

GNAS1 Mutationen in gastrointestinalen Tumoren

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Bernhard Maria Walther
geboren am 21.08.1982 in Erfurt**

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Hendrik Bläker, Institut für Pathologie, Charité Berlin**
- 2. Prof. Dr. Ferdinand von Eggeling, Institut für Physikalische Chemie, FSU Jena**
- 3. Prof. Dr. Iver Petersen, Institut für Pathologie, FSU Jena**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.April 2016

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CUP	Cancer of unknown primary
DMR's	Differentially methylated regions
DANN	Desoxyribonukleinsäure
FD	Fibröse Dysplasie
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G protein-coupled receptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GIT	Gastrointestinaltrakt
Gs α	α -Untereinheit stimulatorischer G-Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
MAS	McCune-Albright Syndrom
NESP55	Neuroendocrine secretory protein 55
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHP I	Pseudohypoparathyreoidismus Typ I
SSA	Sessile serrated Adenoma
XL α s	extra large variant of Gs α

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das GNAS1 Gen	3
2.2	Die GNAS1 Mutation.....	4
2.3	Auswirkungen der GNAS1 Mutation.....	5
2.4	Gastrointestinale Adenome.....	5
2.5	Hyperplastische Magenpolypen	6
2.6	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NET's)	7
2.7	Kolorektale Adenokarzinome.....	8
3	Ziele der Arbeit	9
4	Publizierte Originalarbeit	10
	<i>GNAS1 mutations analysis in gastrointestinal tumors, Walther BM, Walther I, Chen Y, Petersen I, Pathology - Folia Histochemica et Cytobiologica, 52, 2, 90-95, 2014.</i>	
5	Diskussion	11
5.1	GNAS1 Mutationsanalyse der gastrointestinalen Adenome	11
5.2	GNAS1 Mutationsanalyse der hyperplastischen Magenpolypen	12
5.3	GNAS1 Mutationsanalyse der GEP-NET's	12
5.4	GNAS1 Mutationsanalyse der kolorektalen Adenokarzinome	13
6	Schlussfolgerungen	15
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	16
8	Anhang	21
8.1	Lebenslauf	21
8.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	22
8.3	Danksagung	23

1 Zusammenfassung

Hintergrund:

Weltweit tragen maligne Neoplasien, besonders die des gastrointestinalen Traktes (GIT) zu einer hohen Morbidität und Mortalität bei. Viele dieser Entartungen haben ihren Ursprung in Mutationen. Genetische Sequenzierung gibt uns die Möglichkeit, Gemeinsamkeiten in der Tumorigenese zu finden, Diagnosen schneller zu stellen und eine Therapie einzuleiten. Auf dem Chromosom 20 erstreckt sich der Genlocus des GNAS1 Gens über 13 Exons, welches die α -Subunit eines heterotrimeren membranständigen Rezeptors kodiert, dessen Hauptaufgabe die ubiquitäre Signalübertragung ist. Mutationen dieses Genlocus können Neoplasien zur Folge haben, die schon in vorangegangenen Studien besonders in Weichteiltumoren und in anderen Tumoren nachgewiesen worden. In vorliegender Arbeit wurden unterschiedliche Gruppen von Tumorentitäten des Gastrointestinaltraktes auf eine mögliche GNAS1 Mutation untersucht.

Methoden:

Insgesamt wurden 135 Proben analysiert, darunter 62 Adenome des Kolons (45 tubulär-villös, elf tubulär und sechs rein villös), zehn hyperplastische Magenpolypen, 31 gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NET's) und 32 kolorektale Adenokarzinome. Die DNA wurde aus formalinfixierten Paraffinblöcken extrahiert, mittels PCR ein 252 bp messender Abschnitt des GNAS1 Gens von Exon 8 amplifiziert, mit Positiv- und Negativ-Kontrollen verifiziert und anschließend erfolgte die PCR-Produktüberprüfung mittels 1,5-prozentiger gelRED-gefärbter Agarose-Gel-Elektrophorese. Die erhaltene und anschließend aufgereinigte DNA wurde durch Kapillarelektrophorese sequenziert und auf Mutationen ausgewertet.

Ergebnisse:

Von allen analysierten Proben wiesen fünf (3,7%) eine GNAS1 Mutation auf. Vier der 62 Adenome (6,45%) zeigten eine R201H, sowie ein kolorektales Karzinom (3,13%) eine R201C Mutation. In keinem GEP-NET oder hyperplastischen Magenpolypen konnte eine GNAS1 Mutation nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung:

Adenome zeigen teilweise GNAS1 Mutationen, vor allem aber dann, wenn sie histologisch villöse Anteile zeigen. Besonders häufig kommen GNAS1 Mutationen im Rektum vor,

scheinen aber in der Entstehung von kolorektalen Karzinomen keine große Rolle zu spielen. GEP-NET's sowie hyperplastische Magenpolypen entwickeln sich höchstwahrscheinlich ohne Beteiligung einer GNAS1 Mutation. Als genetischer Marker spielen GNAS1 Mutation derzeit in der Diagnostik keine Rolle. Es scheint Unterschiede zwischen GNAS1 Mutations-Vorkommen zwischen dem japanischen und kaukasischen Patientenkohorten zu geben. Dies sollte ein Ansatz für zukünftige wissenschaftliche Studien werden, um die Zusammenhänge zwischen GNAS1 Mutationen in der Tumorigenese verschiedener Entitäten und unterschiedlicher Populationen besser zu verstehen.

2 Einleitung

2.1 Das GNAS1 Gen

Auf dem langen Arm des Chromosoms 20 erstreckt sich im Bereich von 20q13.2-20q13.3 über eine Länge von 13 Exons der Genlocus des GNAS1 Gens (Bastepe 2007, Levine et al. 1991). Das GNAS1 Gen kodiert die α -Subunit eines heterotrimeren membranständigen Rezeptors, dessen Hauptaufgabe die Signalübertragung und die damit vermittelte Regulation der Informationsweitergabe ist. Es wird vermutet, dass die Gesamtzahl aller unterschiedlichen Rezeptoren, im Allgemeinen heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine bzw. G protein-coupled receptor (GPCR) genannt, zwischen 500 und 1000 liegt (Kobilka 2011, Morris and Malbon 1999). Die in vorliegender Studie untersuchte GNAS1 Mutation betrifft die Untergruppe der stimulatorischen Guaninnukleotid-bindenden Proteine (Gs-Proteine). Hierbei erfolgt die Signalübertragung mittels eines außerhalb der Zelle an den Rezeptor bindenden Liganden, welcher die Information durch eine induzierte Konformationsänderung unter Abspaltung der α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ($G_s\alpha$) in das Zellinnere weitergibt (Helms 1995). Der Transmembranrezeptor erstreckt sich dabei mit sieben Domänen durch die Lipiddoppelschicht der Zelle (Bristow et al. 1989). Intrazellulär ist das heterotrimere G-Protein, bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheit am COOH-Terminus des Rezeptors verankert (Bahouth et al. 1991). Das agierende Zentrum der α -Untereinheit kann GDP binden, welches sich bei der Signaltransduktion des Liganden durch Konformationsänderung intrazellulär abspaltet (Brandt and Ross 1985). Freies intrazelluläres GTP interagiert durch Andocken an diesem Zentrum und bewirkt so eine Konformationsänderung, welche zu einer Dissoziation des gesamten Komplexes, bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheit führt (Spiegel 2000). Die $G_s\alpha$ -Untereinheit aktiviert unter Vermittlung weiterer Moleküle die Adenylatcyclase, die aus zytosolischem AMP schließlich cAMP freisetzt (Levine 1999). cAMP ist als second messenger bei einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen bedeutsam und somit ubiquitär vorhanden (Calebiro and Maiellaro 2014). Durch den Austausch von GTP gegen GDP mittels der dem G-Protein eigenen intrinsischen Aktivität der GTPase kehrt der $G_s\alpha$ -Komplex wieder in seinen inaktiven Grundzustand zurück (Neubig and Siderovski 2002) und steht für einen erneuten Signaltransduktionsvorgang bereit.

2.2 Die GNAS1 Mutation

Die G α -Untereinheit wird durch die von der GNAS1 Mutation betroffenen Region kodiert. Die hier untersuchten Hotspots R201H und R201C zeigen jeweils Missense-Mutationen und gehören zu den frühzeitig entdeckten Veränderungen im GNAS1 Gen (Aldred and Trembath 2000, Weinstein et al. 1991, Landis et al. 1989). Die hierbei veränderte Nukleotidabfolge führt im Codon 201 des Exon 8 bei der R201C Mutation zu einem Austausch von Arginin gegen Cystein bzw. bei der R201H Mutation gegen Histidin (Aldred and Trembath 2000). Grundsätzlich können Mutationen in dieser Region zu einem aktivierenden oder zu einem inhibierenden Effekt führen. Die häufiger untersuchten Mutationen sind die aktivitätssteigernden, bei denen G α ohne weitere extrazelluläre Aktivierung des Rezeptors ungehemmt agiert (Lania et al. 2001). Typische Krankheitsbilder, die schon lange im Zusammenhang mit GNAS1 Mutationen beschrieben wurden, sind das McCune-Albright Syndrom (MAS; Trias von Café-au-lait-Flecken, multiplen Endokrinopathien und polyostotischer fibröse Dysplasie), die sporadisch auftretende fibröse Dysplasie (FD) und verschiedene endokrine Erkrankungen, wie beispielsweise der Pseudohypoparathyreoidismus (Lee et al. 2012, Diaz et al. 2007, Weinstein et al. 1991). Zusätzlich unterliegt der gesamte Genlocus einer sehr komplexen genetischen Kontrolle, die noch nicht komplett verstanden ist (Linglart et al. 2013, Hayward et al. 1998). Mehrere Promotoren und different methylierte Regionen (DMR) führen zu einer Vielzahl von Transskripten, die unterschiedliche Genprodukte kodieren. Hierbei zeigt sich zudem ein Unterschied in der Expression, je nachdem, von welchem Elternteil die Vererbung erfolgte (Li et al. 1993). Dieses so genannte Imprinting führt zu einer spezifischen Expression von Genprodukten, bedingt jeweils nur durch die different methylierten Regionen des mütterlichen bzw. väterlichen Allels. Teilweise findet das Imprinting auch biallelisch statt (Hayward et al. 1998). Die entstehenden Transskripte unterliegen zusätzlich einem alternativen Splicing, so dass unterschiedliche Varianten von Proteinen entstehen können. Weitere in GNAS1 kodierte Produkte sind das neuroendokrine sekretorische Protein 55 (neuroendocrine secretory protein 55, NESP55), die extra große Variante von G α (XL α s) und das GNAS1 antisense Transkript (Rezwan et al. 2014, Weinstein 2014, Bastepe 2007, Weinstein et al. 2004). Da die G α -Untereinheit an zahlreichen Signaltransduktionswegen beteiligt ist und in der Vergangenheit Zusammenhänge zwischen Mutationen der GNAS1 Gen kodierenden Sequenzen und des Auftretens von Neoplasien bewiesen worden sind, wurde in dieser Studie ihr Vorkommen in Bezug auf

verschiedene Entitäten des GIT untersucht (Carter et al. 2014, Narumi et al. 2013, DiCaprio and Enneking 2005, Alman et al. 1996).

2.3 Auswirkungen der GNAS1 Mutation

Generell unterteilt man die GNAS1 Mutationen in aktivierende oder inhibierende, welche zu Funktionsgewinn (gain-of-function) oder Funktionsverlust (loss-of-function) des zugehörigen Signalweges führen. Beispiele für das Auftreten von gain-of-function Mutationen sind die fibröse Dysplasie oder das intramuskuläre Myxom. Die Fibröse Dysplasie befällt monoostotisch oder auch polyostotisch meist lange Röhrenknochen und führt zu einer intraossären, gutartigen Auflockerung der Knochenmatrix (DiCaprio and Enneking 2005). Intramuskuläre Myxome sind benigne Weichgewebstumoren mit unklarer Differenzierung (Luebke et al. 2012), die zumeist in großen stammnahen Muskeln vorkommen. Derzeitige Studien erforschen das Vorkommen von GNAS1 Mutationen und deren Relevanz in der Diagnostik dieser Entitäten (Walther et al. 2014). Mit einer inaktivierenden GNAS1 Mutation verbunden ist der Pseudohypoparathyreoidismus Typ I (PHP I), bei welchem eine Zielorgan-Resistenz gegen das Parathormon vorliegt (Turan and Bastepe 2013). Anhand dieser wenigen Beispiele lassen sich die weitgefächerten Auswirkungen einer Mutation des GNAS1 Gens ansehen. Besonders die hohe Zahl von endokrinen Veränderungen wie auch das erwähnte PHP I sind in der Literatur bereits beschrieben worden (Lemos and Thakker 2015), deutlich seltener jedoch die Auswirkungen, die mit tumorösen oder besonders malignen Entitäten einhergehen. In Zusammenschau der gegenwärtigen wissenschaftlichen Ergebnisse wäre es daher denkbar, dass endokrin aktive Tumore (wie GEP-NET's) eine GNAS1 Mutation tragen könnten.

2.4 Gastrointestinale Adenome

Adenome des gastrointestinalen Traktes sind intraepitheliale Neoplasien, meist gut umschriebene und noch als gutartig eingestufte Läsionen, bestehend aus tubulären und/oder villösen Strukturen. Sie werden als Vorstufe zu malignen Tumoren, besonders im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz in Bezug auf das Adenokarzinom des GIT gezählt. Histologisch sind die Adenomzellen immatur und besitzen vergrößerte, geschichtete Zellkerne. Die Entartungsrate zu malignen Neoplasien ist abhängig von Größe und Lokalisation. Läsionen

unter zwei Zentimeter Durchmesser haben eine Entartungswahrscheinlichkeit von etwa 2%, ab zwei Zentimeter Tumordurchmesser steigt die Malignitätswahrscheinlichkeit auf 40%-50% an (Kleihues and Sobin 2000). Morphologisch unterteilt man die Adenome in vier Gruppen: Bei einem tubulären Adenom muss mindestens 80% des Adenoms aus sich verzweigenden, tubulären Anteilen bestehen und von Lamina propria umgeben sein. Villöse Adenome definieren sich durch das Vorhandensein von mindestens 80% fingerförmigen Strukturen, deren Lamina propria von dysplastischem Epithel bedeckt ist. Das tubulo-villöse Adenom kombiniert morphologische Eigenschaften der beiden anderen, hier müssen mindestens je 20% eines villösen und tubulären Adenoms in der Tumormasse vorliegen. Eine vierte Adenomart ist das sessile serratierte Adenom (sessile serrated Adenoma, SSA), bei dem die Drüsengänge sägezahnförmig aufgebaut sind. Die häufigste vorkommende Entität ist dabei das tubuläre Adenom (72%), gefolgt vom tubulo-villösen (27%) und dem villösen Adenom (1%) (Frimberger et al. 1978). In der Literatur werden die zuletzt erwähnten Veränderungen auch als papilläre oder papillär-tubuläre Adenome bezeichnet (Kleihues and Sobin 2000). Die SSA sind selten und wurden in dieser Arbeit nicht genetisch aufgearbeitet (Lugli and Jass 2006). Adenome gelten als Präkanzerosen und können über verschiedene Mutationen zu malignen Neoplasien entarten, die die genannten Adenomentitäten als Ursprung haben können (Terada 2013). Es wurden in der Vergangenheit verschiedene Tumorentitäten des GIT in Hinsicht auf die GNAS1 Mutation untersucht, die entsprechenden Studien fanden dabei allerdings vorrangig im asiatischen Raum statt (Yamada et al. 2012). Ähnliche Forschungen bezüglich dieser Entitäten im europäischen und westlichen Raum stehen derzeit noch weitestgehend aus. Es wurde in dieser Arbeit das Vorliegen von GNAS1 Mutationen in gastrointestinalen Tumoren untersucht, um diese und deren Rolle in der Tumorigenese besser verstehen zu können und die Ergebnisse international vergleichbar zu machen.

2.5 Hyperplastische Magenpolypen

Insgesamt wird die Inzidenz von Magenpolypen in der Literatur mit 9,8% beschrieben. Dabei sind die hyperplastischen Polypen des Magens mit 19% die zweithäufigste vorkommende polypöse Läsion nach den Funduspolypen mit 80% (Sonnenberg and Genta 2015). Hyperplastische Polypen sind zumeist breitbasig oder gestielt wachsende Läsionen, die typischerweise weniger als zwei Zentimeter messen und sich vermehrt antrumnah finden lassen. Histologisch weisen sie eine Proliferation oberflächlicher Foveolarzellen mit tief in

das Stroma reichenden Gruben auf (Kleihues and Sobin 2000). Eine zugrunde liegende Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* ist im Gegensatz zu Polypen des Fundus ein Risikofaktor und kann zur Entstehung von hyperplastischen Magenpolypen beitragen (Huang et al. 2014). Eine Studie, die das McCune-Albright Syndrom in Hinsicht auf mögliche GNAS1 Mutationen untersuchte, konnte GNAS1 Mutationen in gastrointestinalen Polypen nachweisen (Zacharin et al. 2011). Um zu evaluieren, ob Magenpolypen auch unabhängig des Vorliegens eines MAS eine GNAS1 Mutation vorweisen können, wurden in vorliegender Arbeit hyperplastische Magenpolypen auf die GNAS1 Mutation in den Hotspots R201H und R201C untersucht.

2.6 Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren

Neuroendokrine Tumoren stellen eine weit gefächerte Gruppe von Neoplasien dar, deren gemeinsames Merkmal die Sekretion von Neurotransmittern bzw. Hormonen ist. Darunter zählen beispielsweise Karzinoide, Phäochromozytome, Neuroblastome, medulläre Schilddrüsenkarzinome und gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NET's), wie das Gastrinom oder Insulinom (Kulke et al. 2015, Langley 1994). GEP-NET's sind seltene Tumore mit einer geschätzten Inzidenz von zwei bis fünf Erkrankungen auf 100000 Einwohner (Katalinic et al. 2014). Es finden sich bisher nur wenige ältere Studien, die sich ausschließlich mit diesen Entitäten auseinandergesetzt haben. Letztlich beruht die Heterogenität darauf, dass es sich bei den GEP-NET's um ein Sammelsurium von Entitäten handelt, die früher anders benannt und separat betrachtet wurden. So schließt die Bezeichnung GEP-NET alte Entitäten wie das Karzinoid des Ileums, das Insulinom des Pankreas oder das Gastrinom mit ein. Dazu kommen potentiell hochmaligne neuroendokrine Karzinome, die in vielen Organen des Gastrointestinaltraktes vorkommen. Der Heterogenität versucht man einerseits mit der Unterscheidung von „neuroendokrinen Tumoren“ und „neuroendokrinen Karzinomen“ gerecht zu werden, andererseits durch Tumorgrading und -staging (Klöppel et al., 2010). Manche GEP-NET's zeigen eine hohe Mortalität (Einjahresüberleben: zwei Patienten von 17 Follow-up Studienteilnehmern bei rektalem Karzinoid (Gaffey et al. 1990)), andere Studien zeigen eine komplette Remission nach chirurgischer Resektion (Gunavathy et al. 2014). Die am häufigsten vorkommenden Tumore sind Karzinoide (55%) (durch „NET“ abgelöste Bezeichnung, die gut differenzierte neuroendokrine Tumore zusammenfasst (Klöppel et al. 2010)), pankreatisch nicht-sekretierende Tumore (20%), Metastasen bei

Vorliegen eines sogenannten CUP-Syndroms (Cancer of unknown primary) (9%), Insulinome (8%) und schließlich Gastrinome (4%) (Garcia-Carbonero et al. 2010). Zudem findet man einen Fallreport, bei dem ein Patient zeitgleich einen intestinalen GEP-NET Tumor und ein Adenokarzinom des Kolons aufweist (Katalinic et al. 2014). In der bisherigen Literatur wurden noch keine GEP-NET's auf eine GNAS1 Mutation hin untersucht. Besonders im Zusammenhang mit bewiesenen GNAS1 Mutationen bei Adenomen bzw. kolorektalen Karzinomen (Fecteau et al. 2014) kann eine Mutationsanalyse der GEP-NET's das Verständnis dieser Entitäten erweitern und zur Aufklärung der Pathogenese beitragen.

2.7 Kolorektale Adenokarzinome

Kolorektale Neoplasien verursachen weltweit und besonders in den Industrienationen häufig therapeutische Interventionen und Krankenhausaufenthalte. Vor allem in Europa kommt dem kolorektalen Karzinom eine hohe Bedeutsamkeit zu, da es in der Todesursachenstatistik durch Krebserkrankungen bei beiden Geschlechtern den zweiten Platz einnimmt. Im Jahr 2008 wurden ca. 447000 neu aufgetretene Fälle von kolorektalen Karzinomen in der Europäischen Union erfasst (Ferlay et al. 2013). Die Inzidenz speziell für das Adenokarzinom wird dabei mit ca. 38 Betroffenen auf 100000 Einwohner angegeben. Als Risikofaktoren werden ein hoher Fleisch- und Alkoholkonsum, Rauchen und ein bewegungsarmer Alltag angesehen. Mutmaßlich protektive Faktoren sind ballaststoffreiche Ernährung, viel Bewegung und einige Hormonersatztherapien (Kleihues and Sobin 2000). Läsionen ohne eine Infiltration der Submucosa bilden in der Regel keine Metastasen und werden daher zumeist als „Adenocarcinoma in situ“ bezeichnet. Das kolorektale Adenokarzinom weist morphologisch eine drüsenförmige, in ihrer Größe sehr variable Struktur auf. Histopathologisch stellen sich die epithelialen Zellen relativ groß dar, die Drüsengänge enthalten oft Debris (Kleihues and Sobin 2000). Zusätzlich zum Bestehen bekannter Risikofaktoren können genetische Dispositionen oder Mutationen eine Rolle bei der Tumorigenese spielen. In dieser Studie wurden in Erweiterung schon bestehender Studien (Yamada et al. 2012) kolorektale Adenokarzinome auf das Vorliegen der GNAS1 Mutation hin untersucht.

3 Ziele der Arbeit

In vorliegender Arbeit wurden insgesamt 135 Proben von gastrointestinalen Tumoren untersucht, darunter gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NETs); tubuläre, villöse und tubulo-villöse Adenome, hyperplastische Magenpolypen und kolorektale Adenokarzinome. Die Vielzahl von tumorösen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes sowie die hohe Morbidität und Mortalität dieser Neoplasien stellen besonders in Industrienationen hohe Anforderungen an frühdiagnostische Maßnahmen und die daraus resultierenden therapeutischen Ziele (Ferlay et al. 2013, Okines et al. 2010). Im Allgemeinen sind eine korrekte zeitige Diagnose jedweder morbid entwickelnden Neoplasie und die daraus resultierende angepasste Therapie mit einem besseren Krankheitsverlauf assoziiert. Für den Therapeuten ist es in seiner Entscheidungsfindung unverzichtbar, soviel wie möglich über gefundene pathologische Strukturen zu erfahren, um eine differenzierte Behandlung einleiten zu können. Bei Tumoren des gastrointestinalen Systems ist eine Resektion der Neoplasie allein meist nicht ausreichend, oft müssen auch Anteile von umgebendem Gewebe entfernt werden (Courtney et al. 2014). Je nach Entität können verschiedene operative Möglichkeiten (offene Resektion, endoskopische Abtragung, minimal invasive Chirurgie) in Betracht gezogen werden. Zudem ist bei manchen Tumoren und Patienten die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Zweitneoplasien höher, welches von genetischen Alterationen abhängig ist. Ziel dieser Studie ist es, Entitäten des gastrointestinalen Traktes auf die GNAS1 Mutation zu untersuchen, um deren Stellenwert als Marker zur Früherkennung bzw. Einordnung der Malignität gastrointestinaler Tumoren zu eruieren sowie eventuelle Unterschiede in den Ergebnissen im Vergleich mit anderen Studien zu detektieren.

4 Publierte Originalarbeit

GNAS1 mutation analysis in gastrointestinal tumors

Bernhard Maria Walther, Ina Walther, Yuan Chen, Iver Petersen

Folia Histochemica Et Cytobiologica Vol. 52, No. 2, 2014

pp. 89 - 94

GNAS1 mutation analysis in gastrointestinal tumors

Bernhard Maria Walther, Ina Walther, Yuan Chen, Iver Petersen

Institute of Pathology, University Hospital Jena, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany

Abstract: GNAS1 codes for a part of the α -stimulatory subunit ($Gs\alpha$) of the G protein. Mutation of GNAS1 has been frequently found in myxoid soft tissues, however, in gastrointestinal tumors, little is known about the mutation status of GNAS1. The aim of the study was to analyze the occurrence of GNAS1 mutations in different gastrointestinal, gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) and colorectal tumors. Mutation status of GNAS1 exon 8 was analyzed in one hundred thirty-five formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) gastrointestinal tumor samples including 45 tubular-villous adenomas, 11 tubular adenomas, 6 villous adenomas, 10 hyperplastic gastric polyps, 31 GEP-NETs and 32 colorectal adenocarcinomas by using polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. Five GNAS1 mutations were found in 2 tubular-villous adenomas, 2 villous adenomas and 1 colorectal adenocarcinoma. No mutations were detected in the tubular adenomas, the hyperplastic gastric polyps or GEP-NETs. GNAS1 mutation is not a frequent molecular event in GEP-NETs or hyperplastic gastric polyps. The study confirms the presence of GNAS1 mutations in colon tumors with villous differentiation. (*Folia Histochemica et Cytobiologica* 2014, Vol. 52, No. 2, 89–94)

Key words: GNAS1 mutations; gastric cancer; intestinal tumors; CRC; GEP-NETs

Introduction

Cancer is worldwide and especially in more industrialized nations a major reason for hospitalization and treatment. In 2008, there were 447 000 new cases of colorectal cancer in the European Union [1]. About 65% of all new cases occur in high-income countries. Behavioral risk factors including diet, alcohol intake and physical inactivity account for a large proportion of cases. In Europe, colorectal cancer (CRC) is the second most common cause of cancer death in both men and women. It is the second most common form of cancer in women, after breast cancer, and the third most common in men, after lung and prostate cancer [1]. Although the incidence of gastric cancer is decreasing, there were still 159 900 new cases in Europe in 2006, and about 118 200 deaths, representing the fifth highest incidence and fourth highest cause of cancer-related death [2]. To achieve a reduced mortality of gastrointestinal cancer, a better understanding of the

molecular mechanisms underlying carcinogenesis is essential which eventually will lead to early diagnosis of the disease.

The GNAS1 gene is located on chromosome 20q13.3. It has 13 exons and can undergo alternative splicing [3, 4]. GNAS1 codes for the α -stimulatory subunit ($Gs\alpha$) of heterotrimeric G proteins. $Gs\alpha$ activates the adenylyl cyclase which then catalyzes cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production and can thereby regulate downstream signaling pathways [6]. As a vital parameter in cellular signaling $Gs\alpha$ is ubiquitously found [7]. Different diseases are described with gain-of-function and loss-of-function mutations such as McCune-Albright-Syndrome, a disease which combines *café-au-lait* spots, polyostotic fibrous dysplasia and endocrinopathies [8], fibrous dysplasia itself [9] or endocrinological diseases like pseudohypoparathyroidism [10] with various mutation hotspots [11]. How imprinting mechanism of this gene leads to different diseases partly depending on parent's gender, is not totally understood [5]. Because of the widespread occurrence of G-protein-coupled receptors mutations of the gene could in principle be involved in a large number of different tumor types. And indeed, it was shown that GNAS1 mutation could be found in different neoplasia throughout the whole body ranging from pituitary gland tumors [12] over

Correspondence address: I. Petersen, M.D.
Institute of Pathology, University Hospital,
Friedrich-Schiller-University, Jena
Ziegelmühlenweg St. 1, 07743 Jena, Germany
tel.: +49 (0)3641 933120, fax: +49 (0)3641 933111
e-mail: iver.petersen@med.uni-jena.de

Table 1. Study collective and experimental results

Entity	Number of samples	Age	Mutations found	Kind of mutation
Tubular-villous adenoma	45	Mean 76; range 47–85	2	R 201 H
Tubular adenoma	11		No	
Villous adenoma	6		2	R 201 H
Hyperplastic gastric polyps	10	Mean 72; range 49–85	No	
GEP-NETs	31	Mean 56; range 19–87	No	
Colorectal adenocarcinoma	32	Mean 77; range 58–85	1	R 201 C
All	135		5	

pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) [13, 14], low-grade appendiceal mucinous neoplasia [15], villous adenomas of the colorectum [16] to colorectal carcinoma [17]. However, the mutation status of GNAS1 in gastrointestinal cancer has not yet been well investigated. So far only a handful of publications addressed this issue. Therefore in our study we focused on mutation analysis of GNAS1 in different neoplasia of the digestive tract.

Material and methods

Tumor samples. Altogether 135 gastrointestinal tumor samples from different entities were included in our study (Table 1). Among them, 45 were tubular-villous adenomas, 11 tubular adenomas, both of them ranging from low to high grade, 6 villous adenomas, a rare tumor type, 10 hyperplastic gastric polyps, 31 gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) and 32 colorectal adenocarcinomas. The tubular-villous adenomas were collected throughout the whole gastrointestinal tract and were found in following regions: sigmoid colon — 13, colon not otherwise specified — 11, descending colon — 6, cecum — 5, rectum — 4, transverse colon — 3, and ascending colon — 3. All entities described above were removed endoscopically or surgically, and were fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE). The GEP-NET collective represented a subgroup from a recently published series [18]. The grading for the tumor samples was defined according to the WHO classification of tumors of the digestive system [19]. The GEP-NETs grading was performed according to Capella et. al [20]. All samples were retrieved from the collection of the Institute of Pathology of the Jena University Hospital; the GEP-NETs from 1995 to 2008 and all the other samples from 2010 to 2012.

Genomic DNA isolation, PCR product purification. Genomic DNA was isolated from the 135 FFPE tumor samples by using a QiAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the guidelines of the manufacturer.

The primer pair: 5'-CTCTTTCCAAACTACTCCA-GACC-3' (sense) and 5'-AGCTGGTTATTCCAGAGG-GACT-3' (antisense) was used for the PCR amplification of GNAS1. PeqSTAR 96 Universal Gradient PCR thermocycler has been used for PCR amplification and PeqGold Hot Taq DNA polymerase (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) was applied. PCR was performed in a 50 µl volume (50–100 ng genomic DNA, 2.0 mM dNTPs and 10 pmol of primer pair) under the following conditions: 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 45 s, for 40 cycles after an initial denaturation at 95°C for 15 min and a final elongation at 72°C for 7 min. In each PCR run, positive and negative controls were included. The expected size of the GNAS1 product is 252-bp. All PCR products were visualized on a 1.5% agarose. PCR products were purified by using a DNA Clean&Concentrator™ 5-KIT (Zymo Research Europe, Freiburg Germany) according to the manufacturer's instructions. One hundred nanogram (100 ng) of purified PCR products were applied for direct sequencing by capillary electrophoresis (LGC Genomics, Berlin, Germany).

Results

Of all 135 samples examined, we found that only 5 cases (3.7%) showed GNAS1 mutations (Table 1). In adenomas, 4 out of 62 (6.45%) were mutated. One of the mutated adenoma could not be assigned to a specific region of the colon, whereas all other 3 were found in the rectum. The mutation pattern of all GNAS1 positive adenomas was a change from Arginine to Histidine (R201H; CGT > CAT) (Figure 1). Two of them were diagnosed as tubular-villous low grade adenomas and 2 were villous high grade adenomas, one with severe and one with moderate dysplasia. Out of the 32 colorectal carcinomas, only one positive case (3.13%) was identified. It consisted of the recurrence of a mucinous rectal adenocarcinoma (rpT3, rpN0 (0/5), L0, V0, Pn0, G3, R0). In contrast to the mutations of adenomas, the nucleotide exchange resulted in the substitution of Arginine to Cysteine (R201C;

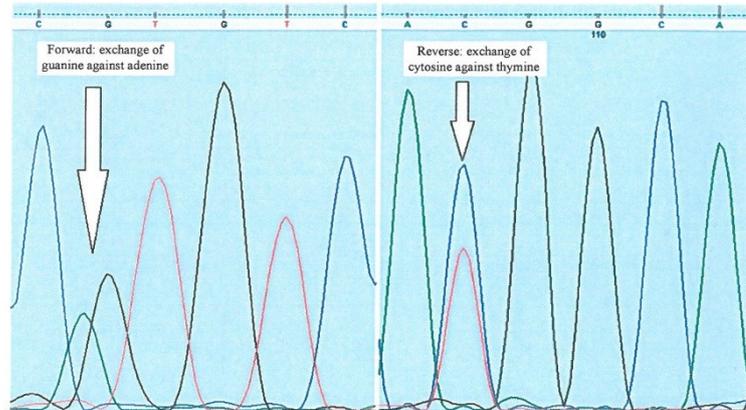


Figure 1. Sequence analysis of GNAS1 R201H mutation in a villous adenoma

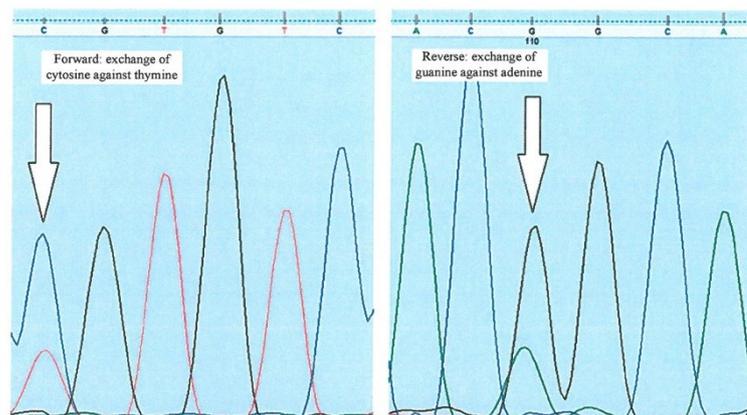


Figure 2. Sequence analysis of GNAS1 R201C of the colorectal carcinoma

CGT > TGT) (Figure 2). The carcinoma harbored an additional KRAS mutation (G13D; GGC > GAC). The histological analysis of the GNAS1-mutated tumors revealed no peculiar patterns compared to the non-mutated cases (Figure 3).

No GNAS1 mutation was found in 10 hyperplastic gastric polyps and 31 GEP-NETs.

Discussion

Many signaling pathways are connected with stimulatory G proteins. In particular, G protein-coupled receptors are the most common receptors which exert their function through nucleotide exchange on heterotrimeric G proteins [21]. These receptors undergo

an exchange of GTP for GDP on the G α -subunit initiating downstream signaling [22]. Mutations in G α itself, but also mutations in the binding pocket of G protein-coupled receptors, can affect their downstream function [23]. Being embedded with its seven transmembrane domains [24] in the double lipid layer of a cell, a G protein-coupled receptor transfers information from outside to the inside by the heterotrimeric G protein and in particular by its GTP-bound alpha subunit. GNAS1 therefore represents a fundamental link to stimulate the cell in order to carry out its proper function. False stimulation or missing input leaves the cell without vital information or may initiate autonomous growth. Generally, mutation can cause an uninhibited activation [25] or a loss of func-

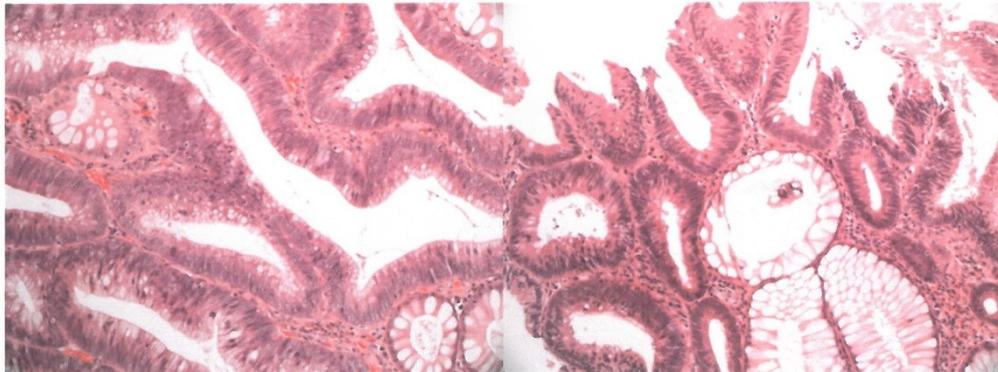


Figure 3. Representative histological images of two adenomas with GNAS R201H mutations ($\times 200$ magnification)

tion [5]. Tissues with high cell turnover like epidermis or epithelium of gastrointestinal tract are especially vulnerable for acquiring mutations. It was proved long ago that RAS, a small G protein, is frequently mutated in colorectal cancer. GNAS1, however, was only recently identified to be mutated in a subset of colon neoplasia, *i.e.* villous adenoma [16]. Therefore, we decided to assess the most frequent mutation of GNAS1 gene by analyzing the FFPE samples of different subsets of gastrointestinal tumors.

In our study, among 45 tubular-villous adenomas, 2 cases showed GNAS1 mutations (4.44%), which is in good agreement with the data from Yamada et al., who tested 35 tubular-villous adenomas and found only in one case (3%) a GNAS1 mutation [16]. It indicates the possibility that GNAS1 mutations could be a factor in adenoma development. GNAS1 R201H and R201C are the most frequently missense mutations found in different non-cancer and cancer diseases [9, 26]. Interestingly Yamada et al. found that 20 out of 24 (83%) villous adenomas presented GNAS1 mutations [16]. We could prove two GNAS1 mutation out of 6 villous adenomas (33.33%). This discrepancy between findings may be explained by a different racial background between Japanese and Caucasian populations. In fact, a very recent Japanese study of 12 villous adenomas in association with colon adenocarcinoma confirmed the high incidence since GNAS1 mutations were detected in 9 cases (75%). Interestingly, the GNAS1 mutations were shared in only 3 of the 12 adenocarcinomas (25%) of which 11 also harbored KRAS mutations [27]. It should be mentioned, however, that this study came from the same group that initially reported GNAS1 mutation in villous adenoma. Unfortunately, to our knowledge there are no independent reports from other groups

confirming the high incidence of GNAS1 mutations in villous adenoma. Still, the data implicates that there may be a connection between a villous differentiation and the GNAS1 mutation in codon 201. The fact that also tubular-villous adenomas were mutated, suggests that even a small villous component raises the possibility of carrying a GNAS1 mutation. In contrast pure tubular adenomas showed no mutation, which corroborates the up to now published data [16]. Thus, it seems that there is no or only a very small relationship between tubular differentiation in colorectal adenoma and the GNAS1 mutation. This should be evaluated in further studies, with discrimination between the villous and tubular components and separate testing of the GNAS1 locus.

We found only one GNAS1 mutation in 32 tested colorectal adenocarcinomas. This is in concordance with the data from other groups regarding GNAS1 analysis. *I.e.*, Yamada et al. found 2 mutations in 76 (3%) colorectal adenocarcinomas [16]. Because of the above mentioned possible connection between villous differentiation in adenoma and the GNAS1 mutation, we wanted to examine if there was a similar villous component in our GNAS1 mutation positive tested CRC. However, our assumption could not be confirmed, because no remarkable villous differentiations were found in this specific GNAS1 positive CRC. Furthermore, there was no noticeable distinction in the histological appearance between the one mutated sample and the other 31 colorectal adenocarcinomas. Further studies of CRC focusing on the histological appearance and their possible GNAS1 mutation should be performed to classify the importance of this mutation in the development of colorectal adenocarcinoma. The recent study by Sekine et al. might indicate that the mutation is relevant for tumor initiation but dispensable for malignant

tumor progression. It confirms our observation of the potential coincidence with a KRAS mutation [27]. Another recent study of 428 colon adenocarcinoma reported a rather low GNAS1 mutation rate of 2.3% and also a coincidence with KRAS mutations. In addition, a correlation with right-sided location was reported, however, this finding does not correlate with our case which consisted of the recurrence of a rectal adenocarcinoma [28]. In addition, it may be interesting to compare the mutation status with the immunohistochemical expression pattern of colon tumors, e.g. markers like CDX2, desmocollin 1–3, PITXI [29] or the MSS/MSI phenotype.

Similarly to other studies [16] we did not find GNAS1 mutations in hyperplastic gastric polyps. Thus, GNAS1 mutation seems to be a rare molecular event in hyperplastic polyps. The analysis was inspired by recent studies showing GNAS1 mutations in pyloric gland adenomas [30, 31]. Our results suggest that distinct genes and pathways are affected in different gastric tumor entities.

GEP-NETs are neuroendocrine tumors with a rising incidence and also represent the most common NETs [32]. Plöckinger et al. suggested surgery as the only therapeutic option for patients with GEP-NETs [33] and despite severe pharmacologic tests it is still the only option currently [34], although radionuclide therapy showed a certain constricted value [34]. Patients with GEP-NETs have a very heterogeneous prognosis, ranging from an overall five-year-survival from 100% to lower than 10% depending on the location of tumor and its biological aggressiveness [35]. Therefore, it is particularly important to identify biomarkers and better understand biology of these tumors with regard to early diagnosis and treatment. Since we did not find any GNAS1 mutation in 31 GEP-NETs, it may be assumed that this mutation is rarely involved in the development of this kind of tumors. Our findings contrast with reports which showed a detectable frequency of GNAS1 mutation in other neuroendocrine tumors, for example 40% GH-secreting pituitary tumors presented GNAS1 mutations [36] and toxic thyroid adenomas — 4.71% GNAS1 mutations [37]. The mutational spectrum of GNAS1 seems also to be different in patients with pseudohypoparathyroidism [38].

In summary, GNAS1 exon 8 mutations seem to be rare events in gastrointestinal tumors. We confirmed that GNAS1 mutations may occur in tubular-villous adenoma and villous adenoma. GNAS1 mutations may be particularly important for epithelial colon tumors with villous differentiation, however, they occur very rarely in colorectal adenocarcinoma. Moreover, GEP-NETs and hyperplastic polyps of the stomach seem not to be connected to genetic mutation of GNAS1 exon 8.

Acknowledgements

The technical assistance of Kristin Zöller and Carola König is gratefully acknowledged.

References

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49:1374–1403.
2. Okines A, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A and ESMO Guidelines Working Group. Gastric Cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21(Suppl 5):v50–v54.
3. Weinstein LS, Chen M, Liu J. Gs(Alpha) mutations and imprinting defects in human disease. *Ann NY Acad Sci*. 2002;968:173–197.
4. Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004;145:5459–5464.
5. Liñgärt A, Maupetit-Méhouas S, Silve C. GNAS-related loss-of-function disorders and the role of imprinting. *Horm Res Paediatr*. 2013;29:119–129.
6. Nagai Y, Nishimura A, Tago K, Mizuno N, Itoh H. Ric-8b stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. *J Biol Chem*. 2010;285:11 114–11 120.
7. Bastepe M. The GNAS locus: quintessential complex gene encoding Gsalpha, Xlalphas, and other imprinted transcripts. *Curr Genomics*. 2007;8:398–414.
8. Nerumi S, Matsuo K, Ishii T, Tanahashi Y, Hasegawa T. Quantitative and sensitive detection of GNAS mutations causing McCune-Albright syndrome with next generation sequencing. *PLoS One*. 2013;8:e60525.
9. Shi RR, Li XF, Zhang R, Chen Y, Li TJ. GNAS mutational analysis in differentiating fibrous dysplasia and ossifying fibroma of the jaw. *Mod Pathol*. 2013;26:1023–1031.
10. Izzi B, de Zegher F, Francois I et al. No evidence for GNAS copy number variants in patients with features of Albright's hereditary osteodystrophy and abnormal platelet Gs activity. *J Hum Genet*. 2012;57:277–279.
11. Alves C, Sampaio S, Barbieri AM, Mantovani G. Pseudohypoparathyroidism type Ia: A novel GNAS mutation in a Brazilian boy presenting with an early primary hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2013;26:557–560.
12. Mantovani G, Lania AG, Spada A. GNAS imprinting and pituitary tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;326:15–18.
13. Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E et al. Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep*. 2011;1:161.
14. Kanda M, Knight S, Topazian M et al. Mutant GNAS detected in duodenal collections of secretin-stimulated pancreatic juice indicates the presence or emergence of pancreatic cysts. *Gut*. 2013;62:1024–1033.
15. Nishikawa G, Semine S, Ogawa R et al. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms. *Br J Cancer*. 2013;108:951–958.
16. Yamada M, Semine S, Ogawa R et al. Frequent activating GNAS mutations in villous adenoma of the colorectum. *J Pathol*. 2012;228:113–118.
17. Idziaszczyk S, Wilson CH, Smith CG, Adams DJ, Cheadle JP. Analysis of the frequency of GNAS codon 201 mutations in advanced colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;202:67–69.

18. Knösel T, Chen Y, Altendorf-Hofmann A et al. High KIT and PDGFRA are associated with shorter patients survival in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, but mutations are a rare event. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138:397–403.
19. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. World Health Organization, and International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th ed., Lyon, IARC Press, 2010.
20. Capella C, Heitz PU, Höfler H, Solcia E, Klöppel G. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch*. 1995;425:547–560.
21. Chung KY, Rasmussen SG, Liu T. et al. Conformational changes in the G protein Gs induced by the β_2 adrenergic receptor. *Nature*. 2011;477:611–615.
22. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J, Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocr Rev*. 2001;22:675–705.
23. Hajjhussein H, Gardner LA, Fujii N, Anderson NM, Bahouth SW. The hydrophobic amino acid cluster at the cytoplasmic end of transmembrane helix III modulates the coupling of the β_1 -adrenergic receptor to Gs. *J Recept Signal Transduct Res*. 2013;33:79–88.
24. Pierce KL, Premono RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:639–650.
25. Lefkowitz RJ. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;190:9–19.
26. Tabareau-Delalande F, Collin C, Gomez-Brouchet A et al. Diagnostic value of investigating GNAS mutations in fibro-osseous lesions: a retrospective study of 91 cases of fibrous dysplasia and 40 other fibro-osseous lesions. *Mod Pathol*. 2013;26:911–921.
27. Sekine S, Ogawa R, Oshiro T et al. Frequent lack of GNAS mutations in colorectal adenocarcinoma associated with GNAS-mutated villous adenoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53:366–372.
28. Fecteau RE, Lutterbaugh J, Markowitz SD, Willis J, Guda K. GNAS mutations identify a set of right-sided, RAS mutant, villous colon cancers. *PLoS One*. 2014;9:e87966. PubMed PMID: 24498230.
29. Knösel T, Chen Y, Hotovy S, Settmacher U, Altendorf-Hofmann A, Petersen I. Loss of desmocollin 1-3 and homeobox genes PITX1 and CDX2 are associated with tumor progression and survival in colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27:1391–1319.
30. Kushima R, Sekine S, Matsubara A, Taniguchi H, Ikegami M, Tsuda H. Gastric adenocarcinoma of the fundic gland type shares common genetic and phenotypic features with pyloric gland adenoma. *Pathol Int*. 2013;63:318–325.
31. Matsubara A, Sekine S, Kushima R et al. Frequent GNAS and Kras Mutations in Pyloric Gland Adenoma of the Stomach and Duodenum. *J Pathol*. 2013;229:579–587.
32. Faggiano A, Ferolla P, Grimaldi F et al. Natural history of gastro-entero-pancreatic and thoracic neuroendocrine tumors. Data from a large prospective and retrospective Italian epidemiological study: The Net Management Study. *J Endocrinol Invest*. 2012;35:817–823.
33. Plöckinger U, Wiedenmann B. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system: the role of early diagnosis, genetic testing and preventive surgery. *Dig Dis*. 2002;20:49–60.
34. Baudin E, Planchard D, Scazec JY et al. Intervention in gastro-enteropancreatic neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26:855–865.
35. Gulenchyn KY, Yao X, Asa SL, Singh S, Law C. Radionuclide therapy in neuroendocrine tumours: a systematic review. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012;24:294–308.
36. Occhi G, Losa M, Albiger N et al. The glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor is overexpressed amongst GNAS1 mutation-negative somatotropinomas and drives growth hormone (GH)-promoter activity in GH3 cells. *J Neuroendocrinol*. 2011;23:641–649.
37. Palos-Paz F, Perez-Guerra O, Cameselle-Teijeiro J et al. and Galician Group for the Study of Toxic Multinodular Goitre. Prevalence of mutations in TSHR, GNAS, PRKAR1A AND RAS genes in a large series of toxic thyroid adenomas from Galicia, an iodine-deficient area in NW Spain. *Eur J Endocrinol*. 2008;159:623–631.
38. Jin HY, Lee BH, Choi JH et al. Clinical characterization and identification of two novel mutations of the GNAS gene in patients with pseudohypoparathyroidism and pseudopseudohypoparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75:207–213.

Submitted: 15 November, 2013
Accepted after reviews: 3 June, 2014

5 Diskussion

5.1 GNAS1 Mutationsanalyse der gastrointestinalen Adenome

In dieser Studie wurden insgesamt 62 Adenome des GIT histologisch aufgearbeitet und mittels direkter Sequenzierung bezüglich einer GNAS1 Mutation untersucht. Unter den Adenomen befanden sich 45 tubulo-villöse Adenome, elf rein tubuläre und sechs rein villöse Adenome. Im Vergleich zu den Inzidenzen älterer Studien mit 27% (Frimberger et al. 1978), stellten die tubulo-villösen Adenome mit 72,6% in dieser Studie einen viel höheren Anteil der Proben dar. Insgesamt konnte eine Mutationsrate von 6,45% der Adenome gezeigt werden (vier von 62 Fällen). Alle GNAS1 Mutationen wiesen einen Austausch von Arginin gegen Histidin (CGT zu CAT) auf, waren also R201H Mutationen. Von den tubulo-villösen Adenomen zeigten 4% eine Mutation (zwei von 45 Fällen), bei den rein tubulären Adenomen konnte keine GNAS1 Mutation nachgewiesen werden und 33% (zwei von sechs Fällen) der villösen Adenome zeigten ebenfalls eine R201H Mutation. Yamada et al. fanden in 3% (einer von 35 Fällen) der untersuchten tubulo-villösen Adenome eine GNAS1 Mutation, keine Mutation in den rein tubulären Adenomen, aber eine Mutationsrate von 83% bei den villösen Adenomen (20 von 24 Fällen) (Yamada et al. 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie decken sich sehr gut mit den von Yamada et al. gefundenen Daten, besonders in Hinblick auf tubulo-villöse und tubuläre Adenome. Die Mutationsrate der von Yamada et al. untersuchten villösen Adenome von 83% konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits war die Probenanzahl bei Yamada et al. höher, andererseits könnte es sich auch um einen generellen Unterschied im genetischen Genpool von kaukasischer und japanischer Bevölkerungsgruppe handeln. Diese Hypothese wird durch eine neuere GNAS1 Mutationanalyse aus Japan gestützt, die eine Mutationsrate von 75% der villösen Adenome aufwies (Sekine et al. 2014). Leider wurden bis heute keine weiteren Studien aus dem europäischen Raum veröffentlicht, die sich mit villösen Adenomen in Bezug auf GNAS1 Mutationen beschäftigen. Hier besteht daher die Notwendigkeit weiterer Forschungsarbeit, um den Zusammenhang zwischen Entstehung der entsprechenden Neoplasien und der Rolle der GNAS1 Mutation besser verstehen zu können. Die bisherigen Daten lassen darauf schließen, dass es eventuell kulturelle (beispielsweise Ernährung) oder genetische Unterschiede in der Entstehung von villösen Adenomen geben könnte. Interessant ist auch, dass drei der vier GNAS1 positiv gestesteten Adenome sich direkt im Rektum

befanden. Dem vierten positiven Adenom ließ sich keine genaue Lokalisation zuordnen. Doch auch mit der Annahme, dass sich dieses nicht im Rektum befand, sind 75% der mutierten Neoplasien in einem doch sehr kleinen Gebiet des GIT gefunden worden. Dies war in ähnlichen Studien (Fecteau et al. 2014) ebenso.

5.2 GNAS1 Mutationsanalyse der hyperplastischen Magenpolypen

Es wurden in dieser Studie insgesamt zehn hyperplastische Magenpolypen auf das Vorliegen einer GNAS1 Mutation hin untersucht. Bei dem schon beschriebenen McCune-Albright Syndrom wurden in verschiedenen Fällen Mutationen des GNAS1 Genlocus gefunden (Lee et al. 2012, Diaz et al. 2007, Wagoner et al. 2007, Weinstein et al. 1991). Eine weitere Studie beschäftigte sich mit Läsionen des GIT bei ebensolchen Patienten und konnte GNAS1 Mutationen in Polypen des Magens und/oder des Duodenums bei 75% der Betroffenen nachweisen, darunter auch eine R201C Mutation (Zacharin et al. 2011). Interessanterweise wurden die Mutationen dabei nicht nur in den untersuchten Polypen, sondern auch im umgebenden, histologisch unauffälligen Gewebe sowie im peripheren Blut detektiert. In einigen Fällen konnte die Mutation allerdings nur isoliert im Polypen, nicht jedoch im peripheren Blut nachgewiesen werden. In unserer Studie wurden die Polypen auf die R201C und die R201H Mutation hin untersucht, da diese bereits im Rahmen von Adenokarzinomen gefunden wurden (Yamada et al. 2012). Wir konnten in keinem der zehn Polypen eine GNAS1 Mutation erfassen. Daraus lässt sich schließen, dass die GNAS1 Mutation in der Genese von hyperplastischen Magenpolypen ohne zugrundeliegendes MAS keine Rolle spielt. Es scheint daher empfehlenswert, beim Vorliegen eines MAS endoskopische Kontrollen bezüglich maligner Entartungen von polypösen Läsionen durchzuführen. Beim Auffinden von hyperplastischen Polypen ohne MAS ist eine GNAS1 Mutationsanalyse in ihrer Aussage eher eingeschränkt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zum Verständnis der Komplexität des gesamten Genlocus und der ubiquitär im Rahmen der Signaltransduktion vorkommenden Genprodukte noch weitere Forschungsarbeiten notwendig sind.

5.3 GNAS1 Mutationsanalyse GEP-NET's

GEP-NET's stellen durch ihre Sekretion von Hormonen eine besondere Herausforderung an den behandelnden Kliniker, denn schon ein sehr kleiner Tumor kann bedeutende Mengen von

endokrin aktiven Substanzen erzeugen. Die Lokalisation bzw. das Auffinden des primären Ursprungs ist daher oft nicht leicht, in manchen Fällen selbst trotz aufwendiger Suche nicht möglich. Häufig stehen am Anfang der Diagnostik die Symptome, ausgelöst durch hormonelle Aktivität, ohne dass es Hinweise auf ein neoplastisches Geschehen gibt. Es wäre diagnostisch sehr hilfreich, bei diesen sehr unterschiedlichen Tumoren vielfältiger möglicher Lokalisationen eventuelle Gemeinsamkeiten aufzuzeigen, um die Diagnostik zu verbessern. Wenn beispielsweise die größte Gruppe, die der Karzinoide mit 55% (Garcia-Carbonero et al. 2010) ein gemeinsames Merkmal aufweisen würden, könnte man sich in der Suche auf dieses Merkmal konzentrieren oder gerade dieses ausschließen, um andere Entitäten in den Fokus rücken zu lassen. Würden alle Tumore, die ihren Ursprung im Kolon oder Pankreas haben, eine Gemeinsamkeit wie eine Mutation aufweisen, könnte man nach Analyse der zuvor gefundenen Metastasen Rückschlüsse auf den Primärtumor ziehen. Für Patienten mit einem CUP-Syndrom, bei denen nur Metastasen, aber kein Primärtumor festgestellt worden sind, wäre dies ein großer Schritt in der Diagnostik und Therapie. Bei keinem der beiden untersuchten Hotspots des GNAS1 Locus konnte allerdings bei den GEP-NET's keine Mutation nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine GNAS1 Mutation in der Entstehung der GEP-NET's keine oder nur eine sehr seltene Ursache darstellt. Die Mutationsanalyse scheint daher keine Relevanz in der Diagnostik der GEP-NET's darzustellen, sie hat derzeit Forschungscharakter.

5.4 GNAS1 Mutationsanalyse der kolorektalen Karzinome

Die kolorektalen Karzinome stellen, wie schon beschrieben, einen Großteil der vorkommenden malignen Neoplasien bei beiden Geschlechtern dar und sind durch ihre Eigenschaften mit einer hohen Mortalität belegt. Jede Maßnahme, die zu einer schnelleren Diagnosestellung und damit einhergehend zu einem früheren Einsetzen der Therapie beiträgt, ist somit von großer ethischer und wirtschaftlicher Bedeutung. Im Zusammenspiel der einzelnen Komponenten der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms wird das Adenom als Vorstufe eines Karzinoms gewertet. In anderen Studien wurden ebenfalls kolorektale Karzinome auf eine GNAS1 Mutation hin untersucht und in 2,3% der Tumoren nachgewiesen (Fecteau et al. 2014). Die vorliegende Studie unterstützt dieses Ergebnis mit 3,31% gefundenen GNAS1 Mutationen und lässt die Schlussfolgerung zu, dass die untersuchten Hot Spots tatsächlich eine Rolle bei der Entwicklung der Neoplasien spielen könnten. Das positiv

getestete kolorektale Karzinom in vorliegender Arbeit wies eine GNAS1 R201C Mutation auf, als einzige Neoplasie in unserer Analyse. Alle anderen Mutationen bei o.g. Entitäten waren R201H Mutationen. Wie bereits beschrieben, zeigen gastrointestinale Adenome mit 6,45% eine deutlich höhere Mutationsrate als das kolorektale Karzinom mit 3,31%. Die maligne Entartung zu einem kolorektalen Karzinom scheint also nur in geringem Maße mit den GNAS1 Mutationen im Codon 201 einherzugehen, sodass der Adenom-Karzinom-Sequenz eine andere Pathophysiologie zu Grunde zu liegen scheint. Eine nachgewiesene GNAS1 Mutation eines rektalen Adenoms würde dann eher gegen eine weitere Entartung zu einem Karzinom sprechen.

6 Schlussfolgerungen

GNAS1 Mutationen kommen bei den verschiedensten Tumorentitäten vor. Die in vorliegender Studie untersuchten Neoplasien des gastrointestinalen Traktes zeigten bei den Adenomen und kolorektalen Karzinomen Mutationen im Codon 201 Exon 8 des Gens, bei den getesteten hyperplastischen Magenpolypen sowie bei den GEP-NET's wurden keine entsprechenden Mutationen nachgewiesen. Die untersuchten villösen Adenome wiesen im Vergleich zu Studien aus Japan eine weitaus geringere Mutationsrate auf, was auf einen unterschiedlichen Genpool und eventuelle kulturelle Faktoren zurückzuführen sein könnte. Schlussfolgernd aus Ergebnissen vorliegender Arbeit kann es als gesichert gelten, dass die GNAS1 Mutation im Codon 201 keine Rolle in der Pathogenese der GEP NET's und der hyperplastischen Magenpolypen spielt. Bezogen auf die gastrointestinalen Adenome und das kolorektale Karzinom konnten Mutationen in den benannten Hotspots nachgewiesen werden, treten jedoch mit nur geringer Prävalenzrate auf. Zur Abschätzung der malignen Entartungswahrscheinlichkeit eines gastrointestinalen Adenoms im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz könnte die GNAS1 Mutationsanalyse einen klinischen Stellenwert erlangen.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

Aldred MA, Trembath RC. 2000. Activating and Inactivating Mutations in the Human Gnas1 Gene. *Hum Mutat*, 16(3):183-189.

Alman BA, Greel DA, Wolfe HJ. 1996. Activating Mutations of Gs Protein in Monoostotic Fibrous Lesions of Bone. *J Orthop Res*, 14(2):311-315.

Bahouth SW, Wang HY, Malbon CC. 1991. Immunological Approaches for Probing Receptor Structure and Function. *Trends Pharmacol Sci*, 12(9):338-43.

Bastepe M. 2007. The Gnas Locus: Quintessential Complex Gene Encoding Gsalpha, Xlalphas, and Other Imprinted Transcripts. *Curr Genomics*, 8(6):398-414.

Brandt DR, Ross EM. 1985. Gtpase Activity of the Stimulatory Gtp-Binding Regulatory Protein of Adenylate Cyclase, Gs. Accumulation and Turnover of Enzyme-Nucleotide Intermediates. *J Biol Chem*, 260(1):266-275.

Bristow MR, Port JD, Hershberger RE, Gilbert EM, Feldman AM. 1989. The Beta-Adrenergic Receptor-Adenylate Cyclase Complex as a Target for Therapeutic Intervention in Heart Failure. *Eur Heart J*, 10(B):45-54.

Carter JM, Inwards CY, Jin L, Evers B, Wenger DE, Oliveira AM, Fritchie KH. 2014. Activating Gnas Mutations in Parosteal Osteosarcoma. *Am J Surg Pathol*, 38(3):402-409.

Calebiro D, Maiellaro I. 2014. Camp Signaling Microdomains and Their Observation by Optical Methods. *Front Cell Neurosci*, 8, 350.

Courtney D, McDermott F, Heeney A, Winter DC. 2014. Clinical Review: Surgical Management of Locally Advanced and Recurrent Colorectal Cancer. *Langenbecks Arch Surg*, 399(1):33-44.

Diaz A, Danon M, Crawford J. 2007. McCune-Albright Syndrome and Disorders Due to Activating Mutations of Gnas1. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 20(8):853-880.

DiCaprio MR, Enneking WF. 2005. Fibrous Dysplasia. Pathophysiology, Evaluation, and Treatment. *J Bone Joint Surg Am*, 87(8):1848-1864.

- Fecteau RE, Lutterbaugh J, Markowitz SD, Willis J, Guda K. 2014. Gnas Mutations Identify a Set of Right Sided, Ras Mutant, Villous Colon Cancers. *PLoS One*, 9(1):e87966.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh J W, Comber H, Forman D, Bray F. 2013. Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe. Estimates for 40 Countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6):1374-1403.
- Frimberger E, Kühner W, Sein HJ, Ottenjann R. 1978. Colorectal Adenom: Relationships among Histological Structure, Dimensions of the Polyps, and Age Distribution. *Minerva Med*, 69(58):3979-3985.
- Gaffey MJ, Mills SE, Lack EE. 1990. Neuroendocrine Carcinoma of the Colon and Rectum. A Clinicopathologic Ultrastructural, and Immunohistochemical Study of 24 Cases. *Am J Surg Pathol* 4(11):1010-1023.
- Garcia-Carbonero R, Capdevila J, Crespo-Herrero G, Díaz-Pérez JA, Martínez Del Prado MP, Alonso Orduña V, Sevilla-García I, Villabona-Artero C, Beguiristain-Gómez A, Llanis-Muñoz M, Marazuela M, Alvarez-Escola C, Castellano D, Vilar E, Jiménez-Fonseca P, Teulé A, Sastre-Valera J, Benavent-Viñuelas M, Monleon A, Salazar R. 2010. Incidence, Patterns of Care and Prognostic Factors for Outcome of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors (Gep-Nets): Results from the National Cancer Registry of Spain (Rgetne), 21(9):1794-1803.
- Gunavathy M, Rohana AG, Norlela S, Nor Azmi K. 2014. A Ten-Year retrospective Analysis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors (Gep-Nets) in Malaysia. *Med J Malaysia*, 69(3):133-137.
- Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. 1998. Bidirectional Imprinting of a Single Gene: Gnas1 Encodes Maternally, Paternally, and Biallelically Derived Proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(26):15475-15480.
- Helms JB. 1995. Role of Heterotrimeric Gtp Binding Proteins in Vesicular Protein Transport: Indications for Both Classical and Alternative G Protein Cycles. *FEBS Lett*, 369(1):84-88.
- Huang CZ, Lai RX, Mai L, Zhou HL, Chen HJ, Guo HX. 2014. Reöletive Risk Factors Associated with the Development of Fundic Gland Polyps. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 26(11):1217-1221.

Katalinic D, Santek F, Juretic A, Skegro D, Plestina S. 2014. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumour Arising in Meckel's Diverticulum Coexisting with Colon Adenocarcinoma. *World J Surg Oncol*, 12:358.

Kleihues P, Sobin LH. 2000. World Health Organization Classification of Tumors. *Cancer* 88(12):2887.

Klöpffel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. 2010. The Enets and Ajcc/Uicc Tnm Classification of the Neuroendocrine Tumors of the Gastrointestinal Tract and the Pancreas. A Statement. *Virchows Arch*, 456(6):595-597.

Kobilka BK. 2011. Structural Insights into Adrenergic Receptor Function and Pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 32(4):213-218.

Kulke MH, Shah MH, Benson AB, Bergsland E, Berlin JD, Blaszkowsky LS, Emerson L, Engstrom PF, Fanta P, Giordani T, Goldner WS, Halfdanarson TR, Heslin MJ, Kandeel F, Kunz PL, Kuvshinoff BW, Lieu C, Moley JF, Munene G, Pillarisetty VG, Saltz L, Sosa JA, Strosberg JRm Vauthey JN, Wolfgang C, Yao JC, Burns J, Freedman-Cass D. 2015. Neuroendocrine Tumors Version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 13(1):78-108.

Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. 1989. Gtpase Inhibiting Mutations Activate the Alpha Chain of Gs and Stimulate Adenylyl Cyclase in Human Pituitary Tumours. *Nature*, 340(6236):692-696.

Langley K. 1994. The Neuroendocrine Concept Today. *Ann N Y Acad Sci*, 733:1-17.

Lania A, Mantovani G, Spada A. 2001. G Protein Mutations in Endocrine Diseases. *Eur J Endocrinol*, 145(5):543-559.

Lemos MC, Thakker RV. 2015. Gnas Mutations in Pseudohypoparathyroidism Type 1a and Related Disorders. *Hum Mutat*, 36(1):11-19.

Levine MA, Modi WS, O'brien SJ. 1991. Mapping of the Gene Encoding the Alpha Subunit of the Stimulatory G Protein of Adenylyl Cyclase (Gnas1) to 20q13.2---Q13.3 in Human by in Situ Hybridization. *Genomics*, 11(2):478-479.

Luebke AM, Gocke C, Priemel M, Grob TJ, Zustin J. 2012. [Intramuscular Myxoma of the Lower Leg.], *Pathologe*.

- Lugli A, Jass JR. 2006. Types of Colorectal Adenoma. 2006. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 90:18-24.
- Morris AJ, Malbon CC, 1999. Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling, 79(4):1373-1430.
- Narumi S, Matsuo K, Ihii T, Tanahashi Y, Hasegawa T, 2013. Quantitative and Sensitive Detection of Gnas Mutations Causing Mccune-Albright Syndrom with Next Generation Sequencing. *PLoS-One*, 8(3):e60525.
- Okines A, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, ESMO Guidelines Working Group, 2010. Gastric Cancer: Esmo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann-Oncol*, 21(5):50-54.
- Neubig RR, Siderovski DP. 2002. Regulators of G-Protein Signalling as New Central Nervous System Drug Targets. *Nat Rev Drug Disov*, 1(3):187-197.
- Rezwan FI, Poole RL, Prescott T, Walker JM, Temple IK, Mackay DJ. 2014. Very Small Deletions within the Nesp55 Gene in Pseudohypoparathyroidism Type 1 b. *Eur J Hum Genet*.
- Sekine S, Ogawa R, Oshiro T, Kanemitsu Y, Taniguchi H, Kushima R, Kanai Y. 2014. Frequent Lack of Gnas Mutations in Colorectal Adenocarcinoma Associated with Gnas-Mutated Villous Adenoma. *Genes Chromosomes Cancer* 53(4):366-372.
- Sonnenberg A, Genta RM. 2015. Prevalence of Benign Gastric Polyps in a Large Pathology Database. *Dig Liver Dis* 47(2):164-169.
- Terada T. 2013. Histopathologic Study of the Rectum in 1,464 Consecutive Rectal Specimens in a Single Japanese Hospital: Ii. Malignant Lesions. *Int J Clin Exp Pathol*. 6(3):385-394.
- Turan S, Bastepe M. 2013. The gnas Complex Locus and Human Diseases Associated with Loss-of-Function Mutations or Epimutations within This Imprinting Genem. *Horm Res Paediatr*, 80(4):229-241.

Wagoner HA, Steinmetz R, Bethin KE, Eugster EA, Pescowitz OH, Hannon TS. 2007. Gnas Mutation Detection Is Related to Disease Severity in Girls with McCune-Albright Syndrome and Precocious Puberty. *Pediatr Endocrinol Rev* 4(4):395-400.

Walther I, Walther BM, Chen Y, Petersen I. 2014. Analysis of Gnas1 Mutations in Myxoid Soft Tissue and Bone Tumors. *Pathol Res Pract*, 210(1):1-4.

Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedmann E, Spiegel AM. 1991. Activating Mutations of the Stimulatory G Protein in the McCune-Albright Syndrome. *N Engl J Med*, 325(24):1688-1695.

Weinstein LS. 2014. Role of Gs α in Central Regulation of Energy and Glucose Metabolism. *Horm Metab Res*, 46(12) 841-844.

Yamada M, Sekine S, Ogawa R, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kanai Y. 2012. Frequent Activating Gnas Mutations in Villous Adenoma of the Colorectum. *J Pathol*.

Zacharin M, Bajpai A, Chow CW, Catto-Smith A, Stratakis C, Wong MW, Scott R. 2011. Gastrointestinal Polyps in McCune Albright Syndrome. *J Med Genet*, 48(7)458-461.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum und –ort	21.08.1982 in Erfurt/Thüringen
Familienstand	verheiratet, eine Tochter
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

09/1993 – 04/2002	Gymnasium Edith-Stein-Schule in Erfurt
07/1999 – 06/2000	Schüleraustausch nach Beaumont, Texas, Westbrook Highschool
09/1989 – 07/1993	Grundschule 8 in Erfurt

Bisherige medizinische Ausbildung

seit 01/2014	Arzt in Weiterbildung, Augenklinik FSU Jena
10/2007 – 12/2013	Studium der Humanmedizin an der FSU Jena
09/2004 – 08/2007	Ausbildung zum staatlich examinierten Gesundheits- und Krankenpfleger in der Krankenpflegeschule am KKH, Erfurt

Famulaturen

07/2011 – 08/2011	Klinik für Augenheilkunde der FSU Jena
02/2011 – 03/2011	Klinik für Augenheilkunde im HELIOS Klinikum, Erfurt
07/2010 – 08/2010	Anästhesiepraxis DM F. Hampel, Dr. med. E. Schnabel, Weimar
02/2010 – 03/2010	Institut für Pathologie der FSU Jena

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Iver Petersen

Dr. Yuan Chen

Kristin Zöllner

Karola König

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den

Bernhard Maria Walther

8.3 Danksagung

Hiermit möchte ich in erster Linie meiner lieben Frau Ina Walther und meinen Eltern, Birgit Walther und PD Dr. Hans-Rainer Walther für die mir immer zur Verfügung stehende Unterstützung in meinem Leben und ganz besonders bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Die moralische Unterstützung und der spirituelle Antrieb verliehen mir die Möglichkeit, nach langer Laborarbeit das Ganze auch schriftlich umzusetzen. Ebenso danke ich Prof. Petersen für das Ermöglichen dieser Arbeit, Dr. Chen für zahlreiche Stunden der methodischen Hilfe sowie Frau Zöller und Frau König für die praktischen Anleitungen und kleinen aber wichtigen Tipps, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.