutationen und Duplikationen. Bei einer in-frame Mutation handelt es sich um den Verlust oder die Insertion eines Vielfachen von drei Basenpaaren, durch die das Codon-Leseraster nicht verschoben wird. Weitere Mutationen bei GISTs wurden auch für Exons 9, 13 und 17 beschrieben [8].

Zahlreiche Mutationen des *C-KIT* Gens werden mit der Entwicklung anderer Tumorentitäten in Verbindung gebracht, insbesondere in den Exons 9, 11, 13

[25,27]. Neben GISTs, bei welchen in drei Viertel der Fälle Mutationen des *C-KIT* Gens nachgewiesen werden können, sind auch Seminome oder Melanome, akute Leukämien und Mastozytosen von Mutationen betroffen [8,24,28,29,30]. Besonders in Mastozytosen ist extrem häufig *C-KIT* Exon 17 verändert [8,31,32].

In NKTCLs wurden *C-KIT* Mutationen in 6% aller Fälle nachgewiesen [9]. Diese Zahlen variieren jedoch je nach Kollektiv sehr stark. In einer Reihe von Studien zur Prävalenz von *C-KIT* Gen Mutationen bei NKTCLs in Asien wurden beispielsweise Raten für Japan von 15,5%, Korea von 11,9%, Nordost-China von 5% und Indonesien von 11,1% gefunden. Eine weitere Studie aus China aus den Regionen von Peking und Chengdu berichtete sogar eine Rate von bis zu 71,4% [3,23,33,34]. Diese teils enormen Differenzen gehen vermutlich auf geografisch korrelierte Unterschiede in ätiologischen Faktoren zurück [3].

Der Nachweis einer überschießenden Expression des KIT-Proteins bzw. von *C-KIT* Gen Mutationen kann therapeutische Relevanz besitzen. So ist ein gezielter Ansatz zur Behandlung von GISTs die Anwendung von Imatinib-Mesylat. Dieses Medikament blockiert die Tyrosinkinase-Aktivität des KIT-Proteins und trägt so dazu bei, das Wachstum des GIST zu verlangsamen oder zu stoppen. Das gilt besonders bei Tumoren mit nachgewiesenen Mutationen im *C-KIT* Gen in den Exons 11 und auch 9, welche zu einer konstitutionellen Aktivierung des Proteins führen können. Andere Mutationen z. B. in den Exons 13 und 17 hängen dagegen eher mit einer Imatinib-Mesylat-Resistenz zusammen [8,22,27,28,32]. Auch für die Behandlung von Melanomen und metastasierten Seminomen mit nachgewiesenen Mutationen im *C-KIT* Gen werden gezielte Therapieansätze mit Imatinib-Mesylat und anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren diskutiert und angewandt [24,28,29].

1.7. β -Catenin und *CTNNB1*

Das Protein β -Catenin ist ein Transkriptionsfaktor und wird durch das Gen *CTNNB1* kodiert. β -Catenin ist gemeinsam mit E-Cadherin an interzellulären Adhäsionsmolekülen beteiligt und trägt damit zur korrekten Zellorientierung und

Anlagerung in Geweben bei. Dies sind wichtige Funktionen im korrekten Ablauf der Zelldifferenzierung, der Zellwanderung und der Wachstumsregulation. Störungen dieser Funktionen können zu einer verstärkten Invasivität von Tumoren führen [5,35].

β -Catenin gilt außerdem als einer der Schlüsseleffektoren des Wnt Signalling Pathways und stimuliert Zellproliferation durch Genmodulation und -Expression [8,23]. Veränderungen im Wnt Signalling Pathway sind an der Entwicklung einer Reihe maligner Tumore beteiligt [16,13,36]. Insbesondere Mutationen, welche das β -Catenin direkt oder indirekt betreffen, können auf verschiedene Weise zu einem onkogenen Effekt führen [16].

Überexpression und damit onkogene Aktivität von β -Catenin kann z. B. durch eine mutationsbedingte Inaktivierung des Adenomatous Polyposis Coli-Proteins (APC) geschehen. Dieses Protein induziert die Degradation von β -Catenin und mit ihrem Wegfall kommt es zu einer β -Catenin-Anreicherung [16,23,37]. Das Axin-Protein ist direkt an der Funktion des APC-Proteins beteiligt und reguliert β -Catenin ebenfalls herunter. Mutationen, welche seine Bindungsstelle für β -Catenin eliminieren, wurden z. B. in hepatozellulären Karzinomen beobachtet [16]. Sowohl APC als auch Axin sind somit als Tumorsuppressoren anzusehen, deren Aufgabe es ist, den proliferativen Effekten des β -Catenin entgegenzuwirken [16].

Eine Mutation direkt im für β -Catenin kodierenden Gen *CTNNB1*, insbesondere im Exon 3, kann ebenfalls in einer Akkumulation des Proteins resultieren. Solche Mutationen können durch Abwandlung der Aminosäure-Sequenz die Phosphorylierungsstellen des Proteins verändern, sodass Regulation und Induktion des Abbaus durch das APC Protein inhibiert werden und das β -Catenin-Protein akkumuliert [5,8,16,23,35,37,38]. Nicht-phosphoryliertes β -Catenin kann nicht degradiert werden, sammelt sich im Zellinneren an und es kommt zur Translokation in den Nukleus [5]. Hier wird mit Hilfe von Kofaktoren wie TCF und LEF der Zellzyklus und die Differenzierung der Zelle beeinflusst und Zellüberleben, neoplastische Transformation bzw. Tumorgenese ausgelöst [5,16]. Diese β -Catenin-Akkumulation zu erkennen, ist für die Prognose und den weiteren Krankheitsverlauf hochrelevant. Bei kolorektalen Karzinomen z. B.

wurde ein signifikant schlechteres Outcome bei Überexpression des β -Catenin-Proteins nachgewiesen [12].

Interessanterweise gibt es nur wenig Überschneidungen verschiedener, das β -Catenin-Protein stabilisierender Mutationen. Unter anderem wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für Mutationen des *CTNNB1* Gens in kolorektalen Tumoren ohne Mutationen des APC Gens deutlich erhöht ist [16]. Protein-stabilisierende Mutationen im *CTNNB1* Gen wurden auch in Tumoren weiterer Gewebearten nachgewiesen, wie bei gastrointestinalen oder hepatozellulären Krebserkrankungen und in Tumoren von Endometrium und Ovarien oder der Prostata, der Schilddrüse, der Nieren und bei Melanomen sowie sporadisch in Desmoid-Tumoren [5,16,38].

Mutationen im *CTNNB1* Gen sind auch in lymphoproliferativen Erkrankungen nach Nierentransplantationen (post-transplantation lymphoproliferative disorder, PT-LPD) [39] oder bei B-Zell-Lymphomen der Nebenniere [40] beschrieben. Sie treten außerdem vermehrt in Hepatitis C-assoziierten hepatozellulären Karzinomen auf [16], was auf eine mögliche virale Komponente in der Ätiologie dieser Tumoren hinweist. Hier gibt es Parallelen zur EBV-Assoziation von NKTCLs. Bei diesen wurden Mutationen des *CTNNB1* Gens in 22% der Fälle berichtet [9].

Betrachtet man die Rolle des Wnt Signalling Pathway für die Entwicklung einer Vielzahl von Krebserkrankungen, so finden sich auch hier viele potentielle Schlüsselemente für künftige gezielte Krebstherapieansätze [8,16].

1.8. Ziele und Fragestellungen

Unser Wissen über typische Genalterationen bei extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen (NKTCL) ist bislang spärlich. Dies ist zum einen der relativen Seltenheit dieser Erkrankung geschuldet, zum anderen in den Eigenschaften der Entität selbst begründet. Häufig ausgeprägte Nekrosen, Einblutungen und reaktive Inflammationen können die Bearbeitung gewonnener Proben erschweren. Das NKTCL ist klinisch und in therapeutischer Hinsicht sehr problematisch: Es wächst lokal hochinvasiv und destruiierend, betrifft im

Mittelgesichtsbereich häufig schwierig zu therapierende Strukturen und besitzt großes Metastasierungspotential und hohe Lokalrezidivraten. Schließlich ist es häufig resistent gegenüber Chemotherapie. Ein besseres Verständnis der typischen Gen- und Proteinveränderungen würde zur Entwicklung neuer und gezielter Therapiestrategien beitragen. Zweck der vorliegenden Studie war es daher die Datenlage zu verbessern.

Im Speziellen diente diese Arbeit der Untersuchung des für die Tyrosinkinase KIT kodierenden *C-KIT* Gens in einem 26 Proben umfassenden internationalen Kollektiv. Das hier behandelte Probenkollektiv umfasst neben asiatischen Proben aus Singapur zusätzlich südamerikanische und europäische Proben aus Peru bzw. Deutschland. Es erlaubt eine internationale Analyse von genetisch unterschiedlichen Populationen und einen Vergleich mit früheren Befunden bei diesem und bei anderen Tumoren. Entsprechend früheren Studien untersuchten wir das *C-KIT* Gen in den Exons 11 und 17. Da das Exon 9 des *C-KIT* Gens z. B. bei gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs) nicht selten aktivierende Mutationen aufweist, wurde es für einen Vergleich mit Daten aus anderen Studien auf mögliche Parallelen in NKTCLs einbezogen. Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1* Gens können dazu führen, dass der Transkriptionsfaktor β -Catenin akkumuliert. Die damit einhergehende überschießende proliferative Aktivierung des Wnt Signalling Pathways ist für die maligne Entartung in einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten verantwortlich. Aus diesem Grund wurde auch dieser Genabschnitt in die Studie eingeschlossen.

Daraus ergaben sich die folgenden konkreten Aufgaben und Fragestellungen dieser Arbeit:

- Mikroskopische und immunhistochemische Charakterisierung von NKTCLs aus Proben der Länder Singapur, Peru und Deutschland.
- Analyse auf Mutationen in ausgewählten Exons der Gene *C-KIT* und *CTNNB1*.
- Gibt es Unterschiede der Mutationsraten dieser Gene bzw. Exons zwischen den Ländern?

- Gibt es Unterschiede in den Mutationsraten zwischen verschiedenen Tumorlokalisationen, nasal/pharyngeal und extranasal/-pharyngeal?
- Vergleich der Mutationen und Mutationsraten der NKTCLs in der Stichprobe mit den der Literatur beschriebenen Mutationen und Mutationsraten der Gene *C-KIT* und *CTNNB1* in NKTCLs und anderen Tumorentitäten.

2. Material und Methoden

2.1. Proben

Das Probenkollektiv entstammt drei verschiedenen Ländern von unterschiedlichen Kontinenten: Den größten Anteil mit 15 Proben stellt Singapur (Department of Pathology, Singapore General Hospital). 6 Proben stammen aus Peru (populationsbezogenes Krebsregister, Registro de Cancer poblacional, Trujillo, Peru). Zusätzlich wurden 5 Proben aus Deutschland untersucht (Institut für Allgemeine Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland). Insgesamt gingen 26 Proben in die Studie ein.

2.2. Mikroskopie und Immunhistochemie

Von den vorliegenden Paraffinblöcken, bzw. Leerschnitten wurden Färbungen zur mikroskopischen Diagnostik angefertigt. Eine erste Begutachtung des Gewebes wurde mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Diese histologische Routinefärbung ermöglicht eine Übersicht und Qualitätsbewertung der Gewebeproben sowie die Lokalisation von Tumorgewebe in Bezug zu nekrotischen Arealen, wie sie für diese Tumorentität sehr häufig sind.

Nekrotisches Gewebe galt es in Anbetracht von typischerweise stark degradiertem und fragmentiertem Genmaterial, inhibitorischen Stoffen und anderen Störfaktoren im Rahmen der DNA-Extraktion für die weitere Analyse möglichst auszuschließen. Zu diesem Zweck wurde nach mikroskopischer Betrachtung bei Bedarf eine Makrodissektion eingesetzt: Mit dem Skalpell wurden nur ausgewählte, möglichst gewebereiche Areale mit wenig Nekrosen vom Objektträger abgekratzt und der DNA-Extraktion zugeführt.

Weiterhin wurden immunhistochemische Färbungen und eine In-situ-Hybridisierung eingesetzt um bestimmte Marker wie Cluster of Differentiation (CD) bzw. EBV-Positivität nachzuweisen oder auszuschließen.

2.3. In-situ-Hybridisierung

Das Probenkollektiv der Studie wurde auf EBV-positive Proben begrenzt., denn EBV-negative Proben erfüllen nicht die diagnostischen Kriterien für extranodale NK-/T-Zell-Lymphome (NKTCLs) der WHO [7]. Der EBV-Nachweis erfolgte mit der In-situ-Hybridisierung, bei der nach Denaturierung des DNA-Doppelstrangs markierte Nukleinsäure-Fragmente (Sonden) an spezifische, komplementäre DNA-Einzelstrang-Abschnitte binden.

Für diese Methode verwendete Sonden variieren in ihrer Länge typischerweise zwischen 20 und 500 Basen. Sie werden mit isotopischen oder nicht-isotopischen Markierungen sichtbar gemacht. Erstere nutzen Radioisotope wie ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P oder ^{33}P . Ihre Verteilung in einer Probe wird mit Hilfe von Röntgenfilm oder Emulsionsautoradiographie festgehalten. Nicht-isotopische Markierungen nutzen Moleküle, die sekundär mit histochemischen oder immunhistochemischen Methoden sichtbar zu machen sind. Am häufigsten werden dafür Biotin und Digoxigenin verwendet.

Isotopische Markierungen sind generell sensitiver und das Ergebnis ist besser quantifizierbar. Nicht-isotopische Markierungen sind demgegenüber weniger zeitaufwendig und erfordern nicht den risikoreicheren Umgang mit radioaktivem Material. Die nicht-isotopische Markierungen werden mit Hilfe von Molekülen wie Avidin, Streptavidin oder Antidigoxigenin-Antikörper sichtbar gemacht, welche mit Enzymen wie der alkalischen Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase konjugiert sind und Reaktionen mit farbigen, schlecht löslichen Produkten katalysieren. Die Farbstoffe akkumulieren und machen dadurch Gewebeareale mit Sonden-markiertem Genmaterial mikroskopisch abgrenzbar.

Für Gewebe mit natürlichem Biotin-Gehalt wie Nieren und Leber ist Digoxigenin besser geeignet um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Alternativ kann enthaltenes Biotin durch die Zugabe von Avidin noch vor der In-situ-Hybridisierung und Färbung gebunden werden. Alkalische Phosphatase ist ebenfalls in verschiedenen Geweben wie dem Gallengangssystem vorhanden. Durch vorangehende Inhibition können daraus resultierende falsch-positive Ergebnisse unterdrückt werden [41].

Für diese Arbeit wurden die Proben nicht-isotopisch auf EBV-Positivität in tumorverdächtigen Zellen untersucht. Dies war für die ggfs. notwendige Makrodissektionen bei der Lokalisation von Tumorgewebe von zusätzlichem Vorteil. Hierzu wurde statt des Nachweises des Virus selbst die Epstein-Barr-Virus encoded small RNA-1 (EBER-1) benutzt. Dabei handelt es sich um ein 167 Nukleotide langes, nicht-kodierendes RNA-Fragment, welches in EBV-infizierten Zellen in hoher Kopienzahl im Zellkern akkumuliert und mit guter Haltbarkeit im Gewebe vorgefunden wird. Die aus Singapur stammenden Proben wurden bereits vor Ort näher analysiert. Daher und in Ermangelung größerer Mengen Probenmaterials wurde in diesen Fällen auf eine erneute Analyse verzichtet.

Die In-situ-Hybridisierung auf EBER wurde unter Verwendung des automatisierten Roche® BenchMark XT IHC/ISH Färbemoduls mit Hilfe des ISH iView Blue Detection Kits durchgeführt. Das paraffinierte Gewebe wird dazu zunächst in Form feiner Schnitte auf Objektträgern vorbehandelt, anschließend hybridisiert und zuletzt das gesuchte Signal mit einer enzymatischen Reaktion detektiert.

Das Gewebe wird zunächst entparaffiniert. Dazu wird der Objektträger auf 75 °C aufgeheizt, für 4 min inkubiert und dreimal abwechselnd mit EZ Prep behandelt und gewaschen. EZ Prep ist eine kommerziell erhältliche Reinigungslösung von Roche® zur lösungsmittelfreien Entparaffinierung. Mit Hilfe von Liquid Coverslip Filmen, einer vorgefertigten Barriereflüssigkeit, wird die Austrocknung der Probe und vermindert. Anschließend wird der Objektträger für 4 min auf 76 °C erhitzt. Trotz des Coverslips verlorengegangenes Volumen muss ausgeglichen werden. Der Objektträger wird nach der Erhitzung erneut gewaschen und mit 100 µl EZ Prep behandelt. Darauf folgt eine zweimalige Zugabe von je 900 µl Waschpuffer, einer natriumzitrathaltigen Lösung, welche unspezifische Bindungen löst. Anschließend wird der Objektträger auf 90 °C erhitzt und für 4 min inkubiert. Nach Zugabe weiterer 300 µl Waschpuffer wird der Objektträger erneut 4 min bei anhaltender Erhitzung inkubiert. Ab dem Ende der Heizphase wird die

Probe für weitere 4 min inkubiert, ehe eine erneute Waschung und Volumen Anpassung erfolgen.

Nachdem ein Coverslip aufgetragen wurde, folgt eine Spülung mit Tris-haltigem Reaktionspuffer und eine Feineinstellung des Volumens. Der Coverslip wird erneuert. Nun wird der Objektträger für 4 min bei 37 °C inkubiert und der Reaktionspuffer-Schritt inklusive neuem Coverslip wiederholt. Um das Ziel der In-situ-Hybridisierung, die zu markierende DNA, durch enzymatischen Verdau von Histonen und anderen Proteinen zu befreien wird ein Tropfen ISH Protease 1 (0,5 U / ml) aufgetragen, dann der Reaktionspuffer-Schritt wiederholt, der Objektträger gewaschen und das Volumen angepasst.

Nach einem weiteren Waschschrift wird 1 Tropfen INFORM EBER aufgetragen. Es handelt sich um eine spezifische, mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierte Oligonukleotid-Sonde, welche mit EBER hybridisiert. Nach einer 4-minütigen Inkubation wird der Objektträger für 12 min auf 85 °C erhitzt und anschließend für weitere 4 min bei 57 °C inkubiert. Diese Schritte dienen der eigentlichen Hybridisierung der gesuchten Nukleinsäuren mit der Sonde. Es folgt eine weitere Inkubationsphase von 1 h, ehe der Objektträger erneut gewaschen und verlorenes Volumen ausgeglichen wird. Drei Waschzyklen folgen ehe zwei weitere Spülungen mit Reaktionspuffer und Volumeneinstellungen durchgeführt werden. Der Coverslip wird wiederholt erneuert und es folgt eine Inkubationsphase von 4 min bei 37 °C.

Nach erneuter Reaktionspuffer-Spülung und Volumeneinstellung wird 1 Tropfen iVIEW ANTI-FLUOR aufgetragen. Es handelt sich um einen anti-FITC-Brücken-Antikörper, welcher die markierten, hybridisierten Sonden bindet. Nachdem ein neuer Coverslip aufgetragen wurde folgt eine Inkubationszeit von 8 min. Zwei Reaktionspuffer-Zyklen folgen ehe 1 Tropfen iVIEW BLUE SA-AP aufgetragen und unter einem Coverslip für 16 min inkubiert wird. Dabei handelt es sich um einen biotinylierten Sekundärantikörper, der den anti-FITC-Brücken-Antikörper bindet und einen Komplex aus Streptavidin und alkalischen Phosphatasen trägt (Abbildung 1).

Nach zwei weiteren Reaktionspuffer-Zyklen wird 1 Tropfen iVIEW BLUE ENHANCER aufgetragen, mit einem Coverslip abgedeckt und für 4 min inkubiert. Anschließend folgen jeweils 1 Tropfen iVIEW BLUE NBT und iVIEW BLUE BCIP und werden für 32 min inkubiert. Diese sind chromogenes Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) bzw. das Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat (BCIP). Die nun von den alkalischen Phosphatasen durchgeführte Reaktion führt zur Präzipitation blauer Farbe im Gewebe am Ort der Hybridisierung. Diese Färbung erlaubt es lichtmikroskopisch EBER-positive von EBER-negativen Zellen abzugrenzen.

Dann folgt nach zwei weiteren Reaktionspuffer-Zyklen noch eine Gegenfärbung mit 1 Tropfen Red Counterstain II und Inkubation unter Coverslip für 8 min. Diese vorgefertigte Gegenfärbung ist speziell für Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes oder gefrorenes Gewebe bei immunhistochemischen Untersuchungen und In-situ-Hybridisierungen vorgesehen. Zuletzt folgen zwei abschließende Waschzyklen mit Reaktionspuffer.

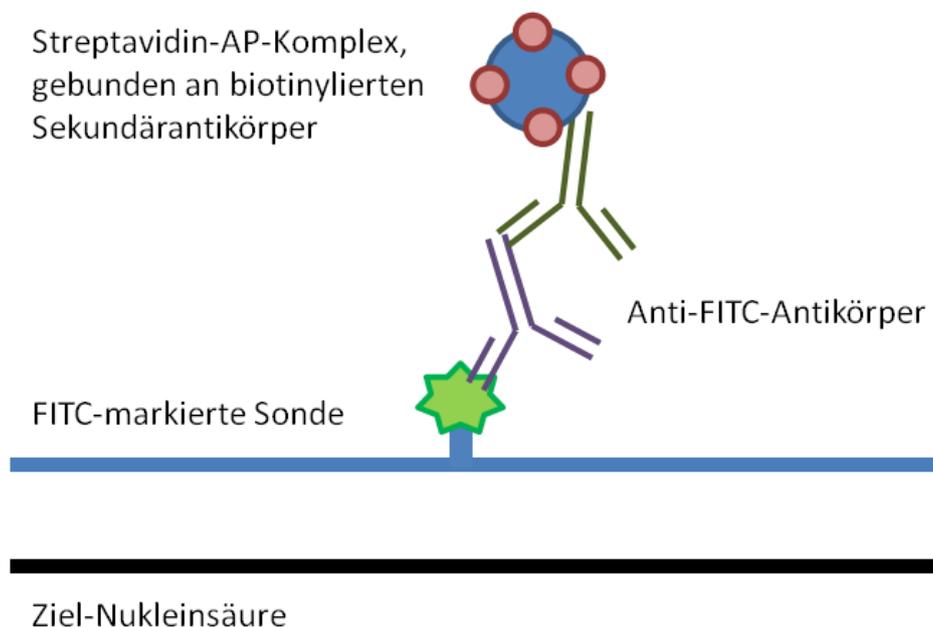


Abbildung 1: Schematische Darstellung der In-situ-Hybridisierung nach Roche®.

2.4. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nach einem der In-situ-Hybridisierung sehr ähnlichen Prinzip mit den BenchMark XT IHC/ISH Färbemodulen von Roche® durchgeführt. Eine Reihe von Proben waren bereits in ihren jeweiligen Herkunftsländern immunhistochemisch abgeklärt worden und es stand zu wenig Probenmaterial für erneute Untersuchungen zur Verfügung. Deshalb können die eingesetzten Antikörper und Verdünnungsstufen (Tabelle 1) in diesen Fällen gewissen Variationen unterliegen.

In unserem Labor gingen wir folgendermaßen vor: Zunächst wird das Gewebe unter Erhitzung mit EZ Prep entparaffiniert. Da anders als bei der In-situ-Hybridisierung spezifische Proteine statt Nukleinsäuren nachgewiesen werden sollen, muss in der Regel noch mit EDTA-Puffer vorbehandelt werden um die Protein-Denaturierung nach Formalin-Fixierung aufzuheben. Es schließen sich eine Reihe von Wasch- und Konditionierungsschritten zur Antigendemaskierung sowie eine Behandlung mit iView INHIBITOR an (3%iges H₂O₂ zur Blockade der endogenen Peroxidase).

Der spezifische Primärantikörper wird sofern nötig mit Hilfe von Antibody Diluent, einem vorgefertigten Antikörper-Lösemittel von Zytomed®, entsprechend verdünnt. Bei ungenügender Verdünnung der Primärantikörper treten häufiger unspezifische Bindungen auf; dies könnte in falsch-positiven oder nicht verwertbaren Ergebnissen resultieren. Das Lösemittel reduziert auch die Oberflächenspannung und erlaubt eine gleichmäßigere Verteilung der Primärantikörper. Die ggfs. verdünnten Antikörper werden von Hand aufgetragen und nach Inkubation und weiteren Waschschritten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper versetzt und inkubiert.

Die Detektion wird nicht wie bei der In-situ-Hybridisierung mit alkalischen Phosphatasen vorgenommen. Stattdessen werden in einem Folgeschritt Streptavidin-HRP-Komplexe aufgetragen und inkubiert, welche an den biotinylierten Sekundärantikörper binden (HRP = horse raddish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase). Bei Zugabe von Wasserstoffperoxid und 3,3'-Diaminbenzidintetrahydrochlorid (DAB) mit Kupfer-Sulfat kommt es in den

spezifisch markierten Gewebearealen zu einer enzymatischen Farbreaktion. Das entstehende braune Präzipitat wird lichtmikroskopisch genutzt um positive von negativen Zellen abzugrenzen.

Äquivalent zur In-situ-Hybridisierung folgt nach der Enzymreaktion noch eine Gegenfärbung des Gewebes mit den vorgefertigten Counterstain #7 bzw. Hämatoxylin-Färbungen mit Bluing Reagent. Alternativ kann Gill's Solution, eine hämatoxylin- und essigsäurehaltige Färbung, eingesetzt werden. Abschließend wird mit Reaktionspuffer gespült. Von den in der nachfolgenden Tabelle 1 vermerkten Abweichungen abgesehen, z. B. dem Einsatz von Verstärkern oder der Anwendung des polymeren OptiView Detection Kits anstelle des iView Blue Systems, wurden die immunhistochemischen Färbungen für die verschiedenen Zielproteine gleichartig durchgeführt.

Tabelle 1: In den immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzte Primärantikörper, ihre Hersteller, Verdünnungsstufen und klonaler Ursprung.

Ziel	Hersteller	VS	Klon	Abweichungen
CD3 ϵ	DCS	1:100	SP7 (monoclonal, rabbit)	-
CD4	Zytomed	1:50	SP35 (monoclonal, rabbit)	mit kommerziellem Verstärker
CD5	Biozol	1:100	SP19 (monoclonal, rabbit)	-
CD7	Novocastra	1:100	LP 15 (monoclonal, mouse)	-
CD8	Dako	1:150	C8/144B (monoclonal, mouse)	nur milde Vorbehandlung
CD20	Dako	1:500	L26 (monoclonal, mouse)	-
CD56	Cell Marque	1:100	MRQ-42 (monoclonal, rabbit)	-
CD117	Dako	1:200	- (polyclonal, rabbit)	-
TIA-1	Biocare Medical	1:50	TIA-1 (mouse, monoclonal)	OptiView
Gra.-B	Cell Marque	Ø	- (polyclonal, rabbit)	OptiView

VS = eingesetzte Verdünnungsstufe, Gra.-B = Granzym-B, Ø = ready-to-use, d. h. keine Verdünnung notwendig.

Beim OptiView Detection Kit trägt der Sekundärantikörper nicht selbst die für die Farbreaktion notwendige Meerrettich-Peroxidase. Stattdessen verfügt er über zahlreiche Bindungsstellen für die enzymtragenden Tertiärantikörper. Dieser Zwischenschritt dient einem Multiplikationseffekt und führt zu einer Verstärkung der Farbstoff-Präzipitation vor Ort.

2.5. DNA-Extraktion

Für die weiteren Analyseschritte musste das genetische Material der eingeschlossenen Proben (Tabelle 2) zunächst von Gewebe, Proteinen, Paraffin und anderen Störsubstanzen separiert werden.

Tabelle 2: Vorhandenes Patientenmaterial nach Art, Menge und Bereitstellungsform für die DNA-Extraktion.

Nr.	Art und Menge	Bereitstellung
1	1 Paraffinblock	Mikrotom
2	1 Paraffinblock	Mikrotom
3	1 Paraffinblock	Mikrotom
4	1 Paraffinblock	Mikrotom
5	3 Leerschnitte 5 µm	Makrodissektion
6	3 Leerschnitte	Abkratzung
7	1 Paraffinblock, 3 Leerschnitte 5 µm	Makrodissektion, Mikrotom
8	3 Leerschnitte 5 µm	Abkratzung
9	3 Leerschnitte 5 µm	Makrodissektion
10	3 Leerschnitte 5 µm	Abkratzung
11	3 Leerschnitte 8 µm	Makrodissektion, 3mal
12	2 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
13	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
14	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
15	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
16	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
17	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
18	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
19	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
20	3 Leerschnitte 8 µm	Makrodissektion
21	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
22	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
23	5 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung, 2mal
24	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
25	3 Leerschnitte 8 µm	Abkratzung
26	1 Paraffinblock	Mikrotom

Lag ein Paraffinblock mit eingebetteter Gewebeprobe vor, wurden mit dem Mikrotom 2 bis 4 Röllchen abgetragen und in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Handelte es sich um Leerschnitte, also Objektträger mit ungefärbtem paraffiniertem Material, wurde mit einem Skalpell im Rahmen der Entparaffinierung eine Makrodissektion zur Vorauswahl des zu untersuchenden Gewebes durchgeführt.

Insbesondere nekrotisches Gewebe und gewebefreie Paraffinstücke wurden von den zu untersuchenden Proben getrennt und verworfen, das gewonnene Material in Eppendorfgefäßen gesammelt. Die Makrodissektion diente der Reduktion ungewünschter Bestandteile in der Analyse: In nekrotischem Gewebe ist Genmaterial meist bereits teilweise abgebaut und stärker fragmentiert, sodass die Analyse erschwert bis nicht mehr möglich ist. Tumorgewebe, das zum Zeitpunkt der Fixierung und Paraffinierung noch intakt ist, wird möglichst vollständig der DNA-Extraktion und folgenden Analysen zugeführt (Abbildung 2).

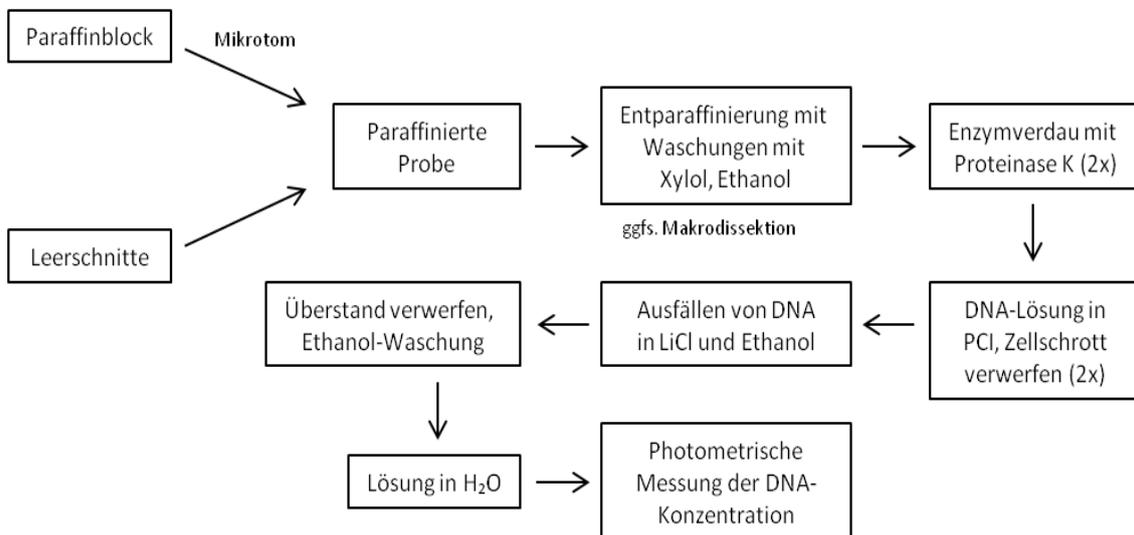


Abbildung 2: Kurzschemata der DNA-Extraktion.

Entparaffinierung: Das gesammelte Gewebe wurde zunächst entparaffiniert. Dabei wird Xylol zugegeben und etwa 10 min einwirken lassen. Nach Entfernung der flüssigen Anteile wird der Schritt mit neuem Xylol wiederholt um

noch verbliebenes Paraffin zu lösen. Darauf folgen 2 Waschungen mit 100%igem Ethanol über jeweils 5 min um nun das eingesetzte Xylol auszuwaschen. Der Überstand wird auch hier beide Male verworfen.

Die Proben sind danach von Paraffin befreit und für den enzymatischen Verdau und weitere Untersuchungsgänge vorbereitet. Bei den von Paraffinblöcken abgetragenen Röllchen wurden diese Waschschrirte in Eppendorfgefäßen vorgenommen. Die Leerschnitte wurden dagegen in xylol- bzw. ethanolhaltigen Glasgefäßen durchgeführt. Im Anschluss an die 2. Waschung mit Ethanol folgte wenn nötig die beschriebene Makrodissektion oder die komplette Abkratzung und Sammlung im Eppendorfgefäß.

Den Gewebeproben wird abschließend 1 ml Ethanol zugegeben, das Eppendorfgefäß zentrifugiert (Biofuge fresco, Hersteller Heraeus®), der Überstand entfernt und die Probe offen in einem Exsikkator (Concentrator 5301, Hersteller Eppendorf®) bei 95 °C getrocknet.

Enzymatischer Verdau: Der folgende enzymatische Verdau benötigt ca. 2 Tage. Hierzu werden zunächst jeweils 300 µl Proteinase K-Puffer zugegeben und die Probe für 10 min bei 95 °C vorerhitzt. Der genannte Proteinase K-Puffer enthält 50 mM Tris und 1 mM EDTA.

Nach kurzer Zentrifugation werden je 20 µl Proteinase K in die Eppendorfgefäße mit den entparaffinierten Proben gegeben. Nach erneuter, kurzer Zentrifugation der Gefäße folgt eine ca. 1 Tag lange Inkubation, mindestens aber für 18 h. Zur Unterstützung der enzymatischen Aktivität geschieht dies bei 56 °C unter stetigem Vermengen in einem Schüttler bei 400 U/min. Am folgenden Tag wird der Prozess mit 10 µl Proteinase K und einer erneuten Inkubation bei 56 °C über Nacht wiederholt. Der wiederholte Verdau dient der Qualitätsverbesserung und dem Ausschluss von störendem Zellschrott und Überresten.

DNA-Extraktion und -Aufreinigung: Nach Abschluss des enzymatischen Verdau folgt die eigentliche DNA-Extraktion und -Aufreinigung. Zu diesem Zweck werden die Eppendorfgefäße kurz mit einem Vortex-Gerät durchmischt und anschließend zentrifugiert.

Dann werden 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, bei einem Mischungsverhältnis von 25:24:1 Teilen) hinzugegeben und der Inhalt erneut vermengt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 13.000 U/min wird der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das gebildete Pellet enthält hauptsächlich Zellschrott und Überreste und wird verworfen.

Im nächsten Schritt werden 150 µl H₂O zugegeben und 5 min zentrifugiert, erneut der Überstand abgenommen und in einem Eppendorfgefäß mit 400 µl PCI gemischt. Nach weiteren 5 min Zentrifugieren werden dem Überstand in einem neuen Eppendorfgefäß 450 µl Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben.

Der nach einer weiteren Zentrifugierung gewonnene Überstand wird dann in einem neuen Eppendorfgefäß mit 40 µl 8 M Lithiumchlorid und 1 ml 100%igem Ethanol vermengt und die Mischung bei Raumtemperatur ½ bis 1 h ruhen gelassen. Genetisches Material wird dabei ausgefällt.

Nach dieser Inkubationszeit wird 30 min bei 13.000 U/min in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und das Gefäß auf einem sauberen Tuch abgetupft, um das entstandene Pellet ausgefallenen Genmaterials nicht zu gefährden.

Anschließend werden 200 µl 70%igen, eisgekühlten Ethanol zugegeben, um verbliebenes Chloroform auszuwaschen, und danach wieder 5 min zentrifugiert. Die 200 µl 70%igen Ethanol werden größtenteils durch Abkippen entfernt und verworfen. Da auch dieser Reinigungsschritt das präzipitierte Genmaterial gefährden kann, wird der restliche Ethanol-Überstand im Anschluss sehr vorsichtig abpipettiert. Dann noch verbliebenes Ethanol verdunstet durch offene Trocknung in einem Exsikkator bei 95 °C für 10 min.

Konzentrationseinstellung: Zuletzt werden den Pellets aus extrahiertem Genmaterial je 50 µl H₂O zugegeben. Um die gewonnene DNA wieder zu lösen, ist sehr gründliches Vermengen notwendig: Die Eppendorfgefäße werden zur Resuspension mit dem Vortexer vermischt und für mindestens 5 min geschüttelt. Die erhaltene Mischung wird anschließend einer Konzentrationsmessung unterzogen und für nachfolgende Analysen bei -20 °C in einer Tiefkühltruhe gelagert.

Die DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe mit Mischungen von H₂O und DNA-Suspension hergestellt und die optische Dichte (OD, optical density) gemessen. Die getesteten Verdünnungen waren 1:10 (4 µl Suspension + 36 µl H₂O), 1:100 (4 µl 1:10 Verdünnung + 36 µl H₂O) und 1:200 (1 µl Suspension + 199 µl H₂O).

Von diesen Verdünnungen wiederum wurden in der Photometrie je 3 µl mit 72 µl H₂O in der Photometrie eingesetzt. Die Suspensionen können anschließend verdünnt bzw. mit größerer Menge von Material in nachfolgenden Untersuchungsschritten verwendet werden.

2.6. PCR, Übersicht

Das Akronym PCR steht für Polymerase Chain Reaction, eine enzymatische Methode zur Vermehrung von ausgewählten DNA- oder auch RNA-Sequenzen [42]. Die Qualität der extrahierten DNA unserer Proben wurde mit einer Qualitäts-PCR geprüft. Für die Mutationsanalysen wurden Amplifikations- und Sequenz-PCRs durchgeführt. Es folgt eine zusammenfassende, tabellarische Auflistung (Tabelle 3) der für diese Studie eingesetzten PCRs, ihrer Primer und der wichtigsten Reaktionsparameter. Genauere Beschreibungen finden sich in den entsprechenden Abschnitten.

Tabelle 3: Zusammenfassung der angewandten PCRs nach Gen und Exon.

Gen		Exon	Primer-Sequenz		Seg.	Primer	DNA (+H ₂ O)	Puffer (+MgCl ₂)	dNTP	Taq	PCR
Qualitäts-PCR	AF4	3	F	GGAGCAGCATTCCATCCAGC	100	2 µl (Mix)	1 µl bzw. 100 ng + 16,2 µl H ₂ O	2,5 µl (10x) + 2 µl MgCl ₂ (2 mM)	1 µl (0,2 mM)	0,3 µl	Zyklen 35 AP 60 °C 45 sec
			B	CATCCATGGGCCGGACATAA							
	AF4	11	F	CCGCAGCAAGCAACGAACC	200						
			B	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC							
	PLZF	1	F	TGCGATGTGGTCATCATGGTG	300						
			B	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC							
	RAG1	2	F	TGTTGACTCGATCCACCCCA	400						
			B	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA							
	TBXAS	9	F	GCCCGACATTCTGCAAGTCC	600						
			B	GGTGTGGCCGGGAAGGGTT							
Amplifikations-PCR	C-KIT	9	S1	F TGAAAAACGACGGCCAGTAGCCAGGGCTTTTGTTTTCT	128	2 µl bzw. fwd 1 µl bwd 1µl	2 µl bzw. 200 ng + 39 µl H ₂ O bis 5 µl bzw. 500 ng + 36 µl H ₂ O	5 µl (10x)	2 µl (0,2 mM)	0,3 µl	Zyklen 55 AP 56 °C 75 sec
			B	CAGGAAACAGCTATGACTACATTCAACCGTGCCATTG	135						
		S2	F	TGAAAAACGACGGCCAGTTTGGAAAGCTAGTGGTTCAGAG							
			B	CAGGAAACAGCTATGACCAGAGCCTAAACATCCCCTTA							
	C-KIT	11	S1	F TGAAAAACGACGGCCAGTGGTGATCTATTTTTCCCTTTCTCC	100						
			B	CAGGAAACAGCTATGACCCCATTTGTGATCATAAGGAAG	100						
		S2	F	TGAAAAACGACGGCCAGTTGTTGAGGAGATAAATGGAAACAA							
			B	CAGGAAACAGCTATGACACCCAAAAAGGTGACATGGA							
	C-KIT	17	S1	F TGAAAAACGACGGCCAGTTGGTTTTCTTTCTCCTCCAA	98						
			B	CAGGAAACAGCTATGACTCATTCTTGATGTCTCTGGCTA							
		S2	F	TGAAAAACGACGGCCAGTCTTACTCATGGTCGGATCAC	88						
			B	CAGGAAACAGCTATGACTGCAGGACTGTCAAGCAGAG							
	CTNNB1	3	S1	F TGAAAAACGACGGCCAGTGCTGATTTGATGGAGTTGGA	148						
			B	CAGGAAACAGCTATGACTCCTCAGGATTGCCTTTACC							
S2		F	TGAAAAACGACGGCCAGTTTCTGGTGCCACTACCACAG	134							
		B	CAGGAAACAGCTATGACCCAGCTACTTGTCTTGAGTGAA								

Fortsetzung von Tabelle 3: Zusammenfassung der angewandten PCRs nach Gen und Exon.

Gen		Exon		Primer-Sequenz		Seg.	Primer	DNA (+H ₂ O)	Puffer (+MgCl ₂)	dNTP	Taq	PCR
Sequenz-PCR	C-KIT	9	S1	F	TGTA AACGACGGCCAGTAGCCAGGGCTTTTGT TTTCT	128	1 µl (fwd oder bwd)	3 µl bis 7 µl (Amplifikat) + 4 µl bis 0 µl H ₂ O	2 µl (PCR Master Mix)			Zyklen 30 AP 50 °C 20 sec
				B	CAGGAAACAGCTATGACTACATTCAACCGTGCCATTG							
		S2	F	TGTA AACGACGGCCAGTTTGGAAAGCTAGTGGTTCAGAG	135							
			B	CAGGAAACAGCTATGACCAGAGCCTAAACATCCCCTTA								
	C-KIT	11	S1	F	TGTA AACGACGGCCAGTG GTGATCTATTTTCCCTTTCTCC	100						
				B	CAGGAAACAGCTATGACCCCATTTGTGATCATAAGGAAG							
		S2	F	TGTA AACGACGGCCAGTTGTTGAGGAGATAAATGGAAACAA	100							
			B	CAGGAAACAGCTATGACACCCAAAAGGTGACATGGA								
	C-KIT	17	S1	F	TGTA AACGACGGCCAGTTGGTTTTCTTTCTCCTCAA	98						
				B	CAGGAAACAGCTATGACTCATTCTTGATGTCTCTGGCTA							
		S2	F	TGTA AACGACGGCCAGTCCTTACTCATGGTCGGATCAC	88							
			B	CAGGAAACAGCTATGACTGCAGGACTGTCAAGCAGAG								
CTNNB1	3	S1	F	TGTA AACGACGGCCAGTGCTGATTTGATGGAGTTGGA	148							
			B	CAGGAAACAGCTATGACTCCTCAGGATTGCCTTTACC								
	S2	F	TGTA AACGACGGCCAGTTTCTGGTGCCACTACCACAG	134								
		B	CAGGAAACAGCTATGACCCAGCTACTTGTCTTGAGTGAA									

S1, S2 = Teilsegment 1 bzw. 2, F bzw. fwd = Forward, B bzw. bwd = Backward, Seg. = amplifizierte Segmentlänge in Basenpaaren, Taq=eingesetzte Taq-Polymerase, AP = Dauer der Annealing-Phase in Sekunden.

2.7. Qualitäts-PCR

Im Falle der Qualitäts-PCR werden mit Hilfe von 5 definierten Primer-Paaren DNA-Stücke der Länge 100, 200, 300, 400 und 600 Basenpaare (bp) amplifiziert. Mit einer Gelelektrophorese werden diese Amplifikate anschließend nach deren Länge aufgetrennt, sichtbar gemacht und anhand der Nachweisbarkeit der Banden eine Aussage über die Qualität der DNA und gegebenenfalls die Ausprägung ihrer Degradation in der vorliegenden Probe getroffen. Die notwendigen Primer (Tabelle 4) wurden als Stocks vorbereitet und eingefroren, d. h. bereits im korrekten Mischungsverhältnis als Primer-Mix bereitgestellt.

Tabelle 4: Im Rahmen der Qualitäts-PCR eingesetzte Primer.

Primer	Sequenz	Produkt
AF4/X3U	GGAGCAGCATTCCATCCAGC	100 bp
AF4/X3L	CATCCATGGGCCGGACATAA	
AF4/X11U	CCGCAGCAAGCAACGAACC	200 bp
AF4/X11L	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC	
PLZF/X1U	TGCGATGTGGTCATCATGGTG	300 bp
PLZF/X1L	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC	
RAG1/X2U	TGTTGACTCGATCCACCCCA	400 bp
RAG1/X2L	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA	
TBXAS1/X9U	GCCCGACATTCTGCAAGTCC	600 bp
TBXAS1/X9L	GGTGTGCGCGGAAGGGTT	

bp = Basenpaare, Produkt = Länge des generierten DNA-Segments.

Die einzelnen Primer wurden mit einer Konzentration von 100 pmol/ μ l gelagert. Um im Primer-Mix für die Qualitäts-PCR die gewünschte Konzentration von 2,5 pmol/ μ l für das Primer-Paar AF4/X3 bzw. von 1,25 pmol für die anderen Primer-Paare zu erreichen, wurden jeweils 5 μ l (pro AF4/X3-Primer) bzw. 2,5 μ l (andere Primer) mit 170 μ l H₂O vermischt. Der entstehende Primer-Mix wurde dann als 200 μ l Stock konserviert und wiederholt eingesetzt.

Für die Qualitäts-PCR wurden von diesem Primer-Mix 2 μ l in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurden 100 ng (1 μ l bei einer Verdünnung von 100 ng/ μ l) des zu amplifizierenden Genmaterials zusammen mit den einzelnen

vorliegenden Nukleotiden als Material zur Konstruktion neuer DNA-Stränge (0,2 mM dNTP, 1 µl), Magnesiumdichlorid (2 mM, 2 µl) und PCR-Puffer (10fach, 2,5 µl) eingesetzt. Als katalysierendes Enzym wurden 0,3 µl Taq Gold DNA-Polymerase verwendet und das PCR-Reaktionsgefäße mit 16,2 µl H₂O auf insgesamt 25 µl aufgefüllt, d. h. 24 µl Reaktionsmischung plus 1 µl zu amplifizierendes Genmaterial. Um den Aufwand zu verringern, wurden die Reaktionsmischungen nicht separat pipettiert. Stattdessen wurde auf die Anzahl der zu amplifizierenden Proben hochgerechnet und das Zielvolumen um den stets beizufügenden Leerwert als Negativkontrolle und eine weitere Eppendorfgefäß-Füllung als für mögliche Schwankungen in der Pipettierung erhöht. Die hergestellte Reaktionsmischung wurde anschließend á 24 µl auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Erst im nächsten Schritt folgte jeweils das Genmaterial á 1 µl auf einem Kühlblock nach. Anschließend gingen die Reaktionsgemische möglichst rasch in die eigentliche PCR-Reaktion.

Im Fall der Qualitäts-PCR lief die Reaktion nach folgendem Schema ab: Zunächst wurde zum Zwecke der DNA-Denaturierung (d. h. Trennung der gepaarten, gegenläufigen DNA-Einzelstränge voneinander, Forward und Backward) für 7 min bei 95 °C vorgekocht. Anschließend folgten 35 Zyklen: 45 sec bei 60 °C (zur Anlagerung bzw. zum Annealing von Primern und freien Nukleotiden), 90 sec bei 72 °C (Temperaturoptimum für Taq-Polymerase, Verbindung der Nukleotide zu neuen DNA-Strängen) und 45 sec lang Denaturierung bei 95 °C (zur Abspaltung der neuen DNA-Einzelstränge von den Matrizen). Mit jedem Zyklus der Qualitäts-PCR wurden die 5 zu amplifizierenden DNA-Stücke vermehrt. Nach Ablauf des letzten Zyklus folgte eine 10 minütige Phase bei 72 °C zur abschließenden Amplifikation. Zuletzt wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und zwischengelagert, bis sie der weiteren Analyse zugeführt werden konnten.

Für die Amplifikate der Qualitäts-PCR bestand dies in einer Gelelektrophorese. DNA weist eine deutlich negative Ladung auf; von der Geschwindigkeit mit der die Amplifikate unter Spannung durch ein Agarosegel wandern kann auf ihre Größe rückgeschlossen werden.

Wir verwendeten durchweg 2%ige Agarosegels. Die Gelplatten wurden mit Biozym ME (2 g), 1fachem Trisborsäure-EDTA-Puffer (100 ml) und Ethidium-Bromid (15 µl) mit den üblichen Schutzmaßnahmen hergestellt. Der Puffer wurde gewöhnlich in größerer Menge (25 l) vorbereitet, 216 g Tris mit 133,6 g Borsäure, 14,8 g EDTA auf 5 l H₂O, anschließend mit 20 l H₂O auf die Zielkonzentration. Der fertige Puffer wurde mit Biozym ME mit dem Magnetstabmixer vermennt, anschließend in der Mikrowelle für 5 min aufgeköcht und im Wasserbad abgekühlt und verrührt, dann das Ethidium-Bromid hinzugefügt und erneut gemixt. Zuletzt wurden die Plattenformen mit Kämmen bestückt und das Gel eingegossen. Das Gel musste 30 min abkühlen, um fest zu werden. Die Kämmen bilden Taschen im fertigen Agarosegel aus, die mit der Analyseprobe beimpft werden.

Hierzu wurde das Agarosegel in eine gepufferte Elektrophorese-Lösung in der Gelelektrophoresekammer verbracht. Auf eine saubere Unterlage wurden einige Tropfen einer Farbmarkierung mit Bromphenolblau gegeben und mit der jeweiligen Probe vermennt, anschließend die Mischungen in je eine der Taschen des Agarosegels überimpft. Auf die gleiche Weise wurde mit dem Leerwert der Qualitäts-PCR als Kontrolle gegen Verunreinigungen im Reaktionsgemisch und unspezifische Amplifikationen und mit einer DNA-Ladder verfahren. Diese enthält vorgegebene Fragmentlängen als Vergleichswerte zu den zu analysierenden Proben und erlaubt so eine Abschätzung der Basenpaarlängen der Amplifikate (Abbildung 3).

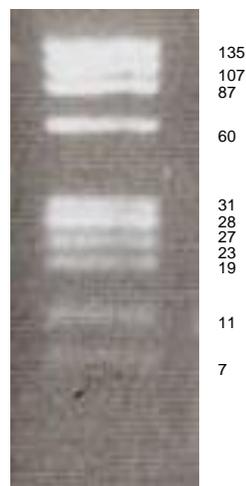


Abbildung 3: DNA-Ladder (φX174 DNA/BsuRI (Hae III) Marker, 9) mit Angabe der den einzelnen Banden entsprechenden Basenpaarlängen.

Anschließend wurde eine Spannung von 120 Volt an das Agarosegel angelegt und die Auftrennung abgewartet. Die Wanderung der DNA-Fragmente nimmt einige Zeit in Anspruch und kann anhand der Farbmarkierung mitverfolgt werden. Nach 30-45 min waren die zu untersuchenden Amplifikate ausreichend aufgetrennt und bildeten ihrer Länge entsprechend Banden im Agarosegel. Das dem Agarosegel beigefügte Ethidium-Bromid fluoresziert unter UV-Licht; es lagert sich an das amplifizierte Genmaterial an und erlaubt so die entstehenden Banden in einer abgedunkelten Fotokammer mit ultravioletter Beleuchtung für die Bilddokumentation sichtbar zu machen.

Je besser die längeren Banden nachweisbar sind, desto höher ist die Qualität der extrahierten DNA. Das Qualitätsziel sollte minimal jene Basenpaarlänge sein, die auch Ziel der spezifischen PCR-Amplifikationen ist. Unter Berücksichtigung der untersuchten DNA-Abschnitte waren in unserer Studie also Fragmente einer Länge von mindestens 200, möglichst 300 Basenpaaren (bp) anzustreben, da das längste zu amplifizierende DNA-Stück, das Exon 3 des *CTNNB1* Gens, 228 bp umfasst.

Sind keinerlei Banden nachweisbar oder zeigt sich nur eine ungeformte, wolkenhafte Aufhellung, so spricht dies für eine sehr ausgeprägte Degradation des Genmaterials in der Probe. Die ungeformte Aufhellung kommt durch die Wanderung der Primer und freien Nukleotide zustande.

2.8. Amplifikations-PCR

Ziel dieser Arbeit war es, das internationale Probenkollektiv von extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen (NKTCLs) auf Mutationen in den Genen *C-KIT* und *CTNNB1* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden folgende spezifische Genabschnitte ausgewählt: Exons 9, 11 und 17 des *C-KIT* Gens, sowie Exon 3 des *CTNNB1* Gens. Für die Sequenzierung und Analyse auf Mutationen mussten diese Genabschnitte amplifiziert werden. Das Prinzip dieser PCR ist das gleiche wie bei der Qualitäts-PCR, mit Ausnahme einiger Details bei der Herstellung des Reaktionsgemisches:

Das Zielvolumen des Reaktionsgemisches betrug 49,3 µl und setzte sich zusammen aus 5 µl Puffer (inklusive MgCl₂), 2 µl dNTP Nukleotiden, 1 µl Forward-Primer sowie 1 µl Backward-Primer und 0,3 µl Tag Gold DNA-Polymerase. Hinzu kamen standardmäßig 38 µl H₂O und 2 µl Probe (200 ng). Die Proben wurden kontinuierlich bei -20 °C gelagert und bei Bedarf frisch aufgetaut, mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und kurz zentrifugiert. Abweichend davon wurden je nach Ergebnis der Qualitäts-PCR auch mehr als 2 µl Probe eingesetzt, um bei sehr degradierter DNA eine größere Menge Genmaterial für die Amplifikation bereitzustellen. Die eingesetzten Mengen lagen in diesen Fällen zwischen 2 µl und 5 µl. Entsprechend des eingesetzten Probenvolumens wurde weniger H₂O zugegeben.

Ähnlich wie bei der Durchführung der Qualitäts-PCR war es auch hier sinnvoll, zunächst eine größere Menge an Reaktionsgemisch ohne Probenzusatz herzustellen. Anschließend wurden für die einzelnen Proben adäquate Mengen H₂O in Reaktionsgefäße gegeben, das unverdünnte Reaktionsgemisch hinzugefügt und erst im letzten Schritt die Proben eingebracht. Danach lief die Amplifikation wie bei der Qualitäts-PCR ab. Als Annealing-Temperatur wurden allerdings 56 °C gewählt und standardmäßig 55 Zyklen gefahren. In Einzelfällen wurden die PCR-Bedingungen variiert, z. B. bei besonders schlechter DNA-Qualität mehr Zyklen gefahren oder die Dauer der Annealing-Phase modifiziert. Zur Amplifikation kamen M13-markierte Primer zum Einsatz (Tabelle 5). M13 stellt einen Vorlauf des Primers dar, der nicht komplementär zum DNA-Teilstück ist, das amplifiziert wird, aber die Erfolgsraten der nachfolgenden Sequenz-PCR durch verbesserte Anlagerung und Stabilität steigern kann.

Tabelle 5: Eingesetzte M13-Teilsegmente.

M13-Forward	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-Backward	CAGGAAACAGCTATGAC

Die den M13-Segmenten nachfolgenden DNA-Abschnitte stellen die eigentliche, zur Matrize komplementäre Primer-Sequenz dar (Tabelle 6). Diese können für verschiedenste Bindungsstellen konzipiert werden und

beispielsweise im dem Exon vorangehenden Intron, zu Beginn des Exons oder auch innerhalb des Exons binden, was für die anschließend beschriebenen exoninternen, überlappenden Primer von Bedeutung ist.

Tabelle 6: Eingesetzte M13-markierte Primer-Paare (Forward und Backward, nicht überlappend, nicht Exon-intern).

C-KIT	Forward	Backward	Produkt
Exon 9	TGTA AACGACGGCCAGTA GCCAGGGCTTTTGT TTTCT	CAGGAAACAGCTATGACCA GAGCCTAAACATCCCCTTA	194 bp
Exon 11	TGTA AACGACGGCCAGTGGT GATCTATTTTTCCCTTTCTCC	CAGGAAACAGCTATGACAC CCAAAAAGGTGACATGGA	129 bp
Exon 17	TGTA AACGACGGCCAGTTG GTTTTCTTTTCTCCTCCAA	CAGGAAACAGCTATGACTG CAGGACTGTCAAGCAGAG	123 bp
CTNNB1	Forward	Backward	Produkt
Exon 3	TGTA AACGACGGCCAGTG CTGATTTGATGGAGTTGGA	CAGGAAACAGCTATGACCCA GCTACTTGTTCTTGAGTGAA	228 bp

bp = Basenpaare, Produkt = Länge des generierten DNA-Segments.

Um die Erfolgsrate zu steigern, wurden auch andere Amplifikationsansätze erprobt, welche nur sehr bedingt zielführend waren und darum nur in Kürze erwähnt werden sollen.

Phusion Hot Start z. B. nutzt ein anderes Enzym zur PCR, welches eine deutlich höhere Replikationsgenauigkeit und Geschwindigkeit vorweisen soll als die hauptsächlich angewandte Taq Gold DNA-Polymerase. Mit Hilfe eines speziellen HF-Puffers sollten insbesondere Adenosin- und Thydim-reiche DNA-Stücke amplifiziert werden können, während ein dedizierter GC-Puffer für Guanodin- und Cytidin-reiche DNA-Abschnitte vorteilhaft sei.

Auch Nested-PCR wurde eingesetzt, bei der die Amplifikationsprodukte einem weiteren Amplifikationsschritt unterzogen werden. Auf diese Weise hofften wir, die schlechte DNA-Qualität auszugleichen. Bei dieser Technik werden Primer eingesetzt, welche innerhalb des ersten Amplifikats ansetzen und damit das Produkt der ersten PCR als Matrize zur Vervielfachung nutzen. Ist der Erfolg der ersten PCR entsprechend der Gelelektrophorese gering, lässt sich dieser unter Umständen durch eine solche Nested-PCR verbessern. Hierbei wurden 40 Zyklen gefahren, in Sonderfällen bis zu 60. Die eingesetzten Amplifikat-

Mengen wurden in Abhängigkeit des Ergebnisses der Gelelektrophorese nach der vorhergehenden PCR festgelegt und lagen zwischen 1 µl und 3 µl.

Der Erfolg dieser zusätzlichen Ansätze war in unserer Studie jedoch eher gering: Insbesondere Proben mit sehr schlechter DNA-Qualität wiesen wiederholt Amplifikations-Fehlschläge auch bei variierten Methoden, Primern und PCR-Bedingungen auf. Aus diesem Grund musste eine alternative Lösung gefunden werden. Anstatt die vermutlich stark fragmentierten, zu untersuchenden DNA-Abschnitte im Ganzen zu amplifizieren, wurden Primer für Bereiche innerhalb des jeweiligen Exons geplant. Die Exons wurden so für eine sekundäre Zusammenschau und Analyse auf jeweils zwei Teilsegmente aufgeteilt (Abbildung 4). Bei stark degradiertem DNA und Strangabbrüchen konnten mit dieser Methode die Chancen auf eine vollständige oder zumindest teilweise erfolgreiche Amplifikation erhöht werden.

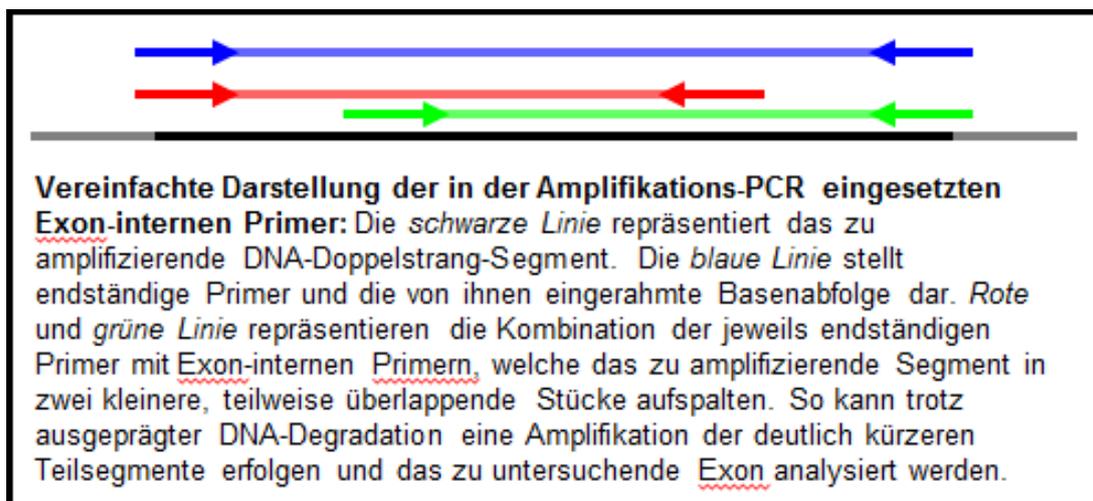


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des überlappenden Primer-Konzepts.

Das Reaktionsgemisch wurde für diesen Ansatz nur minimal variiert: 5 µl Puffer (inkl. MgCl₂), 2 µl dNTP Nukleotide, 1 µl Forward-Primer sowie 1 µl Backward-Primer und 0,3 µl Tag Gold DNA-Polymerase. 39 µl H₂O und 2 µl Probe brachten das Endvolumen auf 50,3 µl. Die PCR-Prozedur wurde zunächst variiert, zeigte jedoch die besten Ergebnisse mit 55 Zyklen und einer Annealing-Temperatur und -zeit von 56 °C bzw. 75 sec nach 1-minütigem Vorkochen bei

95 °C. Der größte Unterschied lag in der Wahl der Primer: Da jedes der zu amplifizierenden Exons in zwei Teilsegmente aufgespalten wurde, mussten entsprechend auch zwei separate Amplifikationen pro Probe durchgeführt werden. Hierfür wurden stets ein endständiger mit einem Exon-internen Primer kombiniert (Tabelle 7), also Forward (endständig) mit Backward (Exon-intern), bzw. Forward (Exon-intern) mit Backward (endständig). Wurde in Kombination mit überlappenden, Exon-internen Primern eine Nested-PCR durchgeführt, so wurden M13-unmarkierte Primer (endständig bzw. Exon-intern) eingesetzt.

Tabelle 7: Eingesetzte M13-markierte Primer-Paare, Forward und Backward, überlappend beziehungsweise Exon-intern, nach Teilsegmenten S1 und S2 aufgeschlüsselt.

C-KIT		Forward	Backward	Produkt
Exon 9	S1	TGAAAACGACGGCCAGTA GCCAGGGCTTTTGTCT	CAGGAAACAGCTATGACTA CATTCAACCGTGCCATTG	128 bp
	S2	TGAAAACGACGGCCAGTTT GGAAAGCTAGTGGTTCAGAG	CAGGAAACAGCTATGACCA GAGCCTAAACATCCCCTTA	135 bp
Exon 11	S1	TGAAAACGACGGCCAGTGGT GATCTATTTTTCCCTTCTCC	CAGGAAACAGCTATGACCCC ATTTGTGATCATAAGGAAG	100 bp
	S2	TGAAAACGACGGCCAGTTGT TGAGGAGATAAATGGAAACAA	CAGGAAACAGCTATGACAC CCAAAAGGTGACATGGA	100 bp
Exon 17	S1	TGAAAACGACGGCCAGTTG GTTTTCTTTCTCCTCCAA	CAGGAAACAGCTATGACTCA TTCTTGATGTCTCTGGCTA	98 bp
	S2	TGAAAACGACGGCCAGTCC TACTCATGGTCGGATCAC	CAGGAAACAGCTATGACTG CAGGACTGTCAAGCAGAG	88 bp
CTNNB1		Forward	Backward	
Exon 3	S1	TGAAAACGACGGCCAGTG CTGATTTGATGGAGTTGGA	CAGGAAACAGCTATGACTC CTCAGGATTGCCTTTACC	148 bp
	S2	TGAAAACGACGGCCAGTT TCTGGTGCCACTACCACAG	CAGGAAACAGCTATGACCCA GCTACTTGTCTTGAGTGAA	134 bp

S1, S2 = Teilsegment 1 bzw. 2, bp = Basenpaare, Produkt = Länge des generierten DNA-Segments.

2.9. Gelelektrophorese der Amplifikate

Wie bei der Qualitäts-PCR wurden Agarosegelelektrophoresen der Amplifikate für die zu untersuchenden *C-KIT*- bzw. *CTNNB1*-Exons der Proben durchgeführt. Da hier pro Amplifikations-PCR jeweils nur ein Primer-Paar eingesetzt wurde, war dementsprechend auch nur eine sichtbare Bande als Zielwert zu erwarten.

War eine Bande sauber abgrenzbar, so sprach dies für eine erfolgreiche Amplifikation. In diesen Fällen konnte das Amplifikat den nachfolgenden Schritten (Aufreinigung und Sequenz-PCR) zugeführt werden. War dies nicht der Fall, so musste die Amplifikations-PCR wiederholt werden bzw. eine andere Herangehensweise oder Variation versucht werden. Abhängig vom Ergebnis der Gelelektrophorese wurde das einzusetzende Volumen an Amplifikat für die folgende Sequenz-PCR festgelegt.

2.10. Aufreinigung mit AMPure®

Die Amplifikate mussten vor der Sequenz-PCR zunächst aufgereinigt werden, um sie von ungewünschten DNA-Fragmenten, verbliebenen freien Nukleotiden, Salzen, Enzymen und anderen möglichen Kontaminanten zu befreien, welche die Reaktion stören könnten. Zu diesem Zweck wurde das kommerzielle System Agencourt® AMPure® von Beckman Coulter® zur paramagnetischen PCR-Aufreinigung verwendet. Es ist für Amplifikate einer Länge von mindestens 100 Basenpaaren geeignet; kürzere Fragmente oder freie Nukleotide und andere Kontaminanten werden ausgewaschen [43].

Zunächst wurde AMPure-Reagenz resuspendiert und 70%iger Ethanol vorbereitet. Auf je 10 µl Amplifikat kamen 18 µl AMPure. Die Mischungen wurden vermengt und mit dem Vortexer für 30 sec gründlich gemischt. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation der Proben. In dieser Phase begann die Bindung der DNA-Stränge an die in dem AMPure-Reagenz enthaltenen Partikel (paramagnetische Beads). Die Inkubation wurde auf einer Magnetplatte für 10 min fortgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Magnete sich möglichst an der Spitze der Reaktionsgefäße befanden. Die Beads sammeln sich dann mit den an sie gebundenen DNA-Strängen am tiefsten Punkt der Reaktionsgefäße an, während Verunreinigungen zum größten Teil im Überstand verbleiben.

Nach dieser Inkubationsphase wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, ohne die Beads aufzuwirbeln oder gar zu verwerfen. Anschließend wurden je 200 µl 70%iger Ethanol beigegeben und die Mischung für 30 sec inkubiert.

Der Überstand wurde erneut abpipettiert und ein zweiter Waschschrift mit 200 µl 70%igem Ethanol durchgeführt sowie möglichst der gesamte restliche Überstand mit feineren Pipetten entfernt. Die Reaktionsgefäße wurden von der Magnetplatte genommen und für 20 min offen stehengelassen, sodass verbliebener Ethanol verdunsten konnte und bestenfalls nur Beads mit gebundenen DNA-Strängen in den Reaktionsgefäßen übrig blieben. Nach der Trocknung kamen je 40 µl H₂O hinzu, die schwer löslichen Beads wurden gründlich mit dem Vortexer resuspendiert. Die aufgereinigten Amplifikate waren nun für die folgende Sequenz-PCR vorbereitet.

2.11. Sequenz-PCR

Vor der Sequenzierung mussten die Amplifikate einer weiteren Form von PCR unterzogen werden. Das Amplifikat wurde jeweils zweimal erneut eingesetzt: Da es aus zwei gegenläufigen, gebundenen DNA-Einzelsträngen besteht, mussten beide Stränge zunächst separat vermehrt werden um je eine Sequenzierung in Forward- und in Backward-Richtung zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde für die Sequenz-PCR jeweils einmal nur der Forward- bzw. nur der Backward-Primer eingesetzt. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden entsprechend der Primer-Ausrichtung farbig gewählt.

Auch das Reaktionsgemisch unterschied sich in Menge und Zusammensetzung deutlich von den zuvor beschriebenen Amplifikationsgemischen: Das Zielvolumen betrug 10 µl pro Probe, wovon 2 µl auf den sogenannten Sequenz-PCR Master Mix entfielen. Diese vorgefertigte Mischung enthält Pufferlösung, DNA-Polymerase und freie Nukleotide. Ein Teil der Nukleotide ist Fluoreszenzmarkiert mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen für Adenosin, Thymin, Guanin und Cytidin [44]. Sie sind darüber hinaus so modifiziert, dass eine Verlängerung des DNA-Strangs und eine Verknüpfung zum nächsten Nukleotid nicht möglich ist: Es fehlt eine zur Strangverlängerung notwendige Hydroxyl-Gruppe, somit kann kein weiteres Nukleotid kovalent gebunden werden und es kommt zum Abbruch. Sie werden darum in Bezug auf ihre farbige Markierung und auf den Strangabbruch auch Dye Terminator Nukleotide genannt [44].

Da diese modifizierten Nukleotide zufällig an die zu amplifizierenden DNA-Stränge binden, finden diese Kettenabbrüche entsprechend an zufälligen Stellen statt. Durch die Anzahl der Replikationen während der wiederholten PCR-Zyklen entstehen so DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen mit Fluoreszenzmarkierung an ihrem 3'-Ende. Diese können später gemessen und die Sequenz so Stück für Stück analysiert werden.

Neben dem Master Mix enthielt das Sequenz-PCR-Reaktionsgemisch 1 µl Primer (Forward oder Backward, ggfs. von Teilsegment 1 oder 2 bei Amplifikationen mit überlappenden, Exon-internen Primern) und einer variablen Menge mit AMPure® aufgereinigten Amplifikats und H₂O. Die eingesetzte Menge Amplifikat wurde in Abhängigkeit vom Ergebnis der vorgeschalteten Gelelektrophorese ausgewählt und lag zwischen 3 µl und 7 µl. Dementsprechend schwankte das verwendete H₂O-Volumen zum Erreichen des Zielvolumens von 10 µl zwischen 4 µl und 0 µl.

Die PCR lief für 30 Zyklen: Zunächst kurzes Vorkochen mit 96 °C für 20 sec, eine 20-sekündige Annealing-Phase bei 50 °C und 4 min bei 60 °C zur DNA-Polymerisation. Nach Abschluss der Sequenz-PCR, aber vor Durchführung der Sequenzierung, musste das Produkt erneut aufgereinigt werden.

2.12. Aufreinigung mit CleanSEQ®

Um Störfaktoren wie freie Nukleotide, Salze und andere Kontaminanten vor der Sequenzierung aus dem Sequenz-PCR-Produkt zu entfernen, musste ein weiterer Aufreinigungsschritt durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde das kommerzielle Produkt Agencourt® CleanSEQ® von Beckman Coulter® eingesetzt. Es handelt sich um ein ähnliches, ebenfalls auf Beads basierendes System zur Aufreinigung wie AMPure® [45]. Ein großer Vorteil dieser Herangehensweise war es, dass die Aufreinigung direkt in der 96-Well-Platte durchgeführt werden konnte, aus welcher heraus auch die Sequenzierung stattfand. Auf diese Weise konnten die Zahl der Transferschritte und somit der Aufwand und das Risiko für Kontaminationen verringert werden.

Zunächst wurde CleanSEQ-Reagenz resuspendiert, 85%iger Ethanol vorbereitet und Sample Loading Solution (SLS) aufgetaut. Bei SLS handelt es sich um ein Medium zur Lösung des Sequenz-Produkts von den magnetischen Beads nach Abschluss der Aufreinigung. Laut Herstellerangaben kann zu häufig aufgetaute und wieder eingefrorene SLS zu verringerter Signalintensität bei oder sogar zu einem kompletten Scheitern der Sequenzierung führen. Aus diesem Grund wurde stets nur möglichst frische SLS eingesetzt.

Sobald CleanSEQ-Reagenz ausreichend resuspendiert war, konnte mit der Bestückung der 96-Well-Platte begonnen werden. Zur Optimierung des Ablaufs wurde zu diesem Zeitpunkt bereits jedem Well im EDV-System des Sequencers (GenomeLab™ System, Version 10.2.3) eine definierte Proben-Identifikation zugewiesen, um den späteren Ablauf zu beschleunigen und Verwechslungen zu vermeiden. Jeweils 10 µl Sequenz-Produkt und 10 µl CleanSEQ-Reagenz kamen auf einen Well. Anschließend wurden pro Probe 42 µl 85 %iger Ethanol hinzugefügt und das Gemisch gründlich durch Auf- und Abpipettieren (7-20mal) vermengt. CleanSEQ-Reagenz ist schwer löslich, sodass im Zweifelsfall stärker durchmischt wurde, um eine einheitliche Trübung zu erreichen. Nun konnten die Sequenzprodukte an die magnetischen Beads binden.

Anschließend wurde die 96-Well-Platte in einer passenden Magnetplatte für 3 min inkubiert, bis sich die Beads an den Rändern der Wells gesammelt hatten und der restliche Überstand klar war. Der Überstand mit den darin gelösten Kontaminanten wurde sehr vorsichtig abpipettiert, möglichst ohne die Beads aufzuwirbeln und Sequenz-PCR-Produkt zu verlieren. Es folgte ein weiterer Waschungsschritt mit 100 µl 85%igem Ethanol pro Well. Erneut wurde für 3 min inkubiert und anschließend der Überstand vorsichtig und soweit möglich abpipettiert ohne die gesammelten Beads aufzuwirbeln.

Die 96-Well-Platte wurde anschließend aus der Magnetplatte genommen und kurz offen getrocknet, maximal 10 min. Zu langes Trocknen kann zum Verlust von Signalintensität bei der Sequenzierung führen, sodass eine zügige Weiterverarbeitung notwendig ist. Zu jeder Probe kamen 40 µl SLS hinzu, die Beads wurden möglichst gründlich resuspendiert und die Mischung für 5 min inkubiert.

Nun lösten sich die Sequenz-PCR-Produkte von den magnetischen Beads und gingen in die SLS in Lösung über. Abschließend wurde die 96-Well-Platte so auf einer Magnetplatte positioniert, dass sich die nun ausgelösten Beads in den Spitzen der Wells sammelten und nicht bei der nachfolgenden Sequenzierung störten.

2.13. Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde ein GenomeLab™ GeXP Sequencer der Firma Beckman Coulter® mit zwei Slots für 96-Well-Platten eingesetzt. Die Sequenzierung funktionierte nach dem modifizierten Sanger-Prinzip: Die von Sanger et al. 1977 entwickelte Methode [46] nutzt modifizierte freie Nukleotide um die Sequenz eines DNA-Fragments mit Hilfe der PCR zu bestimmen. Hierzu wurden je Probe 4 Sequenz-PCRs durchgeführt, bei welchen neben unmodifizierten freien Nukleotiden jeweils auch ein radioaktiv-markiertes Nukleotid ohne 3'-Hydroxyl-Gruppe eingesetzt wurde, also entweder markierte und modifiziertes Adenosin, Thymin, Guanin oder Cytidin. Die DNA-Polymerase kann keine Verknüpfung zwischen diesem und dem nächsten Nukleotid herstellen und es kommt zum Strangabbruch an zufälliger Stelle. Anschließend wurde das Sequenz-PCR-Produkt einer Acrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und die Position der radioaktiv markierten Banden mit Hilfe eines Autoradiographs auf Film aufgezeichnet. Durch Zusammenschau der 4 Ansätze konnte so anhand der DNA-Fragmentlängen die Sequenz der Probe rekonstruiert werden.

In dieser Arbeit wurde eine modernere auf diesem Strangabbruch-Prinzip aufbauende Methode angewandt. Wichtige Unterschiede zu der von Sanger et al. entwickelten Methode sind neben der Automatisierung und vereinfachten Auswertung vor allem der Einsatz von Fluoreszenzmarkern anstatt radioaktiver Markierung der modifizierten Nukleotide. Dadurch konnte der aufwendige und riskante Umgang mit radioaktivem Material ersetzt werden. Darüber hinaus erlaubt der gleichzeitige Einsatz von 4 verschiedenen Fluoreszenzmarkern eine erfolgreiche Sequenzierung mit nur einem Sequenz-PCR-Ansatz pro

Leserichtung durchzuführen. Die Fluoreszenzreaktion wird mit Hilfe von Laserbeleuchtung provoziert und der Einsatz verschiedener Wellenlängen für die Marker macht die entstandenen, verschieden langen DNA-Fragmente für alle 4 markierten Nukleotide in einem gemeinsamen, fortlaufenden Messgang auswertbar [44]. Außerdem wurde die manuelle Gelelektrophorese durch eine automatisierte Kapillarelektrophorese ersetzt. Dabei erfolgt die Analyse im Lumen eines kleinen Röhrchens, das mit einer Elektrolytlösung befüllt ist. Feinmechanik und Automatisierung erlauben eine höhere Durchsatzrate bzw. gleichzeitige Analysen mehrerer Proben in parallel angeordneten Kapillaren [44]. In dem von uns eingesetzten GenomeLab GeXP Sequencer konnten 8 Wells der 96-Well-Platte gleichzeitig analysiert werden, was die Analysedauer deutlich verkürzte. Auch erlaubte die Automatisierung und Programmierung des Systems den Ablauf der Sequenzierung in Abwesenheit, beispielsweise über Nacht. Bis zu 2 dieser 96-Well-Platten konnten zur Analyse vorbereitet und gleichzeitig in die Maschine eingebracht werden.

2.14. Auswertung der Sequenzierung

Die Auswertung der Sequenzierung bestand aus mehreren Schritten. An erster Stelle stand eine Grobübersicht der Ergebnisse und Kontrolle der Analysenqualität. Zu diesem Zweck wurden die in GenomeLab™ System, Version 10.2.3, als Elektropherogramme dargestellten Messergebnisse auf ausgeprägte Abweichungen von der Wildtypsequenz und insbesondere auf Sequenzierungsabbrüche, Unreinheiten und auch Hintergrundrauschen hin überprüft (Abbildung 5). Zeigte sich eine große Variation der Baseline-Werte im Hintergrund der gemessenen Sequenz, so sprach dies für ein unbefriedigendes Sequenzierungsergebnis. Eine weiterführende Analyse war in diesen Fällen als problematisch anzusehen und gegebenenfalls Grund zur Wiederholung der vorangegangenen Amplifikations-, Aufreinigungs- oder Sequenzierungsschritte.

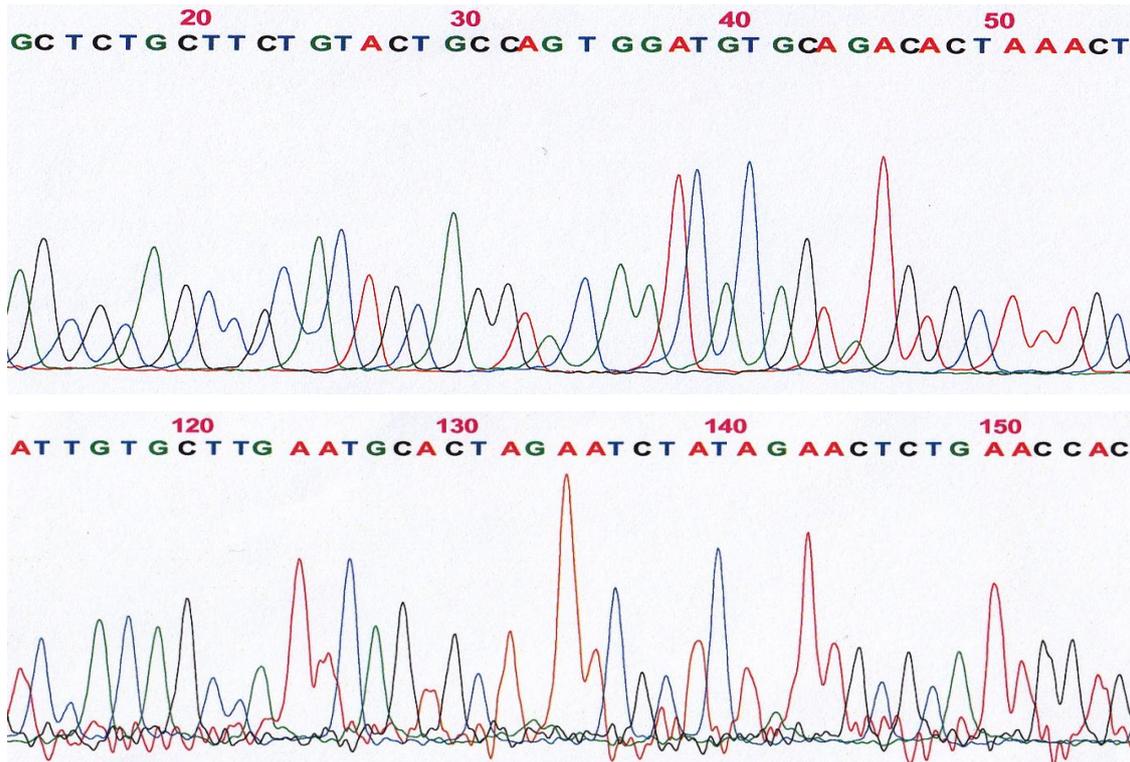


Abbildung 5: Beispiel eines Elektropherogramms mit hoher Sequenzierungs-Qualität und wenig Hintergrundrauschen (oben, Probe 3, *C-KIT* Exon 9 Forward) bzw. geringer Sequenzierungs-Qualität, starkem Hintergrundrauschen und schlechter Auswertbarkeit (unten, Probe 23, *C-KIT* Exon 9 Backward); GenomeLab™ System, Version 10.2.3.; rote Peaks entsprechen dem Nukleotid Adenosin, blaue Thymin, grüne Guanodin und schwarze Cytidin.

Sofern die Grobauswertung der erstellten Elektropherogramme befriedigte, folgte der erste Schritt der Feinauswertung: Ermittelte Basenabfolgen wurden mit Hilfe der Alignment-Software BioEdit mit Wildtyp-DNA des zu untersuchenden Exons abgeglichen [47].

Das Alignment wurde nach folgendem Schema durchgeführt: Die Wildtyp-Sequenz des zu untersuchenden Exons wurde zunächst mit der fortlaufenden Gen-Sequenz und/oder der Sequenz der eingesetzten Primer angeglichen um Beginn und Ende des zu amplifizierenden DNA-Stücks bzw. dessen Teilsegmente einfacher abgrenzen zu können. Die in der Analyse ermittelten Sequenzen wurden in das Alignment mit einbezogen (jeweils Forward- und Backward-Sequenz des Amplifikats). Wurden anstatt nur eines Amplifikats zwei überlappende Exon-Teilsegmente analysiert, so erfolgte das Alignment entsprechend mit vier Sequenzen (Forward und Backward von Segment 1 bzw. 2; Abbildung 6).

Vom automatischen Alignment fehlerhaft angeordnete Sequenzen wurden manuell verschoben und angeglichen, bzw. Lücken gelöscht oder hinzugefügt. Dies war insbesondere der Fall bei Verdacht auf Deletionen oder Insertionen oder um Messungenauigkeiten auszugleichen.

Im Anschluss an die manuellen Alignment-Korrekturen wurden Abweichungen in den Sequenzen gesucht und dokumentiert. Insbesondere zu Anfang der jeweiligen Sequenzierungen fanden sich bei vielen Proben Fehler, welche in der gegenläufigen Sequenzierung nicht reproduziert werden konnten. Diese sind nicht als valide Mutationen sondern als technische Limitation der Sequenzierung zu werten.

Da die generierten Basenabfolgen allerdings nur die dominanten Peaks registrieren, mussten im zweiten Schritt der Feinauswertung im BioEdit auffällig gewordene Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz mit Hilfe der Elektropherogramme der Sequenz-Analyse von Hand abgeglichen werden. Umgekehrt bedeutet dies auch, dass unterschwellige, mutationsverdächtige Peaks überhaupt nicht im BioEdit-Alignment festgestellt werden können. Aus diesem Grund wurden auch bei anhand der Basenabfolgen oberflächlich als Wildtyp diagnostizierten Alignments die Elektropherogramme genauer analysiert. Dies bedeutet, dass alle erzeugten Elektropherogramme auch ohne Hinweis auf Mutationen in vorangegangenen Schritten durchgesehen und mit der Sequenz des Wildtyps abgeglichen wurden.

Zeigten sich im Elektropherogramm einer Sequenzierung Abweichungen vom Wildtyp oder unterschwellige Peaks, so wurden diese mit der korrespondierenden Sequenzierung (also Forward und Backward) abgeglichen. Bei auf Grund geringer DNA-Qualität auf zwei Teilsegmente aufgeteilten Proben konnten ggfs. auch Elektropherogramme des anderen Teilsegments bei Überlappungen zum Abgleich verwendet werden.

Lagen Veränderungen nur in einem der Teilsegmente oder war die Amplifikation des anderen Teilsegments gescheitert, so erübrigte sich dies. War die Abweichung in zwei oder mehr korrespondierenden Sequenzierungen nachweisbar, so wurde sie in die Auswertung eingeschlossen.

Sehr deutliche Veränderungen in nur einer Sequenz mit gescheiterten korrespondierenden Sequenzen wurden abhängig von der Sequenzierungs-Qualität eingeschlossen. Auffällige, eventuell auf Mutation verdächtige Peaks bei stark ausgeprägtem Hintergrundrauschen wurden in der Auswertung nicht akzeptiert.

2.15. Statistische Auswertung und Datenbankabgleiche

Die statistische Auswertung und Erstellung von Diagrammen erfolgte mit Hilfe von Microsoft® Excel 2007.

Wenn nicht anders angegeben wurden die Vergleiche von Mutationshäufigkeiten bzw. Mutationsraten trotz der kleinen Stichprobe mit dem ein- bzw. zweidimensionalen Chi²-Test geprüft [48]. Wegen des heuristischen Charakters und der geringen Test-Power der Untersuchungen wurde auf die entsprechenden exakten nichtparametrischen Tests für kleine Stichproben und eine Korrektur für multiple Testung verzichtet.

Die Konfidenzintervalle für die Anteilswerte (Mutationsraten) wurden mit dem Online-CI-Rechner des Instituts für Empirische Sozial- und Wirtschaftsforschung der Universität Köln geschätzt [49].

Zur Grafikbearbeitung kamen Photofiltre 7 und Microsoft® PowerPoint 2007 zum Einsatz.

Datenbankabgleich und DNA-Analysen erfolgten mit Hilfe folgender Webseiten:

- NCBI BLAST [50].
- NCBI Mapview [51].
- Ensembl [52].
- COSMIC [53].

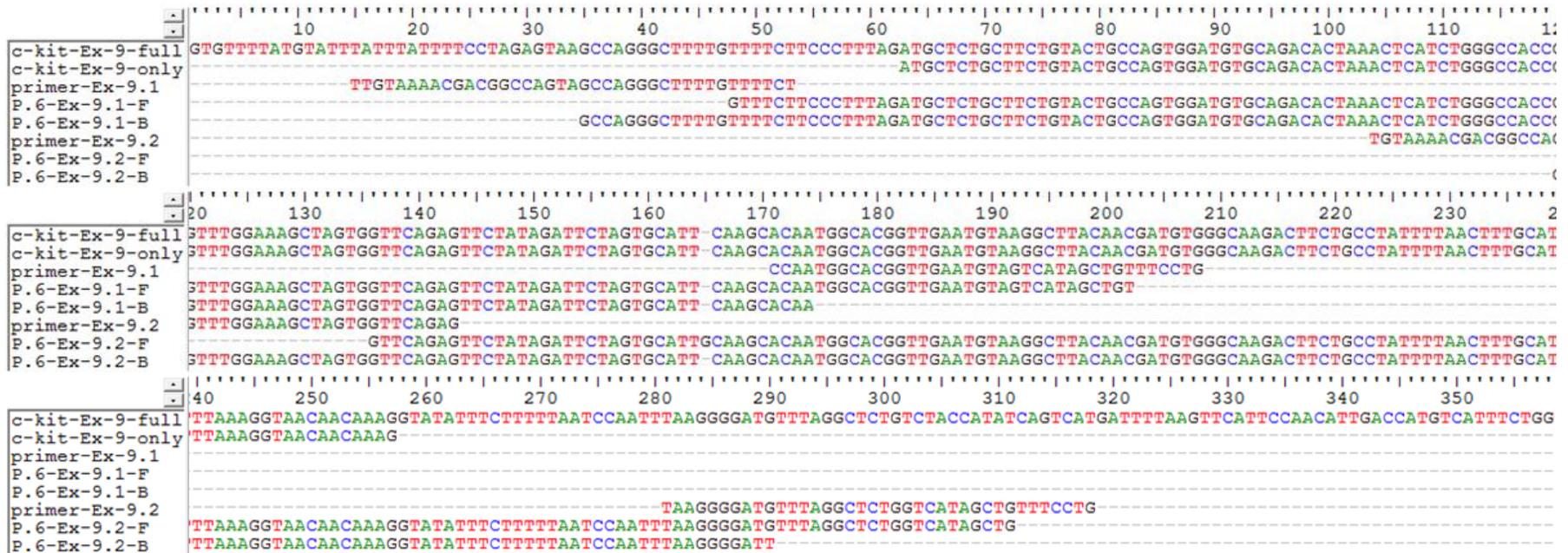


Abbildung 6: Beispiel eines BioEdit-Alignments mit überlappenden Teilssegmenten von Probe 6, *C-KIT*, Exon 9.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des eingeschlossenen Probenkollektivs

Die eingeschlossenen Proben stammen aus drei Ländern von drei verschiedenen Kontinenten (Abbildung 7, links): 15 Proben aus Singapur (Department of Pathology, Singapore General Hospital); 6 Proben aus Peru (populationsbezogenes Krebsregister, Registro de Cancer poblacional, Trujillo, Peru); 5 Proben aus Deutschland (Institut für Allgemeine Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland).

Ursprünglich lagen 8 Proben aus Peru mit klinischem oder histologischen Verdacht auf extranodales NK-/T-Cell-Lymphom (NKTCL) vor, allerdings waren zwei davon in der vorgeschalteten In-situ-Hybridisierung EBV-negativ und wurden wegen der beinahe universellen EBV-Assoziation dieses Krankheitsbilds ausgeschlossen. Es verblieben somit 6 Proben aus Peru, insgesamt wurden 26 Proben eingeschlossen. Mit 20 von 26 Proben (76,9%) stammten überproportional viele von männlichen Patienten ab (Abbildung 7, rechts), d. h. im Verhältnis von ca. 3:1 ($\chi^2 = 6,5$; $p < 0,05$). Das Geschlechterverhältnis weicht nicht nennenswert von früheren Studien ab. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme wies mit einer Spanne von 22 bis 80 Lebensjahren eine große Spannweite von 58 Jahren auf. Das Durchschnittsalter lag bei 51,35, der Medianwert bei 51,5 Jahren. Er unterscheidet sich damit nicht von dem in früheren Studien bei NKTCLs beobachteten Median bei 50 (Mediantest, $p > 0,50$, n. s.).

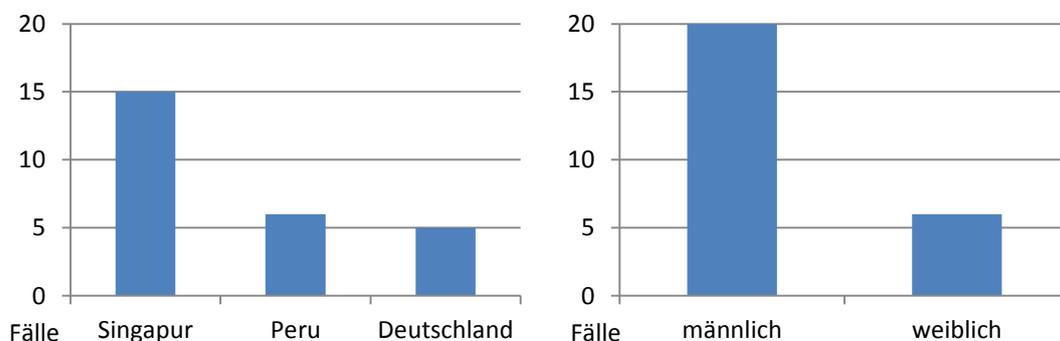


Abbildung 7: Verteilung der Proben nach Ländern (links) bzw. Geschlecht (rechts).

Die Gewebeproben stammen aus einer Reihe von Lokalisationen, wie Nasenhöhlen- und Nasennebenhöhlenschleimhaut, Gaumenschleimhaut, Lymph- und Nierengewebe, dem Gastrointestinaltrakt, Hoden, Haut und Weichteilen. Nasale Isolate waren am häufigsten (13 Proben), Nasennebenhöhlenschleimhaut war 3mal vertreten, Gaumenschleimhaut, Lymphknoten, Magen und Nierengewebe jeweils 1mal, gastrointestinale Proben 3mal, Gewebe aus Hoden 5mal, aus Haut bzw. Weichteilen 2mal. In 6 Fällen lag von einem Patienten mehr als ein Gewebetyp vor.

Primäre extranasale/-pharyngeale Manifestationen der Erkrankung sind mit deutlich schlechterem Outcome assoziiert. Aus diesem Grund teilten wir die eingeschlossenen Fälle für die Auswertung in Proben mit nasaler/pharyngealer Beteiligung zum einen und nur extranasale/-pharyngeale Gewebeproben zum anderen ein (Abbildung 8). Von 26 eingeschlossenen Fällen lagen zusammengenommen 16 Proben mit nasaler/pharyngealer Beteiligung vor (61,5%). Dagegen stammten 10 Proben aus extranasalen/-pharyngealen Geweben (38,5%). Bei 6 der 26 Proben waren Paraffinblöcke verfügbar: Dies galt für alle 5 Proben aus Deutschland und einen Fall aus Peru (Probe 7); bei letzterem wurden zusätzlich mehrere Leerschnitte bereitgestellt. Die restlichen Fälle aus Peru und sämtliche Proben aus Singapur lagen dagegen als Leerschnitte mit ca. 5 µm bis 8 µm Dicke vor.

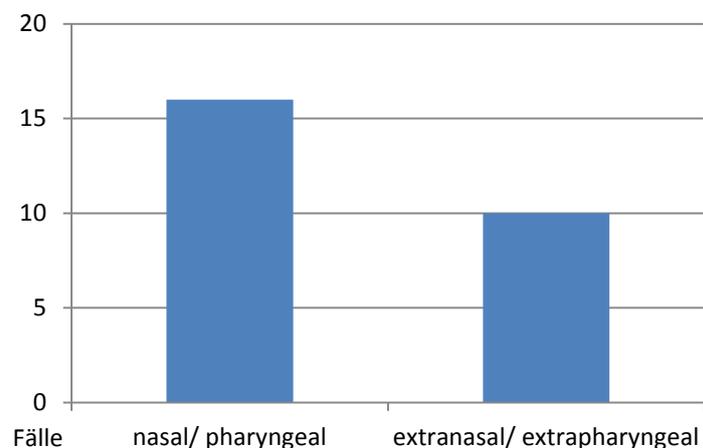


Abbildung 8: Zahl der Proben mit nasaler/pharyngealer Beteiligung gegenüber extranasaler/pharyngealer Manifestation.

3.2. Mikroskopie und Immunhistochemie

Die mikroskopische Beurteilung der eingesetzten Proben mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung ermöglichte eine Übersicht und Qualitätsbewertung der vorliegenden Gewebeprobe und die Lokalisierung von Tumorgewebe insbesondere in Bezug zu nekrotischen Arealen (Tabelle 8). Desgleichen wurden Informationen zur Zellmorphologie und Wachstumsform des Tumorgewebes (solide - diffus etc.) sowie zu Besonderheiten wie Gefäßinvasionen gewonnen. Weitere Informationen wurden aus vorliegenden pathologischen Befunden bezogen. Abhängig von der mikroskopischen Beurteilung wurden gegebenenfalls ganze Leerschnitte verwendet oder zunächst eine Makrodissektion zur Sicherung von Tumorgewebe vorgeschaltet.

Insgesamt zeigte sich ein weites Spektrum von mikroskopischen Befunden, von Gewebeprobe mit großen Mengen an intaktem Tumorgewebe bis größtenteils nekrotischen Arealen mit nur sehr spärlichen für die DNA-Extraktion nutzbaren Bereichen. 25 der 26 Proben (96,2%) wiesen Nekrosen auf; bei 6 (23,1%) erstreckten sich die nekrotischen Areale auf den größten Teil des Gewebes. Der Grad der Nekrose unterschied sich nicht zwischen den Ländern (χ^2 , n. s.). Zytologisch lag eine ausgeprägte Zell-Polymorphie vor. Bei 9 der Proben (34,6%) waren vitale Tumorzellen von deutlich unterschiedlicher Größe in relevanter Zahl nachweisbar. Mittelgroße und große Zellen waren bei 19 (73,1%) bzw. 13 Proben (50%) am stärksten vertreten. Kleine Zellen kamen dagegen nur in 2 Proben (7,7%) in ausgeprägter Zahl vor. Auch die Zytologie der Proben unterschied sich nicht zwischen den drei Ländern.

Legende zu Tabelle 8: Zyt. = Zytologie, Nek. = Nekrosen, Gra.-B = Granzym-B, SH = Schleimhaut, NNH = Nasennebenhöhle, GIT = Gastrointestinaltrakt, WT = Weichteile, l = large cells, m = medium-sized cells, s = small cells, 0 = keine Nekrosen, 1+ = vereinzelt Nekrosen, 2+ = nekrotische Areale, 3+ = ausgedehnte Nekrotisierung, pos. = positiv, neg. = negativ, neg.* = schwach reaktiv, positiv in Mastzell-Kontrolle, n. v. = nicht verwertbar, n. d. = nicht durchgeführt bzw. nicht vorliegend; Befunde von besonderem Interesse gelb, weitere grau hinterlegt.

Tabelle 8: Übersicht über das eingeschlossene Probenkollektiv nach klinischen, histologischen und immunohistochemischen Informationen.

Nr.	Alter	Sex	Herkunft	Lokalisation	Zyt.	Nek.	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD20	CD56	CD117	TIA-1	Gra.-B	EBER
1	37	M	Deutschland	Lymphknoten	l	1+	pos.	n. d.	pos.	n. d.	pos.	neg.	neg.*	n. d.	pos.	pos.	pos.
2	74	F	Deutschland	Gaumen-SH	l	2+	pos.	pos.	neg.	n. d.	neg.	neg.	neg.*	n. d.	pos.	n. d.	pos.
3	57	M	Deutschland	Nasen-SH	m	3+	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	n. d.	pos.	pos.	pos.
4	61	F	Deutschland	Niereninfiltrat	m/l	3+	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. v.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	pos.
5	50	M	Peru	Nasale Biopsie	m	2+	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	neg.	n. v.	n. d.	n. d.	n. d.	pos.
6	40	M	Peru	Nasale Biopsie	l	2+	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	neg.	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	pos.
7	39	F	Peru	Nasale Biopsie	s/m	3+	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	neg.	n. v.	n. d.	n. d.	n. d.	pos.
8	22	M	Peru	Nasale Biopsie	m	2+	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	neg.	n. v.	n. d.	n. d.	n. d.	pos.
9	56	M	Peru	Nasale Biopsie	m	3+	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	neg.	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	pos.
10	43	F	Peru	Nasale Biopsie	m	1+	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	neg.	pos.	n. d.	n. d.	n. d.	pos.
11	66	M	Singapur	Nasenhöhle	m	2+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	n. d.	pos.	n. d.	pos.
12	36	M	Singapur	Nase, Magen	m	1+	pos.	pos.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	n. d.	pos.	n. d.	pos.
13	49	M	Singapur	NNH	m	1+	pos.	pos.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	neg.	pos.	n. d.	pos.
14	37	M	Singapur	Nasenhöhle	l	2+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	neg.	pos.	n. d.	pos.
15	54	M	Singapur	NNH, Hoden	m	3+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	neg.	neg.	pos.	n. d.	pos.
16	66	M	Singapur	Nase, NNH	l	2+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	neg.	pos.	n. d.	pos.
17	42	M	Singapur	NNH	m/l	2+	pos.	pos.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	neg.	pos.	n. d.	pos.
18	48	M	Singapur	GIT	m/l	1+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	neg.	neg.	pos.	n. d.	pos.
19	53	F	Singapur	GIT	l	2+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	n. d.	pos.	n. d.	pos.
20	24	M	Singapur	GIT	m/l	2+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	neg.	pos.	n. d.	pos.
21	75	M	Singapur	Haut, Hoden	m/l	1+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	pos.	n. d.	pos.	neg.	pos.	n. d.	pos.
22	80	F	Singapur	Haut, Hoden	m/l	1+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	neg.	pos.	n. d.	pos.
23	69	M	Singapur	WT, Hoden	m/l	0	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	pos.	n. d.	pos.	n. d.	pos.
24	65	M	Singapur	WT	m	1+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	neg.	neg.	pos.	n. d.	pos.
25	61	M	Singapur	Hoden	l	2+	pos.	neg.	n. d.	n. d.	neg.	n. d.	neg.	neg.	pos.	n. d.	pos.
26	31	M	Deutschland	Nasen-SH	s/m	3+	pos.	n. d.	pos.	n. d.	n. d.	pos.	pos.				

Darüber hinaus führten wir immunhistochemische Untersuchungen und In-situ-Hybridisierungen durch (Tabelle 8). Insbesondere die Marker CD3, CD56 und EBER waren hier von Bedeutung: Zytoplasmatisches CD3 ϵ , eine Teilkette des T-Zell-Korezeptors, war in unserem Probenkollektiv zu 100% positiv.

Die immunhistochemische Färbung auf CD56, einen typischen NK-Zell-Marker, war in 3 Proben aus Peru auf Grund schlechter Qualität nicht verwertbar. 1 Probe aus Deutschland war so ausgeprägt autolytisch, dass auf eine Untersuchung auf CD56 verzichtet wurde. Von den restlichen 22 Proben waren 16 positiv (72,7%). Der Wert liegt damit im vorbeschriebenen Bereich (CI 90: 58,3-87,1%; CI 95: 55,6-89,8%).

Die In-situ-Hybridisierung auf EBER (Epstein Barr Virus small RNA) wird zum Nachweis des Vorliegens einer EBV-Infektion angewandt: Ein negatives Ergebnis war Ausschlusskriterium.

Nach Gewebeverfügbarkeit wurden immunhistochemische Untersuchungen auf folgende weitere Marker durchgeführt: CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, TIA-1 und Granzym-B. Diese waren teilweise bereits in Laboren der Herkunftsländer auch im Rahmen der klinisch-pathologischen Diagnostik bestimmt worden. Allerdings waren diese Analysen nicht einheitlich über das Probenkollektiv hinweg, sondern meist nur bruchstückhaft vorhanden. Die geringe Menge an Material ließ es jedoch meist nicht zu, Untersuchungen nachzuholen oder auszuweiten. Aus diesem Grund konnten nur 11 Fälle aus Singapur auf mutationsbedingte Überexpressionen von CD117 (KIT-Protein) untersucht werden. Keine der untersuchten Proben war allerdings CD117 positiv.

3.3. Qualitäts-PCR

Das extrahierte Genmaterial wurde mit Hilfe einer gut etablierten Qualitäts-PCR auf Länge der DNA-Fragmente getestet und entsprechend den Ergebnissen der nachgeschalteten Gelelektrophorese evaluiert. Gewebeproben können abhängig von Fixierungs-, Einbettungs- und Lagerungstechnik in unterschiedlichem Ausmaß Degradation des enthaltenen Genmaterials erleiden.

Dies spiegelt sich in DNA-Strangabbrüchen wider, welche durch Analyse der Basenpaar-Länge (bp) der in der Qualitäts-PCR produzierten Amplifikate dargestellt werden können. Hierzu wird das Amplifikat einer Agarosegelelektrophorese unterzogen und mit einer bekannten DNA-Ladder als Vergleichsgrundlage die Länge der Probe bestimmt.

Stark degradiertes Genmaterial erschwert aber die Amplifikation spezifischer Genabschnitte, insbesondere von längeren DNA-Segmenten am Stück. Aus diesem Grund wurde zunächst eine qualitative Beurteilung vorgenommen. Wurden in der Gelelektrophorese der Qualitäts-PCR Banden entsprechend der Fragment-Länge ≥ 300 bp gefunden, so wurde die Qualität dieser Probe mit „gut“ (+++) bewertet. Banden entsprechend einer maximalen Fragment-Länge von 200 bp wurden als „mittel“ (++) bewertet. Zeigte sich nur eine einzige Bande entsprechend der Fragment-Länge = 100 bp, so wurde die Probe mit „schlecht“ (+) bewertet. Besonders problematisch waren Proben, bei denen keinerlei Banden abgrenzbar waren. Dies spricht für eine ausgeprägte DNA-Degradation mit einer Fragment-Länge < 100 bp und wurde als "sehr schlechte" Qualität (-) kategorisiert (Abbildung 9).

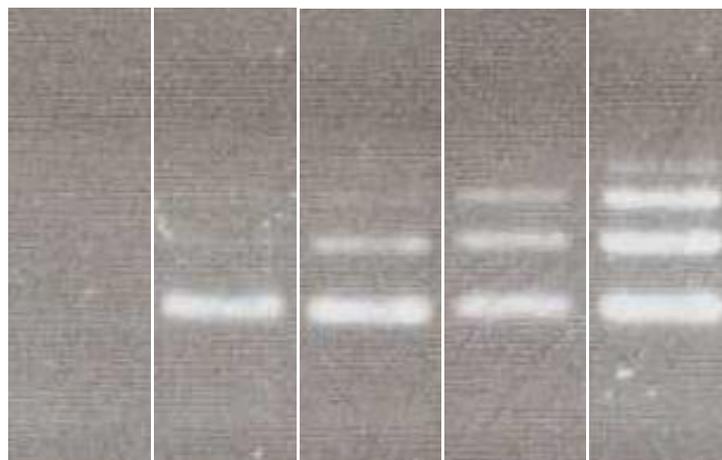


Abbildung 9: Beispiele der Agarosegelelektrophorese im Rahmen der Qualitäts-PCR; von links nach rechts: keine Banden nachweisbar, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp.

Die in unserem Probenkollektiv festgestellte DNA-Qualität war sehr heterogen. Die Ergebnisse schwankten von qualitativ hochwertigen Fragmenten einer Länge von bis zu 400 bp im besten Fall bis hin zum Fehlen selbst einer nur 100 bp langen Bande in der Gelelektrophorese in den schlechtesten Fällen (Abbildung 10). Die DNA-Qualität von Gewebeproben aus Deutschland variierte bei 5 Proben zwischen 200 und 400 bp und war damit am höchsten. Proben aus Peru und Singapur schwankten dagegen zwischen einer Länge von < 100 bp ohne Nachweis einer Bande und maximal 200 bp.

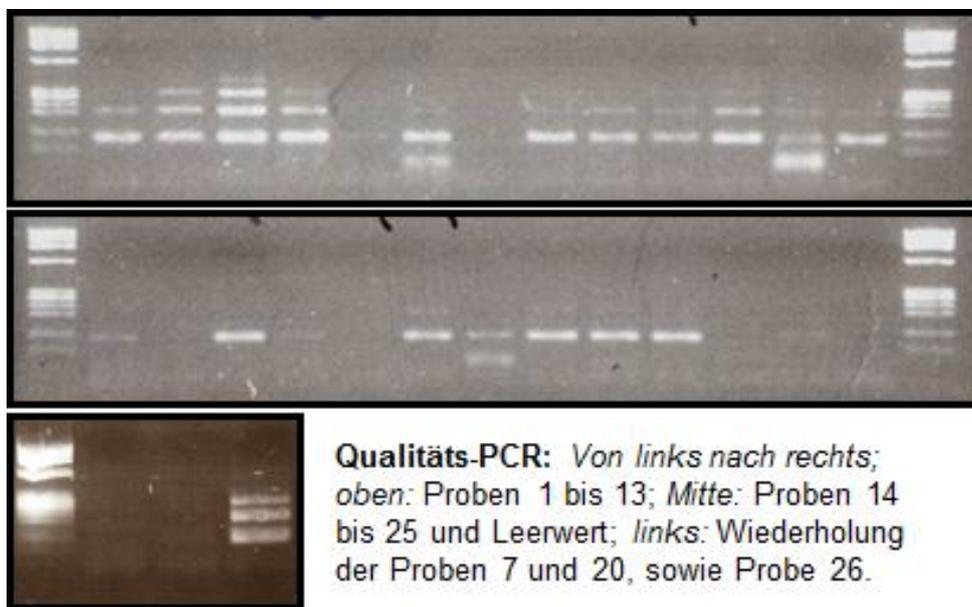


Abbildung 10: Bilder der Agarosegelelektrophorese der Qualitäts-PCR-Produkte mit DNA-Ladders.

Insgesamt wies der größte Teil der Proben eine schlechte DNA-Qualität (+) auf (10 von 26 Proben = 38,5%). 7 Proben (26,9%) besaßen mittlere DNA-Qualität (++), 5 (19,2%) waren von sehr schlechter Qualität (-). Eine gute DNA-Qualität (++++) lag nur bei 4 (15,4%) vor (Tabelle 9, Abbildungen 11a-d).

Die DNA-Qualität nach Basenpaaren korrelierte deutlich mit dem Herkunftsland. Alle 4 Proben mit einer Fragmentlänge von ≥ 300 bp stammten aus Deutschland. Jeweils 3 Proben mit Fragmenten einer Länge von maximal 200 bp stammten aus Peru und Singapur, 1 Probe aus Deutschland. Unter den deutschen Proben fanden sich keine mit Fragmenten < 200 bp.

Bei 2 peruanischen Proben und 8 Proben aus Singapur war eine Fragmentlänge von nur 100 bp nachweisbar. Fragmentlängen < 100 bp entfielen auf 4 Proben aus Singapur bzw. 1 aus Peru.

Tabelle 9: Beurteilung der DNA-Qualität nach Probe, Herkunftsland und Basenpaar-Länge.

Nr.	Herkunftsland	bp	Beurteilung
1	Deutschland	200	++
2	Deutschland	300	+++
3	Deutschland	400	+++
4	Deutschland	300	+++
5	Peru	100	+
6	Peru	200	++
7	Peru	0	-
8	Peru	100	+
9	Peru	200	++
10	Peru	200	++
11	Singapur	200	++
12	Singapur	200	++
13	Singapur	100	+
14	Singapur	100	+
15	Singapur	0	-
16	Singapur	100	+
17	Singapur	100	+
18	Singapur	0	-
19	Singapur	200	++
20	Singapur	100	+
21	Singapur	100	+
22	Singapur	100	+
23	Singapur	100	+
24	Singapur	0	-
25	Singapur	0	-
26	Deutschland	300	+++

bp = Basenpaar-Länge, (-) sehr schlechte, (+) schlechte, (++) mittlere, (+++) gute Qualität

Der statistische Vergleich erfolgte entsprechend der Länge der untersuchten Genabschnitte zwischen Proben mit sehr schlechter/schlechter (- bzw. +) und Proben mit mittlerer/guter DNA-Qualität (++ bzw. +++). Die DNA-Qualität korrelierte signifikant mit dem Herkunftsland (Tabelle 10; $\chi^2 = 7,4257$; $p < 0,01$; s. s.).

Tabelle 10: DNA-Qualität < 200 bp bzw. ≥ 200 bp nach Ländern.

DNA-Qualität	- / + (< 200 bp)	++ / +++ (≥ 200 bp)	gesamt
Singapur	12	3	15
Peru	3	3	6
Deutschland	0	5	5
gesamt	15	11	26

bp = Basenpaar-Länge, (-) sehr schlechte, (+) schlechte, (++) mittlere, (+++) gute Qualität.

Wegen der geringen Fallzahlen insgesamt und besonders aus Peru wurde das Ergebnis nach Zusammenfassung der Proben aus Singapur und Peru überprüft und bestätigt (Tabelle 11; $\text{Chi}^2 = 5,8454$; $p > 0,01$; s. s.).

Tabelle 11: DNA-Qualität < 200 bp bzw. ≥ 200 bp nach Ländern (Singapur und Peru zusammengefasst).

DNA-Qualität	- / + (< 200 bp)	++ / +++ (≥ 200 bp)	gesamt
Singapur/Peru	15	6	21
Deutschland	0	5	5
gesamt	15	11	26

bp = Basenpaar-Länge, (-) sehr schlechte, (+) schlechte, (++) mittlere, (+++) gute Qualität.

An dieser Stelle sind auch die Unterschiede in der Art der bereitgestellten Proben relevant; von allen Proben aus Deutschland und einer Probe aus Peru lagen besser haltbare Paraffinblöcke vor, während dies für keine der Proben aus Singapur der Fall war.

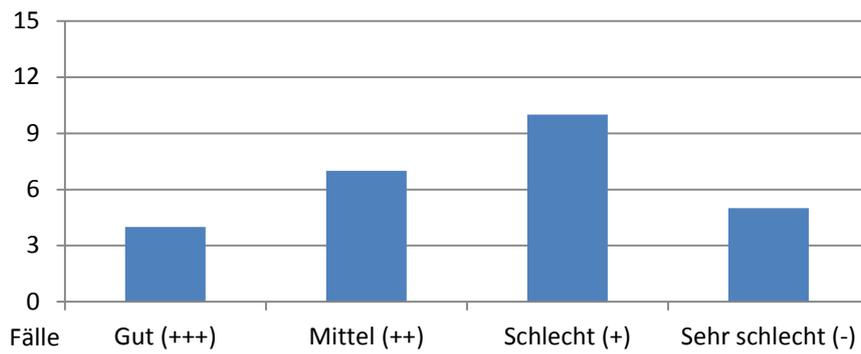


Abbildung 11a: Verteilung der festgestellten DNA-Qualität (alle).

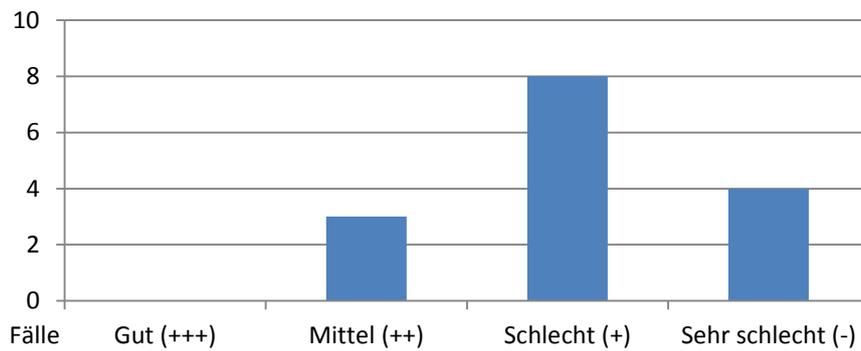


Abbildung 11b: Verteilung der festgestellten DNA-Qualität (Singapur).

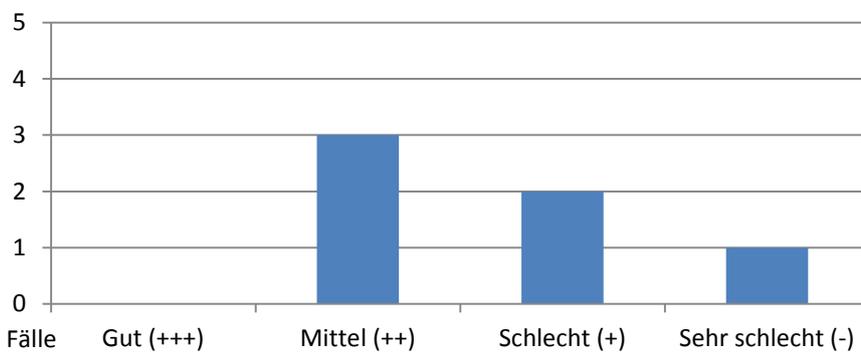


Abbildung 11c: Verteilung der festgestellten DNA-Qualität (Peru).

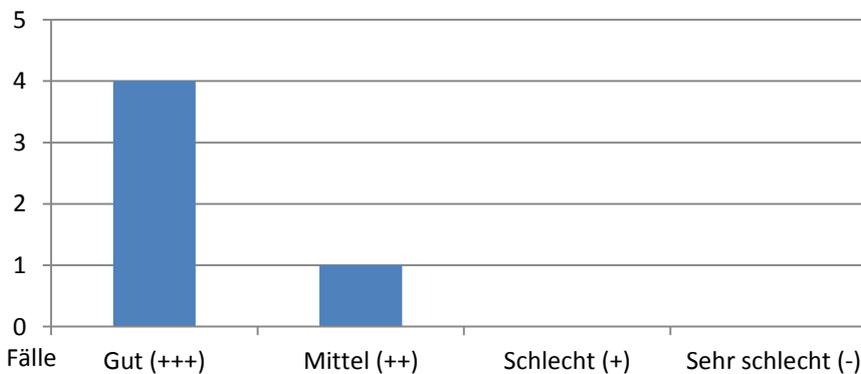


Abbildung 11d: Verteilung der festgestellten DNA-Qualität (Deutschland).

3.4. Primer-Auswahl

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben erfolgten zunächst Amplifikations-PCRs mit Primern, welche die zu amplifizierenden Exons 9, 11 und 17 des *C-KIT* Gens bzw. Exon 3 des *CTNNB1* Gens endständig einrahmten. Da es trotz wiederholter Versuche insbesondere bei Proben mit schlechter (+) oder sehr schlechter DNA-Qualität (-) zu Fehlschlägen in der Amplifikation und/oder Sequenzierung kam, wurde ein anderer Ansatz versucht: Schlug die Amplifikation wiederholt fehl, waren Sequenzen schlecht auswertbar oder Befunde unklar, dann wurden 4 statt 2 Primern pro Exon eingesetzt. Das DNA-Segment wurde mit Hilfe entsprechender Exon-interner Primer in zwei überlappende Teilsegmente (S1, S2) aufgespalten und separat amplifiziert (Abbildung 12). Mit dieser Methode konnte die Auswertung auch auf einige äußerst schwierig zu amplifizierende Proben ausgeweitet und in den meisten Fällen zumindest eine teilweise Analyse durchgeführt werden.

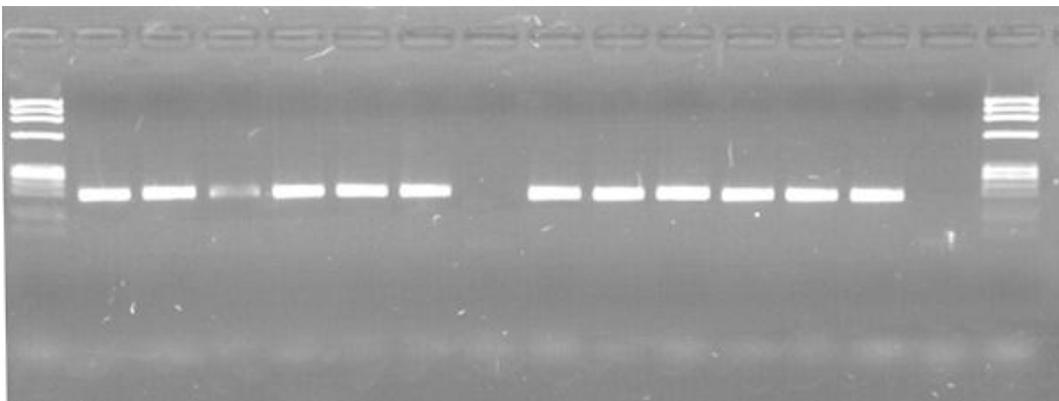


Abbildung 12: Beispielhaftes Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation mit überlappenden, Exon-internen Primern; von links nach rechts: DNA-Ladder (DNA-L), Probe 1 (P1) Segment 1 (S1), P9 S1, P12 S1, P13 S1, P19 S1, P22 S1, Leerwert (L) S1, P1 S2, P9 S2, P12 S2, P13 S2, P19 S2, P22 S2, L S2, DNA-L.

Da in vielen Fällen der Ansatz mit endständigen Primern für eine zufriedenstellende Sequenz-PCR und nachfolgende Sequenzierung ausreichend war, wurde diese Technik nicht für alle Proben angewandt (Tabelle 12). Insgesamt wurden bei 55 von insgesamt 104 Amplifikationen überlappende, Exon-interne Primer eingesetzt (52,9%).

Tabelle 12: Liste der Proben, DNA-Qualität und Primer-Ansatz je Exon.

Nr.	DNA-Qualität	<i>C-KIT</i>			<i>CTNNB1</i>
		Exon 9	Exon 11	Exon 17	Exon 3
1	++	ÜP	E	E	ÜP
2	+++	ÜP	E	E	E
3	+++	E	E	E	E
4	+++	E	E	ÜP	E
5	+	E	ÜP	ÜP	ÜP
6	++	ÜP	E	ÜP	ÜP
7	-	E	ÜP	ÜP	ÜP
8	+	E	E	ÜP	ÜP
9	++	E	E	E	ÜP
10	++	E	E	E	E
11	++	E	E	E	E
12	++	E	E	E	ÜP
13	+	ÜP	ÜP	ÜP	ÜP
14	+	ÜP	ÜP	ÜP	ÜP
15	-	ÜP	ÜP	ÜP	ÜP
16	+	ÜP	ÜP	E	ÜP
17	+	E	ÜP	ÜP	ÜP
18	-	E	ÜP	ÜP	ÜP
19	++	E	ÜP	E	ÜP
20	+	E	ÜP	ÜP	ÜP
21	+	E	ÜP	E	ÜP
22	+	E	ÜP	ÜP	ÜP
23	+	ÜP	ÜP	E	ÜP
24	-	E	ÜP	E	ÜP
25	-	E	ÜP	E	ÜP
26	+++	E	E	E	E

E = nur endständige Primer, 1 Segment, ÜP = überlappende, Exon-interne Primer, also 2 Teilsegmente.

3.5. Analyseerfolg

Trotz der verschiedenen eingesetzten Methoden und Ansätze scheiterten schlussendlich einige der Amplifikationen, Sequenz-PCRs oder Sequenzierungen vollständig. Alle 3 gescheiterten Analysen fanden sich bei Proben, welche in der vorangegangenen Qualitäts-PCR eine sehr schlechte DNA-Qualität aufgewiesen hatten (Proben 7, 15 und 24). Auffällig ist, dass dies nur bei Amplifikationen von Exon 11 des *C-KIT* Gens der Fall war. Es fanden sich 5 von 8 nur teilweise erfolgreichen Analysen bei Proben mit sehr schlechter DNA-Qualität (Proben 15 und 18), 1 bei einer Probe mit schlechter DNA-

Qualität (Probe 14) und 2 bei Proben mit mittlerer DNA-Qualität (Proben 10 und 12). Bei den Proben mit guter DNA-Qualität (Proben 2, 3, 4 und 26) scheiterte keine Analyse (Tabelle 13). Allerdings war bei einigen wenigen der Einsatz der überlappenden, Exon-internen Primer zur erfolgreichen Amplifikation notwendig bzw. zusätzlich erfolgt.

Tabelle 13: Analyseerfolg nach Proben und zu untersuchendem Exon aufgeschlüsselt.

Nr.	DNA-Qualität	C-KIT			CTNNB1
		Exon 9	Exon 11	Exon 17	Exon 3
1	++	✓	✓	✓	✓
2	+++	✓	✓	✓	✓
3	+++	✓	✓	✓	✓
4	+++	✓	✓	✓	✓
5	+	✓	✓	✓	✓
6	++	✓	✓	✓	✓
7	-	✓	x	✓	✓
8	+	✓	✓	✓	✓
9	++	✓	✓	✓	✓
10	++	✓	✓	(✓) B	✓
11	++	✓	✓	✓	✓
12	++	✓	✓	(✓) B	✓
13	+	✓	✓	✓	✓
14	+	✓	(✓) S1	✓	✓
15	-	(✓) S1	x	✓	(✓) S1
16	+	✓	✓	✓	✓
17	+	✓	✓	✓	✓
18	-	✓	(✓) S2	(✓) S2	(✓) S1
19	++	✓	✓	✓	✓
20	+	✓	✓	✓	✓
21	+	✓	✓	✓	✓
22	+	✓	✓	✓	✓
23	+	✓	✓	✓	✓
24	-	✓	x	✓	✓
25	-	✓	✓	✓	✓
26	+++	✓	✓	✓	✓

✓ = erfolgreich, (✓) = teilweise erfolgreich, S1 = nur Teilsegment 1, S2 = nur Teilsegment 2, B = nur Backwards, x = gescheitert.

3.6. Beispielhafte Darstellung der Sequenzierungsauswertung

Nach erfolgter Sequenz-PCR und den notwendigen Aufreinigungsschritten wurde die eigentliche Sequenzierung und schließlich Auswertung der Proben nach der beschriebenen Methode in mehreren Schritten durchgeführt.

War das Elektropherogramm des amplifizierten Genabschnitts grundsätzlich auswertbar, die Sequenzierung also weder gescheitert noch verrauscht, so wurden zunächst Alignments mit Hilfe des Freeware-Tools BioEdit durchgeführt [47]. Bei überschwelligen Punktmutationen erlaubte dies eine rasche Untersuchung der Basenabfolge im Vergleich zum Wildtyp. Gegebenenfalls wurden Punktmutationen in der Basenabfolge als Überlagerung dargestellt. In diesem Fall musste in BioEdit die ausgetauschte Base entsprechend des Elektropherogramms anstelle des Platzhalters eingefügt werden.

Beispielhaft wird an dieser Stelle das Alignment von Exon 17 des *C-KIT* Gens der Probe 23 dargestellt (Abbildung 13). Hier wurde eine Base im Rahmen einer die Aminosäure-Sequenz verändernden Punktmutation sowohl in Forward- als auch in Backward-Richtung ausgetauscht: Das Codon 825 wies anstatt GTT die Kombination ATT auf. Dies entspricht einer Substitution der Aminosäure Valin durch Isoleucin.

```
TCAAGAATGATTCTAATTATGTGGT-TAAAGGAAACGTGA
TCAAGAATGATTCTAATTATGTGGT-TAAAGGAAAC----
TCAAGAATGATTCTAATTATGTGAGTTAAAGGAAACGTGA
TCAAGAATGATTCTAATTATGTGATATAAAGGAAACGTGA
```

Abbildung 13: Ausschnitt des Alignments der Probe 23 in Exon 17 des *C-KIT* Gens. Roten markiert ist die Basensubstitution von Guanodin im Wildtyp (1., 2. Zeilen) durch Adenosin in der Probe (3., 4. Zeilen, Forward- bzw. Backward-Richtung).

In den Elektropherogrammen der Sequenzierung ließ sich diese Mutation ebenfalls nachweisen und genauer analysieren (Abbildung 14): So zeigte sich hier eine deutliche Überlagerung zweier Peaks für Guanodin und Adenosin an der ersten Stelle des Codons 825, beispielhaft dargestellt am Elektropherogramm in Forward-Richtung.

Da diese Mutation auch in Backward-Richtung erkennbar war und die Baseline des Elektropherogramms keine starken Störsignale als Hintergrundrauschen aufwies, konnte diese Mutation für die Auswertung akzeptiert werden.

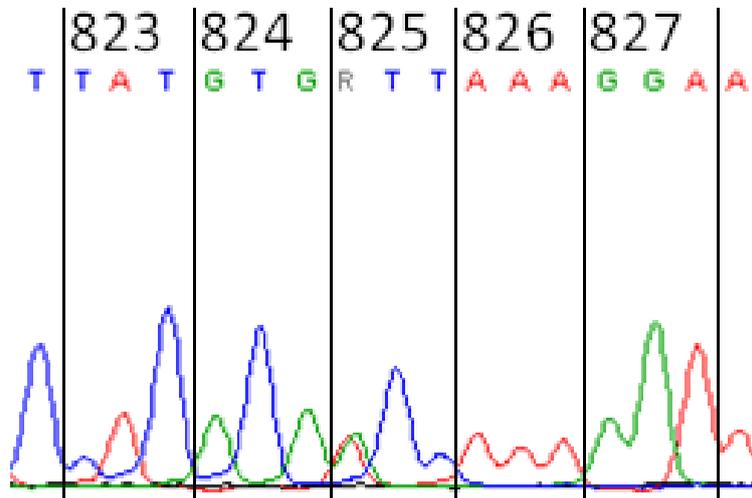


Abbildung 14: Ausschnitt des Elektropherogramms der Probe 23 in Exon 17 des *C-KIT* Gens in Forward-Richtung; Überlagerung zweier Peaks in Codon 825 (mit R designiert); rot = Adenosin, blau = Thymin, grün = Guanodin, schwarz = Cytidin.

Bei Deletionen oder Insertionen dagegen ist die Basenabfolge meist dermaßen stark verändert, dass eine Auswertung mit Hilfe von BioEdit schlecht möglich ist und besser direkt anhand der Elektropherogramme erfolgt. So scheiterte das Alignment in BioEdit für Exon 9 des *C-KIT* Gens der Probe 4 in Forward-Richtung auf Grund zahlreicher Abweichungen und Überlagerungen zwischen mutierter und Wildtyp-Basenabfolge. Erst mit Hilfe des Elektropherogramms konnte die vorliegende Mutation festgestellt und manuell genauer analysiert werden (Abbildung 15).

Die Basenabfolge für Codons 504 und 505 lautet im Wildtyp TTT AAC. Im vorliegenden Fall zeigten sich in der Sequenzierung jedoch weitere Signale, sodass die automatische Analyse keine eindeutige Zuordnung treffen konnte. Obwohl der Wildtyp weiterhin nachweisbar ist, liegen zusätzliche unter- und überschwellige Peaks in beiden Codons vor, welche manuell als die Basenabfolge GCC TAT identifiziert wurden. Diese deckt sich mit der Folge der vorangegangenen Codons 502 und 503. Es handelte sich somit um eine

Duplikationsmutation der Codons 502 und 503. Da die Duplikation mit 6 Basen ein Vielfaches von 3 umfasste, wurde dabei das Aminosäure-Leseraster nicht verschoben (kein Frame-Shift). Alle nachfolgenden Codons sind jedoch auf Grund der Insertion zweier zusätzlicher Codons verschoben, was die weiteren Überlagerungen und das Scheitern der automatischen Auswertung auch des restlichen Elektropherogramms nach der Mutation erklärt.

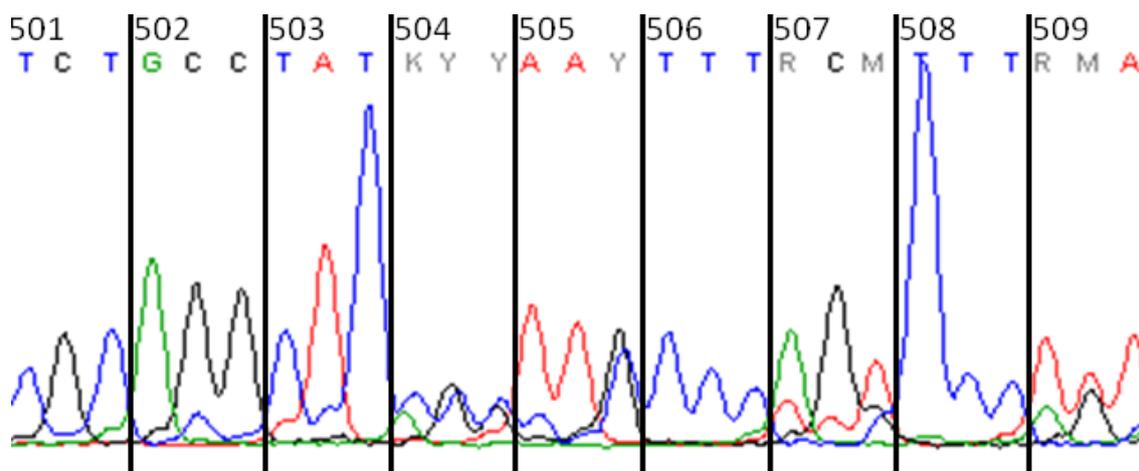


Abbildung 15: Ausschnitt des Elektropherogramms der Probe 4 in Exon 9 des *C-KIT* Gens in Forward-Richtung; mutationsbedingte Überlagerung zahlreicher Peaks; rot = Adenosin, blau = Thymin, grün = Guanin, schwarz = Cytidin.

3.7. Ergebnisse der Sequenzierung

Bei 26 Proben und je 4 zu analysierenden Exons (*C-KIT* Gen Exons 9, 11 und 17; *CTNNB1* Gen Exon 3) waren also insgesamt Sequenzierungen von 104 Genabschnitten vorgesehen. Es fanden sich zusammengenommen insgesamt 21 Mutationen. Davon hatten 16 Mutationen einen die Aminosäure-Sequenz-verändernden Effekt, d. h. die Mutation führte zum Einbau einer anderen Aminosäure in Form einer Substitution (Missense) oder zu einer Verlängerung oder Verkürzung des Produkts der Proteinbiosynthese (Duplikation bzw. Translationsabbruch). Von den festgestellten Mutationen wiesen dagegen 5 Fälle keine Veränderungen der Aminosäure-Sequenz auf, d. h. das aus der Mutation resultierende Codon kodierte aufgrund der Redundanz im genetischen Code dennoch für dieselbe Aminosäure.

Nach Ländern und Genen aufgeschlüsselt ergibt sich folgendes Bild in unserem Probenkollektiv: Im *C-KIT* Gen wurden insgesamt 14 Mutationen nachgewiesen, welche auf 11 verschiedene Proben entfielen. Bei 9 von insgesamt 26 Proben lag mindestens eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation vor. Somit wiesen 42,3% der eingeschlossenen Fälle Mutationen bzw. 34,6% mindestens eine Mutation mit Einfluss auf die Aminosäuresequenz auf.

- Proben aus Deutschland wiesen mit 1 von 5 Fällen mit Aminosäure-Sequenz-verändernden Mutationen (20%), die geringste Gesamtmutationsrate für das *C-KIT* Gen in unserem Kollektiv auf. Stumme Mutationen wurden nicht nachgewiesen (0%).
- Bei peruanische Proben lagen in 2 von 6 Fällen Mutationen vor (33,3%). Allerdings war nur bei einem dieser Fälle eine Veränderung der Aminosäure-Sequenz eingetreten (16,7%).
- Proben aus Singapur wiesen bei 8 von 15 Fällen Mutationen auf (53,3%). Auch hier lagen in einem Fall nur stumme Mutationen vor; die Fallmutationsrate mit Veränderung der Aminosäure-Sequenz beträgt für Singapur 46,7%.

Im *CTNNB1* Gen wurden insgesamt 7 Mutationen nachgewiesen, die auf 6 Proben entfielen. Bei 5 Proben lag mindestens eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation vor. Somit wiesen 23,1% der Fälle Mutationen bzw. 19,2% mindestens eine Mutation mit Einfluss auf die Aminosäuresequenz auf.

- Proben aus Deutschland wiesen mit 0 von 5 Fällen keinerlei Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1* Gens auf (0%).
- Peruanische Proben zeigten in 3 von 6 Fällen Mutationen (50%). Nur 2 von 6 Fälle zeigten jedoch Mutationen mit Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz (33,3%).
- Bei den Proben aus Singapur lagen in 3 von 15 Fällen insgesamt 4 Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1* Gens vor (20%), wobei auf Probe 20 zwei Mutationen entfielen. Alle Mutationen bei Proben aus Singapur gingen mit Veränderungen der Aminosäure-Sequenz einher.

Bei drei der vorgesehenen Sequenzierungen, alle das *C-KIT* Gen Exon 11 betreffend, scheiterten die angewandten PCRs wiederholt auch bei verschiedenen Ansätzen; daher war hier die Sequenzierung nicht möglich. Bei 8 Fällen gelang nur eine teilweise Sequenzanalyse, da das zu untersuchende Exon nur in einer Leserichtung bzw. nur als Teilsegment erfolgreich untersucht werden konnte (Tabelle 13). Es ist durchaus denkbar, dass in diesen Proben weitere, unentdeckte Mutationen vorliegen. In Anbetracht der schlechten DNA-Qualität und dem Mangel an Probenmaterial ließ sich dies nicht weiter eruieren.

C-KIT Exon 9: Nach Exons aufgeschlüsselt fanden sich im *C-KIT* Gen bei Exon 9 insgesamt 8 Mutationen, welche auf 6 Proben entfielen (Abbildung 16 bzw. Tabelle 14). Davon wiesen 5 Mutationen eine Veränderung der Aminosäure-Sequenz auf (62,5%), bei 3 handelte es sich dagegen um stumme Mutationen (37,5%). 7 von 8 Mutationen waren Punktmutationen (Proben 14, 16, 22, 24 und 25), 4 mit Substitution einer Aminosäure (Proben 14, 22, 24 und 25); bei 1 Mutation lag eine Duplikation von 6 Basen/2 Codons mit Verlängerung der Aminosäure-Sequenz vor (Probe 4).

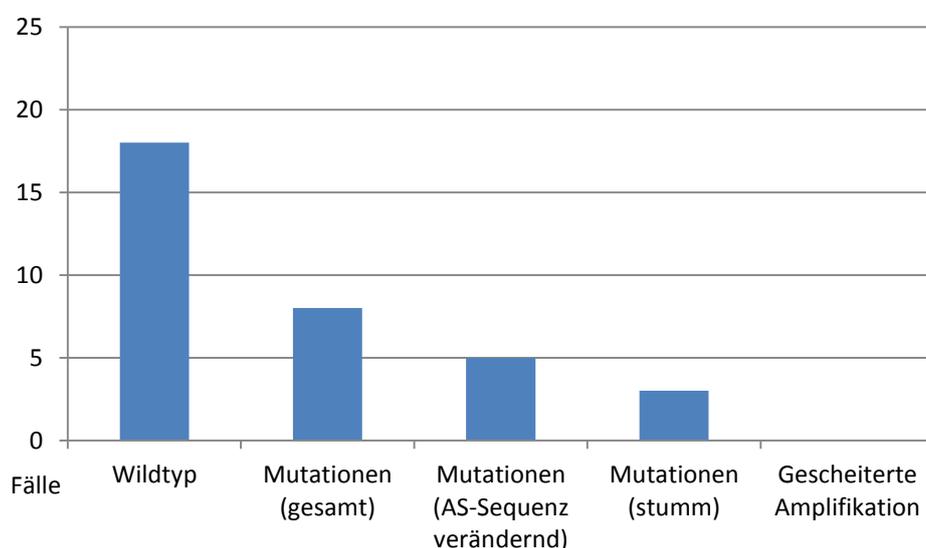


Abbildung 16: Mutationsergebnis für *C-KIT* Gen Exon 9.

In Anbetracht der prognostischen Relevanz der Lokalisation des Tumorgewebes, wurden die diagnostizierten Mutationen in Bezug zum jeweiligen Entnahmeort der Probe gesetzt. Bei 4 der 8 Mutationen (50%) handelte es sich um nasale/pharyngeale Proben (Proben 14, 16, beide je 2 Mutationen, beide aus Singapur). Es führte nur eine dieser Mutationen zu einer Veränderung der Aminosäure-Sequenz (25%).

Die beschriebene Duplikation bei Probe 4 im *C-KIT* Gen Exon 9 wurde dagegen bei einem Tumordinfiltrat aus Nierengewebe bei einer Probe aus Deutschland nachgewiesen; bei ihr handelt es sich also um eine extranasale/-pharyngeale Manifestation. Die letzten 3 festgestellten Punktmutationen wurden in extranasalen/-pharyngealen Proben aus Hoden, Haut und Weichteilen bei Fällen aus Singapur festgestellt und führten zu Substitutionen. Damit lagen bei allen Mutationen in extranasalen/-pharyngealen Proben Veränderungen der Aminosäure-Sequenz vor (100%).

Tabelle 14: Mutationen im Exon 9 des *C-KIT* Gens, aufgeschlüsselt nach Typ der Mutation, Codon und veränderter Aminosäure, Lokalisation, Herkunftsland.

Nr.	Art der Mutation	Mutation	Lokalisation	Herkunft
4	1 Duplikation (AS-verändernd)	<u>p.A502_Y503dup</u>	extranasal/ -pharyngeal (Niereninfiltrat)	Deutschland
14	2 Punktmutationen (AS verändernd, bzw. stumm)	<u>p.S481N</u> ; p.K471K	nasal/pharyngeal (Nasenhöhle)	Singapur
16	2 Punktmutationen (stumm)	p.N505N; p.N512N	nasal/pharyngeal (Nasen- und Nasen- nebenhöhle)	Singapur
22	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.S451L</u>	extranasal/ -pharyngeal (Hoden, Haut)	Singapur
24	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.F504L</u>	extranasal/ -pharyngeal (Weichteile)	Singapur
25	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.P467L</u>	extranasal/ -pharyngeal (Hoden)	Singapur

AS-verändernd = Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen; diese sind unterstrichen.

C-KIT Exon 11: Im Exon 11 des *C-KIT* Gens wurde 1 Mutation bei Probe 17 nachgewiesen (3,8%), welche die Aminosäure-Sequenz veränderte (Abbildung 17 bzw. Tabelle 15). Es wurden hier keine weiteren Mutationen nachgewiesen, allerdings scheiterten bei 3 Proben (11,5%) die Analysen vollständig (Proben 7, 15 und 24).

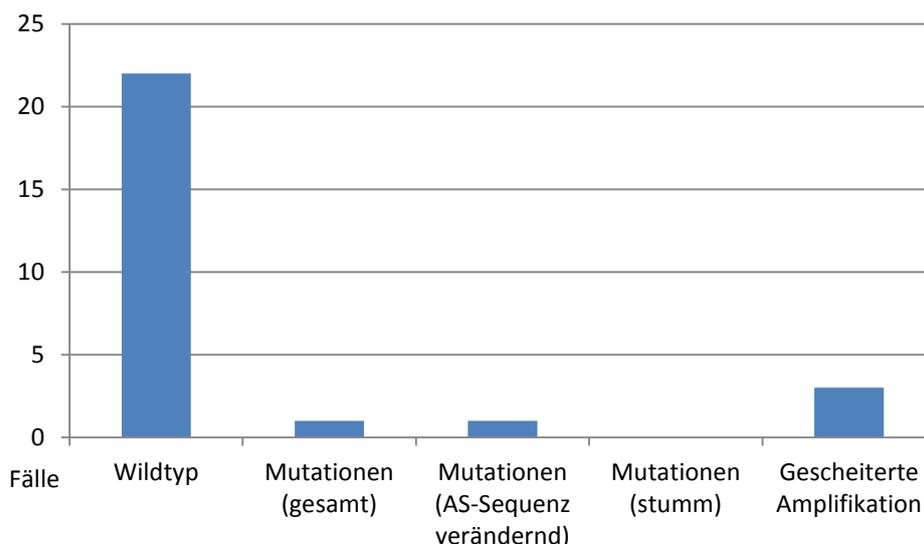


Abbildung 17: Mutationsergebnis für *C-KIT* Gen Exon 11.

Bei der nachgewiesenen Mutation handelt es sich um eine Nonsense-Mutation: Das veränderte Codon entspricht keiner Aminosäure, sondern kodiert für den Stopp der Proteinbiosynthese; es kommt zum verfrühten Translationsabbruch. Diese die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation entstammt einer nasalen/pharyngealen Probe aus Singapur.

Tabelle 15: Mutationen im Exon 11 des *C-KIT* Gens, aufgeschlüsselt nach Typ der Mutation, Codon und veränderter Aminosäure, Lokalisation, Herkunftsland.

Nr.	Art der Mutation	Mutation	Lokalisation	Herkunft
17	1 Punktmutation bzw. Nonsense (Abbruch, AS-verändernd)	<u>p.W557X</u> <u>= stop</u>	nasal/pharyngeal (Nasennebenhöhle)	Singapur

AS-verändernd = Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen; diese sind unterstrichen.

Bei nasaler Manifestation betrug somit die Rate der Aminosäure-Sequenz verändernden Mutationen 100%, allerdings wurde nur eine einzige Mutation in dieser Lokalisation nachgewiesen; es wurden keine Mutationen bei extranasaler/-pharyngealer Tumormanifestation gefunden; desweiteren scheiterten 3 Amplifikationen. Die Aussagekraft bezüglich möglicher Mutationen im Exon 11 ist daher sehr eingeschränkt.

C-KIT Exon 17: Bei den Sequenzierungen des *C-KIT* Gens im Exon 17 wurden insgesamt 5 Mutationen gefunden, welche auf 5 Proben entfielen (Abbildung 18 bzw. Tabelle 16). 4 der 5 Mutationen wiesen eine Veränderung der Aminosäure-Sequenz auf (80%), 1 Mutation war stumm (20%). Bei allen 5 Mutationen handelte es sich um Punktmutationen (Proben 5, 6, 17, 20 und 23).

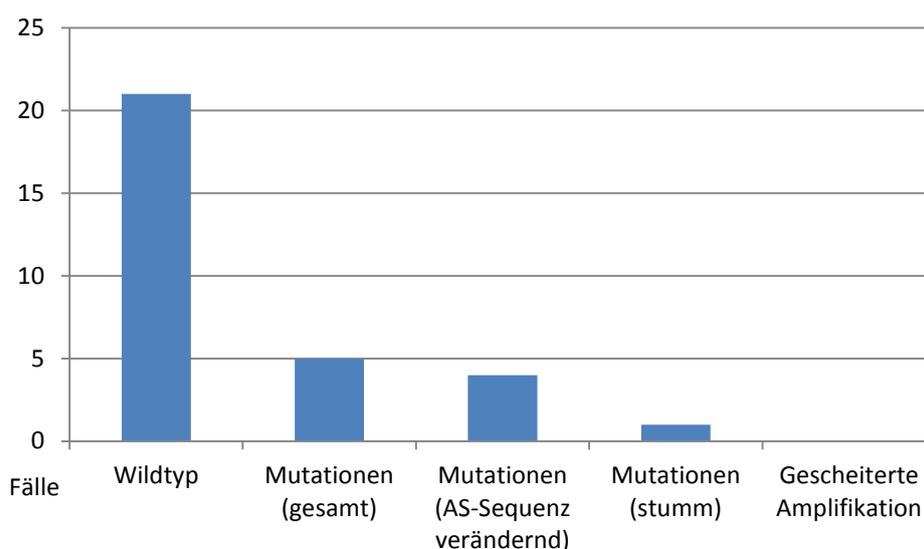


Abbildung 18: Mutationsergebnis für *C-KIT* Gen, Exon 17.

Von 5 nachgewiesenen Mutationen wurden 3 aus nasalen/pharyngealen Proben nachgewiesen. Bei 2 dieser 3 Proben lagen die Aminosäure-Sequenz verändernde Punktmutationen vor (66,6%). Bei den übrigen 2 Mutationen handelte es sich um die Aminosäure-Sequenz verändernde Punktmutationen aus Proben mit extranasaler/-pharyngealer Manifestation (100%).

Tabelle 16: Mutationen im Exon 17 des *C-KIT* Gens, aufgeschlüsselt nach Typ der Mutation, Codon und veränderter Aminosäure, Lokalisation, Herkunftsland.

Nr.	Art der Mutation	Mutation	Lokalisation	Herkunft
5	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.R804Q</u>	nasal/pharyngeal (nasale Biopsie)	Peru
6	1 Punktmutation (stumm)	p.I798I	nasal/pharyngeal (nasale Biopsie)	Peru
17	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.A814V</u>	nasal/pharyngeal (Nasennebenhöhle)	Singapur
20	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.C788Y</u>	extranasal/ -pharyngeal (Gastrointestinaltrakt)	Singapur
23	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.V825I</u>	extranasal/ -pharyngeal (Weichteile, Hoden)	Singapur

AS-verändernd = Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen; diese sind unterstrichen.

In allen 3 untersuchten Exons des *C-KIT* Gens zusammen wurden also insgesamt 8 Mutationen in Fällen mit nasaler/pharyngealer Beteiligung nachgewiesen, 6 bei extranasaler/-pharyngealer Manifestation (Tabelle 17). Alle extranasal/-pharyngeal aufgetretenen Mutationen führten zu Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz (100%); bei nasaler/pharyngealer Beteiligung wurden 4 Mutationen gefunden, welche die Aminosäure-Sequenz veränderten und 4 weitere, die stumm waren (jeweils 50%).

Tabelle 17: Zahl nachgewiesener Mutationen im *C-KIT* Gen nach Lokalisation und Effekt auf die kodierte Aminosäure-Sequenz.

Lokalisation	nasal/pharyngeal	extranasal/-pharyngeal
AS-Sequenz verändernd	4	6
stumm	4	0
Gesamtzahl	8	6

AS-verändernd = Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen, stumm = stumme Mutationen.

CTNNB1 Exon 3: Bei den Sequenzierungen des Exons 3 im *CTNNB1* Gens wurden insgesamt 7 Mutationen nachgewiesen, welche auf 6 Proben entfielen (Abbildung 19 bzw. Tabelle 18). Bei 5 von insgesamt 26 Proben lag mindestens

eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation vor; 23,1% der eingeschlossenen Fälle wiesen Mutationen auf, 19,2% davon mindestens eine Mutation mit Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Mit 6 von 7 Mutationen bewirkten 85,7% eine Veränderung der Aminosäure-Sequenz, 1 war stumm (14,3%). In allen Fällen handelte es sich um Punktmutationen (Proben 7, 8, 10, 14, 20 und 25).

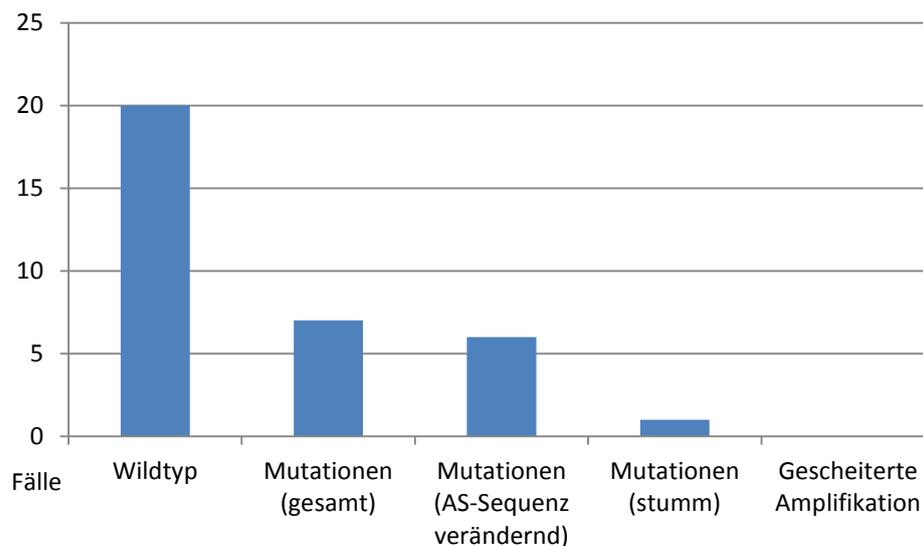


Abbildung 19: Mutationsergebnis für *CTNNB1* Gen, Exon 3.

Auf alle Fälle bezogen wiesen 25% mit nasaler/pharyngealer Beteiligung und 20% der Fälle mit extranasaler/-pharyngealer Manifestation Mutationen auf. Werden nur die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen einbezogen, so fällt dieser Wert für nasale/pharyngeale Fälle auf 18,8% ab.

Von 7 nachgewiesenen Mutationen wurden 4 in nasalen/pharyngealen Proben nachgewiesen (Tabelle 19). Bei 3 dieser 4 Mutationen wurden die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen nachgewiesen (75%). Die 3 verbliebenen Mutationen lagen in extranasalen/-pharyngealen Proben vor und veränderten alle die Aminosäure-Sequenz (100%).

Tabelle 18: Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1* Gens, aufgeschlüsselt nach Typ der Mutation, Codon und veränderter Aminosäure, Lokalisation, Herkunftsland.

Nr.	Art der Mutation	Mutation	Lokalisation	Herkunft
7	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.T42A</u>	nasal/pharyngeal (nasale Biopsie)	Peru
8	1 Punktmutation (stumm)	p.H24H	nasal/pharyngeal (nasale Biopsie)	Peru
10	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.E55G</u>	nasal/pharyngeal (nasale Biopsie)	Peru
14	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.G48D</u>	nasal/pharyngeal (Nasenhöhle)	Singapur
20	2 Punktmutationen (AS-verändernd)	<u>p.A13T</u> ; <u>p.A39V</u>	extranasal/ -pharyngeal Gastrointestinaltrakt)	Singapur
25	1 Punktmutation (AS-verändernd)	<u>p.S47N</u>	extranasal/ -pharyngeal (Hoden)	Singapur

AS-verändernd = Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen; diese sind unterstrichen.

Tabelle 19: Zahl nachgewiesener Mutationen im *CTNNB1* Gen nach Lokalisation und Effekt auf die kodierte Aminosäure-Sequenz.

Lokalisation	nasal/pharyngeal	extranasal/-pharyngeal
AS-Sequenz verändernd	3	3
stumm	1	0
Gesamtzahl	4	3

AS-verändernd = Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen, stumm = stumme Mutationen.

3.8. Zusammenfassung und statistische Auswertung der Ergebnisse

3.8.1. Tabellarische Darstellung

Es folgt eine tabellarische Auflistung der Proben nach interner Fallnummer, Herkunftsland, Patienteninformationen, festgestellter DNA-Qualität und Status der analysierten Exons (*C-KIT* Gen Exon 9, 11 und 17, *CTNNB1* Gen Exon 3; Tabelle 20).

Nachgewiesene Mutationen, die in COSMIC gene analysis [Zugriff 26.01.2015] als bereits vorbeschrieben identifiziert wurden, sind zusätzlich markiert:

* - Vorbeschrieben.

° - Nicht vorbeschrieben.

Insgesamt waren 5 von 14 im *C-KIT* Gen nachgewiesenen Mutationen (35,7%) und 5 von 7 im *CTNNB1* Gen (71,4%) vorbeschrieben.

C-KIT Gen:

Exon 9:

p.A502_Y503dup / c.1504_1509dup (Probe4)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=1326>)

p.F504L / c.1510T>C (Probe 24)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=53305>)

Exon 11:

p.W557X=Stop / c.1671G>A (Probe 17)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=1231>)

Exon 17:

p.I798I / c.2394C>T (Probe 6)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=1307>)

p.V825I / c.2473G>A (Probe 23)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=19110>)

CTNNB1 Gen:

Exon 3:

p.T42A / c.124A>G (Probe 7)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5745>)

p.E55G / c.164A>G (Probe 10)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5752>)

p.G48D / c.143G>A (Probe 14)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5733>)

p.A13T / c.37G>A (Probe 20)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5747>)

p.S47N / c.140G>A (Probe 25)

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5712>)

Tabelle 20: Ergebniszusammenfassung.

Nr.	Herkunft	Age	Sex	Lok.	Q.	C-KIT Exon 9	C-KIT Exon 11	C-KIT Exon 17	CTNNB1 Exon 3
1	Deutschland	37	M	LK	++	wt	wt	wt	wt
2	Deutschland	74	F	Gaumen	+++	wt	wt	wt	wt
3	Deutschland	57	M	Nase	+++	wt	wt	wt	wt
4	Deutschland	61	F	Niere	+++	<u>p.A502 Y503dup/ c.1504 1509dup*</u>	wt	wt	wt
5	Peru	50	M	Nase	+	wt	wt, schlecht	<u>p.R804Q/c.2411G>A°</u>	wt
6	Peru	40	M	Nase	++	wt	wt	<u>p.I798I/c.2394C>T*</u>	wt
7	Peru	39	F	Nase	-	wt	gescheitert	wt	<u>p.T42A/c.124A>G*</u>
8	Peru	22	M	Nase	+	wt	wt	wt	<u>p.H24H/c.72C>T°</u>
9	Peru	56	M	Nase	++	wt	wt	wt	wt
10	Peru	43	F	Nase	++	wt	wt	wt, nur B	<u>p.E55G/c.164A>G*</u>
11	Singapur	66	M	Nase	++	wt	wt	wt	wt
12	Singapur	36	M	Nase, Magen	++	wt	wt	wt, nur B	wt
13	Singapur	49	M	NNH	+	wt	wt	wt	wt
14	Singapur	37	M	Nase	+	<u>p.K471K/c.1413G>A° p.S481N/c.1442G>A°</u>	wt, nur S1	wt	<u>p.G48D/c.143G>A*</u>

Mutationen gelb markiert, die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen zusätzlich unterstrichen; Lok. = Lokalisation, Q. = DNA-Qualität, LK = Lymphknoten, NNH = Nasennebenhöhle, GIT = Gastrointestinaltrakt, WT = Weichteile, wt = Wildtyp, nur S1/S2/B = nur partielle Amplifikation und Auswertung möglich von Teilsegment 1, 2, Backward, gescheitert = Amplifikation und Auswertung vollständig gescheitert, schlecht = schlechte Sequenzierungsqualität; mit * markierte Mutationen sind laut COSMIC vorherbeschrieben, mit ° markierte nicht.

Fortsetzung von Tabelle 20: Ergebniszusammenfassung.

Nr.	Herkunft	Age	Sex	Lok.	Q.	C-KIT Exon 9	C-KIT Exon 11	C-KIT Exon 17	CTNNB1 Exon 3
15	Singapur	54	M	Nase, Hoden	-	wt, nur S1	gescheitert	wt	wt, nur S1
16	Singapur	66	M	Nase, NNH	+	<u>p.N505N/c.1515C>T°</u> <u>p.N512N/c.1560C>T°</u>	wt	wt	wt
17	Singapur	42	M	NNH	+	wt	<u>p.W557X=Stop/</u> <u>c.1671G>A*</u>	<u>p.A814V/c.2441C>T°</u>	wt
18	Singapur	48	M	GIT	-	wt	wt, nur S2	wt, nur S2	wt, nur S1
19	Singapur	53	F	GIT	++	wt, schlecht	wt	wt	wt
20	Singapur	24	M	GIT	+	wt	wt, schlecht	<u>p.C788Y/c.2363G>A°</u>	<u>p.A13T/c.37G>A*</u> <u>p.A39V/c.116T>C°</u>
21	Singapur	75	M	Haut, Hoden	+	wt	wt	wt	wt
22	Singapur	80	F	Haut, Hoden	+	<u>p.S451L/c.1351T>C°</u>	wt	wt	wt
23	Singapur	69	M	WT, Hoden	+	wt, schlecht	wt	<u>p.V825I/c.2473G>A*</u>	wt
24	Singapur	65	M	WT	-	<u>p.F504L/c.1510T>C*</u>	gescheitert	wt	wt
25	Singapur	61	M	Hoden	-	<u>p.P467L/c.1400C>T°</u>	wt, schlecht	wt	<u>p.S47N/c.140G>A*</u>
26	Deutschland	31	M	Nase	+++	wt	wt	wt	wt

Mutationen gelb markiert, die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen zusätzlich unterstrichen; Lok. = Lokalisation, Q. = DNA-Qualität, LK = Lymphknoten, NNH = Nasennebenhöhle, GIT = Gastrointestinaltrakt, WT = Weichteile, wt = Wildtyp, nur S1/S2/B = nur partielle Amplifikation und Auswertung möglich von Teilssegment 1, 2, Backward, gescheitert = Amplifikation und Auswertung vollständig gescheitert, schlecht = schlechte Sequenzierungsqualität; mit * markierte Mutationen sind laut COSMIC vorbeschrieben, mit ° markierte nicht.

3.8.2. Ergebnisse nach Exon, Lokalisation und Herkunft

Die folgenden Abbildungen 20-23 fassen die Untersuchungsergebnisse nach Fällen insgesamt (a), nach Tumorlokalisation (b-c: nasale/pharyngeale versus extranasale/-pharyngeale Manifestation) und Herkunftsland (d-f: Singapur, Peru, Deutschland) für die untersuchten Gene bzw. deren Exons zusammen.

Auf Fall-Ebene werden unterschieden:

- Wildtyp; kein Nachweis von Mutationen des untersuchten Exon;
- Nur stumme Mutationen
- Mindestens eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation, ggfs. gemeinsam mit weiteren, auch stummen Mutationen
- Vollständiges Scheitern der Amplifikations-PCRs und folgender Untersuchungsschritte.

Das partielle oder Scheitern von Untersuchungen schränkt bei der bereits kleinen Probenzahl die Aussagekraft der Ergebnisse zusätzlich ein.

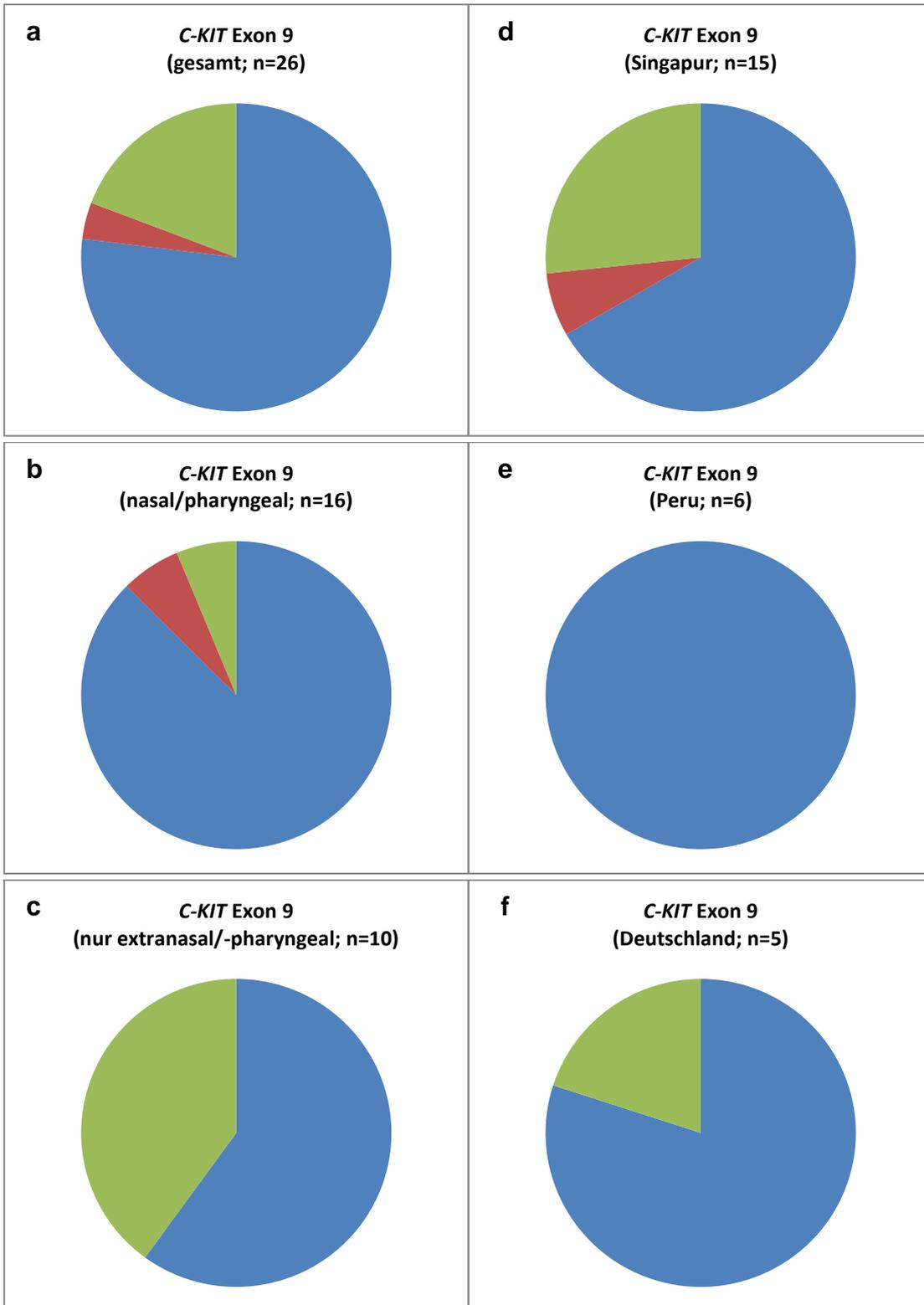


Abbildung 20: Ergebnisse der Sequenzanalysen nach Fällen für das *C-KIT* Gen, Exon 9; gesamt (a), abhängig von der Lokalisation (links, b-c) und dem Herkunftsland (rechts, d-f).

- Wildtyp
- Mutation (nur stumm ≥ 1)
- Mutation (AS-verändernd ≥ 1)
- Amplifikation gescheitert

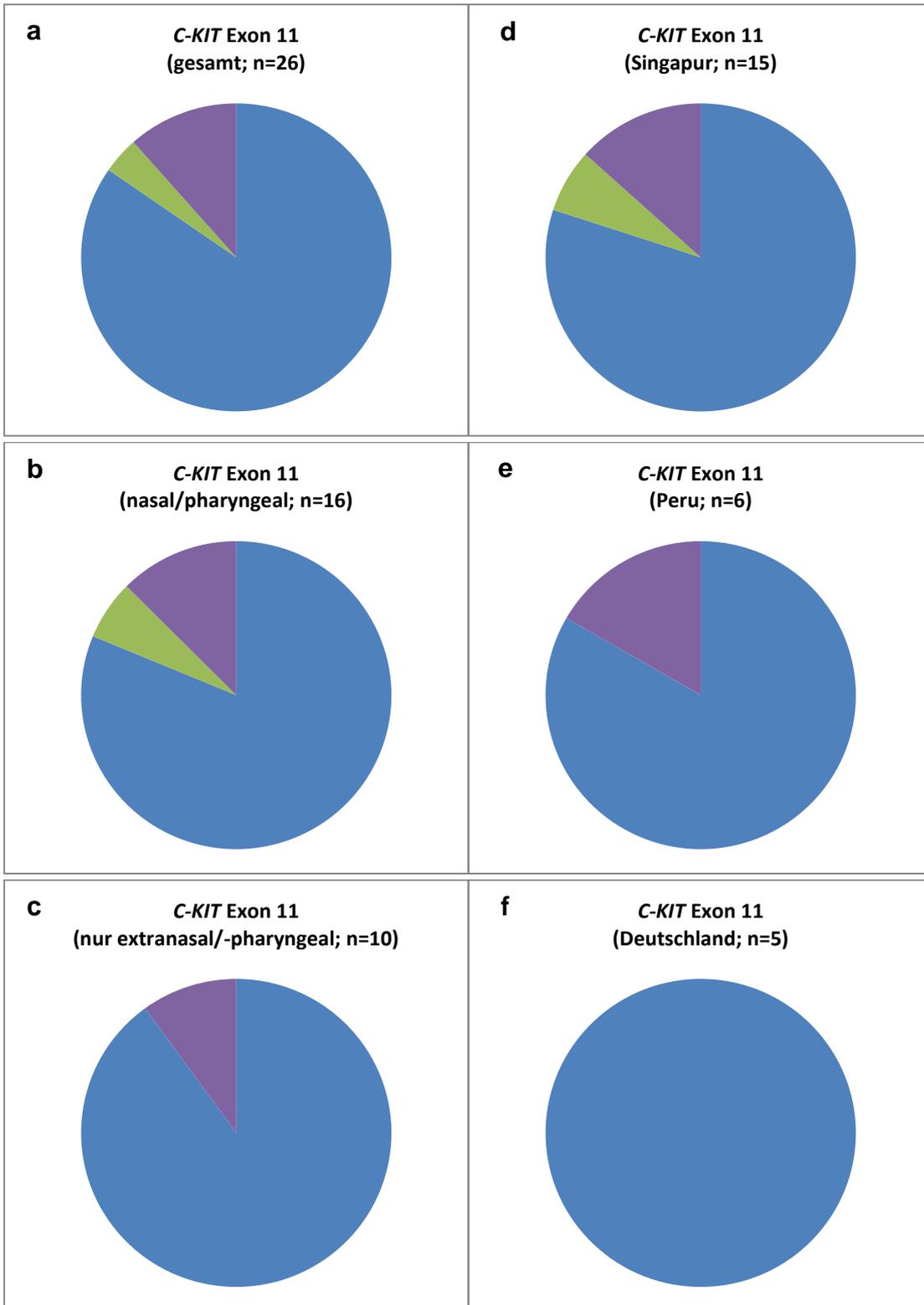


Abbildung 21: Ergebnisse der Sequenzanalysen nach Fällen für das C-KIT Gen, Exon 11; gesamt (a), abhängig von der Lokalisation (links, b-c) und dem Herkunftsland (rechts, d-f).

- Wildtyp
- Mutation (nur stumm ≥ 1)
- Mutation (AS-verändernd ≥ 1)
- Amplifikation gescheitert

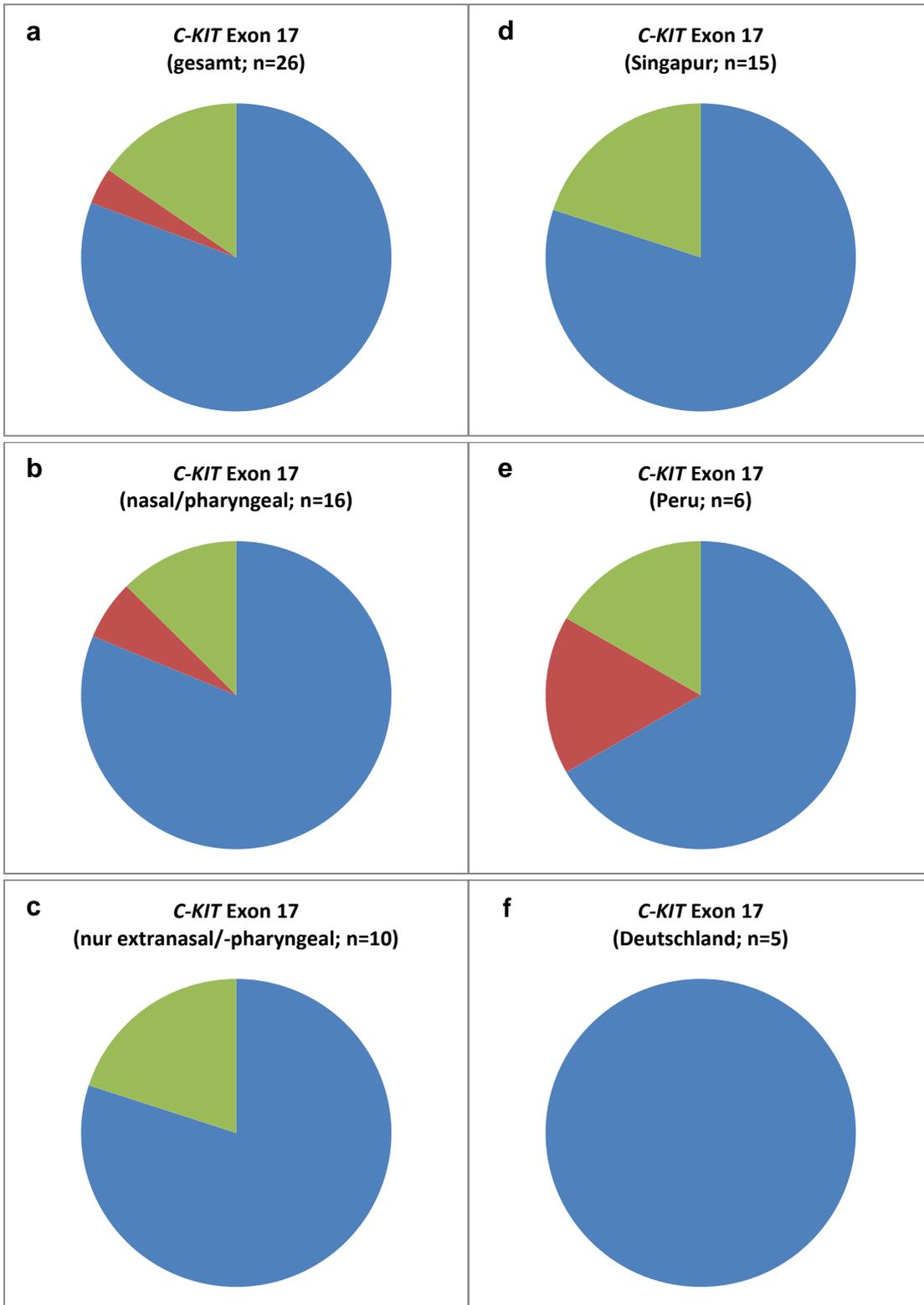


Abbildung 22: Ergebnisse der Sequenzanalysen nach Fällen für das C-KIT Gen, Exon 17; gesamt (a), abhängig von der Lokalisation (links, b-c) und dem Herkunftsland (rechts, d-f).

- Wildtyp
- Mutation (nur stumm ≥ 1)
- Mutation (AS-verändernd ≥ 1)
- Amplifikation gescheitert

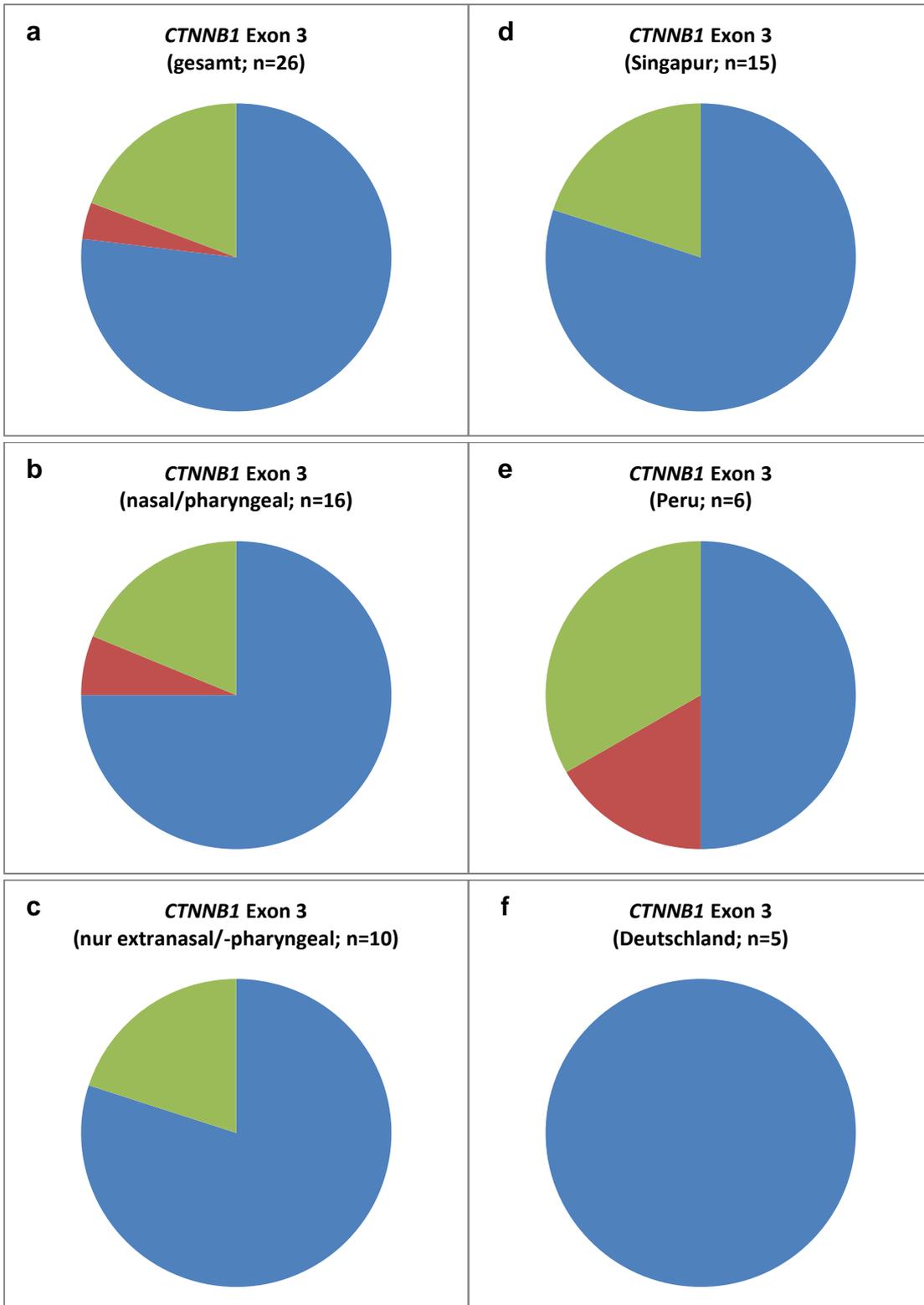


Abbildung 23: Ergebnisse der Sequenzanalysen nach Fällen für das *CTNNB1* Gen, Exon 3; gesamt (a), abhängig von der Lokalisation (links, b-c) und dem Herkunftsland (rechts, d-f).

- Wildtyp
- Mutation (nur stumm ≥ 1)
- Mutation (AS-verändernd ≥ 1)
- Amplifikation gescheitert

3.8.3. Globale Mutationsraten über alle Gene und Exons

Insgesamt wiesen 14 von 26 Fällen (53,8%) mindestens eine Mutation in den untersuchten Genabschnitten auf, in 11 Fällen (42,3%) lag mindestens eine Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation vor. Die globalen Mutationsraten der vier untersuchten Exons unterschieden sich nicht signifikant, weder die Aminosäure-Sequenz verändernden Mutationen noch die Mutationen insgesamt (Tabelle 21; $\chi^2 = 1,667$ bzw. $2,444$; $p > 0,20$; n. s.).

Tabelle 21: Anzahl der Fälle mit Wildtyp und stummen bzw. Aminosäure-Sequenz verändernden Mutationen nach Gen und Exon.

Gen/Exon	<i>C-KIT</i> Exon 9	<i>C-KIT</i> Exon 11	<i>C-KIT</i> Exon 17	<i>CTNNB1</i> Exon 3	gesamt
Wildtyp	20	22	21	20	83
nur stumm ≥ 1	1	0	1	1	3
AS-verändernd ≥ 1	5	1	4	5	15
Amp. gescheitert	0	3	0	0	3
auswertbar	26	23	26	26	101
gesamt	26	26	26	26	104

Amp. gescheitert = Amplifikation und nachfolgende Untersuchungen vollständig gescheitert.

3.8.4. Länderspezifische Mutationsraten über alle Gene und Exons

Auch Unterschiede der Gesamtmutationsraten zwischen den drei Ländern waren bei konservativem Testen nicht nachzuweisen (Tabelle 22; $\chi^2 = 4,3388$; $0,20 > p > 0,10$; n. s.). Die Fälle mit gescheiterten Amplifikationen (*C-KIT* Exon 11) verteilten sich auf Proben aus Singapur und Peru. Einer dieser Fälle (Probe 15) wies neben einer gescheiterten Amplifikation sonst nur Wildtyp-Ergebnisse auf und wurde für diese Berechnung darum als Wildtyp gewertet. Es lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass im nicht amplifizierbaren Genabschnitt Mutationen vorlagen.

Tabelle 22: Anzahl der Fälle mit Mutationen (inkl. stumm) bzw. Wildtyp nach Land.

Herkunft	Singapur	Peru	Deutschland	gesamt
Fälle mit Mutationen (inkl. nur stumm)	8	5	1	14
Fälle nur mit Wildtyp (inkl. 1 Amp. gescheitert)	7	1	4	12
gesamt	15	6	5	26

Amp. gescheitert = Amplifikation und nachfolgende Untersuchungen vollständig gescheitert.

Testet man die Daten von Singapur und Peru zusammen gegen die von Deutschland, zeigt sich ein sehr signifikanter Unterschied der genetisch näher verwandten asiatischen und südamerikanischen (mongolisch-stämmigen) Populationen gegenüber der deutschen (kaukasischen) Bevölkerung (Tabelle 23; $\chi^2 = 7,5837$; $p < 0,01$; s. s.). Allerdings bedarf dieses Ergebnis bei den kleinen Fallzahlen und geringen Mutationshäufigkeiten der Überprüfung in einem größeren Probenkollektiv.

Tabelle 23: Anzahl der Fälle mit Mutationen (inkl. stumm) bzw. Wildtyp bei Proben aus Singapur und Peru gegenüber Deutschland.

Herkunft	Singapur/Peru	Deutschland	gesamt
Fälle mit Mutationen (inkl. stumm)	13	1	14
Fälle nur mit Wildtyp (inkl. 1 Amp. gescheitert)	8	4	12
gesamt	21	5	26

Amp. gescheitert = Amplifikation und nachfolgende Untersuchungen vollständig gescheitert.

3.8.5. Länderspezifische Mutationsraten nach Genen und Exons

Werden die Gesamtmutationsraten nicht nur nach Ländern sondern nach einzelnen Exons getrennt betrachtet, können für Exon 9 des *C-KIT* Gens allein keine signifikanten länderspezifischen Unterschiede mehr nachgewiesen werden ($\chi^2 = 2,9849$; $p > 0,20$; n. s.). Dies ändert sich auch nicht, wenn wie oben Singapur und Peru zusammengefasst werden.

Die einzige im Exon 11, die wenigen in Exon 17 des *C-KIT* Gens und im Exon 3 des *CTNNB1* Gens gefundenen Mutationen erlauben keine Aussage über länderspezifische Unterschiede.

3.8.6. Lokalisationsspezifische Mutationsraten

Die Prüfung lokalisationsspezifischer Unterschiede der Gesamtmutationsraten unterliegt zusätzlichen Einschränkungen. So standen aus Peru keine Proben mit nur extranasaler/-pharyngealer Manifestation zur Verfügung. Dem liegt vermutlich eher ein systematischer Stichprobenfehler (Verfügbarkeit von Probenmaterial, Vorselektion vor Ort) als ein echter Populationsunterschied zugrunde. Die scheinbar höhere Gesamtmutationsrate in Exon 9 des *C-KIT* Gens bei extranasaler/-pharyngealer im Vergleich zu nasaler/pharyngealer Tumorlokalisation ist daher nicht klar; der Unterschied ist jedoch auch nicht signifikant (Tabelle 24; $\chi^2 = 2,6266$; $0,20 > p > 0,10$; n. s.).

Tabelle 24: Anzahl der Fälle mit Mutationen (inkl. stumm) bzw. Wildtyp im *C-KIT* Gen Exon 9 nach Tumorlokalisation.

Lokalisation (<i>C-KIT</i> Exon 9)	nasal/ pharyngeal	extranasal/ -pharyngeal	gesamt
Fälle mit Mutationen (inkl. nur stumm)	2	4	6
Fälle nur mit Wildtyp (inkl. 1 Amp. gescheitert)	14	6	20
gesamt	16	10	26

Amp. gescheitert = Amplifikation und nachfolgende Untersuchungen vollständig gescheitert.

Im Exon 11 des *C-KIT* Gens fand sich nur eine einzige Mutation. Lokalisationsspezifischen Unterschiede der Gesamtmutationsrate waren deshalb nicht prüfbar. Auch im Exon 17 des *C-KIT* Gens war kein Unterschied der Gesamtmutationsraten zwischen nasaler/pharyngealer Beteiligung und extranasaler/-pharyngealer Manifestation nachzuweisen (Tabelle 25; $\chi^2 = 0,0062$; $p > 0,20$, n. s.). Ebenso wenig im Exon 3 des *CTNNB1* Gens (Tabelle 26; $\chi^2 = 0,0866$; $p > 0,20$, n. s.).

Tabelle 25: Anzahl der Fälle mit Mutationen (inkl. stumm) bzw. Wildtyp im *C-KIT* Gen Exon 17 nach Tumorlokalisation

Lokalisation (<i>C-KIT</i> Exon 17)	nasal/ pharyngeal	extranasal/ -pharyngeal	gesamt
Fälle mit Mutationen (inkl. nur stumm)	3	2	5
Fälle nur mit Wildtyp (inkl. 1 Amp. gescheitert)	13	8	21
gesamt	16	10	26

Amp. gescheitert = Amplifikation und nachfolgende Untersuchungen vollständig gescheitert.

Tabelle 26: Anzahl der Fälle mit Mutationen (inkl. stumm) bzw. Wildtyp im *CTNNB1* Gen Exon 3 nach Tumorlokalisation

Lokalisation (<i>CTNNB1</i> Exon 3)	nasal/ pharyngeal	extranasal/ -pharyngeal	gesamt
Fälle mit Mutationen (inkl. nur stumm)	4	2	6
Fälle nur mit Wildtyp (inkl. 1 Amp. gescheitert)	12	8	20
gesamt	16	10	26

Amp. gescheitert = Amplifikation und nachfolgende Untersuchungen vollständig gescheitert.

3.8.7. Konfidenzintervalle der Mutationsraten

Zum Vergleich der von uns gefundenen mit den in der Literatur beschriebenen Mutationsraten für das extranodale NK-/T-Zell-Lymphom (NKTCL) und weitere ausgewählte Tumoren wurden mangels genauerer bzw. nur bruchstückhafter Stichprobenangaben für Differenztests die 90% und 95% Konfidenzintervalle (CI 90, CI 95) unserer Werte bei der gegebenen Stichprobengröße zugrundegelegt (approximierte CI, berechnet mit dem Online-CI-Rechner, Institut für Empirische Sozial- und Wirtschaftsforschung, Universität Köln [49]).

Wegen der kleinen Fallzahl wurde dabei nicht nach Ländern unterschieden und die jeweilige Gesamtmutationsrate (inkl. stumme) verwendet. Die folgende Aufstellung fasst die Ergebnisse zusammen.

C-KIT Gen:

Gesamt:

Mindestens eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation: 9 von 26 Fällen (34,6%).

CI 90: 19,3-50%.

CI 95 : 16,3-52,9%.

Mindestens eine Mutation (inkl. stumm): 11 von 26 Fällen (42,3%).

CI 90: 26,4-58,2%.

CI 95: 23,3-61,3%.

Exon 9:

Mindestens eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation: 5 von 26 Fällen (19,2%).

CI 90: 6,5-31,9%.

CI 95: 4,1-34,3%.

Mindestens eine Mutation (inkl. stumm): 6 von 26 Fällen (23,1%).

CI 90: 9,5-36,7%.

CI 95: 6,9-39,3%.

Exon 11:

Mindestens eine Mutation (inkl. stumm): 1 von 26 Fällen (3,8%).

CI 90: 0-9,9%.

CI 95: 0-11,2%.

Exon 17:

Mindestens eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation: 4 von 26 Fällen (15,4%).

CI 90: 3,8-27,1%.

CI 95: 1,5-29,3%.

Mindestens eine Mutation (inkl. stumm): 5 von 26 Fällen (19,2%).

CI 90: 6,5-31,9%.

CI 95: 4,1-34,3%.

NKTCLs: In der Literatur beschriebene Mutationsraten für das extranodale NK-/T-Zell-Lymphom variieren stark in den einzelnen Studien. Wir verglichen deshalb nach Ländern. Der niedrigste Wert, die untere Grenze des CI 95 (23,3%), liegt deutlich über den Werten der Kollektive aus Japan (15,5%), Korea (11,9%), Indonesien (11,1%) und dem Nordosten Chinas (5%). Gleichzeitig liegt die obere Grenze des CI 95 (61,3%) unter der vorbeschriebenen Mutationsrate in der Region Peking in China (71,4%). Unser Ergebnis liegt innerhalb des weiten Streubereichs.

GISTs: Die obere Grenze des CI 95 für *C-KIT* (61,3%) liegt unter den beschriebenen Werten (70-75%). Die Bereiche der Gesamtmutationsraten überschneiden sich nicht. Die Differenz ist besonders für Exon 11 deutlich: GIST: 60-65%; obere Grenze unseres CI 95 von Exon 11: 11,2%. Betrachtet man nur die Aminosäure-Sequenz verändernden Mutationen, so fallen die beschriebenen Mutationsraten für Exon 9 (5%) gerade noch in das CI 95 (untere Grenze 4,1%) und verfehlen dieses für Exon 17 knapp (1%; untere Grenze 1,5%).

Melanome: Verglichen wurden die beschriebenen Mutationsraten für mukosale Melanome. Sie verfehlen mit einem Streubereich von 9-21% den unteren Wert des CI 95 (23,3%) knapp (keine Überschneidung). Weitere Melanom-Subtypen streuen weit (0-50%).

Seminome: In Seminomen sind Mutationen des *C-KIT* Gens in 10-45% der Fälle beschrieben. Das CI 95 unserer Ergebnisse (23,3-61,3%) überschneidet sich damit stark.

Mastozytose: Die in der Literatur beschriebene Gesamtmutationsrate des *C-KIT* Gens (90%) überschneidet sich nicht mit dem CI 95 unserer Anteilswerte; dessen obere Grenze (61,3%) liegt mit großem Abstand darunter. Noch auffälliger ist der Unterschied beim Vergleich mit den Raten für Exon 17 (80-90%; obere Grenze CI 95 Exon 17: 34,3%).

CTNNB1 Gen:

Exon 3:

Mindestens eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation: 5 von 26 Fällen (19,2%).

CI 90: 6,5-31,9%.

CI 95: 4,1-34,3%.

Mindestens eine Mutation (inkl. stumm): 6 von 26 Fällen (23,1%).

CI 90: 9,5-36,7%.

CI 95: 6,9-39,3%.

NKTCLs: Die beschriebene Mutationsrate im *CTNNB1* Gen (22%) wird von den Konfidenzintervallen unserer Ergebnisse umschlossen (Missense, CI 90: 6,5-31,9%; CI 95: 4,1-34,3%; Gesamtmutationsrate, CI 90: 9,5-36,7%; CI 95: 6,9-39,3%). Unsere Studie ergab damit vergleichbare Werte.

HCCs: Das CI 95 unserer Mutationsraten (6,9-39,3%) weist eine ausgedehnte Überschneidung mit den beschriebenen Mutationsraten (11-46%) auf. Werden nur die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen betrachtet (CI 95: 4,1-34,3%), ist der Effekt zwar geringer ausgeprägt, aber weiterhin deutlich.

Hepatoblastome: Unsere Werte (obere Grenze CI 95: 39,3%) überschneiden sich nicht mit der berichteten Rate von 51%.

Lungenkrebs: Auch die berichtete Rate von 4% überschneidet sich nicht mit unseren Werten der Gesamtmutationsrate (untere Grenze CI 95: 6,9%). Allerdings wird diese bei Betrachtung der Aminosäure-Sequenz verändernder Mutationen nur scharf verfehlt (Missense, untere Grenze CI 95: 4,1%).

Kolorektale Karzinome: Mit 10% fallen die vorbeschriebenen Werte in die Konfidenzintervalle unserer Studie (Missense, CI 90: 6,5-31,9%; CI 95: 4,1-34,3%; Gesamtmutationsrate, CI 90: 9,5-36,7%; CI 95: 6,9-39,3%).

Desmoid-Tumore: Unsere Ergebnisse (obere Grenze CI 95: 39,3%) liegen deutlich unter den beschriebenen Mutationsraten für Desmoid-Tumore (48-87%). Die Bereiche überschneiden sich nicht.

4. Diskussion

4.1. Beschreibung des NK-/T-Zell-Lymphoms

Das extranodale NK-/T-Zell-Lymphom (NKTCL) ist ein hochaggressives Malignom, das durch ausgedehnte Nekrosen, lokale Gewebsdestruktion und Gefäßschädigungen charakterisiert ist. Häufig sind die Schleimhäute des oberen Respirationstrakts involviert. Es sind besonders Menschen mit asiatischer und süd- oder mittelamerikanischer Abstammung betroffen [11,18,54,55]. Insgesamt sind die Überlebensraten für diese Erkrankung auch heute noch schlecht, Resistenzen gegen Chemotherapeutika häufig [1,3,9,54].

Das NKTCL ist unabhängig von der geografischen und ethnischen Herkunft der Patienten sehr eng mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert. Eine ätiologische Verbindung ist wahrscheinlich, aber der genaue Mechanismus ist derzeit noch unklar [3,4,5,7,8,9,10,11,13,15,16,56]. Die geografische Verteilung des NKTCLs spiegelt sich allerdings innerhalb dieser Assoziation mit EBV wider: So steht insbesondere der Subtyp A des Virus, welcher vor allem in Asien vertreten ist, mit dieser Erkrankung in enger Verbindung, während Fälle mit Subtyp B zwar bekannt, aber sehr viel seltener sind [3,7]. In einer brasilianischen Studie mit 122 Fällen wurde in 89% der Fälle der Subtyp A und in nur 11% der Subtyp B nachgewiesen [18].

Neben EBV-Positivität weisen NKTCLs eine Reihe typischer immunhistochemischer Charakteristika auf. So sind bei Untersuchungen paraffinierter Proben in der Regel 95% der Fälle CD3ε-positiv [4,6,9,10,13,18,57]. Auch CD56 ist mit 85% Expression sehr häufig positiv, jedoch nicht spezifisch und für die Diagnosestellung nicht zwingend notwendig [4,6,10,11,13,17,18,56,57]. Zytotoxische Marker wie TIA-1 und Granzym-B sind bei 90% bzw. 85% positiv [18,57]. Die Variabilität innerhalb des immunhistochemischen Befundmusters scheint aber keine Auswirkungen auf das klinische Verhalten der Erkrankung zu zeigen [56].

4.2. Genetische Veränderungen des NKTCLs (sine *C-KIT* und *CTNNB1*)

4.2.1. Allgemein

Neben den von uns untersuchten Mutationen sind eine Reihe weiterer Signalpfade zur Klärung der Ätiologie des NK-/T-Zell-Lymphoms (NKTCLs) von Interesse. Zu diesen zählen unter anderem die für die Tumorsuppression relevanten p53 und FAS-Rezeptor sowie Transkriptionsfaktoren wie STATs und assoziierte Proteine wie Janus-Kinasen (JAKs) und der antiapoptotisch wirkende NF- κ B Protein-Komplex (Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells) [54,55,57]. Je nach deren Rolle ist ein Funktionsverlust beispielsweise mit enthemmten Wachstum und verminderter Apoptose oder überschießender Proliferation verknüpft.

In Untersuchungen von Gen-Expressions-Profilen bei NKTCLs konnte eine Reihe von Genen nachgewiesen werden, die im Vergleich zu normalen NK-Zellen überexprimiert wurden. Dies betraf unter anderem Gene mit Bezug zu Zell-zu-Zell-Interaktionen wie Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1), zur Zellzyklus-Kontrolle wie Cyclin D1 (CCND1), verschiedene Chemo- und Zytokine sowie Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wie Platelet-derived Growth Factor C (PDGFC) bzw. Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGFR α) und verschiedene STAT-Transkriptionsfaktoren [57]. Ein weiteres hier relevantes Protein ist BIRC5 oder Survivin. Es ist antiapoptotisch wirksam und wies hohe Überexpressionsraten von bis zu 97% der untersuchten NKTCL-Fälle auf. Es steht unter dem Einfluss von p53 und NF- κ B [54,55].

4.2.2. FAS

Der FAS-Rezeptor gehört zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren und führt durch Bindung des Fas-Liganden zur Aktivierung eines zur Apoptose führenden Signalwegs. Mutationen dieses Tumorsuppressors können zur Störung des Zellsterbens bzw. zum Überleben von Tumorzellen führen. In einer Studie mit 14 Fällen von NKTCLs wurden bei 50% entsprechende Veränderungen nachgewiesen [58].

4.2.3. p53

Das Tumorsuppressorgen TP53 kodiert für p53, welches eine essentielle Rolle im Zellzyklus und insbesondere in der Induktion der Apoptose spielt. Mutationsbedingte Störungen in Funktion und gleichzeitige Deregulation (Überexpression) von mutiertem p53 resultieren in vermindertem Zellsterben und sind in NKTCLs sehr häufig. Raten in einem Probenkollektiv aus Peru wurden z. B. mit 86% berichtet [15,54].

4.2.4. NF-κB

Der NF-κB Protein-Komplex spielt eine große Rolle in der Steuerung des Zellzyklus und der Produktion von inflammatorischen Zytokinen. Als Transkriptionsfaktor ist es beteiligt an Zellüberleben, Proliferation und Adhäsion, an Immunantwort und Autoimmunerkrankungen. Bei Aktivierung begünstigt es z. B. bei klassischen Hodgkin- und peripheren T-Zell-Lymphomen die Krebsentwicklung und -progression. In NKTCLs wird NF-κB im Vergleich zu normalen NK-Zellen deutlich überexprimiert [54,59]. Von Hodgkin-Lymphomen ist bekannt, dass das virale Protein LMP-1 aktivierend auf den NF-κB Pathway wirken kann. Es ist also denkbar, dass EBV auch in Hinsicht auf NKTCLs über LMP-1 onkogene Wirkung entfaltet [54,57]. Neben direkter Aktivierung des NF-κB Protein-Komplexes ist auch eine Entthemmung möglich. So wurde für das Protein A20 eine inaktivierende Wirkung auf NF-κB festgestellt; mutationsbedingte Funktionsstörungen konnten in einer Reihe von Lymphomen nachgewiesen werden. In einer Studie zu NKTCLs waren inaktivierende Mutationen jedoch nur in 15% der Fälle nachweisbar. Auch wenn NF-κB eine wichtige Rolle bei NKTCLs spielen mag, ist es eher unwahrscheinlich, dass dem eine A20-bedingte Entthemmung zugrunde liegt [59].

4.2.5. BIRC5

Die förderliche bzw. hemmende Rolle des NF-κB Protein-Komplexes und von p53 wird unter anderem über BIRC5 (Survivin) vermittelt, das Caspase-9-Aktivität und Apoptoseinduktion zu inhibieren vermag, z. B. in fetalen Zellen.

Eine Hemmung von BIRC5 führt zur Induktion des Zellsterbens, während eine Überexpression durch Aktivierung von NF- κ B oder Deregulation von p53 zur Entwicklung von Krebserkrankungen beiträgt [54]. Speziell in NKTCLs wurden Überexpressionsraten zwischen 91% und 97% nachgewiesen; dagegen zeigten normale NK-Zellen meist keine, maximal aber 10% Expression [54,55].

4.2.6. PDGFR α

Der Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGFR α) ist eine Tyrosinkinase und ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren der PDGF-Gruppe. Er ist an der Steuerung von Zellproliferation, Differenzierung und Wanderung und in dieser Funktion auch an der Entwicklung von Tumoren beteiligt. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte PDGFR α in 85% der NKTCLs und in stärkerer Expression als bei normalen NK-Zellen nachgewiesen werden. In Untersuchungen in vitro mit Imatinib-Mesylat, einem Tyrosinkinase-Inhibitor der unter anderem bei gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs) therapeutisch zum Einsatz kommt, konnten PDGFR α -positive Zellen einer vom NKTCL abgeleiteten Zelllinie (MEC04) am Wachstum gehindert werden [57]. In der klinischen Praxis wurden allerdings primäre Resistenzen gegen Imatinib-Mesylat bei GISTs sowohl bei PDGFR α -Wildtyp als auch bei bestimmten Mutationen (z. B. p.D842V) beobachtet [60]. PDGFR α interagiert unter anderem mit dem JAK-STAT Pathway, welcher ebenfalls große onkogene Bedeutung hat [57].

4.2.7. JAK-STAT Pathway

Die Familie der Janus-Kinasen (JAKs) umfasst JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2. Sie sind an Signalkaskaden ausgelöst durch Wachstumsfaktoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) beteiligt und aktivieren durch Phosphorylierung unter anderem als STAT-Proteine (Signal Transduction And Transcription) bekannte Transkriptionsfaktoren [55]. STATs wirken auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung und fördern bei Aktivierung die Entartung von Zellen und die Krebsentwicklung [21]. Im Gen-Expressions-Profilung von

NKTCLs wurde die Überexpression einer Reihe von Bestandteilen des JAK-STAT Pathways im Vergleich zu normalen NK-Zellen nachgewiesen werden, auch STAT3 in aktivierter Form [21,57]. Dieser Transkriptionsfaktor trägt bei Überexpression/Aktivierung über die Regulation von BIRC5 zur Apoptosehemmung und malignen Entartung von Zellen bei [21]. Dies kann unter anderem durch konstitutionell aktivierte Janus-Kinasen (JAKs) bedingt sein, wie es für eine Reihe von lymphoproliferativen Erkrankungen vorbeschrieben ist. Speziell in NKTCLs wurden in einer Studie in 87% der Fälle eine anhaltende Aktivierung der JAK3 und in 21% entsprechende aktivierende Punktmutationen nachgewiesen [55].

4.2.8. Epigenetik, CADM1 und DAL-1

Die Proteine Cell Adhesion Molecule 1 (CADM1) und Band 4.1-like Protein 3 (DAL-1) sind durch ihre Rolle in der Entwicklung von Lungentumoren als Tumorsuppressoren bekannt. Sie werden überwiegend durch Methylierung ihrer jeweiligen Promoter-Region inaktiviert. Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome wiesen z. B. bei CADM1 in 37% und DAL-1 in 55% Methylierungen auf [61]. In NKTCLs wurden bei CADM1 und DAL-1 in 80% bzw. 76% Methylierungen nachgewiesen, während normale NK-Zellen für diese epigenetische Veränderung negativ waren. Da diese Proteine an der Zell-zu-Zell-Adhäsion beteiligt sind, könnte ihre Inaktivierung insbesondere für die ausgeprägte Tendenz zu invasivem Wachstum und Metastasierung mitverantwortlich sein. In Anbetracht der Tatsache, dass nur 17% der untersuchten Fälle von NKTCLs homozygote Deletionen in dem für das CADM1 kodierenden Gen aufwiesen [61], ist die mögliche Rolle epigenetischer Einflüsse auf die Entwicklung dieses Tumors nicht zu unterschätzen.

4.3. Genetische Veränderungen des NKTCLs (*C-KIT* und *CTNNB1*)

4.3.1. *C-KIT*

Das KIT-Protein ist in seiner Rolle als Transmembran-Tyrosinkinase-Rezeptor an der Induktion von Zellproliferation beteiligt und spielt unter anderem eine

Rolle in hämatopoetischen Stammzellen, Mastzellen, in der Angiogenese und bei Schrittmacherzellen der Darmperistaltik. Mutationen in dem kodierenden Protoonkogen *C-KIT* können zu einer Überexpression des Proteins oder zu seiner konstitutionellen Aktivierung und somit zu unkontrolliertem Zellwachstum führen [3,8,22,23,24,25,26].

Extranodale NK-/T-Zell-Lymphome (NKTCLs) bereiten bei der Klärung mutationsbedingter Hintergründe allerdings ausgeprägte Probleme in der Probengewinnung auf Grund großer geografischer Unterschiede und kleinen Kollektiven sowie wegen der Proben selbst, die häufig Einblutungen, Autolysen, inflammatorische Infiltrationen und ausgeprägte Nekroseareale aufweisen. Dennoch konnten in früheren Studien neben einer Reihe verschiedener, möglicherweise an der Ätiologie beteiligter Pathways auch Mutationen im *C-KIT* Gen untersucht und nachgewiesen werden [6].

Auf Grund der genannten Schwierigkeiten ist die vorliegende Literatur allerdings spärlich. So werden Mutationen im *C-KIT* Gen mit 6% der NKTCLs angegeben [9], aber die geografischen bzw. Studien-spezifische Unterschiede variieren stark. Mögliche Ursachen könnten z. B. in Unterschieden der Ätiologie abhängig von der geografischen Verteilung von EBV-Subtypen, lokalem Pestizid-Einsatz oder im genetischen Hintergrund der betroffenen Populationen liegen [3,7]. Beschriebene Mutationsraten für diese Tumorentität liegen bei 15,5% in Japan, 11,9% in Korea, 5 in Nordost-China [23], 11,1% in Indonesien [34] und bis zu 71,4% in den Regionen Peking und Chengdu in China [23,33]. Die zitierten Studien behandeln insbesondere Exon 11 und 17 des *C-KIT* Gens: Ein internationaler Vergleich fand Mutationen im Exon 11 des *C-KIT* Gens in 11,1% bzw. 21,4% der Fälle aus Osaka und Peking. Bezüglich Mutationen in Exon 17 war der Unterschied mit 11,1% bzw. 50% in japanischen gegenüber chinesischen Proben deutlich ausgeprägter [33].

Besonders interessant ist die Lokalisation der nachgewiesenen Mutationen innerhalb der jeweiligen Exons. So waren als mögliche Hotspots in Exon 11 überwiegend das Codon 561 und in Exon 17 fast ausschließlich Codon 825 betroffen [33].

Eine andere Studie mit Proben aus dem Nordosten Chinas fand eine deutlich geringere Mutationsrate von nur 5%. Hier wurde dagegen eine das Codon 557 im Exon 11 betreffende Nonsense-Punktmutation (Stop-Codon) nachgewiesen [23]. Weder Codon 561 noch 825 wiesen hier Mutationen auf.

4.3.2. *CTNNB1*

Bei β -Catenin handelt es sich um ein Protein, welches unter anderem bei der Ausbildung von Zell-zu-Zell-Adhäsionen gemeinsam mit E-Cadherin und somit auch bei der Zellausrichtung, Wanderung und Differenzierung eine große Rolle spielt, also Prozesse, die in invasiv wachsenden und metastasierenden Tumoren gestört sind [5,35]. Wichtiger noch ist die Überexpression von β -Catenin in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor und Teil des Wnt Signalling Pathways, z. B. durch eine mutationsbedingte Inaktivierung der β -Catenin-abbauenden Enzyme, Tumorsuppressoren, oder durch stabilisierende Mutationen des β -Catenins selbst [16].

Das Exon 3 des *CTNNB1* Gens gilt als typische Lokalisation von solchen stabilisierenden Mutationen mit Veränderungen der zum Abbau notwendigen Phosphorylierungsstellen [5,8,16,38]. Das akkumulierende β -Catenin kann in den Zellkern translozieren und die Proliferation anstoßen [5, 16]. Diese Mutationen wurden in Tumoren vieler verschiedener Gewebearten nachgewiesen, wie beispielsweise gastrointestinal, hepatozellulär, in Endometrium und Ovarien, Prostata, Schilddrüse, Niere, Melanomen, in sporadischen Desmoid-Tumoren [5,16] und in malignen Lymphomen, auch in B-Zell-Lymphomen der Nebenniere und T- oder NK-/T-Zell-Lymphomen nach Nierentransplantation [5]. Speziell auf extranodale NK-/T-Zell-Lymphome (NKTCLs) bezogen, wurden Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1* Gens in 22% der Fälle berichtet [9]. Eine Studie der Gen-Expressionsmuster bei NKTCLs fand jedoch beim Vergleich zwischen Tumorgewebe und umgebenden epi- und endothelialen Zellen keine nukleäre Überexpression des β -Catenin Proteins [57], dies zieht die Bedeutung der nachgewiesenen Mutationen für die Ätiologie der Erkrankung in Zweifel.

4.4. Bezug zur Fragestellung

Das Ziel dieser Studie war, ein internationales Kollektiv von extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen (NKTCLs) durch Analysen der Gene *C-KIT* und *CTNNB1* sowie mit Hilfe immunhistochemischer Methoden näher zu charakterisieren, um die Erkenntnisse über typische Genalterationen bei dieser Entität zu erweitern und mögliche Mechanismen ihrer Ätiologie zu beleuchten. Dies ist aus klinischer Sicht für die Entwicklung neuer Therapieansätze für diese hochaggressive, häufig therapieresistente Erkrankung wichtig, insofern sie ein besseres Verständnis der molekulargenetischen Hintergründe voraussetzen. Die Studie umfasst neben asiatischen Proben aus Singapur zusätzlich südamerikanische und europäische Proben aus Peru bzw. Deutschland und erlaubt so trotz des kleinen Kollektivs einen ersten vergleichenden Einblick.

Unser Hauptaugenmerk lag auf dem KIT-Protein und auf Mutationen, welche mit einer onkogenen Aktivierung einhergehen könnten. Dazu wurde neben den Exons 11 und 17 des *C-KIT* Gens auch das Exon 9 untersucht, ein Genabschnitt der bei gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs) nicht selten aktivierende Mutationen aufweist und zu dem für NKTCLs bislang kaum Informationen verfügbar sind. Immunhistochemische Untersuchungen des KIT-Proteins galten möglichen Auswirkungen von Mutationen auf die Expression dieser Tyrosinkinase. Auf Grund seiner Rolle in der Zellproliferation und bei der Entwicklung einer Vielzahl von Tumoren wurde außerdem Exon 3 des für den Transkriptionsfaktor β -Catenin kodierenden Gens *CTNNB1* einbezogen.

4.5. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Die wesentlichen Hauptergebnisse waren:

- Die mikroskopische und immunhistochemische Charakterisierung des Probenkollektivs bestätigte die Diagnose NKTCL im histologischen Bild und mit dem Nachweis von EBER und CD3 ϵ . Die Untersuchungen auf KIT-Protein (CD117) trugen zur Bewertung der nachgewiesenen *C-KIT* Gen Mutationen bei.

- In den Genen *C-KIT* und *CTNNB1* konnten eine Reihe die Aminosäure-Sequenz verändernder und stummer Mutationen nachgewiesen werden.
- In einzelnen Fällen war ein direkter Vergleich der Veränderungen spezifischer, in der Literatur vorbeschriebener Codons möglich. Darunter fielen Mutationen, die sowohl für NKTCLs als auch für eine Auswahl anderer Tumorentitäten vorbeschrieben wurden.
- Das internationale Kollektiv von drei Kontinenten erlaubte einen ersten Vergleich länder- und lokalisationspezifischer Mutationsbefunde. Auf Grund der kleinen Probenzahl und der dadurch bedingten geringen Test-Power waren jedoch nur einzelne globale Unterschiede der Mutationsrate statistisch zu sichern. Das Ergebnis ist trotzdem hilfreich für die Generierung von Hypothesen für weitere Untersuchungen mit höherer Power.

Diese Ergebnisse werden nachfolgend genauer besprochen und mit früheren Berichten in Beziehung gesetzt.

4.5.1. Kollektiv

Um einen Einblick in Mutationsraten aus verschiedenen, geografisch getrennten Kollektiven zu gewinnen, wurden Proben in einem kleinen, aber genetisch verschiedenartigen und internationalen Kollektiv aus Singapur, Peru und Deutschland untersucht (n = 15, 6 und 5). Das Geschlechterverhältnis von 3:1 und das Alter (Median 51,5 Jahre) stimmen mit denen in früheren Studien von extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen (NKTCLs) überein [7,8,9].

4.5.2. Histologie und Immunhistochemie

Die Proben zeigten eine Vielfalt an mikroskopischen Befunden. Neben Einblutungen und Gefäßdestruktionen waren insbesondere ausgedehnte nekrotische Areale, ein typisches Merkmal von NKTCLs, mit 96,2% der Fälle fast immer nachweisbar. Auch zytologisch zeigten sich die typischen Befunde

mit ausgeprägter Zell-Polymorphie [4,6]. Länderspezifische Unterschiede im Grad der Nekrose oder zytologischem Befund wurden nicht festgestellt.

Von besonderem Interesse war die immunhistochemische Charakterisierung der Proben: In der In-situ-Hybridisierung auf EBER negativ getestete Fälle wurden wie beschrieben wegen der fast universellen Assoziation des NKTCLs mit Epstein-Barr-Virus (EBV) [10] ausgeschlossen.

Ebenfalls in der Regel mit 95% positiv bei NKTCLs ist das zytoplasmatische CD3 ϵ , eine Teilkette des T-Zell-Korezeptors. [4,6,9,10,13,18,57] In Bestätigung der gestellten Diagnosen ließ sich dieses Merkmal in allen Proben unseres Kollektivs nachweisen.

CD56 weist eine gewisse Varianz auf und ist nicht spezifisch für diese Zelllinie und Tumorentität und für die Diagnosestellung "extranodales NK-/T-Zell-Lymphom" nicht zwingend notwendig. Unser Probenkollektiv entspricht mit 72,7% überwiegend dem für NKTCLs üblichen CD56-Immunphänotyp. Die in der Literatur beschriebene Rate von 85% liegt im 95% Konfidenzintervall des CD56-positiven Anteils in unserer Studie [4,6,10,11,13,17,18,56,57].

In der Färbung auf KIT-Protein (CD117) war keine der untersuchten Proben positiv. Die Anteile von nasalen/pharyngealen und extranasalen/-pharyngealen Tumorlokalisationen unterschieden sich darin nicht. Auch der Nachweis von Mutationen hatte darauf keinen Einfluss. Die fehlende Überexpression des KIT-Proteins macht eine pathogenetische Rolle in der Entwicklung des NKTCLs deshalb unwahrscheinlich. Dies hat Implikationen für den vermuteten therapeutischen Nutzen von Stoffen wie Imatinib-Mesylat, die KIT-Protein inhibieren.

4.5.3. Unterschiede der DNA-Qualität

Die DNA-Qualität unseres Probenkollektivs war sehr heterogen. Die Proben aus Deutschland wiesen eine mittlere bis gute DNA-Qualität auf. Bei den Proben aus Peru und Singapur fanden sich dagegen sehr schlechte bis bestenfalls mittelmäßige Ergebnisse. Die Amplifikation scheiterte vollständig bei 2,9% der untersuchten Genabschnitte; in 7,7% gelang nur eine partielle Amplifikation.

Eventuell vorhandene Mutationen können hier dementsprechend nicht nachgewiesen oder sicher ausgeschlossen werden.

Neben diesem Informationsverlust, kann die schlechte DNA-Qualität weitere Probleme nach sich gezogen haben: Obwohl in den Sequenzergebnissen festgestellte Abweichungen möglichst im Vergleich zwischen Forward und Backward bzw. Teilsegment 1 und Teilsegment 2 bestätigt wurden, ist es denkbar, dass im Rahmen der Amplifikationsschritte, bei der Sequenzierung oder deren Auswertung auf Grund minderer DNA-Qualität besonders bei stummen Punktmutationen falsch-positive Ergebnisse gefunden wurden. Bei entsprechend großer Variation der Baseline-Werte eines erstellten Elektropherogramms kann eine auf Mutation verdächtige Abweichung nicht immer sicher bestätigt werden. Wissenschaftliche Kataloge zu vorbeschriebenen Mutationen, mit deren Hilfe verdächtige Abweichungen gegen die existierende Literatur geprüft werden, können die Bewertung unterstützen.

Die DNA-Qualität deutscher Proben war zwar deutlich besser als aus den anderen beiden Ländern; allerdings ist die Fallzahl aus Deutschland sehr klein. Bei ansonsten gleicher Vorgehensweise bezüglich DNA-Extraktion, verschiedenen Amplifikationsansätzen und der Sequenz-PCR sind die festgestellten Qualitätsunterschiede vermutlich größtenteils auf Aspekte der Präanalytik zurückzuführen. Eine Vielzahl von Störfaktoren kann hier eine Rolle spielen. Sie reichen vom Austrocknen der Probe vor der Konservierung über stark ausgeprägte Nekrosen oder Autolysen des Gewebes bis zu Schädigungen während der Entnahme der Gewebeprobe, beispielsweise durch Kauterisation im Rahmen der Blutstillung bei chirurgischen Interventionen. Insbesondere ist aber die langfristige Konservierung von Gewebeproben und deren Lagerung von Bedeutung.

Bei paraffinierten Proben ist immer von einer gewissen Schädigung des Gewebes und einem Verlust an DNA-Qualität durch vermehrte Fragmentierung auszugehen. Um die DNA-Degradation zu minimieren, müssen entsprechende Konservierungsschritte und -methoden bereits vor der eigentlichen Einbettung in Paraffin angewandt werden:

Zunächst muss das Gewebe adäquat fixiert und paraffiniert werden, um auch Jahre später DNA-Extraktion, Färbungen und In-situ-Hybridisierungen zu erlauben. Hierzu wird gewöhnlich 4- bis 10%iges Formalin verwendet. Die Fixierung bewirkt eine Verhärtung des Gewebes und Koagulation von Proteinen. Die DNA-Qualität kann bei der Fixierung insbesondere mit ungepufferter Formalinlösung weiter leiden, weshalb eine angemessene Pufferung notwendig ist. Das zu konservierende Gewebe muss für 8-18 h in der gepufferten Formalinlösung eingelegt werden, je nach Volumen und der Art der Probe. Nach der Fixierung wird das Gewebe mit Isopropanol möglichst ohne Gewebeschrumpfung und Artefaktbildung entwässert. Eine ungenügende Entwässerung hinterlässt Flüssigkeit im Gewebe, welche bei der Paraffinierung stören kann. Dazu wird die Probe nach Xylol-Behandlung 1 Tag in 60 °C heißem Paraffin eingelegt. In dieser Zeit durchdringt das Paraffin das fixierte und entwässerte Gewebe allmählich. Zuletzt wird die Probe in einen Paraffinblock eingegossen [62].

Es ist wahrscheinlich, dass in Peru und Singapur ungepufferte oder nicht ausreichend gepufferte Formalinlösung zur Fixierung eingesetzt wurde, oder dass an anderer Stelle im Konservierungsprozess Unterschiede in der Vorgehensweise existierten, die eine spätere molekulargenetische Analyse erschweren. Dies würde die große Diskrepanz der DNA-Qualität erklären. Weiterhin lagen mit einer Ausnahme aus Peru die restlichen 20 Proben aus Asien und Südamerika in Form von Leerschnitten vor. Diese 5 µm bis 8 µm dicken, ungefärbten Gewebeschichten bieten keinen ausreichenden Schutz vor Schädigung der paraffinierten Probe. Anders als im Paraffinblock ist das Gewebe hier Luftsauerstoff und anderen Umwelteinwirkungen ausgesetzt, sodass es schneller zur Oxidation und Schädigung des Erbguts kommt. Außerdem erlaubt es der Paraffinblock wenn nötig größere Probenmengen einzusetzen, wenn in einer Schnittschicht nicht ausreichend geeignetes Gewebe enthalten ist.

Ein weiterer Faktor bei schlechter DNA-Qualität können die typischen, meist stark ausgeprägten Nekrosen in extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen (NKTCL) sein [4,6]. Diese führen zur Fragmentierung der DNA und zur Kontamination mit

freigesetzten inhibitorischen Stoffen. Allerdings wurden keine ausgeprägten länderspezifischen Unterschiede im Nekrosegrad festgestellt. Ein Großteil der mit Gewebnekrosen assoziierten Probleme kann außerdem im Rahmen einer vorangestellten Makrodissektion, der DNA-Extraktion und der einzelnen Aufreinigungsschritte vermieden werden.

Bedenkt man aber die deutlichen Unterschiede der DNA-Qualität innerhalb des Probenkollektivs und die insgesamt guten Ergebnisse der Proben aus Deutschland, ist es unwahrscheinlich, dass die Schwierigkeiten bei dieser Studie in der DNA-Extraktion oder den Aufreinigungsschritten lagen. Da die Proben grundsätzlich gleich behandelt, extrahiert und aufgereinigt wurden, hätten inhibitorische Stoffe und andere Kontaminanten die Ergebnisse aus den verschiedenen Ländern gleichartig beeinflusst.

Auffällig waren außerdem die Schwierigkeiten speziell bei der Amplifikation des Exons 11 im *C-KIT* Gen. Alle drei vollständig gescheiterten Amplifikationen betrafen diesen Genabschnitt und traten ausnahmslos bei Proben mit sehr schlechter DNA-Qualität auf. Je stärker fragmentiert die DNA ist, desto schwieriger ist es, ein Exon als Ganzes zu amplifizieren. Allerdings ist Exon 11 des *C-KIT* Gens bei weitem nicht der längste Genabschnitt, der in dieser Studie amplifiziert wurde: Im *C-KIT* Gen war Exon 9 mit 194 Basenpaaren am längsten, Exon 11 kommt mit 129 Basenpaaren an zweiter Stelle und Exon 17 ist mit 123 Basenpaaren nur um wenige Basen am kürzesten. Darüber hinaus ist Exon 3 des *CTNIB1* Gens der insgesamt längste in dieser Studie untersuchte Genabschnitt mit 228 Basenpaaren; hier traten aber deutlich weniger Probleme mit der Amplifikation auf.

Je höher der Gehalt an Guanosin und Cytidin des zu amplifizierenden Genabschnitts desto schwieriger ist die Denaturierung der Doppelstrang-DNA und die folgende Amplifikation auf Grund stärkerer Bindung der Einzelstränge zueinander. Wird der prozentuale Anteil an Guanosin und Cytidin auf die Basenpaarlänge bezogen, weist *C-KIT* Gen Exon 11 allerdings den geringsten GC-Anteil der in dieser Studie untersuchten Genabschnitte auf, sodass dieser vermutlich nicht für die Schwierigkeiten mit der Amplifikation verantwortlich ist (Tabelle 27).

Tabelle 27: Prozentualer Guanodin- und Cytidin-Anteil, nach Gen, Exon und Segmentlänge aufgeschlüsselt.

Genabschnitt	Länge in bp	GC-Gehalt	
<i>C-KIT</i>	Exon 9	194	43,3%
	Exon 11	129	38,8%
	Exon 17	123	39,0%
<i>CTNNB1</i>	Exon 3	228	49,1%

bp = Basenpaar-Länge.

Möglicherweise sind die Schwierigkeiten der Amplifikation auch im Design der Primer, der Wahl der eingesetzten DNA-Polymerase, der verwendeten Pufferlösung oder ähnlichen Einflüssen begründet. Die Ursache ließ sich abschließend nicht sicher klären.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es für den Erfolg vergleichender, insbesondere internationaler Studien wie dieser von großer Bedeutung ist, einheitliche Standards für die Präanalytik und Probenkonservierung zu etablieren. Solche Standard Operating Procedures (SOP) an allen beteiligten Standorten gleichmäßig umzusetzen, ist instituts- und insbesondere länderübergreifend jedoch schwierig. In unserem Fall handelt es sich darüber hinaus um eine rein retrospektive Studie, bei welcher die Probengewinnung zum Teil schon vor Jahren abgeschlossen war und die Bedingungen der Probennahme- und der Konservierung nicht mehr verändert werden konnten; sie mögen sich auch im Laufe der Zeit verändert haben. Insbesondere für prospektive Studien ist eine klare Festlegung auf gemeinsame SOPs eine hohe Priorität.

4.5.4. Lokalisation

Die klinische Bedeutung der Lokalisation des extranodalen NK-/T-Zell-Lymphoms (NKTCLs) wurde bereits hervorgehoben. Nasale/pharyngeale Tumoren werden in einem früheren Stadium symptomatisch und haben ein besseres Outcome, während extranasale/-pharyngeale Manifestationsformen häufig erst nach bereits erfolgter systemischer Dissemination entdeckt werden [1,6,7,9,11,13]. Studien aus Brasilien, Japan und Italien wiesen Kollektive auf,

bei denen nasale/pharyngeale Manifestationen 80,8-88,5% der Fälle und extranasale/-pharyngeale nur 11,5-19,2% ausmachten. In einem internationalen Studienprojekt, dem International Peripheral T-Cell Lymphoma Project (IPTCLP), zeigten Proben aus Nordamerika, Europa und Asien ein Verhältnis von 72,4% nasalen/pharyngealen zu 27,6% extranasalen/-pharyngealen Lokalisationen [6]. In unserem Probenkollektiv mit drei sehr unterschiedlichen Quellen ist ein direkter Vergleich jedoch nicht möglich.

4.5.5. Gesamtmutationsraten

Insgesamt wiesen in unserem Probenkollektiv 53,8% der eingeschlossenen Fälle mindestens eine Mutation in den untersuchten Genabschnitten auf, 42,3% mindestens eine Mutation mit Veränderung der Aminosäure-Sequenz. Zwischen diesen Genabschnitten konnten wir jedoch keine Unterschiede der Mutationsrate nachweisen. Dies spricht dagegen, dass eines der in unserer Studie untersuchten Exons für die Pathogenese des extranodalen NK-/T-Zell-Lymphoms (NKTCLs) von herausragender Bedeutung ist, allerdings ist die Aussagekraft der Studie auf Grund des kleinen Probenkollektivs eingeschränkt.

Auffällig ist dagegen im länderspezifischen Vergleich, dass Fälle aus Singapur und Peru deutlich häufiger Mutationen aufwiesen als dies bei deutschen Proben der Fall war. Es ist bekannt, dass von mongolischen Bevölkerungsgruppen abstammende Populationen ein höheres Risiko tragen, an NKTCLs zu erkranken. Neben ostasiatischen Gruppen fallen hierunter auch Teile der peruanischen Bevölkerung [12].

Möglicherweise korreliert das höhere Erkrankungsrisiko auch mit diesen höheren Mutationsraten in den untersuchten Genabschnitten, während Fälle von NKTCLs aus kaukasischen Bevölkerungsgruppen insgesamt seltener sind und gleichzeitig weniger Mutationen in diesen Genabschnitten aufweisen.

Es ist auch möglich, dass Differenzen der länderspezifischen Mutationsraten auf geografische Unterschiede in ätiologischen Faktoren zurückgehen. Die geografische Verteilung dieser Tumorerkrankung entspricht dem Auftreten des Subtyps A des Epstein-Barr-Virus [3]. Neben den Unterschieden in der Inzidenz

der Erkrankung könnten also auch die Differenzen der Mutationsraten von viralen Faktoren beeinflusst sein. Dazu könnten weitere Umweltfaktoren wie die Exposition gegenüber Pestiziden betragen [3]. Eine alternative Erklärung bestünde darin, dass bei den in kaukasischen Bevölkerungsgruppen vorherrschenden NKTCLs andere, in dieser Studie nicht näher untersuchte Genabschnitte von Mutationen betroffen sind als bei ostasiatischen und südamerikanischen Bevölkerungsgruppen. Ohne weitere Untersuchungen und größere Kollektive ist eine weiterführende Bewertung jedoch nicht möglich.

4.5.6. C-KIT

4.5.6.1. C-KIT bei extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen

In unserem Probenkollektiv wiesen 42,3% der eingeschlossenen Fälle mindestens eine Mutation im C-KIT Gen auf (Tabelle 28) und 34,6% mindestens eine Mutation mit Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz.

Tabelle 28: Übersicht der Mutationsraten des C-KIT Gens ausgewählter Tumorentitäten insgesamt und nach Exon 9, 11 und 17 aufgeschlüsselt.

C-KIT	Mutationsrate			
	Gesamt	Exon 9	Exon 11	Exon 17
NKTCL (Studie)	42,3%	23,1%	3,8%	19,2%
NKTCL (Literatur)	5-71,4%	N/A	5-21,4%	50%
GIST	70-75%	5%	60-65%	1%
Melanom	0-50%	N/A	4,2%	N/A
Seminom	42,8%	N/A	7,1%	35,7%
Mastozytose	90%	N/A	N/A	80-90%

NKTCL = extranodales NK-/T-Zell-Lymphom, GIST = gastrointestinaler Stromatumor, N/A = keine Einzelangaben zu Exon-spezifischen Mutationsraten in der Literatur aufgefunden; NKTCLs weisen ausgeprägte geografische Schwankungen auf, z. B. Peking vs. Nordost-China; Melanome zeigen große subtypspezifische Unterschiede in den Mutationsraten, z. B. akrale Melanome vs. kutane Melanome ohne chronische Sonnenschädigung [3,8,23,26,28,33,64].

Eine Schwierigkeit des Vergleichs der Mutationsraten im *C-KIT* Gen bei NKTCLs ist die große Varianz der bislang beschriebenen Werte und die insgesamt schwache Datenlage [3,6,23]. Während für Exon 11 und 17 eine Reihe teilweise auch länderspezifischer Mutationsraten beschrieben wurden, konnten speziell für Exon 9 keine Quellen gefunden werden. Aus diesem Grund werden an dieser Stelle die berichteten Mutationsraten nicht nach einzelnen Exons aufgeschlüsselt sondern mit der Gesamtmutationsrate für die untersuchten Abschnitte des *C-KIT* Gens aus unserer Studie bzw. ihrem 95% Konfidenzintervall (CI 95) verglichen. Auch wird auf Grund der insgesamt kleinen Fallzahl auf eine Aufschlüsselung unseres Probenkollektivs nach Herkunftsländern verzichtet.

Das CI 95 der in unserer Studie festgestellten Gesamtmutationsrate im *C-KIT* Gen umfasst 23,3-61,3%. In Anbetracht der sehr hohen länderspezifischen Streubreite der in der Literatur vorbeschriebenen Raten wird der Vergleich einzeln durchgeführt: Unsere Studie liegt mit einer unteren CI 95-Grenze von 23,3% deutlich über den Kollektiven aus Japan (15,5%), Korea (11,9%), Indonesien (11,1%) und Nordostchinas (5%). Gleichzeitig liegt die obere Grenze mit 61,3% deutlich unter dem Wert aus der Region Peking in China (71,4%) [3,23,33]. Keiner der vorbeschriebenen Werte deckt sich mit dem CI 95 unseres Probenkollektivs, wobei jedoch nur der aus der Region Peking beschriebene Wert über der oberen Grenze liegt. Insgesamt erscheint die in unserer Studie festgestellte Mutationsrate im Vergleich zu einem großen Teil der Literatur deutlich höher. Ob diese Unterschiede jedoch auf echte geografisch korrelierte ätiologische Faktoren zurückzuführen sind oder eher auf die nicht nur in unserer Studie kleinen Fallzahlen, lässt sich ohne weitere Untersuchungen an größeren Probenkollektiven nur schwer sagen.

Innerhalb unseres Kollektivs schienen Fälle aus Singapur eine höhere Mutationsrate mit Veränderungen der Aminosäure-Sequenz (46,7%) im Vergleich zu Peru (16,7%) oder Deutschland (20%) zu zeigen. Diese Unterschiede ließen sich jedoch nicht statistisch sichern. Anhand größerer Kollektive könnten sich diese Trends möglicherweise bestätigen.

Betrachtet man die Mutationsraten nach der Lokalisation der Proben, so fällt speziell im *C-KIT* Gen Exon 9 eine scheinbar höhere Rate von Mutationen mit Veränderung der Aminosäure-Sequenz bei extranasaler/-pharyngealer im Vergleich zu nasaler/pharyngealer Tumorlokalisationen auf. Dieser Unterschied war zwar nicht signifikant, könnte sich aber in Untersuchungen mit größeren Stichproben erhärten lassen. Bei den *C-KIT* Gen Exons 11 und 17 und im *CTNNB1* Gen bei Exon 3 zeichnet sich dies dagegen nicht ab.

Es ist bekannt, dass eine extranasale/-pharyngeale Manifestation des NKTCLs zum Zeitpunkt der Diagnose häufig bereits systemisch disseminiert sind [1,6,7,9,11,13]. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist es denkbar, dass eine extranasale/-pharyngeale Manifestation in NKTCLs und deren stärker ausgeprägte Metastasierungsbereitschaft mit einer insgesamt höheren Rate von Aminosäure-Sequenz verändernden *C-KIT* Mutationen einhergeht. Der Vergleich ist in unserer Studie aber außer durch die insgesamt kleine Fallzahl auch durch das völlige Fehlen von extranasalen/-pharyngealen Proben aus Peru erschwert.

Es ist daher bei weiteren Untersuchungen lohnend, der Frage genauer nachzugehen, ob NKTCLs bei extranasaler/-pharyngealer Manifestation oder systemischer Dissemination häufiger als bei nasaler/pharyngealer Beteiligung Mutationen im Exon 9 des *C-KIT* Gens aufweisen, möglicherweise analog zu anderen extranasalen/-pharyngealen Tumoren wie z. B. dem gastrointestinalen Stromatumor (GIST).

C-KIT Exon 9: In diesem Zusammenhang ist die im Exon 9 des *C-KIT* Gens der nachgewiesene Duplikationsmutation (Probe 4, p.A502_Y503dup) zu nennen, die einzige in unserem Probenkollektiv nachgewiesene Genalteration im *C-KIT* Gen bei der es sich nicht um eine Punktmutation handelte. Es liegt eine typische, aktivierende Mutation im *C-KIT* Gen vor, wie sie bereits bei GISTs beschrieben wurde [63]. Bei Probe 4 handelt es sich um ein Tumordinfiltrat aus Nierengewebe. Da von ihr keine immunhistochemische Untersuchung auf CD117 durchgeführt werden konnte, war eine aktivierende Wirkung bzw. eine KIT-Protein-Expression nicht zu bestätigen.

Trotz der durchgängig negativen Ergebnisse der durchgeführten CD117-Färbungen, erscheint es sinnvoll, eine entsprechende Analyse in diesem speziellen Fall zum Ausschluss einer KIT-Protein Expression nachzuholen.

C-KIT Exon 11: Im Exon 11 des *C-KIT* Gens wurde in unserem Probenkollektiv nur eine einzige Mutation in Probe 17 nachgewiesen. Es handelt sich um eine Punktmutation, welche in einem vorzeitigen Translationsabbruch resultiert (p.W557X=Stop). Genau diese Nonsense-Mutation ist auch die einzige *C-KIT* Veränderung, die in einer Studie zu NKTCLs mit einem kleinem Probenkollektiv aus dem Nordosten Chinas vorbeschrieben wurde [23]. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen bislang nicht beschriebenen Hotspot für Mutationen des Exons 11. Probe 17 gehört zu den Fällen aus Singapur und stammt damit aus dem größeren ostasiatischen Raum. In Anbetracht dieses Fundes ist angezeigt, weitere Proben aus dem ostasiatischen, speziell aber chinesischen und singapurischen Raum zu akquirieren und auf diese Mutation in Exon 11 zu untersuchen. Auf Grund der in unserem Kollektiv festgestellten Schwierigkeiten bei der Amplifikation speziell von Exon 11 des *C-KIT* Gens wäre aber neben Proben mit einheitlicher Präanalytik und möglichst höherer DNA-Qualität auch eine Veränderung bzw. Anpassung der gewählten Primer zu testen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass es in der immunhistochemischen Analyse der Probe 17 keinen Hinweis auf eine Überexpression des KIT-Proteins gab, möglicherweise auf Grund des vorzeitigen Translationsabbruchs.

Weitere für Exon 11 des *C-KIT* Gens beschriebene Mutationen in Kollektiven aus Peking und Osaka betreffen Codons 559 und 561 [33]; eine Studie aus Indonesien fand außerdem Veränderungen in den Codons 576 und 577 [34]. Keine dieser Mutationen konnten in unserem Probenkollektiv nachgewiesen werden. Es fällt allerdings auf, dass die genannten Lokalisationen in der Lesefolge nach dem in Probe 17 mit einer Nonsense-Mutation betroffenen Codon 557 liegen. Möglicherweise spielen diese Anteile der Aminosäure-Sequenz eine besondere Rolle in der Entwicklung des NKTCLs. Weitere Untersuchungen auf die genannte Nonsense-Mutation sollten daher auch mögliche andere Veränderungen in Exon 11 begutachten.

C-KIT Exon 17: In denselben Studien wurden auch Mutationen in Exon 17 untersucht. Fast alle nachgewiesenen Veränderungen betrafen das Codon 825 und bestanden im Austausch von Valin gegen Alanin durch Substitutionsmutation [33,34].

In unserem Probenkollektiv sind 5 verschiedene Codons in 5 Proben im Exon 17 des *C-KIT* Gens betroffen, eines davon ebenfalls Codon 825 (Probe 23). Obgleich es sich um eine andere Mutation mit Substitution von Valin gegen Isoleucin handelt, könnte die Lokalisation im Codon 825 von besonderer Bedeutung sein und auf ätiologisch relevante Veränderungen im KIT-Protein hinweisen. Eine immunhistochemische Untersuchung auf CD117 konnte in dieser Probe nicht durchgeführt werden, sodass eine Bewertung der KIT-Protein-Expression nicht möglich ist.

4.5.6.2. C-KIT bei gastrointestinalen Stromatumoren

Gastrointestinale Stromatumoren (GISTs) zeigen mit etwa 70-75% eine deutlich höhere Zahl von Mutationen im *C-KIT* Gen als das Probenkollektiv dieser Studie. Desweiteren liegt nur ein geringer Anteil der bei GISTs beschriebenen Mutationen in den Exons 9 und 17 des *C-KIT* Gens, während 60-65% in Exon 11 liegen [8]. Diese Mutationsraten überschneiden sich nicht mit den Konfidenzintervallen für unsere Studie: Die obere Grenze des CI 95 aller in unserer Studie untersuchten *C-KIT* Genabschnitte liegt mit 61,3% noch deutlich unter den beschriebenen Werten.

Insbesondere bei Exon 11 liegt das CI 95 für alle Mutationen von 0-11,2% in unserer Studie weit unterhalb der beschriebenen Anteile. Ist Exon 11 des *C-KIT* Gens bei GIST noch am häufigsten betroffen, wurde dagegen in unserem Probenkollektiv nur eine einzige Mutation nachgewiesen (Nonsense-Mutation im Codon 557 mit Abbruch der Proteinbiosynthese). Für GISTs sind Mutationen an dieser Stelle des *C-KIT* Gens vorbeschrieben, sowohl Punktmutationen mit Aminosäure-Austausch, Deletionen und Insertionen als auch Stop-Codons mit Translationsabbruch [25,30]. Hier ergibt sich neben der bereits beschriebenen

Duplikationsmutation im Exon 9 trotz der insgesamt geringen Mutationsrate in Exon 11 eine weitere interessante Beziehung zu den NKTCLs.

Angesichts der schlechten Prognose von NKTCLs ist es sinnvoll, gezielte Therapieansätze wie Imatinib-Mesylat als Behandlungsoption weiter zu untersuchen. Es handelt sich um ein Mittel, welches an der Überexpression des KIT-Proteins ansetzt und dessen Tyrosinkinaseaktivität hemmt [8,22,27]. Sein Einsatz kann insbesondere zur Therapie von GISTs sinnvoll sein, bei welchen Mutationen im *C-KIT* Gen in den Exons 11 und auch 9 nachgewiesen wurden, die zu einer konstitutionellen Aktivierung des KIT-Proteins führen können. Andere Mutationen z. B. in Exons 13 und 17 stehen dagegen eher mit einer Imatinib-Mesylat-Resistenz im Zusammenhang [8,22,27,28,32].

Da sich in unserem Probenkollektiv jedoch bei den auf CD117 untersuchten Proben trotz einer Reihe nachgewiesener Mutationen keine Überexpression des KIT-Proteins feststellen ließ, erscheint der entsprechende Ansatzpunkt zur Therapie in NKTCLs nicht ausreichend. Eine direkte Verbindung zwischen den nachgewiesenen Mutationen des *C-KIT* Gens und der Pathogenese des NKTCLs ist unwahrscheinlich.

Bezüglich Imatinib-Mesylat konnte andererseits in einer von NKTCLs abstammenden Zelllinie (MEC04) zumindest in vitro eine deutlich Suppression ausgelöst werden. Dieser Effekt könnte jedoch nicht auf KIT-Protein sondern auf die ausgeprägte Expression einer anderen Tyrosinkinase, dem Platelet-derived Growth Factor Receptor α (PDGFR α), zurückgehen [57]. In der Behandlung von GISTs mit Imatinib-Mesylat sind laut aktuellen Leitlinien beide diese Rezeptoren für die Therapieentscheidung von Bedeutung [60]. Da allerdings Resistenzen bei einer Vielzahl von Genotypen auftreten können, inklusive Wildtypen von KIT und PDGFR α , spielen vermutlich weitere Faktoren für den Nutzen dieser Therapie bei GIST und möglicherweise analog für NKTCLs eine Rolle.

Auch wurden Fälle von sekundärer Resistenz gegenüber Imatinib-Mesylat bei GISTs beschrieben [27]. Neu aufgetretene Mutationen und die Selektion von entsprechend veränderten Zellklonen können im Krankheitsverlauf zur

Unwirksamkeit des Tyrosinkinase-Inhibitors führen [27,28]. Es ist anzunehmen, dass ein ähnlicher Prozess bei NKTCLs unter Imatinib-Mesylat eintreten kann.

Zusammenfassend halten wir aus diesen Gründen den therapeutischen Nutzen von Imatinib-Mesylat bei NKTCLs für vermutlich nicht gegeben. Weitere Untersuchungen zu krankheitsdefinierenden genetischen Alterationen und möglichen gezielten Therapieansätzen, inklusive KIT und anderen Tyrosinkinasen, sind notwendig.

4.5.6.3. C-KIT bei Melanomen

Melanome weisen in einer Minderheit Abweichungen im *C-KIT* Gen auf, wie beispielweise *C-KIT* Gen Amplifikationen, also eine erhöhte Zahl an *C-KIT* Gen Kopien [28,29]. Mutationen im *C-KIT* Gen sind allerdings nur für ca. 3% aller Melanome beschrieben [28].

Bei Melanom-Patienten mit *C-KIT* Gen Mutationen zeigen Imatinib-Mesylat und andere Tyrosinkinase-Inhibitoren in klinischen Studien einen messbar positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf und das Tumorwachstum. Die Erkrankung schreitet aber häufig nach 3 bis 4 Monaten fort und die Prognose ist insgesamt schlechter mit Mutationsnachweis. Andere Tyrosinkinase-Inhibitoren können auch nach dieser Resistenzentwicklung noch wirksam sein [28,29].

Die bei Melanomen nachgewiesenen *C-KIT* Gen Mutationen sind nicht eindeutig mit bestimmten Genabschnitten assoziiert, sondern finden sich über die Exons 9, 11, 13, 17 und 18 verstreut. Die Spanne der beschriebenen Mutationsraten hängt vom untersuchten Melanom-Subtyp ab. Melanome der Haut ohne chronische Sonnenschädigung z. B. weisen Raten von 0-8% auf. Am häufigsten zeigen sich *C-KIT* Mutationen dagegen bei den akralen und mukosalen Subtypen, also bei Manifestation an Handflächen, Nagelbett oder Fußsohlen, bzw. an gastrointestinalen, respiratorischen oder urogenitalen Schleimhäuten. Die Mutationsraten für *C-KIT* werden hier mit 11-50% bzw. 9-21% angegeben [28,29]. Im Zusammenhang mit den für NKTCLs typischen ulzerativen Schleimhautmanifestationen, ist ein Vergleich zu den Raten mukosaler Melanome vermutlich am relevantesten. Die für diesen Subtyp

angegebenen Werte liegen allerdings scharf unterhalb der unteren Grenze des CI 95 von 23,3% in unserer Studie. Dagegen sind einige in der Literatur beschriebene Raten für NKTCLs, z. B. Werte aus Japan mit 15,5%, Korea mit 11,9% und Indonesien mit 11,1% [3,23], denen mukosaler Melanome recht ähnlich. Insgesamt machen die weit streuenden, vom Subtyp abhängigen Mutationsraten einen Vergleich schwierig.

4.5.6.4. C-KIT bei Seminomen

Bei testikulären Seminomen wurden Mutationen des *C-KIT* Gens in 10-45% der Fälle in den Exons 11 und insbesondere 17 beschrieben [24,64]. Das CI 95 der Mutationsrate in unserer Studie (23,3-61,3%) überschneidet sich damit stark. Mutationen im *C-KIT* Gen scheinen bei Seminomen demnach mit ähnlicher Häufigkeit wie bei NKTCLs aufzutreten.

Das Codon 816 in Exon 17 ist bei Seminomen besonders häufig betroffen und spielt auch bei der Mastozytose eine wichtige Rolle [64]. Hierbei handelt es sich oft um Mutationen, die eine ligandenunabhängige Aktivierung des KIT-Proteins einleiten können [31]. Ebenfalls von Interesse sind beschriebene Mutationen in Exon 11 an Codon 557, die neben Seminomen auch bei gastrointestinalen Stromatumoren (GISTs) bekannt sind [25,30,64].

4.5.6.5. C-KIT bei Mastozytose:

Unter dem Begriff der Mastozytose wird eine Gruppe heterogener hämatopoetischer Erkrankungen zusammengefasst, welche auf eine überschießende Vermehrung von Mastzellen zurückgehen. Die Symptome sind abhängig vom Ausmaß der Mastzell-Proliferation und den davon betroffenen Organen sehr vielfältig und werden durch die Freisetzung von Zytokinen vor Ort ausgelöst [26,31]. Es können Knochenmark, Milz, Leber, Lymphknoten, Gastrointestinaltrakt und Haut betroffen sein [31]. Eine Manifestation an der Haut ist typisch für Patienten im Kindesalter, während eine systemische bzw. die inneren Organe betreffende Erkrankungsform vor allem bei späterer Manifestation im Erwachsenenalter beobachtet wird.

Die Mastozytose kann von sehr mild bis hochaggressiv, lokal-destruktiv oder systemisch mit progressiver Organschädigung verlaufen. Im Sonderfall der Mastzellleukämie ist die überschießende Mastzellproliferation und ihre rapide Akkumulation aufgrund von Multiorganversagen oft sogar innerhalb weniger Monate tödlich [31].

Die Proliferation und Differenzierung von Mastzellen steht in direkter Abhängigkeit von dem durch das *C-KIT* Gen kodierten KIT-Protein und seiner Aktivierung durch den Stem Cell Factor. Die Deregulierung des Mastzellen-Wachstums geht in mehr als 90% der Fälle mit Mutationen des *C-KIT* Gens einher. Insbesondere im Exon 17 des Gens wurden verschiedene Mutationen nachgewiesen [26,31]. Mutationen in diesem Exon können eine von Liganden unabhängige Aktivierung des KIT-Proteins einleiten, denn es kodiert für die Aminosäure-Sequenz der sogenannten Activation Loop des KIT-Proteins mit und ist so für die Aktivitätsregulierung des Proteins von Bedeutung. Mutationen in diesem Exon, insbesondere in und um Codon 816 herum, können zu Veränderungen der Activation Loop und damit zu konstitutioneller Aktivierung des KIT-Proteins führen, d. h. auch ohne Bindung von Liganden wie dem Stem Cell Factor [26,32].

Konstitutionell-aktivierende Mutationen haben unter Umständen auch wichtige therapeutische Implikationen: Der Austausch der Aminosäure Asparaginsäure durch Valin am Codon 816 beispielsweise (p.D816V) führt durch die Konformationsänderung der Bindestelle von Imatinib-Mesylat zur Resistenz gegenüber diesem Therapeutikum, ist mit ca. 80% der *C-KIT* Gen Mutationen die häufigste bei Mastozytose nachgewiesene Genalteration und ein diagnostisches Kriterium für systemische Verlaufsformen [26,32]. Fälle von Mastozytose ohne entsprechende Mutationen innerhalb des Exon 17 können dagegen Sensibilität aufweisen, sodass betroffene Patienten von dieser Therapie profitieren können [32].

Obwohl sich in unserem Probenkollektiv eine Reihe von Mutationen im Exon 17 des *C-KIT* Gens nachweisen ließen, konnte keine einzige das Codon 816 betreffende Mutation festgestellt werden.

Das CI 95 der Mutationsrate im Exon 17 des *C-KIT* Gens liegt bei NKTCLs in unserer Studie mit einer Obergrenze von 34,3% und von 61,3% für alle untersuchten *C-KIT* Genabschnitte deutlich unter den für die Mastozytose vorgeschriebenen Werten. Für die Pathogenese der NKTCLs relevante Mutationen scheinen sich zumindest im Rahmen unserer Studie damit nicht zu überschneiden.

4.5.7. *CTNNB1*

4.5.7.1. *CTNNB1* bei extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen

In unserer Studie wiesen 23,1% der eingeschlossenen Fälle im *CTNNB1* Gen mindestens eine Mutation auf (Tabelle 29), 19,2% mindestens eine Mutation mit Veränderung der Aminosäure-Sequenz.

Tabelle 29: Übersicht der Mutationsraten des *CTNNB1* Gens bei ausgewählten Tumoren.

<i>CTNNB1</i>	Mutationsrate
Entität/Lokalisation	Exon 3
NKTCL (Studie)	23,1%
NKTCL (Literatur)	13-30%
Hepatozelluläres Ca.	11-46%
Hepatoblastom	51%
Lungenkrebs	4%
kolorektales Ca.	10%
Desmoid-Tumoren	48-87%

Ca. = Karzinom, NKTCL = extranodales NK-/T-Zell-Lymphom, GIST = gastrointestinaler Stromatumor [5,9,23,38,35,36,66,67].

Die in der Literatur beschriebene Mutationsrate von 22% im *CTNNB1* Gen bei NKTCLs [9,23] fällt völlig in das in unserer Studie festgestellte CI 95 von 6,9-39,3%. Die Mutationsraten in unserem Probenkollektiv unterscheiden sich damit nicht von den bisherigen Befunden. Auffällig ist allerdings der scheinbare länderspezifische Unterschied in unserer Studie. So wurden in Proben aus Deutschland weder stumme noch die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutationen nachgewiesen (0%). Die Proben aus Singapur wiesen in 20% der Fälle mindestens eine die Aminosäure-Sequenz verändernde Mutation auf. Peruanische Proben zeigten in 50% Mutationen, wobei 33,3% Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz nach sich zogen. Die beobachteten länderspezifischen Unterschiede ließen sich jedoch nicht statistisch sichern. Auch lokalisationspezifische Trends waren nicht festzustellen.

Der mit dem β -Catenin assoziierte Wnt Signalling Pathway spielt eine große Rolle in der Induktion von Zellproliferation und -entartung [9,16,23,65]. Der Transkriptionsfaktor, der durch das *CTNNB1* Gen kodiert wird, transloziert bei onkogener Aktivierung in den Zellkern und beeinflusst dort die Zellproliferation [5,16]. Da bislang keine Prüfung der nukleären Expression in unserem Probenkollektiv erfolgte, ist es nicht möglich die nachgewiesenen Mutationen mit entsprechenden proliferativen Effekten einer Akkumulation zu korrelieren. Insoweit Material akquiriert werden kann, sollten besonders diese Analysen bei den Fällen mit die Aminosäure-Sequenz verändernden Mutationen nachgeholt werden.

4.5.7.2. *CTNNB1* bei Leberkrebs

Hepatozelluläre Karzinome (HCCs) sind die fünfthäufigste Todesursache durch Krebsleiden weltweit und für ca. 500.000 Tote pro Jahr verantwortlich [65]. Sie finden sich in mehr als 75% der Fälle in Südostasien und Subsahara-Afrika. In mehr als 70% der global auftretenden Fälle liegt ätiologisch eine Hepatitis B Virus-Infektion zugrunde [66]. In Europa und Nordamerika dagegen ist eine Hepatitis C-Infektion der wichtigste ätiologische Faktor (60% der HCC-Fälle).

Alkoholabusus und die daraus resultierende Leberzirrhose gelten als beteiligte Faktoren in etwa einem Drittel der weltweit auftretenden Fälle von HCCs [66].

Für unsere Studie von besonderem Interesse sind Mutationsraten im *CTNNB1* Gen im Rahmen des HCC [35]. Festgestellte Mutationsraten variieren von 11-46% der Fälle [66]; mit Hepatitis C-assoziierte HCC wiesen mit 41% besonders hohe Raten von Mutationen auf [35]. In einer anderen Studie wurden Mutationen des *CTNNB1* Gens mit Einfluss auf Phosphorylierungsstellen bei 14,2% der untersuchten HCC gezeigt [35]. Die recht große Schwankungsbreite dieser Werte zu den Mutationsraten des *CTNNB1* Gens scheint also von zusätzlichen Faktoren und insbesondere einer viralen Komponente wie der chronischen Hepatitis C-Infektion beeinflusst zu sein. Neben der Rolle, welche Viren bei ihrer Entwicklung spielen, zeigt sich eine weitere Parallele von HCCs zu NKTCLs im Vergleich der beschriebenen Mutationsraten mit dem CI 95 der in unserer Studie festgestellten Werte von 6,9-39,3%, die sich damit deutlich überschneiden.

In der Analyse von Hepatoblastomen, aggressiven embryonalen Lebertumoren, wie sie Kinder mit einem Durchschnittsalter von 2 bis 3 Jahren betreffen, konnten ebenfalls Mutationen des *CTNNB1* Gens nachgewiesen werden: Bei sporadischem Auftreten der Erkrankung wurden im Exon 3 hohe Raten von 51% beschrieben [35]. Das NKTCL liegt in unserer Studie allerdings deutlich darunter.

4.5.7.3. *CTNNB1* bei Lungenkrebs

In einer Studie wurden in Proben aus unterschiedlichen Lungenkrebs-erkrankungen bei 2 Fällen (4%) Punktmutationen mit Veränderungen der Aminosäure-Sequenz im Exon 3 beobachtet. In beiden Fällen handelte es sich um Adenokarzinome [38]. Aufgrund der schlechten Datenlage zu Mutationen im *CTNNB1* Gen bei Lungenkrebs und der kleinen bislang untersuchten Probenkollektive ist ein Vergleich mit unserer Studie schwierig. Im Vergleich anhand des CI 95 liegt das NKTCL mit einer unteren Grenze von 6,9% über diesem Wert.

4.5.7.4. *CTNNB1* bei kolorektalen Karzinomen

Eine mutationsbedingte Überaktivierung des Wnt Signalling Pathway findet sich in unterschiedlichen Formen bei einer großen Mehrheit der sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome mit 90% der Fälle [35,36,37]. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Expressionsraten des β -Catenin-Proteins bei kolorektalen Karzinomen eine wichtige prognostische Rolle spielen und mit schlechterem Outcome korrelieren [12].

Überexpressionen können beispielsweise eintreten, wenn für den Abbau des β -Catenin-Proteins zuständige Enzyme, vor allem das APC-Protein, mutationsbedingt inaktiviert werden oder das β -Catenin-Protein selbst durch stabilisierende Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1* Gens an seinen für den Abbau notwendigen Phosphorylierungsstellen verändert wird [5,8,16,23,37,35]. Diese Mutationen im eigentlichen *CTNNB1* Gen sind in nur 10% der kolorektalen Karzinome vorhanden. Dieser Wert fällt in das CI 95 der Mutationsrate im Exon 3 des *CTNNB1* Gens in unserer Studie von 6,9-39,3%.

Es ist bemerkenswert, dass Mutationen im *CTNNB1* Gen und das APC-Protein verändernde Mutationen bei kolorektalen Karzinomen in der Regel nur getrennt voneinander auftreten [35]. Es scheint also bereits ein einziger, das β -Catenin-Protein stabilisierender und zur Akkumulation führender Mechanismus für die Krebsentwicklung auszureichen [35]. Es hat sich auch gezeigt, dass Adenome, welche Mutationen des *CTNNB1* Gens aufweisen, eher seltener zu kolorektalen Karzinomen weiterentarten als bei Mutationen, die das APC-Protein inaktivieren. Letztere finden sich mit 80% beim Großteil der kolorektalen Karzinome. Obwohl beide Veränderungen an ähnlicher Stelle im Wnt Signalling Pathway ansetzen und auf unterschiedliche Weise zu einer Akkumulation des β -Catenin-Proteins führen können, scheinen sie für die Entwicklung dieser Krebserkrankungen nicht gleichwertig zu sein [35].

Vor diesem Hintergrund ist eine Untersuchung des APC Gens im Zusammenhang mit NKTCLs zur weiteren Abklärung des Wnt Signalling Pathways von Interesse.

4.5.7.5. *CTNNB1* bei Desmoid-Tumoren

Die Desmoid-Tumore fallen unter die Fibromatosen, Wucherungen des Bindegewebes. Es handelt sich um seltene, meist sporadisch auftretende Weichteiltumore mit fibroblastischer oder myofibroblastischer Differenzierung [35,67]. Sie sind auch mit der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) assoziiert [35,36,67]. Vorwiegend betreffen Desmoid-Tumoren junge Frauen, meist wachsen sie an den Extremitäten. Obwohl diese Erkrankung in der Regel nicht metastasiert, wachsen Desmoid-Tumoren häufig lokal-destruktiv und hochgradig infiltrierend [67] und sind als eine semimaligne Krankheitsentität anzusehen. Auf Grund ihres invasiven Wachstums und der damit verbundenen Schwierigkeiten bei der chirurgischen Resektion und weiteren Behandlung sind Lokalrezidive mit Raten von 19-38% sehr häufig. Die Lokalisation der Desmoid-Tumoren, ihre Wachstumstiefe und die wiederholten Rezidive können wiederholte Operationen oder sogar Amputationen nach sich ziehen [67].

In molekulargenetischen Untersuchungen wurde bei sporadischen Desmoid-Tumoren sehr häufig die Deregulierung des β -Catenin-Proteins nachgewiesen [36,67]. Speziell im *CTNNB1* Gen wurden hohe Mutationsraten von 48-87% der sporadischen Erkrankungsfälle beschrieben [36,67]. Besonders auffällig ist, dass diese Mutationen überwiegend die Codons 41 und 45 in Exon 3 betrafen, während eine Reihe anderer Tumoren mit Mutationen des *CTNNB1* Gens eine größere Variation von Mutationen aufweisen [67].

Im Vergleich der Krankheitsverläufe der untersuchten Patienten zeigte sich außerdem, dass bestimmte Mutationen im Exon 3 mit einem erhöhten Risiko für Rezidive assoziiert sind, was auf Unterschiede in der Transkriptionsfaktor-Aktivität der unterschiedlich veränderten β -Catenin-Proteine zurückgehen könnte. In Anbetracht der hohen Raten an Mutationen des *CTNNB1* Gens und der Spezifität der typischerweise betroffenen Codons, kann eine Analyse des Exons 3 auch zur Diagnosefindung und -bestätigung beitragen. Ein negatives Ergebnis schließt aber einen Desmoid-Tumor nicht sicher aus [67].

Im Vergleich mit unserem Probenkollektiv zeigten sich bei den nachgewiesenen Mutationen im *CTNNB1* Gen allerdings keinerlei Veränderungen in den Codons 41 und 45. Die obere Grenze des CI 95 der Mutationsrate bei den NKTCLs liegt mit 39,3% in unserer Studie deutlich unter den für die Desmoid-Tumore beschriebenen Werten.

4.6. Therapeutischer Ausblick

Es wurden bereits einige Aspekte zur Imatinib-Mesylat-Therapie in Abhängigkeit von Mutationen der KIT- und/oder PDGFR α -Proteine und zu den Ergebnissen unserer Studie dargestellt. Weitere Untersuchungen zur Rolle von Tyrosinkinase und dem therapeutischen Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren bei NKTCLs sind jedoch notwendig, bevor eindeutige Folgerungen gezogen werden können. An dieser Stelle sollen einige weitere in der Literatur beschriebene, unter Umständen künftig nutzbare therapeutische Ansätze zusammengefasst werden.

Eine mögliche Perspektive geht von Untersuchungen aus, in denen von extranodalen NK-/T-Zell-Lymphomen (NKTCLs) abstammende Tumorzellen in vitro unter Gabe von NF- κ B-Inhibitoren wie BAY 11-7082 und Curcumin in ihrem Wachstum unterdrückt und die Apoptose eingeleitet werden konnten [54]. Auch das beschriebene Survivin (BIRC5) bzw. dessen Überexpression und die folgende Apoptosehemmung könnten eine Grundlage gezielter Therapiestrategien darstellen; z. B. wurde Teramprocolm, ein Transkriptionsinhibitor, der die Expression von BIRC5 reduziert, in vitro erfolgreich auf die Förderung der Apoptose von Tumorzelllinien getestet [54].

Schließlich bietet auch der JAK-STAT Pathway einen vielversprechenden Ansatz. Insbesondere der Transkriptionsfaktor STAT3 wurde im Kontext mit NKTCLs als mögliches indirektes Angriffsziel genannt. Seine konstitutionelle Aktivierung durch deregulierte Janus-Kinasen (JAKs) kann z. B. mit AG490, einem Inhibitor von JAK-Proteinen, unterbunden werden. In Tumor-Fremdtransplantat-Mausmodellen wurde dieser Mechanismus unter Anwendung des JAK3-Inhibitors CP-690550 erfolgreich nachgestellt. Die

behandelten Mäuse wiesen ein verlangsamtes Tumorwachstum auf, auch wenn dieses nach Absetzen der Therapie rasch wieder zunahm [21,55].

Obwohl die Ätiologie und mögliche krankheitsdefinierende Mutationen des NKTCLs derzeit nicht ausreichend geklärt sind, gibt es somit eine Reihe von aussichtsreichen Ansätzen für künftige gezielte Therapien.

4.7. Limitationen

Diese Arbeit unterliegt gewissen Limitationen ihrer Aussagekraft. Die wichtigsten sind im Folgenden aufzuführen.

Das Probenkollektiv ist mit insgesamt 26 Proben klein. Dies begrenzt die statistische Aussagekraft und verhindert eine biometrisch anspruchsvollere Auswertung der Ergebnisse. Insbesondere ist die Test-Power auch auf Strecken zu gering, um kleinere, inhaltlich aber womöglich bedeutsame Unterschiede auch statistisch zu sichern.

Die sehr verschiedenen, internationalen Teilkollektive stellen einerseits einen Vorteil für vergleichende Untersuchungen dar, andererseits ist die Probenzahl einzelner Länder minimiert und durch Präselektion verzerrt. Insbesondere für den Vergleich der Mutationsraten zwischen Ländern und zwischen den Tumorlokalisationen fehlten extranasale/-pharyngeale Proben aus Peru.

Weiterhin sind die gesammelten Proben selbst problematisch. Das extranodale NK-/T-Zell-Lymphom (NKTCL) weist häufig ausgeprägte Nekrosen auf, die sich negativ auf die Auswertbarkeit immunhistochemischer Färbungen und insbesondere auch die molekulargenetische Methodik (PCR, Sequenzierung) auf Grund inhibitorischer Stoffe und fragmentierter DNA auswirken. Insgesamt lag eine eher schlechte DNA-Qualität mit starker Fragmentierung vor, welche Amplifikation, Sequenzierung und Auswertung der zu untersuchenden Genabschnitte deutlich erschwerte. Das macht die Echtheit der nachgewiesenen, insbesondere der stummen Mutationen fraglich.

Zusätzlich war von vielen Proben nur sehr wenig Material verfügbar; auf eine Reihe weiterführender sinnvoller Untersuchungen, insbesondere CD117-

Färbungen bei den restlichen 15 Proben sowie die Analyse der nukleären Expression von β -Catenin, musste aus diesem Grund verzichtet werden. Mehr Material hätte auch bei gescheiterten Amplifikationen weitere Wiederholungen oder Veränderungen des PCR-Protokolls erlaubt.

Problematisch ist auch die insgesamt spärliche Datenlage zum NKTCL in der Literatur. Vergleiche mit bekannten Mutationsraten bzw. beschriebenen Mutationen waren nur in einer insgesamt kleinen Zahl der Fälle sinnvoll möglich.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser retrospektiven, experimentellen Studie war es, den Kenntnisstand über das extranodale NK-/T-Zell-Lymphom (NKTCL), insbesondere über die mit ihm assoziierten Mutationen zu verbessern.

Zu diesem Zweck wurde ein internationales, von drei Kontinenten stammendes Probenkollektiv zusammengetragen. Insgesamt wurden 26 Fälle aus Singapur, Peru und Deutschland auf genetische Alterationen in den Genen *C-KIT* und *CTNNB1* untersucht. Neben der Sichtung weiterer mit dieser Entität assoziierter Genmutationen und Pathways, wurde ein Vergleich mit den bislang beschriebenen Mutationsraten bzw. Mutationen sowie eine Gegenüberstellung zu weiteren Tumoren durchgeführt, welche mit Veränderungen in diesen Genen assoziiert sind.

Im Speziellen wurden Sequenzierungen von Exons 9, 11 und 17 des *C-KIT* Gens und Exon 3 des *CTNNB1* Gens durchgeführt und insgesamt 21 verschiedene Mutationen nachgewiesen, wovon 20 auf Punktmutationen und 1 auf eine Duplikation entfielen. Die Proben wurden soweit möglich immunhistochemisch charakterisiert. Um die Rolle einer Überexpression des von *C-KIT* kodierten KIT-Proteins bei diesem Tumor näher zu untersuchen, wurde eine CD117-Färbung bei 11 der Proben durchgeführt. In keinem dieser Fälle konnte eine Überexpression nachgewiesen werden.

In der Zusammenschau der Daten erscheint es unwahrscheinlich, dass das *C-KIT* Gen den Locus von krankheitsdefinierenden Mutationen des NKTCLs darstellt. Insbesondere der gastrointestinale Stromatumor (GIST), welcher neben anderen Tumoren zum Vergleich herangezogen wurde, weist ein deutlich anderes Mutationsmuster und insgesamt höhere Raten auf als in unserem Probenkollektiv nachweisbar.

Bemerkenswert ist aber, dass es sich bei einer der nachgewiesenen Mutationen um eine für GIST vorbeschriebene, aktivierend-wirkende Mutation aus einer extranasalen/-pharyngealen Probe handelte. Es sollten daher in kommenden Studien extranasal/-pharyngeal manifestierte NKTCLs auf Mutationen besonders in diesem Genabschnitt untersucht werden.

Trotz der genannten Einschränkungen ist eine GIST-analoge, KIT-abhängige Therapie mit Imatinib-Mesylat zu diesem Zeitpunkt als vermutlich ungeeigneter Angriffspunkt in der Behandlung des NKTCLs zu betrachten. Weitere Abklärungen der Beteiligung von KIT und anderen Tyrosinkinase wie PDGFR α könnten dies in anderes Licht rücken.

Die weitere Forschung wird durch die relative Seltenheit dieser Tumorentität und einige ihrer Eigenschaften wie starker Nekroseneigung erschwert. Nur mit weiteren Anstrengungen in der molekulargenetischen und ätiologischen Erforschung dieser Entität an repräsentativen Kollektiven sind auf längere Sicht neue Therapieansätze und gezieltere Behandlungen ausfindig zu machen. Dies ist in Anbetracht der auch heute noch sehr schlechten Prognose dieser Tumorentität und der hohen Resistenzraten gegenüber Chemotherapeutika dringend zu fordern.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Sandner A, Kösling S, Helmbold P, Winkler M, Bloching MB and Holzhausen HJ (2007) Primäre nasale NK/T-Zell-Lymphome. HNO 55(2): 93-99.
- [2] McBride P (1991) Photographs of a case of rapid destruction of the nose and face. 1897. J Laryngol Otol 105(12): 1120.
- [3] Aozasa K, Takakuwa T, Hongyo T and Yang WI (2008) Nasal NK/T-cell lymphoma: epidemiology and pathogenesis. Int J Hematol 87(2): 110-117.
- [4] Tlholoe MM, Kotu M, Khammissa RA, Bida M, Lemmer J and Feller L (2013) Extranodal Natural Killer/T-cell lymphoma, nasal type: 'midline lethal granuloma.' A case report [online]. Head Face Med 9: 4.
URL: <http://www.head-face-med.com/content/9/1/4>
DOI: 10.1186/1746-160X-9-4
[Zugriff 26.01.2015]
- [5] Takahara M, Kishibe K, Bandoh N, Nonaka S and Harabuchi Y (2004) P53, N- and K-Ras, and β -Catenin Gene Mutations and Prognostic Factors in Nasal NK/T-Cell Lymphoma From Hokkaido, Japan. Hum Pathol 35(1): 86-95.
- [6] Lima M (2013) Aggressive mature natural killer cell neoplasms: from epidemiology to diagnosis [online]. Orphanet J Rare Dis 8: 95.
URL: <http://www.ojrd.com/content/8/1/95>
DOI: 10.1186/1750-1172-8-95
[Zugriff 26.01.2015]
- [7] Chan JKC, Quintanilla-Martinez L, Ferry JA and Peh SC (2008) Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. 285-288. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.
- [8] Miettinen M (2010) Modern Soft Tissue Pathology: Tumors and Non-Neoplastic Conditions. 48, 54, 62, 80-81, 143, 491-492, 501-505, 992-993. Cambridge University Press. Cambridge, England.
- [9] Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, Campo E and Arber DA (2010) Hematopathology. 474-487. Saunders Elsevier. Philadelphia, USA.
- [10] El-Mallawany NK, Frazer JK, Van Vlierberghe P, Ferrando AA, Perkins S, Lim M, Chu Y and Cairo MS (2012) Pediatric T- and NK-cell lymphomas: new biologic insights and treatment strategies [online]. Blood Cancer J 2(4): e65.
URL: <http://www.nature.com/bcj/journal/v2/n4/full/bcj20128a.html>
DOI: 10.1038/bcj.2012.8
[Zugriff 26.01.2015]
- [11] Gill H, Lang RH and Tse E (2010) Extranodal Natural-Killer/T-Cell Lymphoma, Nasal Type [online]. Adv Hematol 2010: 627401.
URL: <http://www.hindawi.com/journals/ah/2010/627401/>
DOI: 10.1155/2010/627401
[Zugriff 26.01.2015]

- [12] Lee MA, Park JH, Rhyu SY, Oh ST, Kang WK and Kim HN (2014) Wnt3a expression is associated with MMP-9 expression in primary tumor and metastatic site in recurrent or stage IV colorectal cancer [online]. *BMC Cancer* 14: 125.
URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/125>
DOI: 10.1186/1471-2407-14-125
[Zugriff 26.01.2015]
- [13] Schmitt C, Sako N, Bagot M, Huang Y and Gaulard P (2011) Extranodal NK/T-Cell Lymphoma: Toward the Identification of Clinical Molecular Targets [online]. *J Biomed Biotechnol* 2011: 790871.
URL: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/790871/>
DOI: 10.1155/2011/790871
[Zugriff 26.01.2015]
- [14] Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Keller G, Nathrath M, Gamboa-Dominguez A, Meneses A, Luna-Contreras L, Cabras A, Hoefler H, Mohar A and Fend F (2001) p53 Mutations in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma from Mexico. *Am J Pathol* 159(6): 2095-2105.
- [15] Quintanilla-Martinez L, Franklin JL, Guerrero I, Krenacs L, Naresh KN, Rama-Rao C, Bhatia K, Raffeld M and Magrath IT (1999) Histological and immunophenotypic profile of nasal NK/T cell lymphomas from Peru: High prevalence of p53 overexpression. *Hum Pathol* 30(7): 849-855.
- [16] Polakis (2000) Wnt signalling and cancer. *Genes Dev* 14(15): 1837-1851.
- [17] Morice WG (2007) The Immunophenotypic Attributes of NK Cells and NK-Cell Lineage Lymphoproliferative Disorders. *Am J Clin Pathol* 127(6): 881-886.
- [18] Gualco G, Domyeny-Duarte P, Chioato L, Barber G, Natkunam Y and Bacchi CE (2011) Clinicopathologic and Molecular Features of 122 Brazilian Cases of Nodal and Extranodal NK/T-Cell Lymphoma, Nasal Type, With EBV Subtyping Analysis. *Am J Surg Pathol* 35(8): 1195-1203.
- [19] Hiddemann W and Bartram CR (2010) *Die Onkologie, Band 1*. 231-232. Springer. Luxemburg, Luxemburg and Berlin, Deutschland.
- [20] Lynch DT, Zimmerman JS and Rowe DT (2002) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) co-localizes with LMP2A in perinuclear regions in transiently transfected cells. *J Gen Virol* 83(Pt 5): 1025–1035.
- [21] Coppo P, Gouilleux-Gruart V, Huang Y, Bouhlal H, Bouamar H, Bouchet S, Perrot C, Vieillard V, Dartigues P, Gaulard P, Agbalika F, Douay L, Lassoued K and Gorin NC (2009) STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia* 23(9): 1667–1678.
- [22] Dabbs DJ (2006) *Diagnostic Immunohistochemistry, Second Edition*. 449-451. Saunders Elsevier. Philadelphia, USA.
- [23] Hoshida Y, Hongyo T, Jia X, He Y, Hasui K, Dong Z, Luo WJ, Ham MF, Nomura T and Aozasa K (2003) Analysis of p53, K-ras, c-kit, and β -catenin gene mutations in sinonasal NK/T cell lymphoma in northeast district of China. *Cancer Sci* 94(3): 297-301.

- [24] Hersmus R, Stoop H, van de Geijn GJ, Eini R, Biermann K, Oosterhuis JW, Dhooge C, Schneider DT, Meijssen IC, Dinjens WN, Dubbink HJ, Drop SL and Looijenga LH (2012) Prevalence of c-KIT Mutations in Gonadoblastoma and Dysgerminomas of Patients with Disorders of Sex Development (DSD) and Ovarian Dysgerminomas [online]. PLOS One 7(8): e43952.
URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043952>
DOI: 10.1371/journal.pone.0043952
[Zugriff 26.01.2015]
- [25] Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M and Saito K (2003) Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. Cancer Sci 94(6): 486–491.
- [26] Trifa AP, Patiu M, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Pop IV and Popp RA (2010) Systemic Mastocytosis Associated with the C-Kit D816V Mutation – Importance of Molecular Diagnosis and Therapeutic Implications. Case Report. TMJ 60(2-3): 241-243.
- [27] Linch M, Claus J and Benson C (2013) Update on imatinib for gastrointestinal stromal tumors: duration of treatment. Onco Targets Ther 6: 1011–1023.
- [28] Lyle M and Long GV (2013) Diagnosis and Treatment of KIT-Mutant Metastatic Melanoma. J Clin Oncol 31(26): 3176-3181.
- [29] Bastian BC and Esteve-Puig R (2013) Targeting Activated KIT Signaling for Melanoma Therapy. J Clin Oncol 31(26): 3288-3290.
- [30] Origone P, Gargiulo S, Mastracci L, Ballestrero A, Battistuzzi L, Casella C, Comandini D, Cusano R, Dei Tos AP, Fiocca R, Garuti A, Ghiorzo P, Martinuzzi C, Toffolatti L, Liguria GIST Unit and Bianchi-Scarrà G (2013) Molecular characterization of an Italian series of sporadic GISTs. Gastric Cancer 16(4): 596-601.
- [31] Féger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P and Arock M (2002) Kit and c-kit Mutations in Mastocytosis: A Short Overview with Special Reference to Novel Molecular and Diagnostic Concepts. Int Arch Allergy Immunol 127(2): 110–114.
- [32] Álvarez-Twose I, González P, Morgado JM, Jara-Acevedo M, Sánchez-Muñoz L, Matito A, Mollejo M, Orfao A and Escribano L (2012) Complete Response After Imatinib Mesylate Therapy in a Patient With Well-Differentiated Systemic Mastocytosis [online]. J Clin Oncol 30(12): e126-e129.
URL: <http://jco.ascopubs.org/content/30/12/e126>
DOI: 10.1200/JCO.2011.38.9973
[Zugriff 26.01.2015]
- [33] Hongyo T, Li T, Syaifudin M, Baskar R, Ikeda H, Kanakura Y, Aozasa K and Nomura T (2000) Specific c-kit Mutations in Sinonasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma in China and Japan. Cancer Res 60(9): 2345–2347.
- [34] Kurniawan AN, Hongyo T, Hardjolutito ES, Ham MF, Takakuwa T, Kodariah R, Hoshida Y, Nomura T and Aozasa K (2006) Gene mutation analysis of sinonasal lymphomas in Indonesia. Oncol Rep 15(5): 1257-1263.

- [35] Giles RH, van Es JH and Clevers H (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653(1): 1 – 24.
- [36] Ng TL, Gown AM, Barry TS, Cheang MC, Chan AK, Turbin DA, Hsu FD, West RB and Nielsen TO (2005) Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol* 18(1): 68-74.
- [37] Herbst A, Jurinovic V, Krebs S, Thieme SE, Blum H, Göke B and Kolligs FT (2014) Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling [online]. *BMC Genomics* 15: 74.
URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/74>
DOI: 10.1186/1471-2164-15-74
[Zugriff 26.01.2015]
- [38] Sunaga N, Kohno T, Kolligs FT, Fearon ER, Saito R and Yokota J (2001) Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (β -Catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 30(3): 316–321.
- [39] Hoshida Y, Hongyo T, Nakatsuka S, Nishiu M, Takakuwa T, Tomita Y, Nomura T and Aozasa K (2002) Gene mutations in lymphoproliferative disorders of T and NK/T cell phenotypes developing in renal transplant patients. *Lab Invest* 82(3): 257-264.
- [40] Nakatsuka S, Hongyo T, Syaifudin M, Nomura T, Shingu N and Aozasa K (2002) Mutations of p53, c-kit, K-ras, and β -Catenin Gene in Non-Hodgkin's Lymphoma of Adrenal Gland. *Jpn J Cancer Res* 93(3): 267-274.
- [41] Jin L and Lloyd RV (1997) In situ hybridization: Methods and applications. *J Clin Lab Anal* 11(1): 2-9.
- [42] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- [43] Agencourt® AMPure®; Beckman Coulter®; Gebrauchsanweisung.
- [44] GenomeLab™ Sequencing Chemistry Protocol; Beckman Coulter®; Gebrauchsanweisung.
- [45] Agencourt® CleanSEQ®; Beckman Coulter®; Gebrauchsanweisung.
- [46] Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463-5467.
- [47] Thomas Hall (2013) BioEdit Alignment-Tool 7.2.5 [online]. Ibis Biosciences, Carlsbad, California, USA.
URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
[Zugriff 31.01.2015]
- [48] Bortz J and Lienert GA (2008) Kurzgefasste Statistik für die Klinische Forschung, 3. Auflage. 61-131. Springer. Luxemburg, Luxemburg and Berlin, Deutschland.

- [49] Hans-Jürgen Andreß (2003) Online-CI-Rechner [online]. Institut für Empirische Sozial- und Wirtschaftsforschung, Universität Köln.
URL: <http://eswf.uni-koeln.de/lehre/stathome/statcalc/v2202.htm>
[Zugriff 31.01.2015]
- [50] NCBI BLAST [online].
URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
[Zugriff 31.01.2015]
- [51] NCBI Mapview [online].
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>
[Zugriff 31.01.2015]
- [52] Ensembl [online].
URL: <http://www.ensembl.org/index.html>
[Zugriff 31.01.2015]
- [53] COSMIC [online].
URL: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>
[Zugriff 31.01.2015]
- [54] Ng SB, Selvarajan V, Huang G, Zhou J, Feldman AL, Law M, Kwong YL, Shimizu N, Kagami Y, Aozasa K, Salto-Tellez M and Chng WJ (2011) Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. *J Pathol* 223(4): 496–510.
- [55] Bouchekioua A, Scourzic L, de Wever O, Zhang Y, Cervera P, Aline-Fardin A, Mercher T, Gaulard P, Nyga R, Jeziorowska D, Douay L, Vainchenker W, Louache F, Gespach C, Solary E and Coppo P (2014) JAK3 deregulation by activating mutations confers invasive growth advantage in extranodal nasal-type natural killer cell lymphoma. *Leukemia* 28(2): 338–348.
- [56] Au WY, Weisenburger DD, Intragumtornchai T, Nakamura S, Kim WS, Sng I, Vose J, Armitage JO, Liang R for the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project (2009) Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* 113(17): 3931-3937.
- [57] Huang Y, de Reyniès A, de Leval L, Ghazi B, Martin-Garcia N, Travert M, Bosq J, Brière J, Petit B, Thomas E, Coppo P, Marafioti T, Emile JF, Delfau-Larue MH, Schmitt C and Gaulard P (2010) Gene expression profiling identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood* 115(6): 1226-1237.
- [58] Takakuwa T, Dong Z, Nakatsuka S, Kojya S, Harabuchi Y, Yang WI, Nagata S and Aozasa K (2002) Frequent mutations of Fas gene in nasal NK/T cell lymphoma. *Oncogene* 21(30): 4702-4705.
- [59] Ando M, Sato Y, Takata K, Nomoto J, Nakamura S, Ohshima K, Takeuchi T, Orita Y, Kobayashi Y and Yoshino T (2013) A20 (TNFAIP3) Deletion in Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders/Lymphomas [online]. *PLOS ONE* 8(2): e56741.
URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056741>
DOI: 10.1371/journal.pone.0056741
[Zugriff 26.01.2015]

[60] Reichardt P and Schütte J (2011) Gastrointestinale Stromatumore (GIST) [online]. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO).

URL: <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/gastrointestinale-stromatumore-gist>

[Zugriff 26.01.2015]

[61] Fu L, Gao Z, Zhang X, Tsang YH, Goh HK, Geng H, Shimizu N, Tsuchiyama J, Srivastava G and Tao Q (2009) Frequent concomitant epigenetic silencing of the stress-responsive tumor suppressor gene CADM1, and its interacting partner DAL-1 in nasal NK/T-cell lymphoma. *Int J Cancer* 124(7): 1572–1578.

[62] Protokoll „Histologische Arbeitsmethoden“ [online]. Universitätsmedizin Mainz, Institut für Virologie.

URL: <http://www.unimedizin-mainz.de/fileadmin/kliniken/virologie/Dokumente/methoden.pdf>

[Zugriff 26.01.2015]

[63] Künstlinger H, Huss S, Merkelbach-Bruse S, Binot E, Kleine MA, Loeser H, Mittler J, Hartmann W, Hohenberger P, Reichardt P, Büttner R, Wardelmann E and Schildhaus HU (2013) Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 9 mutations: Update on genotype-phenotype correlation. *Am J Surg Pathol* 37(11): 1648-1659.

[64] Terada T (2011) Mutations and protein expression of KIT and PDGFRA genes in ipsilateral testicular seminomas: an immunohistochemical and molecular genetic study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19(5): 450-453.

[65] Gu DL, Chen YH, Shih JH, Lin CH, Jou YS and Chen CF (2013) Target genes discovery through copy number alteration analysis in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 19(47): 8873–8879.

[66] Knudsen ES, Gopal P and Singal AG (2014) The Changing Landscape of Hepatocellular Carcinoma Etiology, Genetics, and Therapy. *Am J Pathol* 184(3): 573-884.

[67] Lazar AJ, Tuvín D, Hajibashi S, Habeeb S, Bolshakov S, Mayordomo-Aranda E, Warneke CL, Lopez-Terrada D, Pollock RE and Lev D (2008) Specific Mutations in the β -Catenin Gene (CTNNB1) Correlate with Local Recurrence in Sporadic Desmoid Tumors. *Am J Pathol* 173(5): 1518–1527.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Konzeption und Betreuung der Studie erfolgten durch Prof. Falko Fend, Prof. Leticia Quintanilla de Fend und Dr. Florian Nagl.

Die Versuche zur DNA-Extraktion, den PCRs, Gelelektrophoresen und Aufreinigungen wurden nach Einarbeitung durch Fr. Sema Colak von mir eigenständig durchgeführt.

Die Sequenzierungen wurden von mir mit Unterstützung von Fr. Sema Colak durchgeführt.

Die Auswertungen der Elektropherogramme wurden nach Einarbeitung durch Fr. Sema Colak und Dr. Jan Sperveslage von mir eigenständig durchgeführt.

Immunhistochemische Färbungen und In-situ-Hybridisierungen wurden durch die Mitarbeiter des Labors für Immunhistochemie des Instituts für Pathologie (UKT) durchgeführt und von Prof. Falko Fend ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte nach statistischer Beratung durch Prof. Rupert Hölzl (Mannheim) eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen den 05.02.2015

Doktorand: Florian Michael Hölzl.

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Fr. Sema Colak, ohne deren Expertise und Geduld die praktische Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank geht an Prof. Falko Fend, der mich den Weg zu Ende geführt hat; auch ist Prof. Leticia Quintanilla de Fend und Dr. Florian Nagl zu danken, die mich auf diesen gebracht haben.

Desweiteren möchte ich Dres. Irina Bonzheim, Jan Sperveslage und Fr. Claudia Hermann für ihre Unterstützung danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in diesem Unterfangen stets unterstützt und motiviert haben, auch wenn das nicht immer einfach war.