

Aus dem Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Röcken  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Next-Generation-Sequencing –  
ist die Detektion tumorspezifischer SNPs  
der Schlüssel zur Pathobiologie des Magenkarzinoms?

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Niklas Holze  
aus Bad Segeberg

Kiel 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Röcken

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel

Tag der mündlichen Prüfung:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2018

*Le simple est toujours faux. Ce qui ne l'est pas est inutilisable.*  
- Paul Valéry (1871-1945)

Meinen Großeltern gewidmet.

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Glossarium.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1 Next Generation Sequencing.....	3
1.2 Das Magenkarzinom.....	5
1.3 Therapie des Magenkarzinoms.....	8
1.4 Die Molekulargenetik des Magenkarzinoms.....	9
1.5 Sonderfall mikrosatelliteninstabile Tumoren.....	12
1.6 Aufgabenstellung und Kontext der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	15
2.0. Übersicht über das grundsätzliche Vorgehen.....	15
2.1. Material.....	17
2.1.1. Patientenkollektiv.....	17
2.1.2. NGS-Experimente am Kieler Institut für klinische Molekularbiologie.....	20
2.1.3. Geräte.....	21
2.1.4. Software.....	21
2.1.5. Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.6. Reagenzien, Kits, Lösungen und Chemikalien.....	22
2.1.7. Primer für Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung.....	24
2.2. Methoden.....	28
2.2.1. Genetische Methoden.....	28
2.2.1.1. DNA-Isolation.....	28
2.2.1.2. RNA-Isolation (Gesamt-RNA).....	28
2.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion.....	29
2.2.1.4. cDNA-Synthese.....	30
2.2.1.5. qRT-PCR für mRNA.....	30
2.2.1.6. Reverse Transkription der miRNA (qRT-PCR).....	30
2.2.1.7. Mutationsspezifische PCR.....	31
2.2.1.8. Pyro-Sequenzierung.....	32
2.2.1.9. Sanger-Sequenzierung.....	33
2.2.2. Untersuchungsmethoden auf Protein-Ebene.....	34
2.2.2.1. Histologie.....	34
2.2.2.2. Herstellung von Tissue Micro Arrays.....	34
2.2.2.3. Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten.....	34
2.2.2.4. Western Blots.....	37
2.2.2.4.1. Herstellung der Proteinlysate.....	37
2.2.2.4.2. Messung der Protein-Konzentration.....	37
2.2.2.4.3. Elektrophorese.....	37

2.2.2.4.4. Coomassie-Gelfärbung und Blotting.....	38
2.2.3. Statistische Auswertung.....	39
3. Ergebnisse.....	40
3.1. Überprüfung der pathobiologischen Relevanz von WNK1 beim Magenkarzinom.....	40
3.1.0. Literaturrecherche.....	40
3.1.1. Immunhistochemische Färbung von WNK1 am Gesamtkollektiv.....	41
3.2. Erstes Zwischenfazit.....	45
3.3. Überprüfung von SNPs aus einem WES-Ansatz.....	46
3.4. Überprüfung von SNPs aus einem um ein WGS erweiterten WES-Ansatz.....	50
3.4.1. Immunhistochemische Färbung von Drosha an einem Kollektiv aus 40 Fällen.....	56
3.4.2. Western Blot von Drosha.....	61
3.4.3. <i>DROSHA</i> -mRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR.....	62
3.4.4. miRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR.....	63
3.4.5. Immunhistochemische Färbung von <i>GNAS1</i> am Gesamtkollektiv.....	64
3.5. Zweites Zwischenfazit.....	67
4. Diskussion.....	68
4.1. Generelle tumorbiologische Gesichtspunkte.....	69
4.2. Validität der hier überprüften NGS-Methodik.....	71
4.3. Postranskriptionelle und -translationelle Aspekte.....	73
4.4. Bisherige Erfolge bei der Suche nach einzelnen Biomarkern.....	75
4.5. Schlussfolgerung.....	76
4.6. Ausblick.....	76
5. Zusammenfassung.....	78
6. Literaturverzeichnis.....	80
7. Danksagung.....	87

## 1. GLOSSARIUM

---

3' / 5'	Richtungsangaben auf einem Nukleinsäurestrang. Die Ziffern beziehen sich auf ein Kohlenstoffatom des (Desoxy-)Riboserests einer Base / eines Nukleotids
AP	Alkalische Phosphatase
ARMS	Amplification-Refractory-Mutation-System, eine mutationsspezifische Art der Polymerase-Kettenreaktion
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre (engl. Complementary) DNA: DNA, die durch Reverse Transkriptase von der mRNA kopiert wurde
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer: ein frei zugängliches Verzeichnis bekannter somatischer Mutationen in Tumoren
Cp-Wert	Crossing Point: Maß der Zyklenzahl bis zur Signaldetektion in der RT-PCR
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleic Acid: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Phosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
gDNA	Genomische DNA
HGMD	Human Gene Mutation Database: ein frei zugängliches Verzeichnis bekannter Genmutationen
HQ-Read	High Quality-Read: Bezeichnung für eine Sequenzauslesung im NGS, welche zuvor definierten Qualitätsansprüchen genügt
IHC	Immunhistochemie
L-Kategorie	Lymphgefäßinvasion
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight: Ein Verfahren der Massenspektrometrie
miR, miRNA	Micro-RNA
mRNA	Messenger-RNA
MSI	Mikrosatelliteninstabil
MSS	Mikrosatellitenstabil
NGS	Next Generation Sequencing
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men: eine umfangreiche Datenbank menschlicher Gene und Genvariationen

PCR	Polymerase Chain Reaction: Polymerasekettenreaktion
pTNM	Akronym für die gängigste Tumorklassifikation, u.a. beim Magenkarzinom p = Pathologische Erhebung, im Gegensatz zur klinischen T = Ausbreitung des Primärtumors N = Fehlen oder Vorhandensein und Ausbreitung von regionären Lymphknotenmetastasen M = Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen
(q)RT-PCR	Quantitative Real Time PCR: Echtzeit-PCR-Verfahren zur Quantifizierung eines spezifischen Nukleinsäureabschnitts
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse: Teilverfahren einer Sequenzieretechnik
RNA	Ribonucleic Acid: Ribonukleinsäure
SNP	Single Nucleotide Polymorphism: Einzelnukleotidpolymorphismus
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i> (Taq)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TMA	Tissue Micro Array
UICC	Union internationale contre le cancer
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
V-Kategorie	Veneninvasion
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization

Hinweis zur Nomenklatur: Gennamen werden in der folgenden Arbeit in kursiver Schrift, Proteinnamen in stehender Schrift wiedergegeben.

## 1. EINLEITUNG

---

### 1.1 Next Generation Sequencing

Der Einzug neuer Sequenziermethoden in die Erforschung unterschiedlicher Malignome hat zu einer Vielzahl neuer Erkenntnisse in der Onkologie geführt. Das Tumorzellgenom mit dem somatischen Genom zu vergleichen und somit Rückschlüsse auf die genetische Tumorphogenese zu ziehen, ist eine hoch aktuelle Methodik, welche einen hohen Stellenwert für das immer exakter werdende ätiopathologische Verständnis von Neoplasien hat.<sup>1,2</sup>

Die Sequenziermethoden der „ersten Generation“, wie Sanger- und Pyro-Sequenzierung stellen zwar weiterhin etablierte und kostengünstige Methoden für die Sequenzierung kurzer DNA-Sequenzen dar, wurden bei der Sequenzierung größerer DNA-Mengen jedoch nahezu vollständig durch Methoden der „zweiten Generation“ ersetzt.<sup>3</sup> Diese wurden aufgrund ihrer Bedeutung für die Wissenschaft von der Fachzeitschrift *Nature Methods* sogar zur Methode des Jahres 2007 gekürt.<sup>4</sup> Die neuen Methoden unterscheiden sich in ihrer technischen Beschaffenheit zum Teil beträchtlich. Die meisten Sequenzierplattformen der zweiten Generation nutzen entweder den Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen im Rahmen der Bindung eines Nukleotids im Prozess der DNA-Polymerisation oder sie detektieren hierbei durch die Abspaltung einer Pyrophosphatgruppe vom Nukleotid freiwerdende Wasserstoffionen. Ihnen ist jedoch methodisch gemeinsam, dass eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung der zu analysierenden DNA erfolgen muss, um ausreichende Signalstärken bei der Detektion zu erhalten. Bei den Sequenziermethoden der „dritten Generation“, die die Sequenzierung einzelner DNA-Moleküle erlauben, entfällt dieser Schritt. Aktuell hat diese Methodik jedoch noch bei weitem nicht die Relevanz für die onkologische Forschung erlangt, die die Sequenziermethoden der zweiten Generation innehaben. Dies ist zum einen vor allem der bislang noch vorhandenen hohen Fehlerrate und -anfälligkeit, zum anderen aber auch den hohen Kosten für die entsprechenden Gerätschaften geschuldet.

Neben den Begriffen *High Throughput Sequencing* und *Deep Sequencing* hat sich *Next Generation Sequencing* für die Technik der automatisierten Simultan-Sequenzierung hoher Mengen an Nukleinsäure etabliert. Dieses Verfahren hat inzwischen bei der Erforschung des Genoms von Tumorzellen einen sehr hohen Stellenwert erlangt. Es sind inzwischen unterschiedliche Verfahren etabliert. Den meisten dieser noch jungen Verfahren ist gemein, dass die zu sequenzierende DNA aufbereitet, zumeist fragmentiert und anschließend an eine Feststoffmatrix gebunden wird. Anschließend erfolgt basenweise eine matrixgebundene Amplifikation mit einer speziellen Polymerase-Kettenreaktion. Bei dieser so genannten „Bridge-PCR“ entsteht durch gleichzeitige Matrixanheftung des 3' und 5'-Endes der amplifizierten Nukleinsäure eine „Brücke“, welche dann nach erfolgter Synthese des Komplementärstranges so denaturiert wird, dass jeweils ein DNA-Strang am 3'- und einer am 5'-Ende gebunden bleibt. Somit entstehen räumliche Cluster identischer DNA-



Abschnitte, die dann jeweils als Vorwärts- und Rückwärts-Strang in enger räumlicher Ausdehnung auf der Matrix verankert sind. Die so amplifizierte DNA-Fragmente können auf unterschiedliche Weise analysiert werden. Verfahren der Firma Illumina (Illumina; San Diego, CA, USA), die zurzeit einen hohen Stellenwert unter den Sequenzierverfahren genießen, nutzen beispielsweise an unterschiedliche Nukleotide gebundene Fluoreszenzfarbstoffe. Diese sind zusätzlich mit einem Inhibitor-molekül versehen, sodass immer nur ein Nukleotid pro Zyklus bindet. Nach jeder Zugabe von markierten Nukleotiden (Bindungsvorgang) erfolgt über deren Fluoreszenz die Detektion des jeweils zuletzt gebundenen Nukleotids mit einer Kamera und anschließend die Abspaltung des am 3'-Ende der DNA befindlichen Inhibitor-moleküls zur Ermöglichung der Bindung des jeweils nächsten Nukleotids. An jedem Bildpunkt entsteht eine spezifische Abfolge von Fluoreszenzsignalen, mit der die Basensequenz des gebundenen DNA-Fragments rekonstruiert wird. Da zahlreiche Fragmente zeitgleich auf derselben Matrix sequenziert werden, wird so eine Datenmenge aus teilweise überlappenden Basensequenzen generiert, die nach automatisierten Algorithmen anhand ihrer Überlappung wieder aneinandergesetzt werden. Da im Idealfall für jeden Abschnitt des zu sequenzierenden Erbgutes mehrere Kopien vorliegen, bietet das Verfahren durch hohe Redundanz des Sequenzierungsergebnisses für jeden Abschnitt eine hohe Sicherheit bei der Rekonstruktion der Gesamtsequenz. Die Anzahl identischer abgedeckter Basenabfolgen wird als „Coverage“ bezeichnet, eine Abfolge von Nukleotid-Signalen über einem Bildpunkt als „Read“. Neben dem Analysieren eines gesamten Genoms in vergleichsweise kurzer Zeit bei hoher Kosteneffizienz, dem sogenannten *Whole Genome Sequencing (WGS)*, ist mit gezielten Verfahren auch die Analyse des Exoms (*Whole Exome Sequencing, WES*) oder Transkriptoms auf RNA-Ebene einer Probe möglich.

Eine Vielzahl detektierter Mutationen liegt außerhalb codierender Genabschnitte bzw. funktionell relevanter Bereiche. Sie haben somit vermutlich keinen Einfluss auf die Primärstruktur des codierten Proteins. Es ist deshalb sinnvoll, mithilfe von Datenbanken und Algorithmen eine Einschätzung zu treffen, welche der Mutationen mit besonders hoher Wahrscheinlichkeit für die jeweilig untersuchte Tumorentität tumorbiologisch relevant ist. Weil NGS enorme Mengen an Daten generiert, werden bioinformatisch gestützte Verarbeitungstechniken bei der Datenauswertung unerlässlich.

Beim kolorektalen Karzinom ist durch die Sequenzierung zahlreicher Tumorgenome eine Reihe von überdurchschnittlich häufig betroffenen Genen festgestellt worden. Darunter befindet sich auch die heute bereits therapieentscheidende *KRAS*-Mutation.<sup>5</sup> Die neuartigen Sequenziermethoden können nicht nur bei der Aufdeckung von tumorassoziierten Treiber-Mutationen eingesetzt werden, sondern auch neue therapeutische Angriffspunkte für die zielgerichtete Medizin liefern. Inzwischen gibt es erste Ansätze, Tumorgenome zur Therapieplanung bei einzelnen Patienten zu sequenzieren, um eine möglichst effektive und schonende medikamentöse Krebsmedizin zu etablieren.<sup>6</sup>

## 1.2 Das Magenkarzinom

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist das Magenkarzinom nach dem Lungen- und Leberkrebs die weltweit dritthäufigste zum Tode führende Krebserkrankung.<sup>7</sup> Männer sind insgesamt häufiger vom Magenkarzinom betroffen als Frauen.<sup>8</sup> Generell tritt das Magenkarzinom häufiger im fortgeschrittenen Lebensalter auf. Von den weltweit für das Jahr 2008 geschätzten 989 600 Neuerkrankungen entfallen etwa 70% auf Entwicklungsländer.<sup>9</sup> Es gibt in Ostasien mit 42,2 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner eine über vierfach höhere Inzidenz von Magenkrebs als in Westeuropa mit einer Inzidenz von 9,0 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner.<sup>9</sup> In Japan gibt es eine besonders große Anzahl von Magenkrebsfällen. Es wurde deshalb in Japan ein Screening-Programm eingeführt, das die Mortalität deutlich senken konnte. Auch in Südkorea, wo die Inzidenz der Erkrankung eine der höchsten weltweit ist, werden endoskopische Vorsorgeuntersuchungen ab dem vollendeten 40. Lebensjahr angeboten.<sup>7</sup> Magenkarzinome werden durch das Screening-Programm in einem wesentlich früheren Stadium erkannt und können damit kurativ behandelt werden.<sup>10</sup>

Der histologische Phänotyp des Magenkarzinoms gilt trotz intensivierter Suche nach neuen Klassifikationen und dem Versuch einer Einteilung nach pathophysiologischen Gesichtspunkten als sehr heterogen. Am längsten etabliert ist die auch heute noch gebräuchliche Einteilung nach Laurén, in den intestinalen Typ, den diffusen Typ, den Mischtyp und den nichtklassifizierbaren Typ. Weitere Klassifikationssysteme, wie das von der WHO 2010 veröffentlichte (→ Tabelle 1), unterscheiden deutlich mehr Typen, deren therapeutische und prognostische Bedeutung Gegenstand aktueller Untersuchungen ist. Weitere Klassifikationen haben sich unterdessen nicht durchsetzen können, da ihre Einteilung kaum oder vergleichsweise wenig therapeutische oder prognostische Konsequenz nach sich zieht. Die Notwendigkeit, auch molekulargenetische Aspekte in die Klassifikation mit einzubeziehen, wurde schon von mehreren Autoren thematisiert, jedoch mangels ausreichenden Wissens um molekularbiologische und therapeutisch/prognostisch relevante Merkmale nicht konsequent umgesetzt.<sup>11</sup>

---

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation der epithelialen Tumoren (Lauwers et al. 2010)**

---

Adenokarzinom

- 1) Papilläres Adenokarzinom
- 2) Tubuläres Adenokarzinom
- 3) Muzinöses Adenokarzinom
- 4) Gering kohäsives Karzinom (einschließlich Siegelringzellkarzinom und anderer Varianten)
- 5) Gemischtes Adenokarzinom

Adenosquamöses Karzinom

Karzinom mit lymphoiden Stroma (Medulläres Karzinom)

Hepatoides Adenokarzinom

Plattenepithelkarzinom

Undifferenziertes Karzinom

---

Die Stadieneinteilung des Magenkarzinoms in prognostische Gruppen erfolgt weltweit am häufigsten nach der TNM-Klassifikation. In der achten Version von 2016<sup>12</sup> erfolgt die Einteilung gemäß folgenden tabellarisch aufgeführten Kriterien:

**Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Magenkarzinoms im Überblick**

	<b>6. Auflage (2002)</b>	<b>7. Auflage (2010)<sup>13</sup></b>	<b>8. Auflage (2016)<sup>12</sup></b>
Primärtumor kann nicht beurteilt werden	TX	TX	TX
Kein Anhalt für Primärtumor	T0	T0	T0
Intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria (CIS)	Tis	Tis	Tis
Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa	T1		
Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis mucosae		T1a	T1a
Tumor infiltriert Submukosa		T1b	T1b
Tumor infiltriert Muscularis propria	T2a	T2	T2
Tumor infiltriert Subserosa	T2b	T3	T3
Tumor perforiert Serosa	T3	T4a	T4a
Tumor infiltriert benachbarte Strukturen	T4	T4b	T4b
Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	NX	NX	NX
Keine regionären Lymphknotenmetastasen	N0	N0	N0
Metastasen in 1 bis 6 regionären Lymphknoten	N1		
Metastasen in 1 bis 2 regionären Lymphknoten		N1	N1
Metastasen in 7 bis 15 regionären Lymphknoten	N2		
Metastasen in 3 bis 6 regionären Lymphknoten		N2	N2
Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten	N3		
Metastasen in 7 bis 15 regionären Lymphknoten		N3a	N3a
Metastasen in 16 oder mehr regionären Lymphknoten		N3b	N3b
Keine Fernmetastasen	M0	M0	M0
Fernmetastasen	M1	M1	M1

**Tabelle 3: Stadieneinteilung anhand der pTNM-Klassifikation in der 8. Auflage**

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T1	N1	M0
Stadium IIA	T2	N0	M0
	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
Stadium IIB	T3	N0	M0
	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
Stadium IIIA	T4a	N0	M0
	T2	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T1, T2	N3b	M0
	T3, T4a	N3a	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IIIC	T3, T4a	N3b	M0
	T4b	N3a, N3b	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

### 1.3 Therapie des Magenkarzinoms

Stadienabhängig erfolgt die Behandlung des Magenkarzinoms im kurativen Ansatz entweder rein chirurgisch (z.B. auch endoskopisch) oder chirurgisch in Kombination mit perioperativer Chemotherapie. In der palliativen Situation wird ggf. auf die Resektion verzichtet und rein chemotherapeutisch behandelt.<sup>14</sup> Den in Deutschland gängigen Therapiestandard bildet zurzeit die S3-Leitlinie zur Therapie des Magenkarzinoms von 2012 ab.<sup>15</sup> Mit konventioneller Chemotherapie kann das mediane Überleben gesteigert werden<sup>16</sup>, es beträgt aber mit dem zurzeit gängigem Regime aus entweder Capecitabine oder 5-Fluouracil und zusätzlich einem Platinderivat im Mittel nur ca. 11 Monate.<sup>17</sup> Bei Magenkarzinomen, die die Rezeptortyrosinkinase Her2/neu (Synonyme: ErbB2, HER2) überexprimieren, bietet sich in der palliativen Situation außerdem die Möglichkeit einer ziel-

gerichteten Therapie mit Trastuzumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen Her2/neu.<sup>17</sup> Im Vergleich zur ausschließlich mit konventioneller Chemotherapie therapierten Kontrollgruppe konnte das mediane Überleben von 11,1 auf 13,8 Monate angehoben werden. Aus der Geringfügigkeit der Überlebenszeitverbesserung wird erkenntlich, dass trotz aller Erfolge in der zielgerichteten Therapie bislang nicht von einem Durchbruch in der Breite die Rede sein kann: Nur 7-34%<sup>18–20</sup> der Magenkarzinome zeigen eine Überexpression von Her2/neu. Seit 2014 besteht eine Zulassung des monoklonalen VEGFR2-Antikörpers *Ramucirumab*, nachdem dieser in einer Phase III-Studie das mediane Überleben der Studiengruppe aus 665 mit *Ramucirumab* plus *Paclitaxel* behandelten Patienten gegenüber 335 mit Placebo plus *Paclitaxel* behandelten Patienten von 7,4 auf 9,6 Monate verbessern konnte.<sup>21</sup>

Es gibt auch einzelne, in kleinen Studien beim Fortgeschrittenen Magenkarzinom belegte, mit dem Small-Molecule-Inhibitor des VEGFR2 *Apatinib*.<sup>22</sup> Eine kürzlich veröffentlichte chinesische Phase III-Studie zeigte in einem Studienkollektiv von 267 Patienten eine Verbesserung des medianen Überlebens für die *Apatinib*-behandelte Gruppe.<sup>23</sup> Dies hat bereits zu einer Zulassung für den chinesischen Markt geführt.

Bei anderen Tumorentitäten sind Behandlungserfolge mit weiteren humanisierten Antikörpern und so genannten Small-Molecule-Inhibitoren, die gegen spezifische Ziele wie Wachstumsfaktoren-Rezeptoren, Wachstumsfaktoren oder andere Ziele gerichtet sind, bekannt. Eine besonders in den Fokus gerückte Molekülklasse stellen insbesondere Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Her2/neu dar.

#### 1.4 Die Molekulargenetik des Magenkarzinoms

Eine 2016 veröffentlichte „Proof-of-Principle“-Studie untersuchte 42 Magenkrebs-Fälle vom intestinalen Typ, von denen selektierte Gene bzw. Genabschnitte per NGS sequenziert wurden. Anhand klinischer Daten wurden die Fälle in gutes und schlechtes Outcome dichotomiert. In den Fällen mit gutem Outcome zeigte sich eine vergleichsweise höhere Gesamt-Anzahl an Mutationen. Diese Fälle trugen gehäuft Mutationen in *KRAS* und *TP53*, sowie in Rezeptortyrosinkinasen (*EGFR*, *ERBB2*, *FGFR3*, *KDR*, *KIT* und *MET*) und Genen, die für den mTOR-Signalweg relevant sind (*FBXW7*, *PIK3CA* und *PTEN*). Fälle mit schlechtem Outcome waren ebenfalls häufig von einer *TP53*-Mutation betroffen, seltener waren *PIK3CA*, *SMAD4* und *STK11* von einer Mutation betroffen. Die Studie legt keine signifikante Assoziation zwischen Outcome und dem Mutationsstatus einzelner Gene (*KRAS*, *PIK3CA*, *TP53*, *MET*, *SMAD4*, *STK11*) sowie mit dem Mikrosatellitenstatus nahe.

Die Autoren schlagen vor, ein molekulargenetisches Profil eher anhand der globalen Mutationsstruktur als anhand einzelner Schlüsselmutationen zu erstellen, wobei die Autoren detaillierte Angaben zu hierzu nutzbaren Merkmalen offen lassen.<sup>1</sup>

Kuboki et al. veröffentlichten 2015 eine NGS-gestützte Analyse einzelner Regionen innerhalb von 409 bekanntermaßen Krebs-relevanten Genen in 121 Magenkrebsfällen.<sup>24</sup> Die Analyse ergab ein gehäuftes Vorliegen von Mutationen in den Genen *TP53* (in 36,4% der untersuchten Fälle), *PIK3CA* (7,4%), *ROS1* (5,0%), *ERBB2* (4,1%), *EGFR* (1,7%), *MET* (1,7%), *FGFR2* (1,7%), *BRAF* (1,7%), und *ALK* (1,7%). Die im Weiteren durchgeführte immunhistochemische Expressionsanalyse ergab eine Überexpression der Proteine EGFR (23,1%), Her2/neu (16,5%), FGFR2 (14,0%) und MET (9,9%).

Eine Analyse von Bass et al. aus dem Jahr 2014<sup>2</sup> untersucht 295 primäre Magenkarzinome, die im Rahmen des *Cancer Genome Atlas*-Projektes sequenziert wurden. 215 von 295 Tumoren mit einer vergleichsweise geringen Mutationsdichte zeigten relativ häufig Mutationen in den Genen *TP53*, *ARID1A*, *KRAS*, *PIK3CA* und *RNF43*, außerdem in Genen des  $\beta$ -Catenin-Signalweges (*APC* und *CTNNB1*), des TGF- $\beta$ -Signalweges (*SMAD4* und *SMAD2*) sowie *RASA1*, einem negativen Regulationsfaktor von *RAS*. Weiterhin war *ERBB2* als therapeutisch nutzbares Ziel ebenfalls signifikant häufig betroffen. Bei *ERBB2* lagen 10 von 15 Mutationen in bekannten Hotspot-Regionen. In vier Fällen lag die Mutation S310F vor, die den Angriffspunkt für Small-Molecule-Inhibitoren bildet.<sup>2</sup>

Bass et al. schlagen die Einführung einer molekulargenetischen Klassifizierung von Magenkrebsfällen als Ergänzung zu den etablierten histopathologisch basierten WHO- und Laurén- Klassifikationen vor. Hierzu wurden Magenkarzinome auf der Grundlage einer Vielzahl untersuchter genetischer Merkmale neu eingeteilt. Anhand der Gruppierung in möglichst trennbare Untergruppen wird eine Unterscheidung in vier Gruppen vorgenommen:

1. EBV-positive Tumoren
2. Mikrosatelliten-instabile Tumoren
3. Genomisch stabile Tumoren
4. Tumoren mit chromosomaler Instabilität

Auf Proteinebene konnte mit einem Proteinlysat-Mikroarray auf signifikantem Niveau eine Assoziation zwischen Expression und Zugehörigkeit in eine der vier postulierten molekularbiologischen Gruppen für insgesamt 45 Proteine hergestellt werden.

Bei EBV-positiven Tumoren zeigt sich in 15% der Fälle eine Amplifikation in der chromosomalen Region 9p, was mit einer erhöhten Expression von *JAK2*, *PD-L1* und *PD-L2* einhergeht. EBV- positive Tumoren zeigen weiterhin häufiger Mutationen in *PIK3CA*, *JAK2* und *ERBB2*. Die zugehörigen

Signalwege bieten prinzipiell die Möglichkeit pharmakologischer Einflussnahme durch Antikörper bzw. Small-Molecule-Inhibitoren.<sup>2</sup>

Die Bemühungen, das Magenkarzinom in molekularbiologische Subentitäten zu klassifizieren, führen immer wieder zu neuen, teilweise auch unerwarteten Erkenntnissen. Beispielsweise zeigt eine aktuelle Untersuchung, dass der immunsuppressiv wirkende Faktor PD-L1 nicht nur eine Rolle in Hinblick auf Gesamtüberlebenszeit spielt<sup>25</sup>, sondern sich auch zwischen ethnischen Gruppen in dieser Eigenschaft unterscheidet.<sup>25,26</sup>

Zang et al. publizierten im Jahr 2011 eine NGS-Analyse von 14 Magenkrebs-Zelllinien auf das Vorliegen von Mutationen in Protein- und Phosphoinositid-Kinasen.<sup>27</sup> Hierzu wurde ein „Panel-Verfahren“ angewandt, d.h. es wurden Gene bzw. Genabschnitte von insgesamt 532 Protein- und Phosphoinositid-Kinasen ausgewählt und zu einem „Panel“ zusammengefasst. Die auf dem Panel befindlichen Gene und Genabschnitte wurden dann mit selektiven Verfahren amplifiziert und mit Illumina-Technik sequenziert. Die Analyse zeigt in 11 von 14 Zelllinien ein Vorliegen pathogener SNPs innerhalb von Genabschnitten, die dem komplexen und verzweigten MAPK-Signalweg angehören, der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Migration und Zytokinausschüttung beeinflusst.<sup>28</sup> Unter den einzeln betrachteten Kinasen wiesen *TTN* und *WNK1* mit 12 bzw. 6 von 14 Fällen die größte SNP-Detektionsrate auf, gefolgt von *OBSCN* und *SPEG* in 5 bzw. 4 von 14 Fällen. Sowohl *TTN*, als auch *OBSCN* sind außergewöhnlich lange Gene, sodass eine Häufung von Mutationsfunden zumindest zum Teil der Länge geschuldet ist. Im Fall von *WNK1* ist eine pro-proliferative Wirkung über *ERK5* diskutiert<sup>29</sup>, allerdings wurde eine proliferationsfördernde Wirkung bislang nur bei neuronalen Stammzellen beobachtet<sup>29</sup>, während dieser Beobachtung ein gegenteilig proliferationshemmender, nicht aber Apoptose-fördernder Effekt auf Prädipozyten entgegensteht.<sup>30</sup> An Modellexperimenten am Zebrafisch konnte weiterhin gezeigt werden, dass *WNK1* wahrscheinlich in der Transduktion pro-angiogenetischer Signale über VEGFRs eine Rolle spielt.<sup>31</sup> Die von Zang et al. identifizierten SNPs in *WNK1* betreffen die Zelllinien MKN28, MKN7, TMK1, IM95, YCC3 und AGS, wobei in den drei zuerst angeführten derselbe SNP detektiert wurde. In drei Proben aus unterschiedlichen soliden Tumoren waren interessanterweise keine Alterationen in *WNK1* detektiert worden.

Zang et al. diskutierten, dass der NGS-Ansatz ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit aufweist. Bei der Verifizierung einzelner SNPs mit Sanger-Sequenzierung und beim Vergleich mit im Voraus bekannten SNPs durch so genannte *SNP Genotyping Assays* konnten Zang et al. eine Spezifität bei der Detektion von SNPs von 93,9% und eine Sensitivität von 95% ermitteln.



## 1.5 Sonderfall mikrosatelliteninstabile Tumoren

Sogenannte mikrosatelliteninstabile (MSI) Tumoren zeichnen sich durch Längenveränderungen in kurzen nicht-codierenden DNA-Abschnitten ihres Genoms, den sogenannten Mikrosatelliten, aus. Sie machen einen bedeutenden Anteil sporadischer Magenkarzinome aus.<sup>2</sup> Beim Sonderfall des nicht-sporadischen Magenkarzinoms im Rahmen des hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinoms (Lynch-Syndroms) liegt die Ursache der Mikrosatelliteninstabilität in der Regel in einer Mutation von DNA-Reparaturproteinen, z.B. *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2* oder *MLH1*.<sup>32</sup> Eine Studie von Mathiak et al. an dem auch in dieser Studie untersuchten Kollektiv (→ 2.1.1) belegt, dass sich die Untergruppe der mikrosatelliteninstabilen Fälle, die 7,5 % aller Fälle im Kollektiv umfasst, in ihrer Histomorphologie und auch in klinischen Eigenschaften von den anderen Fällen abhebt: Neben einem im Vergleich zu den mikrosatellitenstabilen Fällen signifikant besserem mittlerem Gesamtüberleben von 35,8 Monaten für MSI Fälle und nur 14,2 Monaten für MSS-Fälle. Trotz ihres histologisch häufig an schlecht differenzierte, „medullären“ Karzinome mit hoher Infiltrationsdichte von Entzündungszellen erinnernden Phänotyps, zeichnen sich MSI-Fälle somit durch eine vergleichsweise günstige Prognose aus. Bemerkenswert ist weiterhin, dass keiner der von Mathiak et al. untersuchten MSI-Fälle EBV-positiv war,<sup>33</sup> was sich mit der von Bass et al. vorgeschlagenen molekulargenetischen Klassifikation<sup>2</sup> deckt.

Die in diesem Zusammenhang betroffenen Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2* werden unter anderem durch miRNAs reguliert.<sup>34,35</sup> Mi(cro)RNAs sind kurze RNA-Transkripte, die spezifisch die Translation von RNAs hemmen können, indem sie an die 3'-untranslatierte Region von mRNAs binden. Schätzungsweise unterliegen 10-40 % der menschlichen Gene miRNA-vermittelter Regulation.<sup>36,37</sup> Vareli et al. zeigten an Zellkulturen des kolorektalen Karzinoms, dass insbesondere die miRNA miR-155 eine Herunterregulation von *MLH1*, *MSH1* und *MSH6* bewirkt und somit eine Mikrosatelliteninstabilität induzieren kann.<sup>34</sup> Ein ähnlicher Zusammenhang ist auch für miR-21 beschrieben, deren Überexpression die Expression von *MSH2* reduziert.<sup>38</sup>

Melo et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen Exportin-5 (*XPO5*)-Mutationen und Mikrosatelliteninstabilität beim kolorektalen Karzinom. Da miRNAs im über Exportin-5 vom Nukleus ins Zytoplasma ausgeschleust werden, fällt die miRNA-vermittelte Regulation aus. Die *XPO5*-Mutationen zeigten sich interessanterweise gehäuft bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren<sup>39</sup>, sodass ein Zusammenhang zwischen miRNA-Expression und Mikrosatelliteninstabilität insgesamt als wahrscheinlich erachtet werden kann.

## 1.6 Aufgabenstellung und Kontext der Arbeit

Durch die zunehmende Verfügbarkeit neuer Sequenziermethoden und deren wachsenden Stellenwert in der Forschung ergeben sich neben der Reproduktion bereits bekannter genetischer Mechanismen in der molekulargenetischen Pathologie des Magenkarzinoms stetig neue tumorspezifische Mutationsfunde.

Zu Beginn der Forschungsarbeit lagen kaum Daten vor, die Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit von NGS als alleinige Methodik zur Mutationsdetektion beim Magenkarzinom zuließen. Ziel dieser Arbeit war zunächst die Verifizierung neuer SNP-detektierter Mutationen mit der Intention, möglicherweise relevante Mutationen aufzudecken und zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Magenkarzinoms beizutragen. Es sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

1. NGS produziert bei der Sequenzierung von Tumorgenomen valide Ergebnisse in Hinblick auf SNP-Detektion, die sich durch konventionelle Sequenzieretechnik unabhängig verifizieren lassen.
2. Vorhandene SNPs zeigen auf Proteinebene Auswirkungen, die sich über immunhistochemische Verfahren nachweisen lassen und somit eine pathobiologische Relevanz wahrscheinlich machen.

Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt lagen noch sehr wenige NGS-Daten zum Magenkarzinom vor. Neben den bereits unter → 1.4. erwähnten Ergebnissen eines „targeted“ NGS von Zang et al. lagen Daten von Holbrook et al. vor, die ebenfalls aus einer Illumina-Sequenzierung von 384 Genregionen in 50 Magenkrebsfällen stammen. Holbrook et al. führten zudem exemplarisch eine Sanger-Sequenzierung durch, um SNP-detektierte Varianten zu bestätigen, was in 74% der Fälle auch gelang. Holbrook et al. wiesen Alterationen in den Genen *KRAS*, *ERBB2*, *EGFR*, *MET*, *PIK3CA*, *FGFR2* und *AURKA* nach und schlussfolgerten auf dieser Grundlage, dass 11 von 50 untersuchten Patienten aufgrund von Mutationen in den genannten Genen von einer zielgerichteten Therapie wahrscheinlich profitieren würden.<sup>40</sup>

Da weder Zang et al., noch Holbrook et al. immunhistochemische Methoden benutzten, sollte zunächst exemplarisch an *WNK1* eine Färbung an unserem Fallkollektiv durchgeführt werden, da durch Zang et al. für das Gen *WNK1* eine besonders hohe Mutationsfrequenz angegeben wird.

Parallel wurden durch eine andere Arbeitsgruppe in Kiel die vollständigen Exome zweier Magenkrebsfälle sequenziert, deren Ergebnisse dann später ebenfalls validiert werden sollten. Durchgeführt wurde zunächst die Sequenzierung zweier vollständiger Tumor-Exome, jeweils im Vergleich mit dem Exom der ebenfalls sequenzierten Nichttumor-Gewebe derselben Patienten. Möglicherweise onkogenetisch relevante Mutationen sollten herausgefiltert und überprüft werden.

Bislang ist nur unzureichend untersucht, in wie weit sich NGS-gestützte Befunde von somatischen Mutationen, also solcher außerhalb der Keimbahnlinie, tatsächlich auf einen Gesamttumor oder gar eine größere Fallzahl extrapolieren lassen. Zur rein molekulargenetischen Ebene sollte auch die translationelle und posttranslationelle Ebene, über die sich durch die Anwendung von NGS als alleinige Methodik keine Aussage treffen lässt, ergänzend untersucht werden. Je nach Ergebnis der Sequenzierung sollten zusätzlich cDNA-Sequenzierungen und immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

### **2.0. Übersicht über das grundsätzliche Vorgehen**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Validierung von SNPs beim Magenkarzinom haben unterschiedliche Datengrundlagen.

Zu Beginn der Arbeit (April 2011) wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, alle zu diesem Zeitpunkt zu NGS-Daten des Magenkarzinoms in PubMed<sup>41</sup> zugänglichen Veröffentlichungen zu NGS beim Magenkarzinom gesichtet und nach Angaben potenziell Tumorrelevanter SNPs durchsucht. Als erstes Gen zur Überprüfung wurde *WNK1* festgelegt, da bei Zang et al. eine Mutationsrate von 6/14 Fällen beschrieben wird. Zang et al. geben nur für einen einzelnen Fall eine Mutation an, die anhand von in-Silico-Simulationsdaten potenziell auf der Proteinebene als relevant zu werten ist. Interessanterweise wurde die Mutation p.I1172M jedoch bei insgesamt 3 Fällen nachgewiesen, so dass es sich möglicherweise um einen „Hotspot“ handeln könnte. Zunächst sollte an unserem Patientenkollektiv eine immunhistochemische Färbung stattfinden, um anhand einer größeren Population eine Aussage über die *WNK1*-Expression treffen zu können. Bei Auffälligkeiten sollte dann ein Pyro-Sequenzier-Assay erstellt werden, mit dem mögliche Hotspots populationsweit gesucht werden sollten.

Weiterhin sollten im Verlauf NGS-Daten einer Arbeitsgruppe am Kieler Institut für klinische Molekularbiologie sowohl durch konventionelle Sequenzieretechnik überprüft und weiterführend auch auf RNA- und Proteinebene näher untersucht werden.

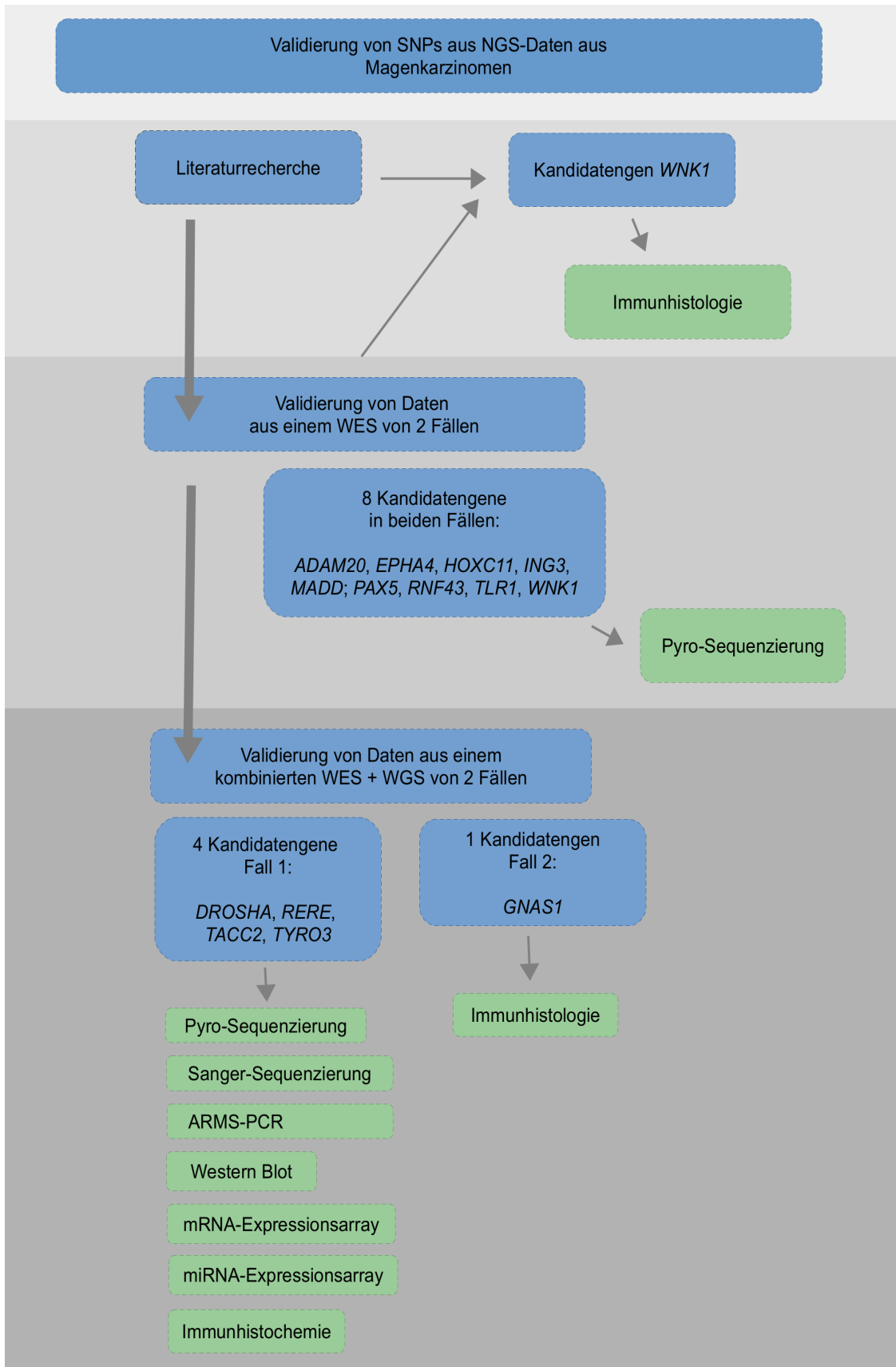


Abbildung 1: Übersicht über die der Arbeit zugrundeliegende Methodik und den Arbeitsfluss.

## **2.1. Material**

### **2.1.1. Patientenkollektiv**

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel wurden alle Gewebeproben von Patienten herausgesucht, die zwischen 1997 und 2009 entweder einer totalen oder einer partiellen Gastrektomie aufgrund eines Adenokarzinoms des Magens oder des ösophagogastralen Übergangs unterzogen worden waren. Folgende Einschluss- und Ausschlusskriterien wurden festgelegt: Patienten wurden in das Studienkollektiv aufgenommen, sofern: 1) Die histologische Begutachtung die Diagnose eines Adenokarzinoms des Magens oder des ösophagogastralen Übergangs bestätigte, 2) der Todeszeitpunkt oder Überlebenszeitdaten vorlagen. Patienten wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen, sofern: 1) histologisch ein anderer Tumor als ein Adenokarzinom vorlag, 2) die histopathologischen Daten nicht vollständig waren oder nicht vollständig erhoben werden konnten, 3) die Patienten zuvor wegen eines Tumorrezidivs im Restmagen nach Billroth-II-Operation operiert worden waren, und/oder 4) keine Daten zum Todeszeitpunkt oder zur Überlebenszeit vorlagen. 5) Patienten mit perioperativ durchgeführter Chemotherapie wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Die folgenden Patientendaten wurden erhoben: Art der Operation, Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Tumorlokalisation, Tumorgroße, histologischer Phänotyp, T-Kategorie, N-Kategorie, UICC-Tumorstadium und Differenzierungsgrad (→ Tabelle 4).

Zur besseren Übersicht, welche Experimente und welche Methodik zur Überprüfung welcher Datensätze durchgeführt wurden, zeigt Abbildung 1 zusammenfassend den Arbeitsfluss.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Patientendaten des Gesamtkollektivs**

<b>Patienten</b>		[n]	482
<b>Alter [Jahre]</b>		[Mittelwert ± SD]	67.9 ± 11.1
		Median	68
<b>Geschlecht</b>	männlich	[n (%)]	297 (61.6)
	weiblich	[n (%)]	185 (38.4)
<b>Klin. Verlaufsdaten</b>	lebt	[n (%)]	131 (28.1)
	verstorben	[n (%)]	335 (71.9)
<b>Lokalisation</b>	Proximal	[n (%)]	149 (30.9)
	Distal	[n (%)]	333 (69.1)
<b>T-Kategorie</b>	pT1a	[n (%)]	13 (2.7)
	pT1b	[n (%)]	49 (10.2)
	pT2	[n (%)]	56 (11.6)
	pT3	[n (%)]	190 (39.4)
	pT4a	[n (%)]	134 (27.8)
	pT4b	[n (%)]	40 (8.3)
<b>N-Kategorie</b>	pN0	[n (%)]	138 (28.8)
	pN1	[n (%)]	67 (14.0)
	pN2	[n (%)]	85 (17.7)
	pN3/a/b	[n (%)]	189 (39.5)
<b>UICC Stadium (7. Ausgabe)</b>	IA	[n (%)]	49 (10.4)
	IB	[n (%)]	32 (6.8)
	IIA	[n (%)]	58 (12.3)
	IIB	[n (%)]	47 (9.9)
	IIIA	[n (%)]	55 (11.6)
	IIIB	[n (%)]	83 (17.5)
	IIIC	[n (%)]	66 (14.0)
	IV	[n (%)]	83 (17.5)
<b>Grading</b>	G1 / G2	[n (%)]	111 (23.7)
	G3 / G4	[n (%)]	357 (76.3)
<b>Resektionsrand</b>	R0	[n (%)]	403 (88.2)
	R1/R2	[n (%)]	54 (11.8)

Aus dem Gesamtkollektiv wurden anschließend 20 MSS- und 20 MSI- Magenkarzinome ausgewählt. Dieses Kollektiv bildet die Grundlage für die DROSHA-Immunfärbung.

**Tabelle 5: Zusammenfassung der Patientendaten des MSI/MSS-Kollektives**

Untergruppe			MSI	MSS
<b>Patienten</b>		[n]	20	20
<b>Alter [Jahre]</b>		[Mittelwert ± SD]	73,25 9,21	72,25 6,92
		Median	73	74
<b>Geschlecht</b>	männlich	[n]	11	11
	weiblich	[n]	9	9
<b>Lokalisation</b>	Proximal	[n]	3	6
	Distal	[n]	17	14
<b>T-Kategorie</b>	pT1a	[n]	0	0
	pT1b	[n]	1	2
	pT2	[n]	6	3
	pT3	[n]	9	10
	pT4a	[n]	3	4
	pT4b	[n]	1	1
<b>N-Kategorie</b>	pN0	[n]	10	11
	pN1	[n]	2	1
	pN2	[n]	4	4
	pN3/a/b	[n]	3	3
<b>UICC Stadium (7. Ausgabe)</b>	IA	[n]	1	2
	IB	[n]	4	3
	IIA	[n]	6	2
	IIB	[n]	0	3
	IIIA	[n]	3	4
	IIIB	[n]	1	0
	IIIC	[n]	3	1
	IV	[n]	1	4
<b>Grading</b>	G1 / G2	[n]	5	6
	G3 / G4	[n]	14	13
<b>Resektionsrand</b>	R0	[n]	16	16
	R1/R2	[n]	2	1



### 2.1.2. NGS-Experimente am Kieler Institut für klinische Molekularbiologie

Es wurden aus dem Gesamtkollektiv zwei am Magenkarzinom verstorbene Patienten herausgesucht, die die folgenden Kriterien erfüllten: Es mussten kryokonservierte Proben vom Tumor und Nichttumor der Patienten vorliegen, es mussten Patienten gleichen Alters und Geschlechts sein und schließlich sollte ein Tumor MSS und der andere MSI sein.

**Tabelle 6: Klinische Daten der zwei Tumorfälle für das Next-Generation-Sequencing**

	Pat.-alter	Mikrosatellitenstatus	Geschlecht	TNM (nach 7. Ausgabe)							Stadium
				T	N	M	L	V	G	R	
Fall 1	74	MSI	weiblich	3	0	X	0	0	3	0	2a
Fall 2	74	MSS	weiblich	4a	1	X	X	X	2	X	3a

Die Exome und anschließend die vollständigen Genome dieser zwei Fälle aus dem Gesamtkollektiv wurden am Institut für Klinische Molekularbiologie des UKSH Campus Kiel mittels *Next-Generation-Sequencing* sequenziert und anschließend durch bioinformatisch gestützte Algorithmen mit ihren jeweils als Referenz genutzten Nichttumorzell-Genomen verglichen. Hierzu kamen jeweils zwei unabhängige Sequenzieretechniken zum Einsatz:

- Für beide Tumorfälle und jeweils korrespondierendes Normalgewebe fand jeweils zunächst ein Whole Exome Sequencing (WES) auf der Plattform SOLiD 4 (Applied Biosystems; Waltham, MA, USA) statt. Mit dieser Technologie wurde eine Coverage zwischen 41- und 66-fach erreicht, dabei betrug die Anzahl der Reads pro sequenziertem Exom zwischen  $160 \times 10^6$  und  $199 \times 10^6$ .
- In einem zweiten Ansatz wurde anschließend ein Whole Genome Sequencing (WGS) unter Verwendung der Illumina HiSeq2000-Sequenzieretechnologie (Illumina; San Diego, CA, USA) durchgeführt. Dieses erzeugte eine Coverage zwischen 14- und 78-fach bei einer Anzahl von Reads zwischen  $6,2 \times 10^9$  und  $922,8 \times 10^9$ .

Es fand eine Filterung der generierten Daten nach unterschiedlich strengen Parametern statt. In beiden Ansätzen wurden nur SNPs berücksichtigt, die mindestens durch 5% der Reads innerhalb der Coverage unterstützt wurden. Die im zweiten Ansatz nachgewiesenen Mutationen mussten sowohl vom WGS, als auch vom zuvor durchgeführten WES unterstützt werden. Es wurden nur SNPs, die durch unterschiedliche Algorithmen („Caller“) unabhängig voneinander aus den Sequenzierdaten ausgegeben wurden, untersucht. Schließlich fand durch einen Abgleich mit mehreren

Datenbanken (COSMIC<sup>42</sup>, OMIM<sup>43</sup>, HGMD<sup>44</sup>) eine Filterung bereits bekannter SNPs/Polymorphismen und bekannter (somatischer) tumorspezifischer Mutationen statt.

Bei den SNPs wurden nur missense- und nonsense-Mutationen weiter betrachtet. Zur Vorhersage, ob eine Mutation auf Proteinebene und letztlich auf funktioneller Ebene eine Auswirkung zeigt, wurden die internetbasierten Simulations-Tools „Sift“<sup>45</sup> und „Polyphen“<sup>46</sup> verwendet.

### 2.1.3. Geräte

Für die Untersuchungen wurden die folgenden Geräte verwendet: BioRad C1000-Thermocycler (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), LightCycler 1.2-RT-PCR-System (Roche Applied Science; Penzberg), Pyromark Q24 mit Pyromark Q24 Preptool (Qiagen; Hilden), Rüttler: MS2 Minishaker (IKA Werke; Staufen), Heizplatte 0TS 30.3 für die Präparation zur Pyro-Sequenzierung (Meditate Medizintechnik; Burgdorf), PyroMark Q24 Plate Holder (Qiagen; Hilden), Vakuumpumpe für Pyro-Sequenzierung: 2511 Dry Vacuum Pump/Compressor (Welch; Niles, IL, USA), Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems; Waltham, MA, USA), Eppendorf-Pipetten (Eppendorf; Hamburg), Leica DM 1000-Mikroskop (Leica Microsystems; Wetzlar), NanoDrop 2000c-Photometer (Thermo Fisher; Waltham, USA), Leica RM2245-Mikrotom (Leica Microsystems; Wetzlar), Mini PROTEAN Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), Gel Doc XR+ -Scanner (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), Kühlschrank für Antikörperinkubation: Siemens KI51FAD30iQ700 (Siemens/SEG Hausgeräte, München), Wasserbad, Zentrifuge: Biofuge pico (Heraeus; Hanau), Druckkochtopf Art.-Nr. 22020 (Haushalt International; Oldenburg), THL1097-Heizplatte (Rommelsbacher Elektrohausgeräte; Dinkelsbühl), Scanner Leica SCN400 Slide Scanner (Leica Microsystems; Wetzlar), MEDline-Gefrierschrank (Liebherr; Kirchdorf), Binder E28-Wärmeschrank (Binder; Tuttlingen), VWR Digital Heat Block II-Heizelement (Tromner; Thorofare, USA), Synergy Mx-Spektralphotometer (BioTek; Winooski, USA), T25 digital Ultra Turrax-Gewebehomogenisator (IKA Werke, Staufen), Vortex Genie 2 (Scientific Industries; Bohemia, USA)

### 2.1.4. Software

Folgende Softwareprodukte wurden verwendet: SPSS Version 20.0 (IBM; Armonk, NY, USA), SPSS SmartReader 24.0 (IBM; Armonk, NY, USA), Microsoft Excel Version 2010 (Microsoft; Redmond, WA, USA), Finch TV Version 1.31 (Geospiza; Seattle, WA, USA), Software für Leica SCN400 Slide Scanner (Leica Microsystems; Wetzlar), PyroMark Assay Design (Qiagen; Hilden), SerialCloner (Serial Basics Software; Paris, Frankreich).

### 2.1.5. Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden verwendet: SuperFrost Plus-Objekträger (Menzel Gläser; Braunschweig), 22x22 mm Deckgläser (Menzel Gläser; Braunschweig)

96-Well-Racks für PCR (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), PCR-Strips und -Caps (Biozym Scientific; Hessisch Oldendorf), Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf; Hamburg), Kapillaren für den LightCycler (Roche Applied Science; Penzberg), Pipettenspitzen (Sarstedt; Nümbrecht), PyroMark Plates, PyroMark Q24 Plate Holder, PyroMark Q24-Standardkartuschen (jeweils Qiagen; Hilden), Disposable Scalpel Standard (Feather Safety Razor Co.; Osaka, Japan), Mikrotomklingen: Microtome Blade A22 (Feather Safety Razor Co.; Osaka, Japan), Porablot PVDF-Membranen (Macherey-Nagel; Düren), Western Blot Filter Paper (Thermo Fisher; Waltham, USA).

### 2.1.6. Reagenzien, Kits, Lösungen und Chemikalien

Folgende Reagenzien wurden für die DNA-Isolation, PCR und Sequenzierungen verwendet: QIAamp DNA mini kit (Qiagen; Hilden), PCR-Kit HotStarTaq (Qiagen, Hilden), Ladder 100 bp- Elektrophorese-Standardleiter (New England BioLabs; Ipswich, USA), Agartabs (Eurogenetec; Lüttich, Belgien), Ethidiumbromid (Carl Roth; Karlsruhe), PyroMark Gold Q24 Reagents Kit für Pyro-Sequenzierung, Denaturation Solution, Wash Buffer, Annealing Buffer für Pyro-Sequenzierung, miScript SYBR Green PCR Kit, miScript miRNA PCR Assays für mir-15, mir-26b, mir-21, mir-103, mir-145, mir-146a und mir-148, QuantiTect SYBR Green

PCR Master Mix (jeweils Qiagen, Hilden), Big Dye Terminator Cycle Kit v3 (Applied Biosystems; Waltham, USA), PCR-Clean Up Kit Nucelospin Extract II (Macherey-Nagel; Düren), NucleoSeq Kit (Macherey-Nagel; Düren), mirVana miRNA-Extraktions-Kit, Maxima First Strand cDNA-Synthese-Kit, Maxima First Strand cDNA-Synthese-Kit, ProteoJet Mammalian Cell Lysis Kit (jeweils Ambion/Thermo Fisher; Waltham, USA), Complete Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche Applied Science; Penzberg), DC Protein Assay-Lysis-Kit (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas/ Thermo Fisher; Waltham, USA)

Folgende Reagenzien wurden für die immunhistochemischen Färbungen und Western Blots verwendet: Methanol, Äthanol, Xylol (jeweils Büfa Chemikalien; Lübeck) NaCl, HCl, Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Zitronensäure-Monohydrat, Essigsäure (jeweils Carl Roth; Karlsruhe), Trizma Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan),  $\beta$ -Mercaptoäthanol, Tween 20 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA), Glycin (Merck Milipore; Darmstadt), Antibody-Diluent (Zytomed; Berlin), Hämalun (Dr. K. Hollborn & Söhne; Leipzig), Hydrogen Peroxide Block, Ultra V Block (jeweils Thermo Scientific; Waltham, MA, USA), DAB/Diaminobenzidin-Substrat (Vector; Burlingame, CA, USA), Histofine

Simple Stain Max PO-Sekundärantikörper für Immunhistochemie (Nichirei; Tokio, Japan), DAKO Pen (Dako/Agilent, Glostrup, Dänemark), Pertex-Eindeckmedium (Medite Medizintechnik; Burgdorf), Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 %, SDS (Natriumdodecylsulfat), Glycerin, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), APS (Ammoniumpersulfat), 0,1 % Bromphenolblau, demineralisiertes Wasser dH<sub>2</sub>O (jeweils Carl Roth; Karlsruhe), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Thermo Fisher; Waltham, USA), Blocker BSA 10x in TBS (Thermo Fisher; Waltham, USA), Goat Anti-Rabbit AP conjugated-Sekundärantikörper für Western Blot (DAKO, Glostrup, Dänemark), 1-Step NBT/BCIP Substrat (Thermo Fisher; Waltham, USA)

Es wurden Zellpellets aus HEK-293-Zellen aus dem Vorrat der Arbeitsgruppe zur Proteinlysatzgewinnung genutzt.

Folgende Puffer wurden für die Immunhistochemie und für die Western Blots verwendet und wie folgt hergestellt:

- 10x-konzentrierter TBS-Puffer für die Immunhistochemie: 60,57 g Trizma Base, 87,66 g Natriumchlorid, in 1 l dH<sub>2</sub>O, titriert mit verd. HCl bis auf pH 7,4
- 10x-konzentrierter Citrat-Puffer für die Immunhistochemie: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1000 ml dH<sub>2</sub>O, titriert mit Zitronensäure-Monohydrat auf pH 6,0
- SDS-Gelpuffer für Western Blots: 90,70 g Trizma Base, 0,75 g SDS auf 250 ml mit aufgefüllt und auf pH 8,45 mit verd. HCl eingestellt.
- 10% APS-Puffer für Western Blots: 5 g APS auf 50 ml mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt.
- 4x-konzentrierter Laemmli-Probenpuffer für Western Blots: 5 ml 0,5 M Tris-HCl eingestellt auf pH 6,8, 4 ml Glycerin, 8 ml 10 % SDS, 2 ml 0,1 % Bromphenolblaulösung, 1 ml β-Mercaptoäthanol auffüllen auf 20 ml mit dH<sub>2</sub>O.
- Blottingpuffer für Western Blots: 3,03 g Tris, 14,40 g Glycin und 200 ml Methanol auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt.
- 10x-konzentrierter TTBS-Puffer für die Immunhistochemie: 9,00 g Trizma Base, 68,50 g Tris-HCl, 87,80 g Natriumchlorid, auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt.
- Elektrophoresepuffer für Western Blots: 30,28 g Trizma Base, 144,00 g Glycin, 10,00 g SDS
- Coomassie-Färbelösung: 100 ml 10% Essigsäure, 3 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 450 ml Methanol gelöst und mit 450 ml dH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt.
- Destaining-Lösung für Coomassie-Färbung: 300 ml Methanol, 100 ml Essigsäure auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Die Elektrophoresegele für Western Blots (nach Schagger et al.<sup>47</sup>) wurden wie folgt hergestellt: Auffüllen des Gel-Glasrahmens zu 2/3 mit 16,5% Acrylamid-Gel-Mischung aus 4,95 ml 40% Acrylamid, 4 ml SDS Puffer, 2 ml Glycerin, 1,05 ml dH<sub>2</sub>O, 120 µl 10% APS und 3 µl TEMED. Kammer mit dH<sub>2</sub>O auffüllen und Gel aushärten lassen. Anschließend Abgießen des dH<sub>2</sub>O und Auffüllen von 10% Gel-Mischung aus 3 ml 40% Acrylamid, 4 ml SDS Puffer, 2 ml Glycerin, 3 ml dH<sub>2</sub>O, 120 µl 10% APS und 6 µl TEMED. Erneut aushärten lassen und schließlich bei eingestecktem Kamm zur Bildung der Elektrophorese-Laufbahnen Auffüllen der Apparatur mit 4% Gel-Mischung aus aus 1,2 ml 40% Acrylamid, 4 ml SDS Puffer, 6,8 ml dH<sub>2</sub>O, 120 µl 10% APS und 9 µl TEMED.

### **2.1.7. Primer für Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung**

Die Primer, ausgenommen die qRT-PCR-Primer aus Tabelle 7, wurden mit dem PyroMark Assay Design Tool entwickelt und anschließend bei biomers (biomers; Ulm) bezogen. Die im Folgenden mit „Forward“ (vorwärts) und „Reverse“ (rückwärts) bezeichneten Primer wurden für die PCR genutzt, wobei jeweils einer der Primer mit einer 5'-Biotinylierung modifiziert wurde. Dies ermöglicht das spätere Binden des PCR-Produktes an die Streptavidin-konjugierten Sepharose-Beads während der Vorbereitung zur Pyro-Sequenzierung.

Für die Sanger-Sequenzierung der *DROSHA*-Mutation wurde der Forward-Primer genutzt, der auch für die PCR zum Einsatz kam. Für die cDNA-Synthese aus RNA kamen alternative Primer zum Einsatz.

Die qRT-PCR-Primer aus Tabelle 8 wurden aus der Roche Universal Probe Library (Roche Applied Science; Penzberg) bezogen.

**Tabelle 7: Übersicht über verwendete Primer**

	Primer	Sequenz	5' - Modifizierung	Anzahl Basen [n]	Schmelz- temperatur [°C]	GC-Anteil [%]
<i>ADAM20</i>	F	GTGCGAGCTACAGTGGTGCATAA	keine	23	73,5	52
	R	GAGGCGGTTGAATACATAATCCAC	Biotin	24	71,6	46
	Seq	GCAGTTATGCCCAATAT	keine	17	50,9	41
<i>EPHA4</i>	F	TCCACTCACAGTCCGCAATCT	Biotin	21	72,1	52
	R	TTGACACAGGAGCCTCGAACTT	keine	24	72,4	50
	Seq	GAACTTCCACCAGGG	keine	17	51,4	60
<i>HOXC11</i>	F	AGCAGAGACCGGCTGCAGTAT	Biotin	21	72,5	57
	R	GGCCCGGTCTGCAGGTTA	keine	18	73,4	67
	Seq	TGCAGTTACAGCAGAG	keine	17	53,3	53
<i>ING3</i>	F	CACCAAAGGCAAATGGTACTGT	keine	23	71,1	44
	R	AGGACCACCTTTATTTGTGTCTGC	Biotin	24	71,5	46
	Seq	CTTCTCTTCATTGCAGC	keine	17	51,7	47
<i>MADD</i>	F	ATCCCTGCAGCCTCTCAGT	keine	19	68,9	68
	R	AGGTGGAGAAGAAAGGGTAGTGG	Biotin	23	70,8	52
	Seq	ACGTCCCTGTGCGTG	keine	15	57,9	67
<i>PAX5</i>	F	CGGGGAGACTTGTTACACAC	keine	19	68,1	58
	R	GGCTCTGTGGTGGTGAAGAT	Biotin	20	69,1	55
	Seq	GGACCGCGTGTTTGA	keine	15	57,9	60

<b>Fortsetzung Tabelle 7: Übersicht über verwendete Primer</b>
--

	Primer	Sequenz (5' → 3')	5' - Modifikation	Anzahl Basen [n]	Schmelz- temperatur [°C]	GC-Anteil [%]
<i>RNF43</i> Pyro-Primer	F	GTGGGCACCATCTTTGTGA	Biotin	19	69,6	53
	R	CTCCTTCCTTCTCCCTAACCA	keine	21	68,6	52
	Seq	TGTGGCGGGGGCGGC	keine	15	73,8	87
<i>TLR1</i> Pyro-Primer	F	CTAGCATCTTCCATTTTGCCATTA	keine	24	70,3	38
	R	AGGTCTTTAGGAACGTGGATGA	Biotin	22	68,8	46
	Seq	AAGAAAGTGAATTTTAGTT	keine	20	47,1	20
<i>TACC2</i> Pyro-Primer	F	TTGAGATCCCAGCCAGTGCTAT	Biotin	22	55,3	50
	R	CTTACCACCTCCACCCCTGAA	keine	21	55,3	57
	Seq	TGAACTTACGTCTTTAGGG	keine	19	41,8	42
<i>DROSHA</i> gDNA Pyro-Primer	F	GGGAGAAGGAATTTACAAAACAC	keine	24	52,3	37
	R	TCCAATTGCTTCTTCAAACCTCA	Biotin	22	51,8	36
	Seq	TATTTCTATTTTCCTGTAGC	keine	20	38,7	30
<i>DROSHA</i> CDNA Pyro-Primer	F	GACGCTTGCTCTTTAATGATCC	keine	22	52,5	45
	R Pyro	TCCAATTGCTTCTTCAAACCTCA	Biotin	22	51,8	36
	Seq	CCACCCACTCCAACCTCA	keine	16	39,7	56

**Tabelle 8: Primer für qRT-PCR**

	<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Katalognummer Roche Universal Probe Library ®</b>	<b>Anzahl Basen [n]</b>	<b>Schmelz- temperatur [°C]</b>	<b>GC-Anteil [%]</b>
<i>SDHA</i>	F	ATTTGGTGGACAGAGCCTCA	5	20	51,8	50
	R	CTGGTATCATATCGCAGAGACC		22	54,8	50
<i>CYCC</i>	F	GGAAAAGTCATTGATGGGATG	59	21	50,5	43
	R	CAAAGGCGTTTTACGTCTA		21	50,5	43
<i>CAPN2</i>	F	CGCTGACCCCCAGTTTATC	25	19	53,2	58
	R	TCAAGGTGAGGGAGGCAAT		19	51,1	53



## **2.2. Methoden**

---

### **2.2.1. Genetische Methoden**

#### **2.2.1.1. DNA-Isolation**

Die DNA wurde aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE) mit dem QIAamp DNA mini kit gemäß Herstellerangaben extrahiert. Dazu wurde zunächst das Tumoreal auf HE-gefärbten Schnittpräparaten markiert und mit Einwegskalpell von konsekutiven Schnitten abgetragen.

Das kryokonservierte Material wurde bereits vor der Archivierung als reines Tumorgewebe präpariert. Die Zwischenlagerung erfolgte bei -70 °C. Das Tumorgewebe wurde mit Hilfe von Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend mit einem Mörser pulverisiert. Eine 2-3 mm durchmessende Menge pulverisierten Gewebes wurde in 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase-K (QIAamp DNA mini kit) überführt und über Nacht bei 56°C schüttelnd lysiert. Anschließend wurden 200 µl AL-Puffer hinzugefügt und weitere 10 Minuten bei 70 °C zur Inaktivierung der Proteinase K inkubiert. Der Ansatz wurde mit 200 µl Äthanol vermischt und auf die QIAamp-Säule zur DNA-Bindung überführt. Es folgten mehrere Waschschriffe bestehend aus Waschen mit AW1-Puffer, anschließend Zentrifugieren bei 8000 G (1 Minute), Waschen mit AW2-Puffer, Zentrifugieren bei 8000 G für 1 Minute und schließlich zur Trocknung der Äthanolreste Zentrifugieren bei 13000 G für 5 Minuten. Anschließend erfolgte die Elution der gewonnenen und an der Säule gebundenen DNA mit 50 µl AE-Puffer. Die Konzentration der gewonnenen DNA-Lösung wurde photometrisch am NanoDrop-Photometer ermittelt und durch anschließende Verdünnung der Proben auf einheitliche 10 ng/µl Endkonzentration eingestellt.

#### **2.2.1.2. RNA-Isolation (Gesamt-RNA)**

Um RNA zu gewinnen wurde das mirVana-miRNA-Isolations-Kit genutzt. Entnommenes gefrorenes Gewebe wurde zunächst unter Kühlung in flüssigem Stickstoff mit dem Mörser fein zerstoßen und anschließend in 300 µl Lysis/Binding-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde 1/10 des Gesamtvolumens miRNA-Homogenat-Additiv hinzugegeben und für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Nach der Inkubation und erfolgten Lyse auf Eis wurde das Lysat mit 300 µl Phenol-Chloroform-Lösung homogen vermischt. Nach Zentrifugation bei 10.000 g bei Raumtemperatur wurde die lipophile Phase von der wässrigen getrennt. Die wässrige Phase enthält die aufzureinigende RNA. Die wässrige Phase, etwa 200 µl, wurde vorsichtig in ein mit 250 µl Äthanol versetztes Reaktionsgefäß überführt, vermischt und anschließend auf eine Extraktionssäule überführt.

Nach 15-sekündiger Zentrifugation wurde das Filtrat verworfen und die Extraktionssäule mit 700 µl Wash Solution 1 versetzt, es folgte eine 15-sekündige Zentrifugation bei 10.000 G. Der Durchfluss wurde erneut verworfen, es folgten zwei weitere Waschschrirte mit der Wash Solution 2/3 mit jeweils 500 µl und jeweils 15 sekündiger Zentrifugation. Zur Trocknung der Säule wurde diese im Anschluss 1 Minute bei 10.000 G zentrifugiert. Die Extraktionssäule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 100 µl auf 95 °C erhitzter Elutionslösung für 30 Sekunden bei 10.000 G eluiert.

### 2.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde vor der Pyro- und Sanger- Sequenzierung eingesetzt, um den zu sequenzierenden DNA-Abschnitt zu generieren und zu amplifizieren. Die entsprechenden Primer-Paare sind Tabelle 6 zu entnehmen. Zu jeweils 5 µl der extrahierten DNA (vorliegend als 10 ng/µl-Lösung, siehe Abschnitt Materialgewinnung) wurden pro Ansatz 1 µl Forward-Primer (10 µM), 1 µl Reverse-Primer (10 µM), aus dem HotStarTaq PCR-Kit jeweils 2,5 µl 10x-Puffer, 1,25 µl dNTPs (Konzentration 2mM), 0,25 µl Taq-Polymerase und schließlich 14 µl Nuklease-freies Wasser gegeben. Die Ansätze wurden verschlossen und anschließend die Reaktion im Thermocycler mit folgendem PCR-Programm gestartet:

- 1: 95 °C für 10 Minuten (Aktivierung der Taq-Polymerase)
- 2: 95 °C für 30 Sekunden (Denaturierung)
- 3: 60 °C für 30 Sekunden (Hybridisierung / Annealing)
- 4: 72 °C für 30 Sekunden (Elongation durch Taq-Polymerase)
- 5: 72 °C für 7 Minuten.

Die Schritte 2-4 wurden je nach Produkt 35- bis 40-fach wiederholt.

Nach Abschluss der PCR erfolgte zur Erfolgskontrolle eine Gelelektrophorese auf einem 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-haltigen 2%-Agarosegel und die anschließende Darstellung und Dokumentation der DNA-Banden mit Hilfe des Geldokumentationssystems.

#### 2.2.1.4. cDNA-Synthese

Hierzu wurde das Maxima First Strand cDNA-Synthese-Kit nach Herstellerangaben genutzt. Jeweils 1 µl 10x dsDNase Buffer wurden mit 1 µl dsDNase der isolierten DNA/RNA beigemischt. Mit Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O wurde auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch kurz auf dem Vortex agitiert und für 2 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Hiernach wurden die Proben auf Eis abgekühlt, erneut kurz zentrifugiert und auf Eis zwischengelagert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 µl Reaktionsmix, 2 µl Enzymmix und 4 µl Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O. Nach erneutem Agitieren wurde für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert und anschließend weitere 15 Minuten bei 50 °C. Die Reaktion wurde dann durch Erhitzen auf 85 °C terminiert.

#### 2.2.1.5. qRT-PCR für mRNA

Synthetisierte cDNA wurde mit dem QuantiTect SYBR Green qRT-PCR-Kit analysiert. Hierzu wurden die schon zuvor verwendeten cDNA-Pyro-Primer für *DROSHA* (→ Tabelle 7) genutzt. 10 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix wurden mit 2 µl *DROSHA*-cDNA-Primer, 2 µl cDNA-Lösung und vermischt und mit 7 µl Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl Probenvolumen aufgefüllt. Neben dem Ansatz für *DROSHA* wurden in gleichem Vorgehen Ansätze für die mRNAs der Gene *CAPN2*, *CYCC* und *SDHA* (→ Tabelle 8) als Referenz pipettiert. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde kurz bei 1000 G anzentrifugiert und die Reaktion im LightCycler 1.2 gestartet wie unter 2.2.4.2. beschrieben.

#### 2.2.1.6. Reverse Transkription der miRNA (qRT-PCR)

Die Reverse-Transkription von miRNAs wurde mit dem miScript SYBR Green PCR Kit durchgeführt. Im ersten Schritt wird zunächst cDNA aus der zuvor extrahierten miRNA synthetisiert. Hierzu wurden 5 µl miRNA-Extrakt mit 4 µl miScript HiSpec-Puffer, 2 µl miScript Nukleinsäure-Mix, 2 µl miScript Reverse-Transkriptase-Mix und 7 µl Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O vermischt und bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 5 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Danach wurde mit der Echtzeit-PCR fortgefahren.

Hierzu wurden die 20 µl Volumen aus der Reverse Transkriptase-Reaktion pro Reaktionsansatz genutzt. Zu 10 µl PCR-Mastermix wurden 2 µl 10x miScript-Universal-Primer und 2 µl 10x miScript Primer Assay für die jeweilige miRNA (mir-15, mir-26b, mir-21, mir-103, mir -145, mir-146a und mir-148) hinzugefügt. Dem Ansatz wurde jeweils 2 µl der verdünnten cDNA hinzugefügt und auf 20 µl Gesamtvolumen mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Zur Vermeidung von Luftblasen in den gekühlten Glaskapillaren wurden diese kurz bei 1000 g abzentrifugiert und die Reaktion anschließend im LightCycler 1.2 gestartet.

Das Programm wurde folgendermaßen gewählt:

- 1: 95 °C für 15 Minuten (Aktivierung der Taq-Polymerase)
  - 2: 94 °C für 15 Sekunden (Denaturierung)
  - 3: 55 °C für 30 Sekunden (Hybridisierung / Annealing)
  - 4: 70 °C für 30 Sekunden (Elongation und Fluoreszenzmessung)
- Die Schritte 2-4 wurden 40-fach wiederholt.

Die Echtzeit-Fluoreszenzmessung erfolgt im LightCycler unter Ausnutzung des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Hierzu werden zwei an kurze Sonden-Oligonukleotide konjugierte Fluorophore (Donor- und Akzeptor-Fluorophor „SYBR Green“), die im miScript PCR-Mastermix enthalten sind, eingesetzt. Lagern sich diese an Einzelstrang-DNA an, kommen Donor- und Akzeptor-Fluorophor in räumliche Nähe. Dies ermöglicht, dass zwischen Donor und Akzeptor Energie durch molekulare Wechselwirkung übertragen wird. Der durch Licht einer Wellenlänge von 494 nm im LightCycler angeregte Donor-Fluorophor gibt somit Energie an den Akzeptor-Fluorophor ab, welcher dann grünes Licht einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Dieses Fluoreszenzsignal wird im LightCycler gemessen. Eine relative Quantifizierung anhand der Signalintensität im Verhältnis zum Hintergrundsignal ist entlang des Reaktionsverlaufs möglich.

Es wird der sogenannte Cp-Wert (engl. *crossing point*) ermittelt, der die Anzahl der Zyklen beschreibt, an dem das detektierte Signal zuerst signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Das Quantifikationsverfahren ist ein relatives, sodass eine interne Kontrolle definiert werden muss, anhand der die jeweiligen miRNA-Konzentrationen gemessen werden. Als Referenz wurden die ubiquitär exprimierten miRNAs mir-15 und mir-26b verwendet.

### 2.2.1.7. Mutationsspezifische PCR

Bei der Durchführung der PCR wurde durch eine mutationsspezifische Primerwahl ausschließlich eine spezifische Punktmutation tragende Basensequenz vervielfältigt. Dieses Prinzip wurde bereits 1989 von Newton et al. als „Amplification Refractory Mutation System“ („ARMS“) benannt und als hochsensitive und -spezifische Methode beschrieben.<sup>48</sup> Einer der PCR-Primer wird hierbei so gewählt, dass er am 3'-Ende komplementär zur Mutation-tragenden DNA ist und somit keine DNA-Synthese bei mangelnder 3'-Bindung an die Wildtyp-Sequenz erfolgen kann. Hierzu müssen die PCR-Parameter genau so gewählt werden, dass das Annealing des mutationsspezifischen Primers spezifisch passieren kann, jedoch eine ausreichende Bindung zwischen Template-Strang und Primer noch gewährleistet ist.



PCR-F-Primer (identisch mit F-Primer für Pyro-Sequenzierung)

Mutationsspezifischer PCR-R-Primer

Wildtyp-spezifischer PCR-R-Primer

Biotinylierter R-Primer für Pyro-Sequenzierung

Sequenzierprimer für Pyro-Sequenzierung

X Mutation c.3589C>T

**Abbildung 2:** Darstellung der Primerbindung an die mutationstragende cDNA-Sequenz in *DROSHA*.

Der R-Primer bindet entweder Wildtyp- oder mutationsspezifisch und ermöglicht unter geschickt gewählten PCR-Parametern so die selektive Amplifikation.

In PCR-Strips mit entsprechenden Caps wurden 5 µl DNA-Lösung (10 ng/µl) mit jeweils 20 µl PCR-Mastermix (2,5 µl 10 Puffer, 1,25 µl dNTP, 1 µl Forward-Primer, 1 µl jeweils Reverse-Primer 0,25 µl Taq-Polymerase, 14 µl nukleasefreies dH<sub>2</sub>O) einer PCR mit 35-40 Zyklen zugeführt. Parallel wurden jeweils Ansätze mit mutationsspezifischem und Wildtyp-spezifischem Reverse-Primer der PCR zugeführt und anschließend über die Agarosegelelektrophorese bewertet.

Es wurden unterschiedliche Parameter für die Annealing-Temperatur und die Zyklenzahl erprobt, um eine möglichst hohe Spezifität der Amplifikation zu erreichen. Diese wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese bewertet. Es wurde folgendes PCR-Programm etabliert:

- 1: 95 °C für 10 Minuten
- 2: 95 °C für 30 Sekunden (Denaturierung)
- 3: 64 °C für 30 Sekunden (Hybridisierung / Annealing)
- 4: 72 °C für 30 Sekunden (Elongation durch Taq-Polymerase)
- 5: 72 °C für 7 Minuten.

Die Schritte 2-4 wurden 30-fach wiederholt.

### 2.2.1.8. Pyro-Sequenzierung

In PCR-Strips mit entsprechenden Caps wurden 5 µl DNA-Lösung (10 ng/µl) mit jeweils 20 µl PCR-Mastermix (2,5 µl 10 Puffer, 1,25 µl dNTP, 1 µl Forward-Primer, 1 µl Reverse-Primer 0,25 µl Taq-Polymerase, 14 µl nukleasefreies dH<sub>2</sub>O) einer PCR mit 35-40 Zyklen zugeführt. Hiernach er-

folgte eine Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des Amplifikationserfolgs. Dem fertigen PCR-Ansatz wurden anschließend jeweils 40 µl Bindungspuffer, 2 µl Sepharose-Suspension (avidinkonjugierte „Sepharose Beads“) und 18 µl Nuklease-freies dH<sub>2</sub>O hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Bindung des biotinylierten Amplifikats an das Sepharosematrix-gebundene Avidin über 10 Minuten auf dem Rüttler.

Die so vorbereiteten Ansätze wurden an der PyroMark Q24 Workstation weiterverarbeitet. Mithilfe der Ansaugvorrichtung (Pyromark Q24 „Preptool“ mit 24 „Filter Probes“) wurden sie angesaugt und an den „Filter Probes“ anhaftend sukzessive mit 70% Äthanol, „Denaturation Solution“ und „Wash Buffer“ denaturiert und gewaschen. Anschließend wurden die so generierten Einzelstränge durch Abstellen der Vakuumpumpe in eine 24-Well Platte („PyroMark Plate“), überführt. Diese wurde zuvor mit jeweils 25 µl „Annealing Buffer“ und 0,75 µl Sequenzierprimer präpariert.

Die *PyroMark Plates* inklusive des Bead-Primer Gemisches wurden anschließend auf 80 °C für 2 Minuten erhitzt, um Sekundärstrukturbildung der einzelsträngigen DNA zu verhindern. Während des folgenden 10-minütigen Abkühlvorgangs bei Raumtemperatur erfolgte die Hybridisierung des Sequenzierprimers. Die Sequenzierung folgte unter Verweendung der PyroMark Q24-Standardkartuschen sowie den Reagenzien aus dem *PyroMark Gold Q24 Reagent Kits* nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

### 2.2.1.9. Sanger-Sequenzierung

Auch für die Sanger-Sequenzierung wurde zunächst eine PCR durchgeführt wie oben geschildert. Als Primer für die *DROSHA*-Sequenzierung wurden die schon für die Pyro-Sequenzierung verwendeten Primer verwendet.

Für die Aufreinigung des PCR-Amplifikats wurde das *PCR-Clean Up Kit Nucelospin Extract II* gemäß der Herstelleranleitung verwendet. Es wurden jeweils 20 µl PCR-Produkt aufgereinigt, d.h. von Oligonukleotiden, Primern bzw. Primerdimeren und von den nicht-DNA-Anteilen des PCR-Produktes befreit. Das Eluat wurde auf dem NanoDrop 2000-Photometer auf die erreichte DNA-Konzentration überprüft und, sofern die DNA-Konzentration über 15 ng/µl lag, vor dem Zuführen in die Sanger-Sequenzierung entsprechend verdünnt. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem *BigDye Terminator Kit* nach Herstellerangaben und nach Umrechnung auf die entsprechend kleinen Volumina mit 2 µl *Premix*, 2 µl Puffer, 0,5 µl Primer, 1 µl Nuklease-freiem Wasser und 1 µl PCR-Produkt angesetzt. Der Sequenzieransatz wurde mit dem *NucleoSeq Kit* zur Entfernung von Oligonukleotiden nach Standardprotokoll des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde das Analysat auf eine 96-Well Platte geladen. Die Sequenzierung erfolgte am Genetic Analyzer 3500. Das folgende Sequenzierprogramm wurde gewählt:

1: 96 °C für 20 Sekunden

2: 53 °C für 15 Sekunden

3: 60 °C für 4 Minuten

Schritte 1-3 mit 26 Wiederholungszyklen, anschließend Kühlung auf 10 °C.

Der Sequenzieransatz wurde anschließend mit dem *NucleoSeq Kit* zur Entfernung von Oligonukleotiden nach Standardprotokoll des Herstellers aufgereinigt und das Analysat auf eine 96-Well Platte geladen. Die Sequenzierung erfolgte am Genetic Analyzer 3500 im „BigDye Sequencing“ Standardprogramm.

Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit FinchTV.

## **2.2.2. Untersuchungsmethoden auf Protein-Ebene**

### **2.2.2.1. Histologie**

Von formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die histologische Klassifikation der Adenokarzinome erfolgte nach Laurén und dem Mucin-Phänotyp. Das Tumorstadium aller Magenkarzinompatienten erfolgte nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation. In dieser Auflage werden zudem alle Tumore des ösophagogastralen Übergangs sowie 5 cm proximal der Magenschleimhaut als Tumoren des Ösophagus klassifiziert. Dies wurde bei der Auswertung berücksichtigt und die Patienten wurden dementsprechend reklassifiziert.

### **2.2.2.2. Herstellung von Tissue Micro Arrays**

Für die Herstellung von Tissue Micro Arrays (TMAs) wurden an den HE-gefärbten Schnittpräparaten Tumorareale gekennzeichnet und anschließend je drei 1,5 mm durchmessende Gewebestanden aus dem korrespondierenden Paraffinblock entnommen und in einen Empfänger-Paraffinblock (den eigentlichen TMA-Block) übertragen. Anschließend wurden 2 µm dicke Schnitte von den TMA-Blöcken angefertigt, mit HE-gefärbt und die erfolgreiche Übertragung tumorhaltigen Gewebes überprüft. Die insgesamt 21 TMA-Blöcke umfassten das gesamte Magenkarzinomkollektiv mit jeweils 5 Gewebeständen pro Fall.

### **2.2.2.3. Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten**

Neben den TMAs des gesamten Fallkollektivs wurden Flächenschnitte des MSI/MSS-Kollektivs gefärbt. Die 2 µm dicken Paraffinschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (2x Xylol, 2x

96% Äthanol, 2x 70% Äthanol, 2x 50% Äthanol und 2x dH<sub>2</sub>O.) entparaffiniert, rehydriert und anschließend in 10 mM Citratpuffer, pH 6,0 jeweils 10 Minuten bei 120 °C in einem Schnellkochtopf vorbehandelt. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten lang in TBS-Puffer gespült und die endogene Peroxidase mit Hydrogen Peroxide Block für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin erfolgte eine erneute dreimalige Spülung in 1x-TBS-Puffer und anschließend eine 5-minütige Inkubation mit Ultra-V-Block, danach eine zweimalige Spülung mit 1x-konzentrierten TBS-Puffer. Nach dieser Vorbehandlung erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern. Die Primärantikörper waren zuvor an geeigneten Kontrollgeweben in unterschiedlichen Verdünnungen etabliert worden. Die für die jeweiligen Antikörper zum bestmöglichen Färberesultat führenden Verdünnungen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Zur Verdünnung wurde Antibody Diluent verwendet. Die Paraffinschnitten wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zum Nachweis der Immunreaktion wurde Simple Stain Max PO, ein Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Polymer mit Affinität zu Primärantikörpern von sowohl Kaninchen als auch Maus, 30 Minuten lang auf den Schnitten bei Raumtemperatur inkubiert, erneut 3x mit TBS-Puffer gespült und dann mit Diaminobenzidin (DAB) als Peroxidase-Substrat 5 Minuten lang entwickelt. Danach wurde mit demineralisiertem Wasser gespült. Nach anschließender Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun für 1 Minute und folgendem Bläuen unter Leitungswasser, wurden die Schnitte wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und abschließend mit Pertex und einem Deckgläschen eingedeckt. Bei der Auswertung am Lichtmikroskop wurde die Immunreaktion auf einer ordinal skalierten Achse bewertet. In den histologischen Score fanden zweierlei Größen Einzug: zum einen die Intensität der Immunreaktion, bewertet auf einer Skala von 0 – 3, sowie der Prozentanteil der angefärbten Tumorzellen, bewertet auf einer Skala von 0 – 5 (→ Tabelle 10). Anschließend wurde ein Summenscore aus beiden Werten gebildet.



**Tabelle 9: Antikörperdaten und Verdünnungen für die Immunhistochemie**

Antikörper	Klonalität	Spezies	Immunogen <sup>¶</sup>	Lieferant	Katalog-nummer	Verdünnung	Kontrollgewebe
Drosha 1	p <sup>†</sup>	K*	nicht spezifiziert	abcam <sup>1</sup>	ab12286	1:800	Haut
Drosha 2	p <sup>†</sup>	Z <sup>°</sup>	nicht spezifiziert	abcam <sup>1</sup>	ab58589	1:50	Haut
Drosha 3	p <sup>†</sup>	K*	Aminosäuren 1324 – 1374 (Isoform 1)	Novus Biologicals <sup>2</sup>	NBP1-03349	1:2000	Haut
Drosha 4	m <sup>†</sup>	K*	um Aminosäure 549	CellSignaling <sup>3</sup>	3410S	1:200	Haut
GNAS1	p <sup>†</sup>	K*	nicht spezifiziert	LifeSpan <sup>4</sup>	LSB4007	1:150	Niere
WNK1	p <sup>†</sup>	K*	nicht spezifiziert	Acris <sup>5</sup>	AP07033PU-N	1:1000	Niere

© Immunogen lt. Herstellerangaben † polyklonal ‡ monoklonal \*Kaninchen ° Ziege

<sup>1</sup> abcam; Cambridge, UK      <sup>2</sup> Novus Biologicals; Littleton, CO, USA

<sup>3</sup> CellSignaling Technologies; Danvers, MA, USA <sup>4</sup> LifeSpan BioSciences; Seattle, WA, USA

<sup>5</sup> Acris; Herford

**Tabelle 10: Auswertungsschema IHC für Drosha- und WNK1-Färbung**

<b>Anteil anfärbbarer Tumorzellen</b>	<b>Färbeintensität { 0, 1, 2, 3 }</b>	<b>IHC-Score { 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 }</b>
keine	0	0
bis 10%	1	2
	2	3
	3	4
11% - 30%	1	2
	2	3
	3	4
31% - 50%	1	4
	2	5
	3	6
51% - 80%	1	5
	2	6
	3	7
über 80%	1	6
	2	7
	3	8

#### 2.2.2.4. Western Blots

##### 2.2.2.4.1. Herstellung der Proteinlysate

Aus gefrorenem Tumormaterial oder aus HEK-293-Zellpellets wurden jeweils etwa 100 µg Material entnommen und mit dem Ultra Turrax-Homogenisator für wenige Sekunden im ProteoJet Lysis Puffer, dem eine Proteaseinhibitor-Tablette gegen Autolyse zugesetzt wurde, homogenisiert. Anschließend wurde bei 16000 G für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verwendet.

##### 2.2.2.4.2. Messung der Protein-Konzentration

Für die Messung der Protein-Konzentration wurde das DC Protein Assay Kit nach Herstellerangaben genutzt. Die Messung erfolgte am Synergy Mx-Spektralphotometer bei 700 nm Wellenlänge.

##### 2.2.2.4.3. Elektrophorese

Die Precast-TGX-Acrylamid-Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer etwa halbvoll befüllt. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer für 10 Minuten bei 95 °C auf dem VWR-Digital-Heizblock erhitzt.

Die Gel-Taschen wurden dann mit 50 µg Proteinlösung und je 50 µl 2x Marker beladen.

Die Elektrophorese wurde für 30 Minuten bei 200 V durchgeführt. Bei Herauslaufen der sichtbaren Pufferfront aus dem Gel wurde die Elektrophorese beendet. Die Gele wurden entnommen und in dH<sub>2</sub>O gespült.

#### 2.2.2.4.4. Coomassie-Gelfärbung und Blotting

Eines der Gele wurde jeweils in Coomassie-Färbelösung über Nacht gefärbt und anschließend für 4 Stunden in Destaining-Lösung wieder entfärbt.

Die PVDF-Membranen wurden vor dem „Blotten“ in Methanol für 30 Sekunden gespült, anschließend in dH<sub>2</sub>O gewaschen und auf dem Rüttler für mindestens 10 Minuten in Blottingpuffer gelegt. Anschließend wurden die Membranen im „Sandwichprinzip“ (wie folgt: Vlies, Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, Filter, Vlies) in die Blotting-Kammer gelegt und die Kammer mit Blottingpuffer gefüllt. Das Blotting in der Kammer („Kassette“) erfolgte in vertikaler Aufstellung. Die Membranen wurden mit 3% BSA/TBS über Nacht blockiert. Anschließend wurde dreimalig für 10 Minuten mit 1x TTBS gespült. Anschließend erfolgte die Benetzung mit dem entsprechenden Primär-Antikörper. Hierzu wurde der jeweilige Antikörper in 3% BSA/TBS verdünnt. Die genutzten Antikörper und Konzentrationen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Inkubiert wurde für 60 Minuten auf dem Rüttler. Nach erneutem dreimaligen Spülen für 10 Minuten mit 1x TTBS wurde der 1:1000 in TTBS verdünnte, AP-konjugierte Sekundär-Antikörper für ebenfalls 60 Minuten auf dem Rüttler inkubiert. Das AP-Substrat wurde so lange auf den Membranen zur Inkubation belassen, bis die gewünschte Intensität der Immunfärbung erreicht war. Anschließend wurden die Membranen getrocknet.

**Tabelle 11: Antikörperdaten und Verdünnungen für die Western Blots**

Antikörper	Klonalität	Spezies	Immunogen <sup>†</sup>	Lieferant	Katalog-nummer	Verdünnung
Drosha 1	p <sup>†</sup>	K*	nicht spezifiziert	abcam <sup>1</sup>	ab12286	1:1000
Drosha 4	m <sup>†</sup>	K*	um Aminosäure 549	CellSignaling <sup>3</sup>	3410S	1:500

### **2.2.3. Statistische Auswertung**

Die immunhistochemischen Färberesultate und der Mutationsstatus wurden in Excel-Übersichtstabellen eingepflegt. Zur Auswertung wurde die Software SPSS v20.0 verwendet. Die immunhistochemischen Scores wurden mit den klinischen Daten der Tumorfälle korreliert. Hierbei wurden der Tau-Test nach Kendall und der exakte Test nach Fisher angewandt. Um die immunhistochemische Anfärbbarkeit und die klinischen Daten mit dem exakten Test nach Fisher korrelieren zu können, wurde zuvor eine Dichotomisierung in positive und negative Fälle bzw. Fälle hoher und Fälle niedriger Expression des IHC-gefärbten Proteins entlang des statistischen Medians der ordinal skalierten immunhistochemischen Scores durchgeführt. Für ordinal skalierte Kategorien wurde auf Kendall's tau-Test zurückgegriffen. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  festgelegt. Sofern für ein auf Korrelation zu prüfendes klinisches Merkmal für einen Fall nicht vorlag, bzw. nicht erhoben wurde, wurden die entsprechenden Fälle nicht in der Statistik berücksichtigt. Weiterhin wurden Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier erstellt.

Hieran wurde eine Signifikanzprüfung mittels Log-Rank-Test nach Mantel-Cox durchgeführt.

## 3 . E R G E B N I S S E

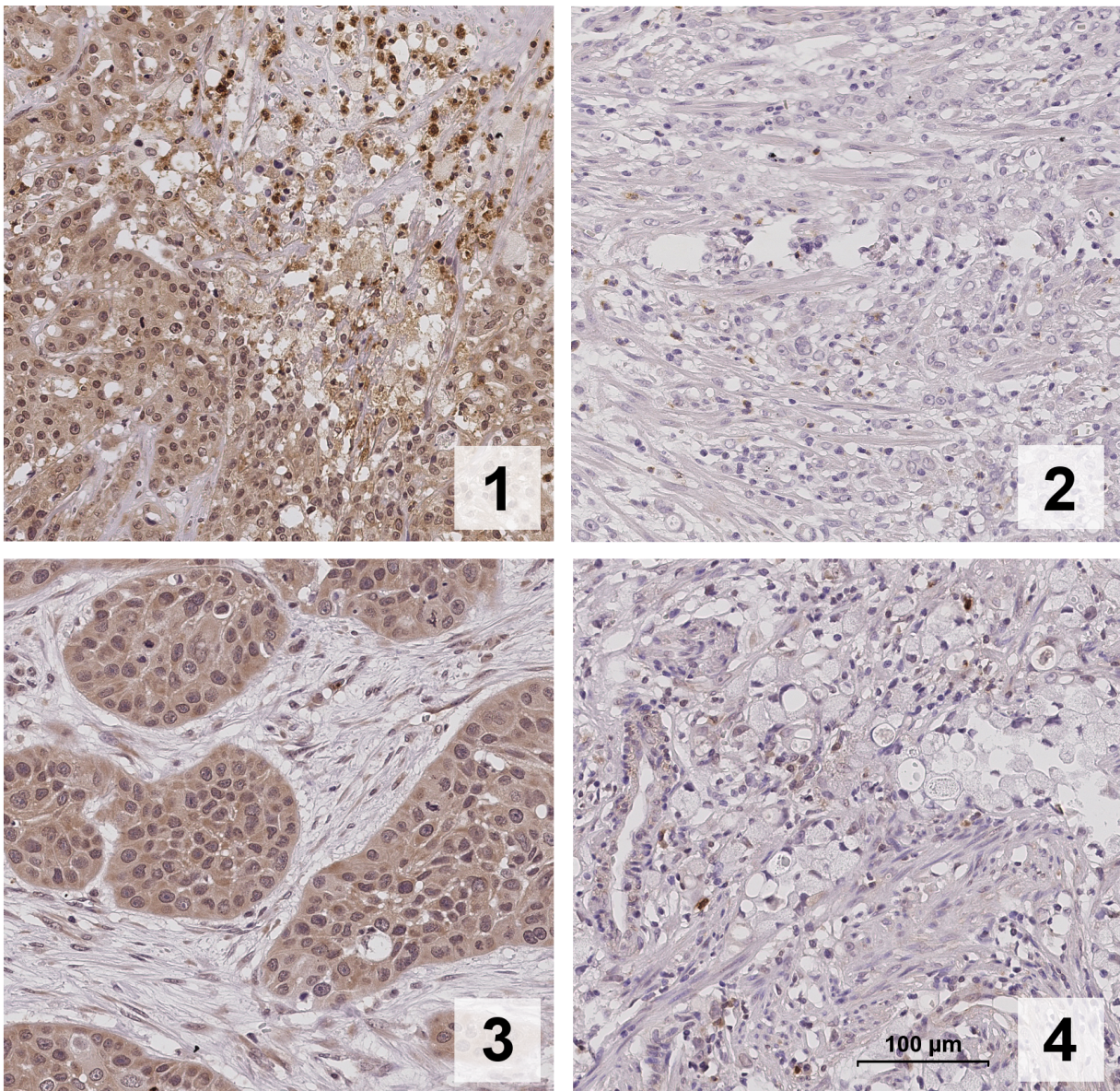
---

### **3.1. Überprüfung der pathobiologischen Relevanz von WNK1 beim Magenkarzinom**

#### **3.1.0. Literaturrecherche**

Die Sichtung der über PubMed<sup>41</sup> verfügbaren Literatur zur Datenlage Genom-weiter oder zielgerichteter Sequenzierung beim Magenkarzinom im April 2011 ergab eine im Vergleich zu einigen anderen Tumorentitäten noch recht überschaubare Datenlage. Vollständige Exom-, sowie Genomsequenzierungen aus Tumorzellen bzw. Tumorgewebe waren bis dahin nicht publiziert worden. Besonderes Augenmerk fiel auf die bereits im Einleitungsteil erwähnte Arbeit von Zang et al.<sup>27</sup>, dessen Arbeitsgruppe ein „Targeted Deep Sequencing“ von Tumorzellen aus 14 Zelllinien beim Magenkarzinom durchgeführt hatte. Untersucht wurden exonische Genregionen von 532 für Kinasen codierenden Genen. Unter den hierbei gefundenen über 300 bislang nicht beschriebenen („novel“) Mutationen fanden sich am häufigsten in den Genen *TTN* und *WNK1* mit 12/14 und 6/14 Zelllinien, gefolgt von *OBSCN* und *SPEG* mit 5/14 bzw. 4/14 Fällen, in denen Mutationen nachgewiesen werden konnten. Ins Verhältnis zur Genlänge gesetzt fielen die Anzahl der Mutationen in *TTN*, *OBSCN* und *SPEG* hinter *WNK1*. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde *WNK1* ausgewählt, um dessen potentielle tumorbologische Relevanz einmal auf Proteinebene immunhistochemisch zu prüfen.

### 3.1.1. Immunhistochemische Färbung von WNK1 am Gesamtkollektiv



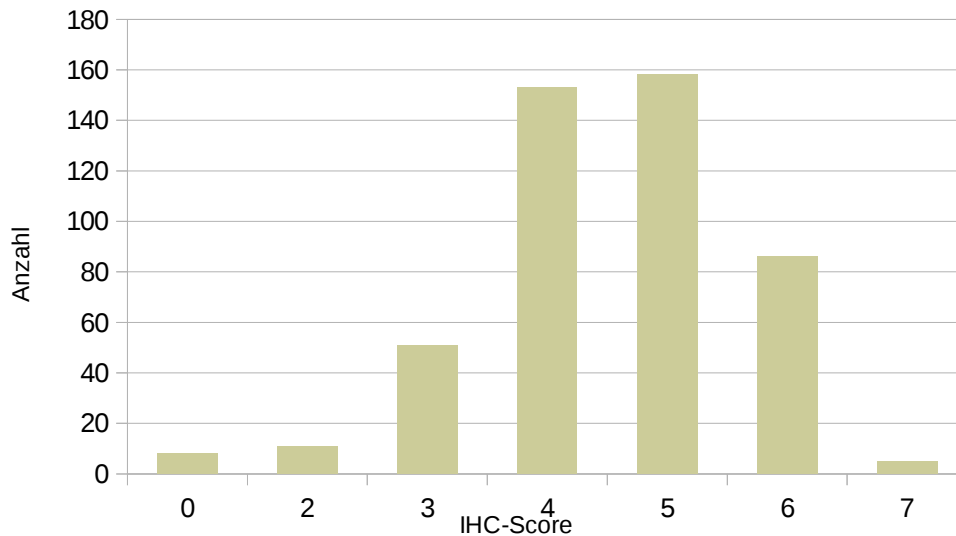
**Abbildung 3:** Darstellung vierer exemplarischer WNK1-gefärbter Fälle in der Immunhistologie. Die Immunreaktion ist diffus zytoplasmatisch (1 & 3). Eine starke Immunreaktion weisen auch Granulozyten auf, die somit eine interne Positivkontrolle darstellen. Originalvergrößerung 400x.

Von den insgesamt 611 Fällen im Gesamtkollektiv waren nach Färbung einer TMA-Schnittserie 472 Fälle auswertbar. Die immunhistochemische WNK1-Färbung an TMA-Schnitten ergab eine spezifische Immunreaktion von Tumorzellen in 77,3% der auswertbaren Fälle. Bei der Auswertung der TMAs fiel eine Verteilung der Immunscores mit Bevorzugung mittlerer Werte auf. Man beachte, dass es sich beim Immunscores um ein nominal skaliertes Merkmal handelt und somit Rückschlüsse auf die Form der Verteilung nur eingeschränkt zulässig sind.

**Tabelle 12: Übersicht über das WNK1-Färbeergebnis**

	IHC-Score	Anzahl [n]	Anteil [%]	Anteil valider [%]	kumulativ [%]
	0	8	1,3	1,7	1,7
	2	11	1,8	2,3	4,0
	3	51	8,3	10,8	14,8
Valide	4	153	25,0	32,4	47,2
Fälle	5	158	25,9	33,5	80,7
	6	86	14,1	18,2	98,9
	7	5	0,8	1,1	100,0
Gesamt		472	77,3	100,0	

Bei der Korrelationsprüfung zwischen Immunscore und einzelnen klinischen Merkmalen (→ Tabelle 12) ergibt sich eine signifikante Korrelation mit dem Mikrosatellitenstatus (p-Wert 0,022). Unter den 35 ausgewerteten MSI-Fällen erreichen 25 einen hohen WNK1-Score, während nur 10 einen geringen Score aufweisen. Weitere Auffälligkeiten im Sinne eines besonderen intrazellulären Verteilungsmusters der Immunreaktion war in der Mikroskopie nicht ersichtlich.



**Abbildung 4** Häufigkeitsverteilung der IHC-Scores innerhalb der WNK1-Färbung.

**Tabelle 12: Korrelation klin. Parameter mit dem dichotomisierten WNK1-IHC-Score**

Klinischer Parameter	Ausprägungen				Skalierung	p-Werte	
						Exakter Test nach Fisher	Kendall's Tau
Geschlecht	weiblich		männlich		nominal	0,637	
Altersgruppe	Patient < 68 Jahre		Patient ≥ 68 Jahre		nominal	0,462	
Lokalisation	proximal		distal		nominal	0,691	
Laurén-Klassifikation	intestinal	diffus	Mischtyp	unklass.	nominal	<u>0,001</u> <sup>✱</sup>	
Mucin-Typus	intestinal	gastrisch	Mischtyp	unklass.	nominal	<u>0,002</u> <sup>✱</sup>	
T-Kategorie	T1	T2	T3	T4	ordinal	0,235 <sup>✱</sup>	0,248 <sup>✱</sup>
N-Kategorie	N0	N1	N2	N3	ordinal	0,894 <sup>✱</sup>	0,782 <sup>✱</sup>
M-Kategorie	M0		M1		ordinal	0,413 <sup>✱</sup>	
TNM-Stadium	IA,B	IIA,B	IIIA,B,C	IV	ordinal	0,463 <sup>✱</sup>	0,820
N-Ratio	< 0,895		≥ 0,895		ordinal	0,713	
Grading	G1, G2		G3, G4		ordinal	0,195	
L-Kategorie	L0		L1		ordinal	0,455	
V-Kategorie	V0		V1		ordinal	0,296	
Helicobacter-Status	positiv		negativ		nominal	0,781	
EBV-Status	positiv		negativ		nominal	0,240	
Mikrosatellitenstatus	stabil (MSS)		instabil (MSI)		nominal	<u>0,022</u>	

**Tabelle 13: Mikrosatellitenstatus, aufgeschlüsselt nach WNK1-Score**

		WNK1-Score [n]		
		niedrig	hoch	
Mikrosatelliten-Status [n]	MSS	209	218	427
	MSI	10	25	35
		219	243	462



Weiterhin ergaben sich signifikante Zusammenhänge zwischen dem WNK1-Immunoscore und der Laurén-Klassifikation ( $p=0,001$ ) (→ Tabelle 12), sowie dem Mucin-Typ ( $p=0,002$ ).

Bei der näheren Betrachtung der Rohdaten (→ Tabelle 14) fällt es jedoch schwer, einen klaren Zusammenhang zwischen dem Laurén-Typ und der Höhe des IHC-Score zu schlussfolgern. Allenfalls scheinen Fälle, die als intestinale und diffuse Tumoren klassifiziert sind, eher einen niedrigen WNK1-Score zu erreichen, während unter den unklassifizierten Tumoren eher eine starke Expression zu beobachten ist.

**Tabelle 14: Laurén-Klassifikation, aufgeschlüsselt nach WNK1-Score**

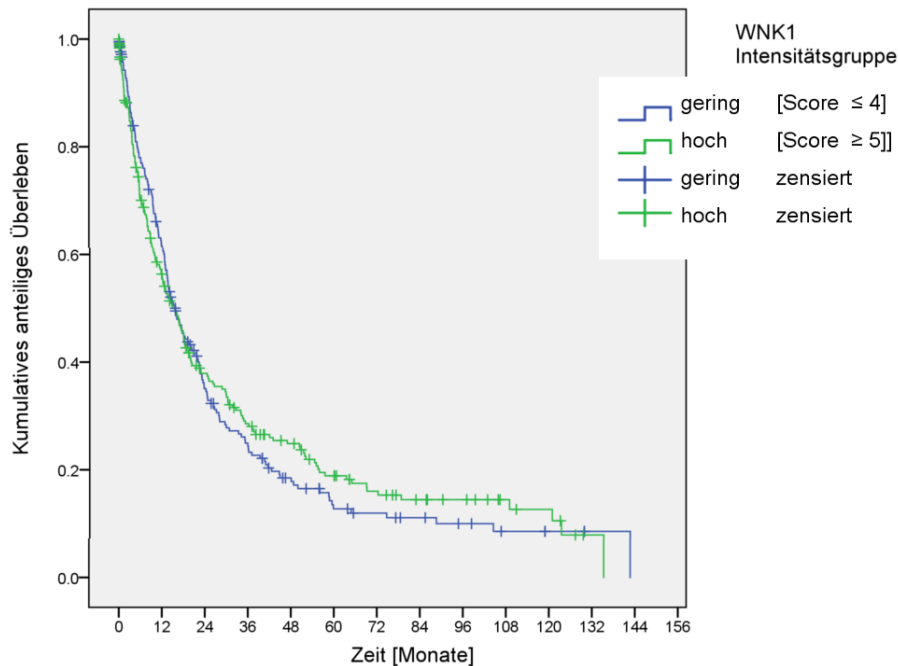
		WNK1-Score [n]		
		niedrig	hoch	
Laurén [n]	intestinal	100	142	242
	diffus	87	59	146
	Mischtyp	15	15	30
	unklass.	19	33	52
		221	249	470

Bei der Aufschlüsselung der Mucin-Typen (→ Tabelle 15) fällt ins Auge, dass Tumoren mit intestinalem Mucin-Typ eher starke WNK1-Expression zeigen, während dies auf Tumoren mit gastrischem und unklassifiziertem Mucin-Typ nicht zutrifft ( $p=0,002$ ).

**Tabelle 15: Mucin-Typus, aufgeschlüsselt nach WNK1-Score**

		WNK1-Score [n]		
		niedrig	hoch	
Mucin-Typus [n]	intestinal	43	78	121
	gastrisch	36	27	63
	Mischtyp	79	90	169
	unklass.	42	26	68
		200	221	421

In der Untersuchung der Überlebenszeit, abhängig vom Vorliegen eines hohen oder niedrigen WNK1-IHC-Scores in der graphischen Darstellung nach Kaplan-Meier (→ Abb. 5), konnte kein Unterschied beim zeitabhängigen Gesamtüberleben der Teilpopulationen festgestellt werden.



**Abbildung 5:** Darstellung der kumulativen Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier für das in Fälle hoher und niedriger WNK1-Expression dichotomisierte Patientenkollektiv.

### **3.2. Erstes Zwischenfazit**

Zusammenfassend lässt sich anhand der Ergebnisse des ersten hier verfolgten Ansatzes kein Hinweis finden, dass die Expression von WNK1 in einem größeren Kollektiv von Magenkarzinomen klinisch relevante Rückschlüsse auf klinische Daten, insbesondere die Überlebensprognose, sowie auch histopathologische Eigenschaften des Tumors zulässt. Zum einen stellt sich die Frage, ob die von Zang et al. berichtete hohe Mutationsfrequenz repräsentativ für ein klinisches Kollektiv ist, zum anderen bleibt unklar, ob putative Mutationen überhaupt zu relevanten Alterationen auf Proteinebene führen. Zum Zeitpunkt dieser Studie waren nur sehr wenige Daten von Krebsgenomsequenzierungen des Magenkarzinoms bekannt. Die literaturgestützte Auswahl putativer Zielgene sollte durch eigene Sequenzierungsergebnisse ergänzt werden. Eine anschließende Validierung auf mehreren Ebenen wurde begonnen, um zusätzliche Erkenntnisse bzgl. der Validität der NGS-Methodik zu gewinnen und bestenfalls therapeutisch und prognostisch relevante Mutationen aufzudecken.

### **3.3. Überprüfung von SNPs aus einem WES-Ansatz**

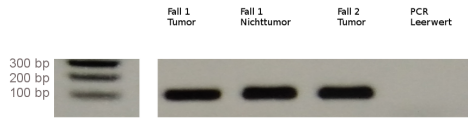
Als Proof-of-Principle-Ansatz wurden Tumoren von zwei Patientinnen auf NGS-Plattformen sequenziert (WGS und WES).

Wieder war das Ziel, putative tumorbiologisch relevante Mutationen/SNPs unabhängig zu validieren. Im ersten Ansatz erfolgte die Überprüfung ausgesuchter SNPs aus dem WES-Ansatz (→ Teil Material; die Ergebnisse dieser Sequenzierung sind Gegenstand der Doktorarbeit von Frau Daniela Esser und werden deshalb hier nicht gezeigt). Nach restriktiver Filterung verblieben 104 Mutationen, von denen nach händischer Selektion schließlich acht anhand ihrer plausibel erscheinenden Rolle als mögliche Onkogene oder Tumorsuppressorgene (NCBI, SwissProt) für die Verifizierung durch Pyro-Sequenzierung ausgewählt wurden. Diese sind in Tabelle 16 zusammenfassend dargestellt. Neben den acht in beiden Tumorfällen per NGS nachgewiesenen Mutationen wurde auch das Vorliegen der Substitution c.7507A>C p.K2242Q (RefSeq<sup>49</sup> NM\_018979) in *WNK1*, welcher im NGS-Ansatz im Tumorfall 1 nachgewiesen werden konnte, verifiziert.

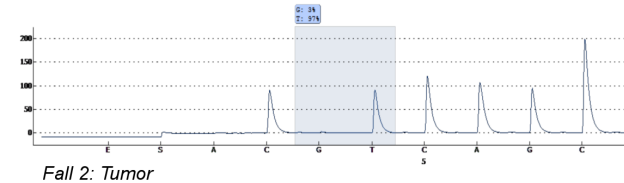
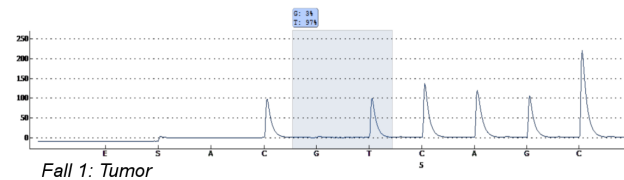
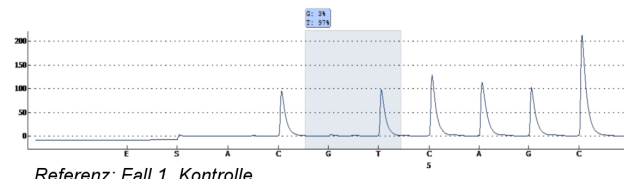
Dafür wurde DNA der kryokonservierten und WES-analysierten Gewebeproben für jede der gefundenen Mutationen mit entsprechend flankierenden Primern einer PCR zugeführt und das Produkt anschließend mit spezifischen Sequenzierprimern mit Hilfe der Pyro-Sequenzierung überprüft.

**MADD**

<u>Mutation</u>	cDNA Protein	c.730T>G (NM_003682) p.L180R		
<u>Referenzsequenz</u>	gDNA Protein	CTC L	AGC S	C H
<u>Sequenz Mutante</u>	gDNA Protein	CGC R	AGC S	C H
<u>Detektierte Sequenz (gDNA)</u>	Referenz Fall 1, Kontrolle Fall 2, Kontrolle	CTC CTC CTC	AGC AGC AGC	C C C



Agarosegel post PCR



**Abbildung 6:** Exemplarische Darstellung des Ergebnisses der Pyro-Sequenzierung anhand der *MADD*-Mutation c.730T>G (Referenz-Sequenz NM\_003682). Links Zusammenschau der Nukleotidsequenzen Wildtyp und Mutante, sowie des Agarosegels mit DNA-Amplifikat, rechts Darstellung der Pyrogramme. Die Detektion der Mutation konnte nicht reproduziert werden, was auch für die Mutationen in *EPHA4*, *HOXC11*, *ING3*, *MADD*, *PAX5*, *RNF43* und *TLR1*, sowie die nur für Tumor 1 im WES detektierte Mutation in *WNK1* gilt.

Die Überprüfung der WES-Daten ergab bei keiner der 8 geprüften Mutationen in *ADAM20*, *EPHA4*, *HOXC11*, *ING3*, *MADD*, *PAX5*, *RNF43* und *TLR1* eine Übereinstimmung. Als Wildtyp-Kontrolle wurde jeweils Nichttumor-DNA von Fall 1 verwendet. Ebenfalls nicht verifiziert werden konnte die im WES ausschließlich für den Fall Tumor 1 detektierte Mutation in *WNK1*. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die überprüften SNPs und die zugrundeliegenden Coverages, sowie Angaben der SNP-unterstützenden Reads innerhalb der NGS-Datenmenge. Als Konsequenz führte die Falsifikation aller geprüfter SNPs zur Revision der bis dahin hier angewandten NGS-Methodik und zog die ergänzende Durchführung eines Whole Genome Sequencing nach sich.

**Tabelle 16: Synopsis über die Funktion der Gene, in denen WES-detektierte Mutationen überprüft wurden**

Gen	Funktion
<i>ADAM20</i>	Codiert für ein membranständiges Protein mit Dystegrin- und Metalloprotease-Domäne, die eine Funktion in Zell-Zell, sowie Zell-Zellmatrix-Interaktionen vermuten lässt. <i>ADAM20</i> wird in Magenschleimhautzellen, die mit <i>Helicobacter pylori</i> infiziert sind, häufiger als von nicht-infizierten Zellen exprimiert. Auch in Magenkarzinomen ist eine stärkere Expression signifikant häufiger zu beobachten. <sup>52</sup>
<i>EPHA4</i>	Rezeptortyrosinkinase, deren Expression beim Magenkarzinom mit hoher Invasionstiefe, hohem Grad an Lymphknoteninvasion, hohem Erkrankungsstadium und schlechtem Gesamtüberleben assoziiert ist. EphA4-Expression wird als unabhängiger prognostischer Faktor und als mögliches Ziel für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern diskutiert. <sup>53</sup>
<i>HOXC11</i>	<i>HOXC11</i> ist ein Mitglied der Homeobox-Genfamilie. <i>HOXC11</i> ist in 5-Fluorouracil-sensitiven Magenkarzinom-Zelllinien zumeist herunterreguliert, während die Expression in den 5-Fluorouracil-resistenten Zelllinien eher erhöht ist. <sup>54</sup>
<i>ING3</i>	Wahrscheinlich spielen ING-Proteine eine Rolle als Rezeptoren und Signalübermittler für Phosphoinositid-Signalmoleküle. Somit sind Einflüsse auf die Transkriptionsregulation, Zellproliferation, Seneszenz und Apoptose wahrscheinlich. Beim Kolorektalen Karzinom ist <i>ING3</i> auf RNA- und Proteinebene im Vergleich zu normaler Schleimhaut überexprimiert. <sup>55</sup>
<i>MADD</i>	Über die Aktivierung von Rab GTPasen spielen Genprodukte von <i>MADD</i> eine Rolle in zellendifferenzierungs- und regulations-relevanten Signalwegen. Eine Unterexpression bei Magenkarzinomzellen verglichen mit normalen Schleimhautzellen ist auf RNA-Ebene vorbeschrieben. Die Expression zeigt eine signifikante Assoziation zu geringerem Gesamtüberleben. <sup>56</sup>
<i>PAX5</i>	Transkriptionsfaktor mit wahrscheinlicher Relevanz für die Zelldifferenzierung der B-Zellreihe, sowie des Nervensystems. Eine Hypermethylierung in der Promoterregion von <i>PAX5</i> ist beim Magenkarzinom mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. <sup>57</sup>
<i>RNF43</i>	Codiert für eine transmembranäre Ubiquitinligase, vermittelt somit über Wnt/ $\beta$ -Catenin Einflüsse auf Proliferation und Zelldifferenzierung. Eine Herabregulation von <i>RNF43</i> ist beim Magenkrebs mit fortgeschrittenem Tumorstadium und geringerem Gesamtüberleben assoziiert. <sup>58</sup>
<i>TLR1</i>	Codiert für Protein aus der Familie der Toll-like-Rezeptoren, das in der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt. Ligandenbindung führt indirekt zu NF-kappa-B-Aktivierung und Zytokinproduktion. Beim Adenokarzinom des Ösophagus ist <i>TLR1</i> im Vergleich zu normaler Schleimhaut überexprimiert. <sup>50</sup>
<i>WNK1</i>	Codiert für eine Serin/Threonin-Kinase mit gewebespezifisch entweder zytoplasmatischer oder membranständiger intrazellulärer Lokalisation. Über den MAP-Kinase-Signalweg kann sowohl Proliferation, als auch Apoptose ausgelöst werden. <sup>30,51</sup> Im Zebrafisch-Modell ergeben sich Hinweise dafür, dass <i>WNK1</i> Mediator in der VEGF-vermittelten Angiogenese ist. <sup>31</sup>

**Tabelle 17: Zusammenfassung über die Ergebnisse der Überprüfung der WES-detektierten Mutationen durch Pyro-Sequenzierung**

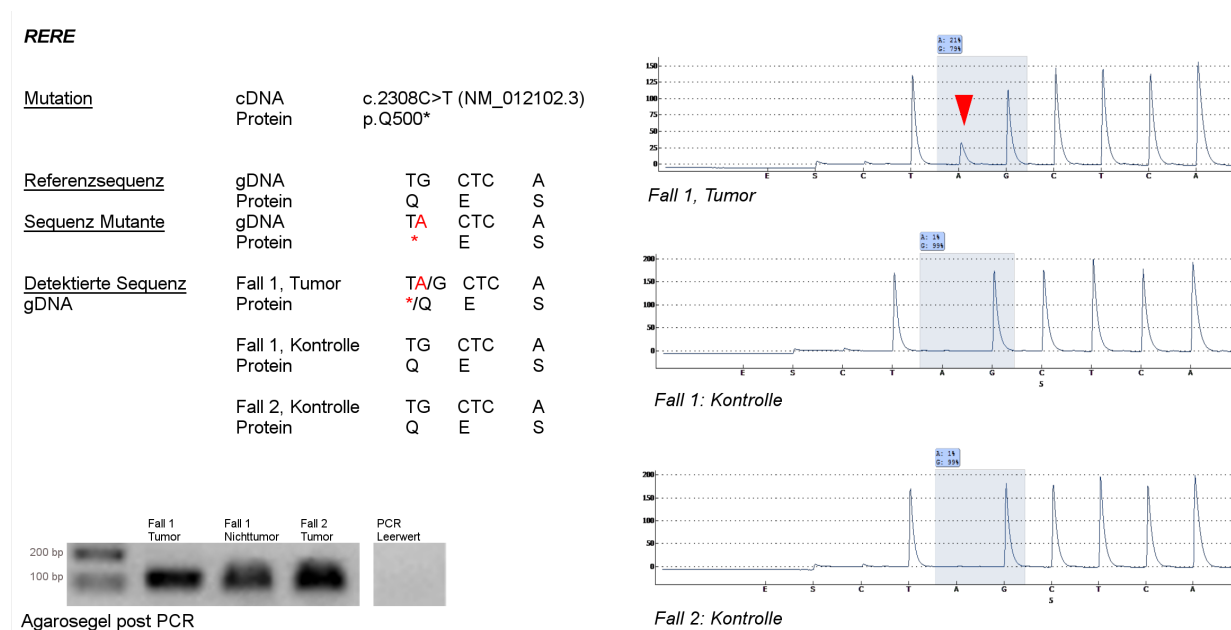
Gen	Lokalisation genomisch (GRCh37/hg19) <sup>¶</sup>	Lokalisation Protein (UniProt <sup>60</sup> -Referenz)	Lokalisation Gen-bezogen (NCBI-RefSeq <sup>50</sup> )	Coverage		SNP-Reads		Mutation verifiziert		
				Fall 1, Tumor	Fall 2, Tumor	Fall 1, Tumor	Fall 2, Tumor	Fall 1, Tumor	Fall 2, Tumor	Fall 1, Kontrolle
<i>ADAM20</i>	chr14:g.70990319C>A	p.D386Y (O43506-1)	c.1501G>T (NM_003814)	44	40	11	6	nein	nein	nein
<i>EPHA4</i>	chr2:g.222428603G>T	p.S224Y (P54764-1)	c.819C>A (NM_004438)	98	68	15	9	nein	nein	nein
<i>HOXC11</i>	chr12:g.54369186C>G	p.P302A (O43248)	c.1020C>G (NM_014212)	15	12	5	4	nein	nein	nein
<i>ING3</i>	chr7:g.120614861C>G	p.T407S (Q9NXR8)	c.1354C>G (NM_019071)	26	26	9	6	nein	nein	nein
<i>MADD</i>	chr11:g.47296590T>G	p.L180R (Q8WVG6)	c.730T>G (NM_003682)	53	40	9	9	nein	nein	nein
<i>PAX5</i>	chr9:g.36966598C>A	p.R243M (Q02548)	c.1185G>T (NM_016734)	18	15	5	4	nein	nein	nein
<i>RNF43</i>	chr17:g.56439928A>G	p.C222R (Q68DV7)	c.1615T>C (NM_017763)	25	12	6	4	nein	nein	nein
<i>TLR1</i>	chr4:g.38800365C>A	p.D30Y (Q15399)	c.362G>T (NM_003263)	26	37	5	7	nein	nein	nein
<i>WNK1</i>	chr12:g.1017096A>C	p.K2242Q (Q9H4A3)	c.7379A>C (NM_018979)	32	kein SNP	6	kein SNP	nein	nicht überprüft	nein

<sup>¶</sup> Lokalisationsangaben bezogen auf: UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly<sup>59</sup>

### 3.4. Überprüfung von SNPs aus einem um ein WGS erweiterten WES-Ansatz

Das nach der Falsifikation der Mutationsdaten aus dem WES durchgeführte WGS lieferte weitere Daten, die vergleichend bzw. zusätzlich zur WES-Rohdatenmenge analysiert wurden. In diesem zweiten Ansatz der Datenanalyse wurden die Filterparameter so gewählt, dass erneut mindestens 5% der Reads einen SNP unterstützten und nur diejenigen Reads beachtet werden, die ein geringes „Hintergrundrauschen“ anderer Fluoreszenzsignale in der Sequenzierung aufwiesen (HQ-Reads). Insbesondere wurden nur SNPs gewertet, deren Detektion sowohl im WES, als auch in WGS erfolgt war.

Nach der abschließenden Datenanalyse wurden händisch vier Varianten für Tumor 1 und eine Deletion für Tumor 2, anhand ihrer Lage in tumorbiologisch als relevant angenommenen Genen, zur weiteren Überprüfung durch Sequenzierung und/oder Immunhistochemie ausgewählt. Die SNPs in *RERE*, *TACC2* und *TYRO3* konnten in eindeutiger Weise mittels Pyro-Sequenzierung reproduziert werden.

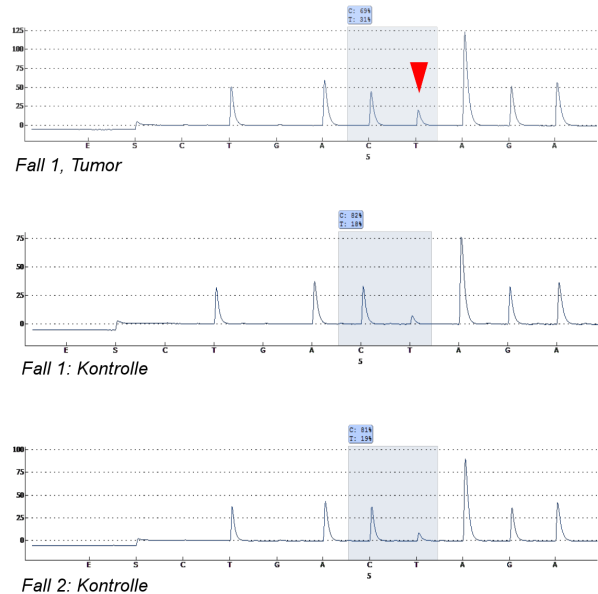
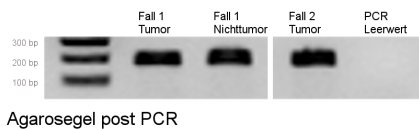


**Abbildung 7:** Darstellung des Ergebnisses der Pyro-Sequenzierung der *RERE*-Mutation c.2308C>T (RefSeq<sup>49</sup> NM\_012102). Links Zusammenschau der Nukleotidsequenzen und korrespondierenden Proteinsequenzen in Wildtyp und Mutante, sowie des Agarosegels mit DNA-Amplifikat. Rechts „Pyrogramme“. Die Mutation konnte im Pyro-Assay bestätigt werden.

Im Falle der Pyro-Sequenzierung für den *DROSHA*-SNP c.3589C>T (NM\_001100412) zeigte sich das stärkste Signal im Fall Tumor 1, jedoch war auch jeweils ein schwaches SNP-unterstützendes Signal in den Proben von Nichttumor-Gewebe von Fall 1 und Fall 2 nachweisbar. Aufgrund der Uneindeutigkeit auch nach der Wiederholung mit anderen DNA-Aliquots fand im Anschluss ergänzend eine Sanger-Sequenzierung statt.

**DROSHA**

<u>Mutation</u>	DNA Protein	c.3589C>T (NM_001100412) p.Q1052*		
<u>Referenzsequenz</u>	DNA Protein	CTA L	CAA Q	GAG E
<u>Sequenz Mutante</u>	DNA Protein	CTA L	TAA X	GAG E
<u>Detektierte Sequenz</u>	Fall 1, Tumor Protein	CTA L	C/TAA Q/X	GAG E
	Fall 1, Kontrolle Protein	CTA L	C/TAA Q/X	GAG E
	Fall 2, Kontrolle Protein	CTA L	C/TAA Q/X	GAG E

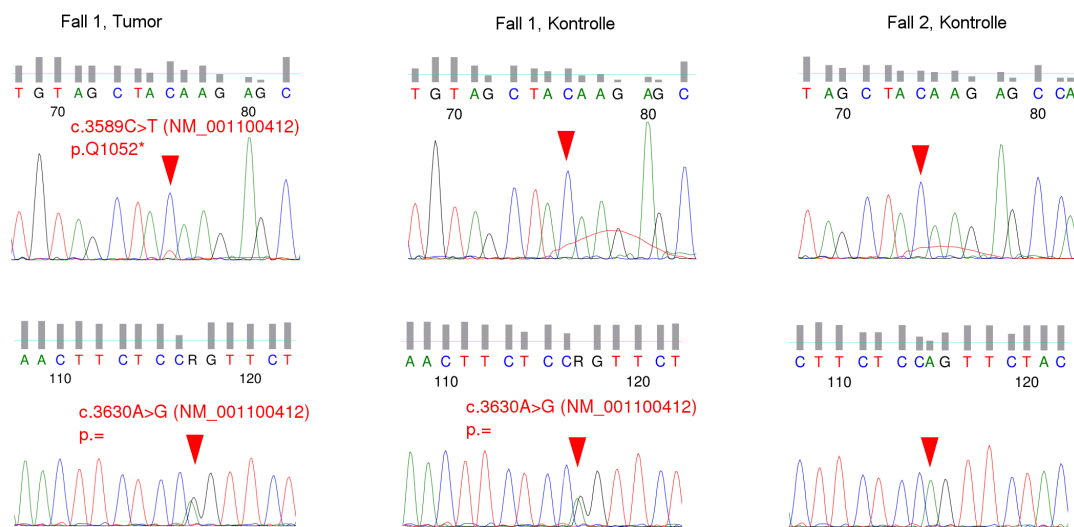


**Abbildung 8:** Darstellung des Ergebnisses der Pyro-Sequenzierung der *DROSHA*-Mutation c.3589C>T (NM\_001100412) auf gDNA-Ebene. Links Zusammenschau der Nukleotidsequenzen und korrespondierenden Proteinsequenzen in Wildtyp und Mutante sowie des Agarosegels mit gDNA-Amplifikat. Rechts „Pyrogramme“. Die Mutation konnte im Pyro-Assay bestätigt werden, wenn auch mit geringer Signalintensität. Da auch in der Kontrolle aus Fall 1 und Fall 2 (jeweils Nichttumor-Gewebe) schwache Peaks nachweisbar sind, fand ergänzend eine Sanger-Sequenzierung statt.

In der Sanger-Sequenzierung konnte das Vorhandensein der Mutation c.3589C>T neben einem stärkeren Signal der Wildtyp-Sequenz nachgewiesen werden. Als Zufallsbefund konnte der Polymorphismus c.3630A>G (chr5:31423007T>C, Referenzgenom GRCh37/hg19) für Tumor- und Kontroll-Gewebe von Fall 1 nachgewiesen werden. Die Datenbank ExAC<sup>60</sup> gibt für den Polymorphismus eine Allelfrequenz von 0,3302 in der untersuchten Gesamtbevölkerung an. Für die europäische Subgruppe beträgt die Frequenz 0,263.



Das Vorhandensein der überprüften Mutation auf gDNA-Ebene wurde somit durch zwei unabhängige Sequenzierverfahren verifiziert. Da durch den SNP ein vorzeitiger Kettenabbruch bei der Protein-synthese zu erwarten ist, fand anschließend eine qRT-PCR der korrespondierenden mRNA statt, um die so synthetisierte cDNA ebenfalls sequenzieren zu können. Im Anschluss wurde erneut Pyro-sequenziert.



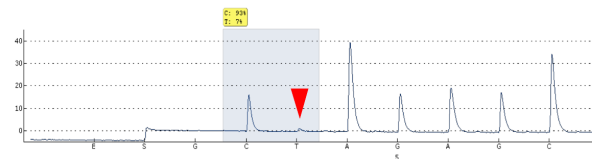
**Abbildung 9:** Zusammenfassende Darstellung der Elektropherogramme der Sanger-Sequenzierung. Visualisierung mit FinchTV. In der Überprüfung von Tumor 1 zeigt sich neben dem Cystin-Peak ein schwächerer, aber eindeutiger Thymin-Peak, der den gesuchten SNP c.3589C>T (NM\_001100412) bestätigt.

Als Zufallsbefund zeigt sich in Fall 1 das Vorliegen des vorbeschriebenen stillen Polymorphismus c.3630A>G (NM\_001100412).

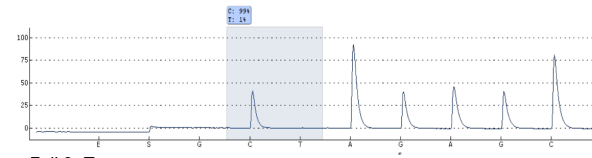
Um die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen, wurde eine RT-PCR nach dem ARMS-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde wie beschrieben (→ 2.2.1.2) eine mutationsspezifische ARMS-PCR etabliert und die Amplifikate im Agarosegel dargestellt. Hierdurch konnte die Mutation auf cDNA-Ebene mit einem weiteren unabhängigen Verfahren verifiziert werden.

**DROSHA**

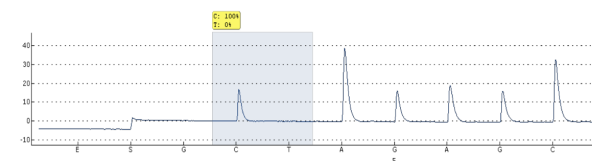
Mutation	cDNA Protein	c.3589C>T (NM_001100412) p.Q1052*		
<u>Referenzsequenz</u>	cDNA Protein	CAA Q	GAG E	CC P
<u>Sequenz Mutante</u>	cDNA Protein	TAA *	GAG E	CC P
<u>Detektierte Sequenz</u>	Fall 1: Tumor Protein	C/TAA Q/*	GAG E	CC P
	Fall 2: Tumor Protein	CAA Q	GAG E	CC P
	Fall 1: Kontrolle Protein	CAA Q	GAG E	CC P
	Fall 2: Kontrolle Protein	CAA Q	GAG E	CC P



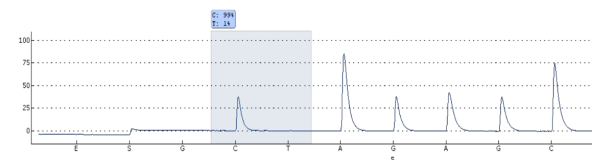
Fall 1: Tumor



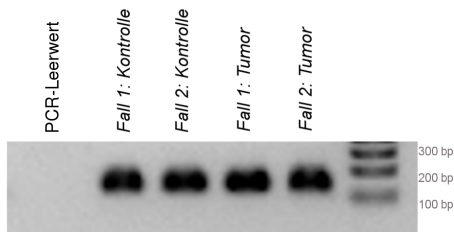
Fall 2: Tumor



Fall 1: Kontrolle

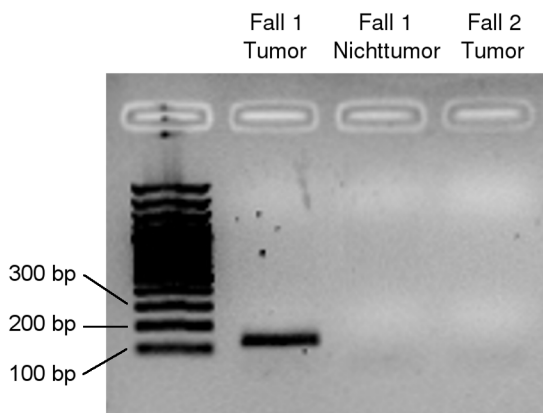


Fall 2: Kontrolle



Agarosegel post PCR

**Abbildung 10:** Darstellung des Ergebnisses der Pyro-Sequenzierung des cDNA-Transkripts aus der RT-PCR. Der SNP c.3589C>T (NM\_001100412) konnte auch auf mRNA-Ebene verifiziert werden, allerdings in der Pyro-Sequenzierung nur mit sehr schwacher Signalintensität.



**Abbildung 11:** Darstellung des Ergebnisses mutationspezifischen PCR im Agarosegel. Die Mutation c.3589C>T (NM\_001100412) konnte spezifisch amplifiziert werden, wie im Agarosegel erkenntlich.

**Tabelle 18: Synopsis über die Funktion der Gene, in denen WGS-detektierte Mutationen überprüft wurden**

Gen	Funktion
<i>DROSHA</i>	Drosha ist eine RNase, die die Spaltung von pri-miRNA zu pre-miRNA vermittelt und somit in der Prozessierung von miRNAs eine Schlüsselrolle einnimmt. Über Interaktion mit dem 3'-UTR-Ende der mRNA nimmt die mature miRNA über vielfältige Interaktionen Einfluss auf die Translation und somit auch Zelldifferenzierung und -proliferation. <sup>63</sup> Eine Überexpression von Drosha auf Proteinebene beim Magenkarzinom ist bekannt, ebenso wie diese für einzelne spezifische miRNAs belegt ist. Auch ein Zusammenhang zwischen schlechtem Gesamtüberleben und niedriger bzw. fehlender Drosha-Expression im Zytoplasma besteht. <sup>62</sup> Auch beim Nasopharynxkarzinom ist eine niedrige Expression mit schlechterem Gesamtüberleben assoziiert. <sup>61</sup>
<i>GNAS1</i>	Codiert für alpha-Untereinheit des G <sub>s</sub> -Proteins, welche ein GTP-abhängiger Aktivator der Adenylatcyclase ist. Das Vorhandensein des relativ häufigen Polymorphismus T393C ist mit einem verkürzten Gesamtüberleben beim Magenkarzinom assoziiert. <sup>64</sup>
<i>RERE</i>	Protein mit charakteristischer Arginin-Glutaminsäure-Wiederholungs-Domäne. Spielt eine Rolle bei der Repression der Transkription von mRNA in der Ontogenese. Hohe RERE-Expression ist beim Prostatakarzinom mit einer erhöhten Rate an Rezidiven assoziiert. <sup>65</sup>
<i>TACC2</i>	Protein interagiert mit Zentrosomen und Mikrotubuli. Somit hat es einen vielschichtigen Einfluss auf zelluläre Regulationsmechanismen. Eine erhöhte Expression ist beim Brustkrebs hochsignifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. <sup>66</sup>
<i>TYRO3</i>	Codiert für eine Rezeptortyrosinkinase mit potenziell onkogenem Einfluss. TYRO3-Expression spielt eine Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Transition, welche im Entstehungsprozess von Malignomen im Verdauungstrakt eine Rolle spielt. Beim Kolonkarzinom ist eine Korrelation zwischen TYRO3-Überexpression und Tumorwachstum und Metastasenbildung in der Maus beschrieben. Im Tiermodell bewirkt die Behandlung mit TYRO3-gerichteten Antikörpern ein verbessertes Ansprechen auf gängige Chemotherapeutika. <sup>67</sup>

**Tabelle 19: Zusammenfassung über die Ergebnisse der Überprüfung WGS-detektierter Mutationen durch Pyro-Sequenzierung**

Gen	Lokalisation genomisch <sup>¶</sup>	Lokalisation	Lokalisation	Nachweis über NGS in	HQ- Coverage		HQ- SNP-/del- Reads		Nachweis über Pyro-Sequenzierung		
		Protein (UniProt <sup>68</sup> -Refe- renz)	cDNA (NCBI-RefSeq <sup>49</sup> )		WES	WGS	WES	WGS	Tumor 1	Tumor 2	Kontrolle 1
<i>DROSHA</i>	chr5:g.31423048 G>A	p.Q1052* (Q9NRR4-4)	c.3589C>T (NM_001100412)	Tumor 1	13	43	4	11	ja <sup>‡</sup>	nein	nein
<i>TYRO3</i>	chr15:g.41860451G>A	p. R333H (Q06418)	c.1234G>A (NM_006293)	Tumor 1	34	37	6	6	ja	nein	nein
<i>RERE</i>	chr1:g.8424848G>A	p.Q500* (Q9P2R6)	c.2308C>T (NM_012102)	Tumor 1	4	18	2	4	ja	nein	nein
<i>TACC2</i>	chr10:g.123971211C>T	p.T2424M (O95359)	c.7631C>T (NM_206861)	Tumor 1	30	41	4	6	ja	nein	nein
<i>GNAS1</i>	chr20:g.57429638 - 57429640delGAT	p.440delD (Q5JWF2-1)	c.1613-1615delGAT (NM_080425)	Tumor 2	1	16	0	3	Nicht überprüft		

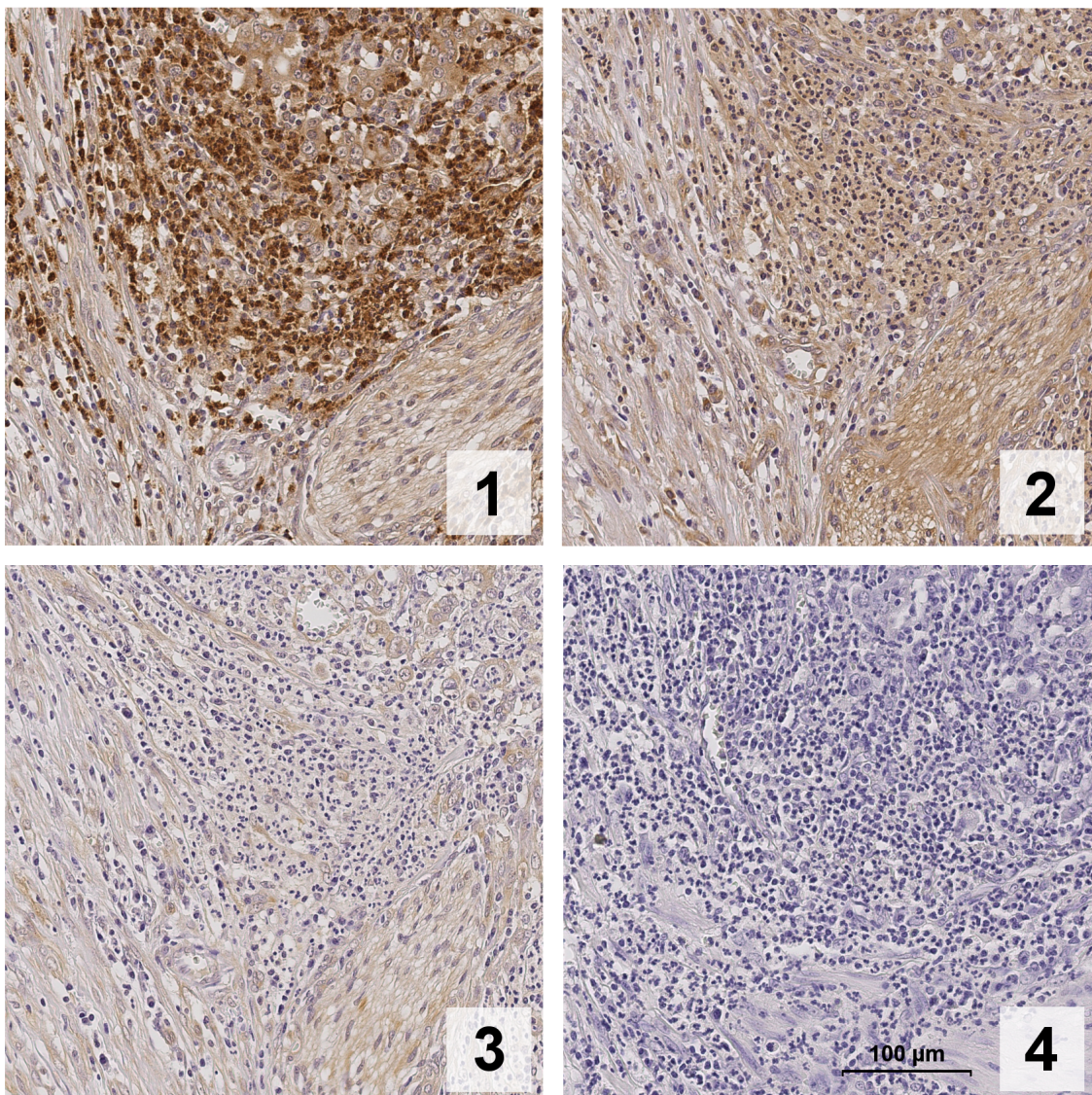
<sup>¶</sup> Lokalisationsangaben bezogen auf: UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly<sup>59</sup>

<sup>‡</sup> zusätzlich durch Sanger-Sequenzierung

### 3.4.1. Immunhistochemische Färbung von Drosha an einem Kollektiv aus 40 Fällen

Nach Verifikation der in Tumor 1 nachgewiesenen *DROSHA*-Mutation c.3589C>T

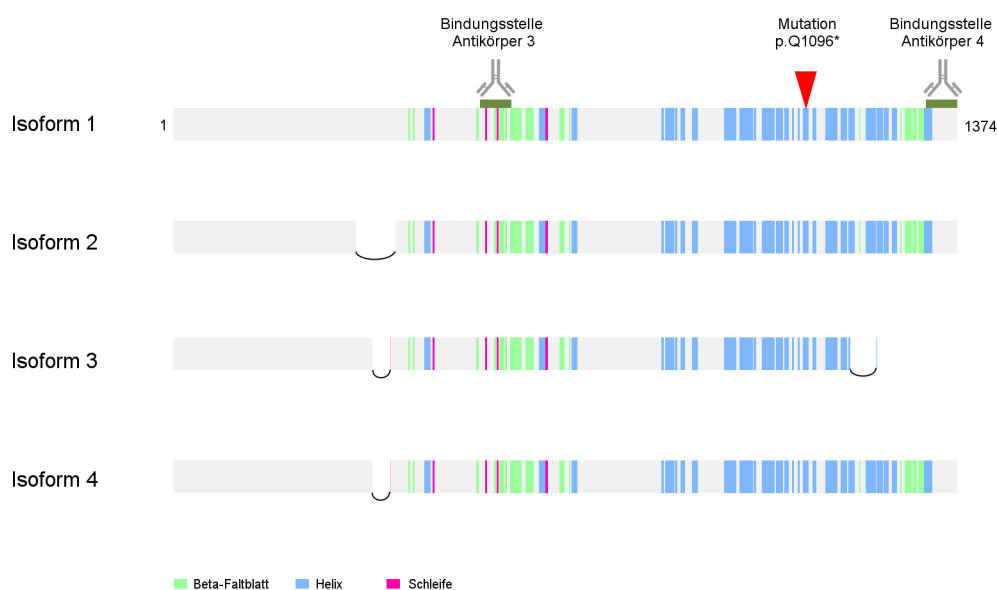
(NM\_001100412.1) p.Q1052\* auf Ebene von gDNA und mRNA sowie vor dem Hintergrund der bekannten Überexpression im Magenkarzinom<sup>69</sup> erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit zunächst nur einem kommerziell erhältlichen Antikörper. Bei sich abzeichnender fehlender Spezifität der erreichten Färbung wurden 3 weitere Antikörper unterschiedlicher Hersteller erprobt (→ siehe Tabelle 9). Die Auswertung erfolgte für alle 4 Antikörper auf dem 40-Fälle-Kollektiv (→ siehe Tabelle 5), bestehend aus 20 MSI- und 20 MSS-Fällen (→ siehe Abb. 12 - 14, Tabellen 20 – 23).



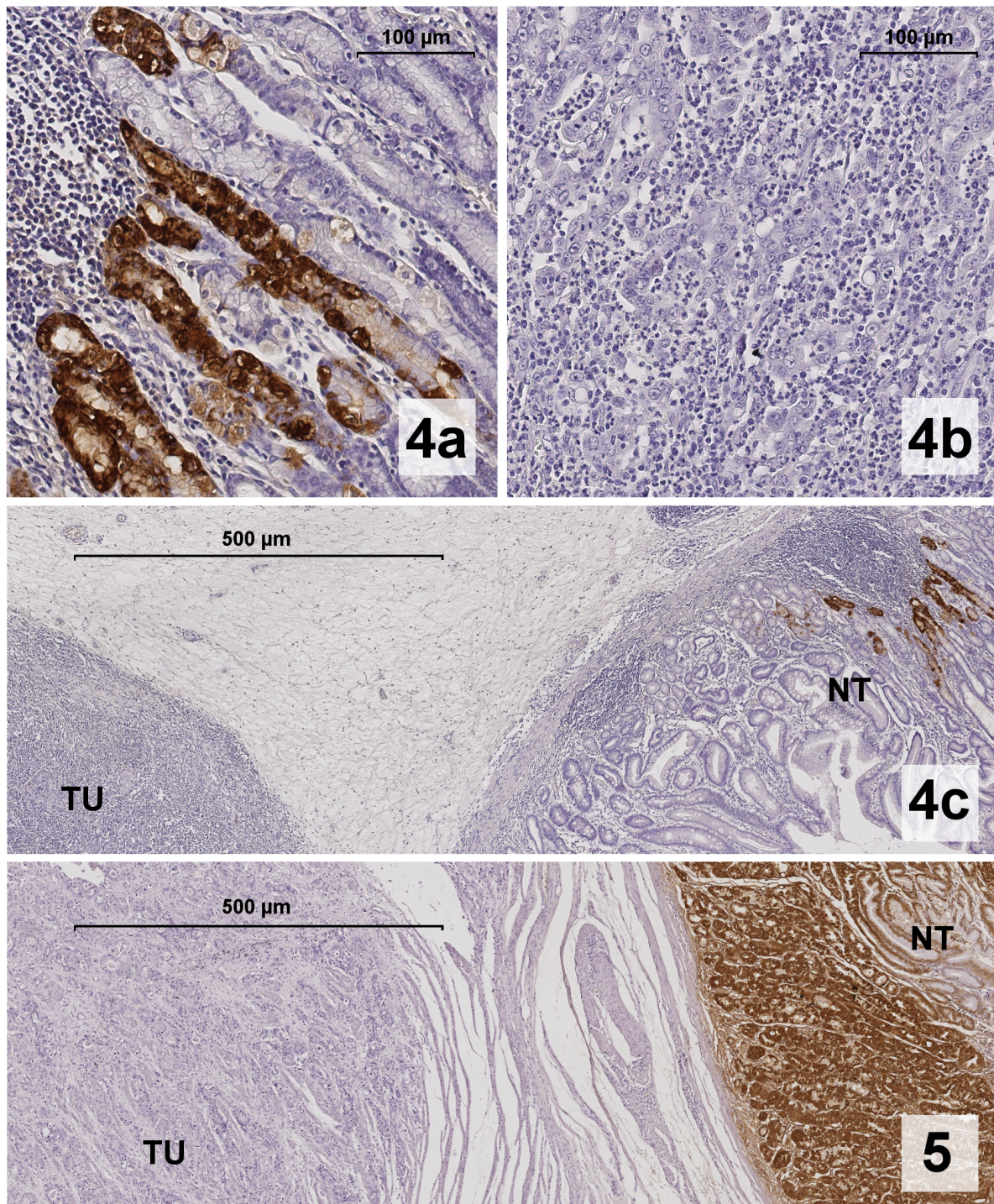
**Abbildung 12:** Exemplarische Darstellung der Drosha-Immunfärbung mit vier unterschiedlichen Drosha-Antikörpern (1-4). Dargestellt ist jeweils ein korrespondierendes Areal in vier Schnitten des Falles mit nachgewiesener p.Q1052\*-Mutation aus dem MSI/MSS-Kollektiv. Die Färbung weicht in einem Großteil der Fälle zwischen den einzelnen Antikörpern in einem hohen Ausmaß voneinander ab. Originalvergrößerung 400x.

Nach Dichotomisierung in negative und positive Färbeergebnisse durch Trennung entlang des Medians des IHC-Scores erfolgte die statistische Auswertung. Die Korrelationsprüfung zweier Variablen wurde anhand des exakten Tests nach Fisher durchgeführt.

Mit keinem der vier eingesetzten Antikörper konnte eine Färbung erzielt werden, die auf einem zuverlässigen Signifikanzniveau einen Zusammenhang zwischen immunhistochemisch quantifizierter Drosha-Expression und Mikrosatellitenstatus belegt. Die Färbeergebnisse unterscheiden sich im Vergleich zwischen den einzelnen Antikörpern zum größten Anteil beträchtlich. Besonders auffällig ist die positive Anfärbung in 19/40 Fällen bei Antikörper 3, während nur 6 durch Antikörper 1, 9 Fälle durch Antikörper 2 und 4 Fälle durch Antikörper 4 eine Immunreaktion zeigten.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Tertiärstruktur der 4 Isoformen von Drosha (RNase III) mit Kennzeichnung der zu verifizierenden Mutation und den Bindungsstellen der Antikörper 3 und 4. Isoform 1 ist gewebeübergreifend als abundant exprimiert beschrieben, wobei die Isoformen sich in ihrer intrazellulären Lokalisation unterscheiden.<sup>89</sup>

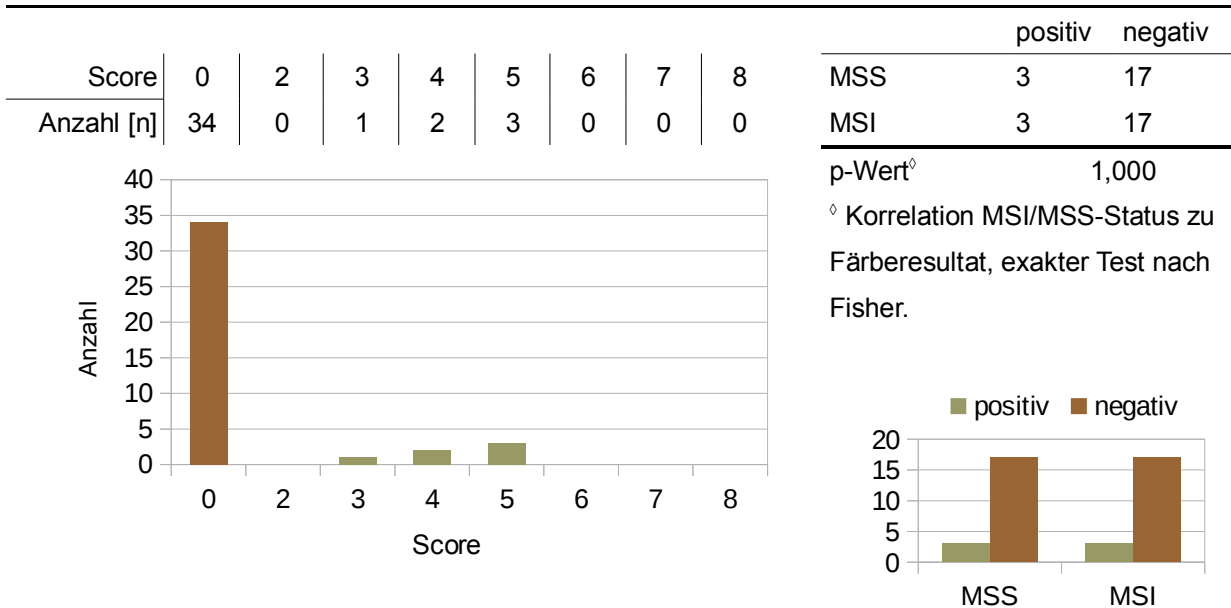


**Abbildung 14:** Färberegebnis Antikörper 4. Während sich das gesamte Tumorgewebe (TU) in Fall 1 (4b, 4c) mit Antikörper 4 nicht anfärbte, stellen sich einzelne Zellen innerhalb des auf demselben Schnitt mit-erfassten Nichttumor-Gewebes (NT) spezifisch und klar gefärbt dar. Es handelt sich um Haupt- und Belegzellen innerhalb der Drüsenkörper (4a).

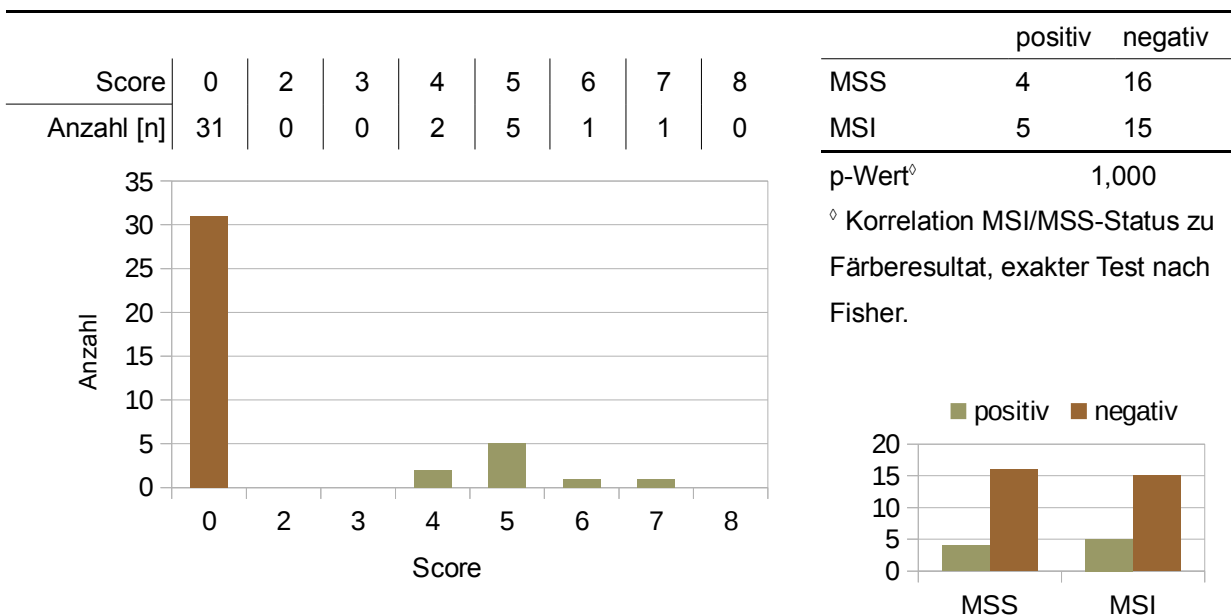
Eine fehlende Färbung von Tumorgewebe bei spezifischer Anfärbung des Normalgewebes zeigen allerdings auch einige MSS-Fälle, wie hier exemplarisch dargestellt (5). Originalvergrößerung 400x.

Für den MSI-Tumorfall (Tumor 1) mit nachgewiesener *DROSHA*-Mutation p.Q1052\* ergab sich für Antikörper *DROSHA* 1 ein immunhistochemischer Score von 2. Für Antikörper 2 und 3 wurde ein Score von 1 ermittelt. Für den auf Tertiärstrukturebene hinter der Mutation bindenden Antikörper 4 ein Score von 0 bei im Tumor vollständig fehlender Immunreaktion.

**Tabelle 20: Auswertung Antikörper 1**

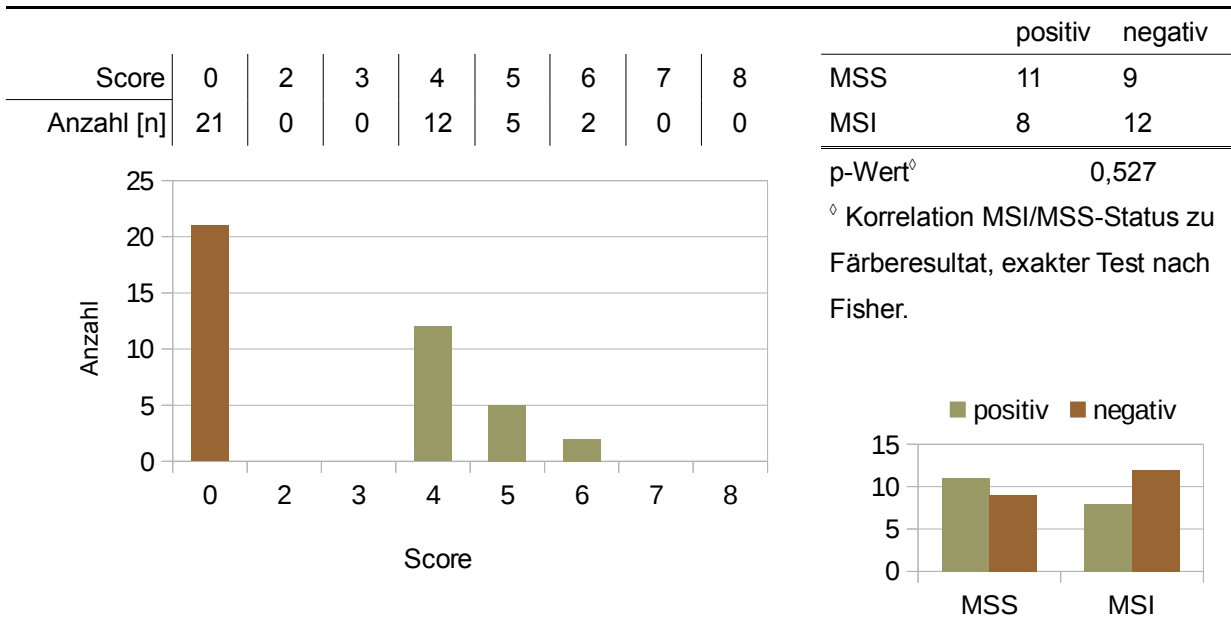


**Tabelle 21: Auswertung Antikörper 2**

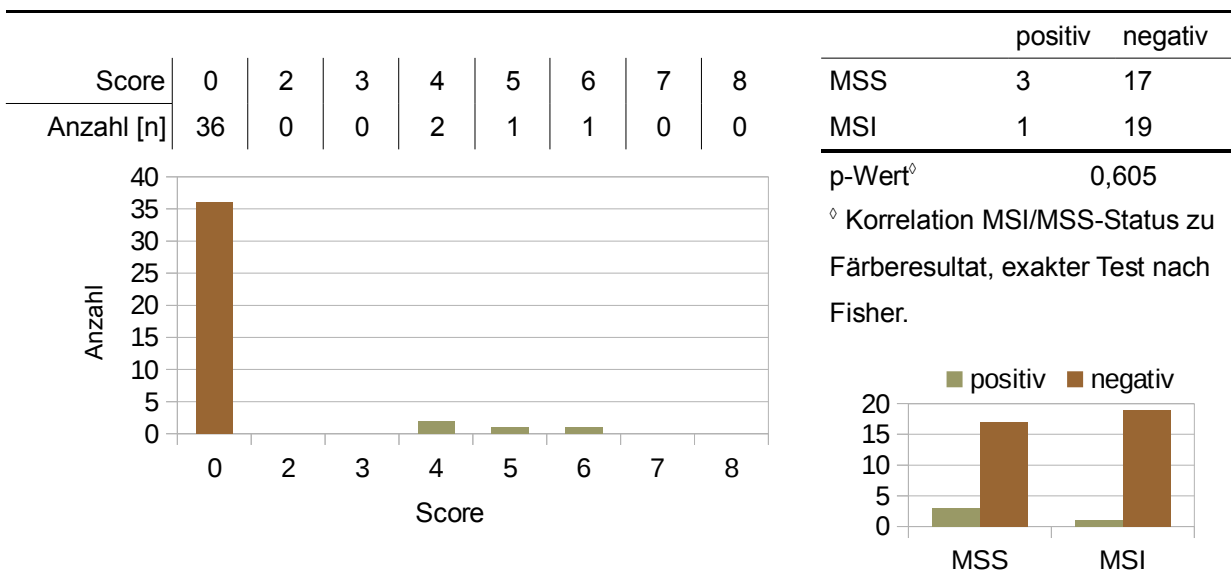




**Tabelle 22: Auswertung Antikörper 3**



**Tabelle 23: Auswertung Antikörper 4**

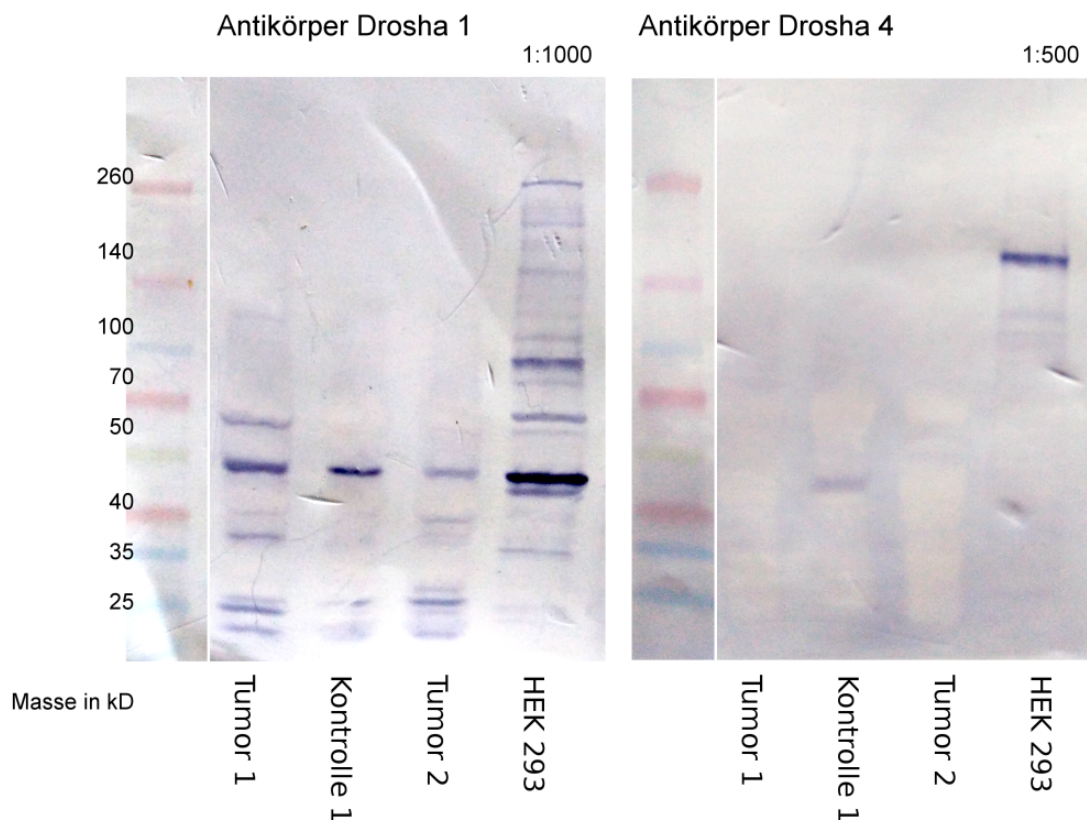


Die mit Abstand am ehesten spezifische Färbung ergab hier Antikörper 4, wobei im MSI/MSI nur 4 Fälle als positiv zu werten waren. Bei diesen waren keine Gemeinsamkeiten bzgl. Geschlecht, TNM-Klassifikation, Grading und Erregerstatus (*Helicobacter pylori* und Epstein-Barr-Virus) auf.

### 3.4.2. Western Blot von Drosha

Ergänzend zur Immunhistochemie wurden zur Untersuchung der *DROSHA*-Expression auf Proteinebene Western Blots angefertigt. Fallspezifisch wurden Proteinlysate der Gelelektrophorese zugeführt und anschließend geblottet. Hierzu wurden vergleichend die Antikörper 1 und 4 (→ Tabelle 11) eingesetzt und sowohl Proteinlysate aus Tumor- und Kontroll-Gewebe als auch solches aus lysierten HEK-293-Zellen vergleichend dargestellt. Als Ladekontrolle wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Antikörper 1 wurde 1:1000, Antikörper 4 1:500 verdünnt.

Es zeigt sich keine spezifische Immunreaktion bei Isoform 1 mit einer molekularen Masse von 159,316 kD in der Färbung mit Antikörper 1. Der Blot mit Antikörper 4 zeigt eine passende Bande in der Elektrophoresespur des HEK-293-Zelllysats. Isoform 2, 3, 4 weisen Massen zwischen 134 und 159 kD auf, die ebenfalls nicht zur Darstellung kommen. Somit wäre die Färbung mit Antikörper 1 als unspezifisch zu werten, während Antikörper 4 zwar prinzipiell mit einer Darstellung von Isoform 1 im Fall des HEK-293-Lysats zu vereinbaren wäre, jedoch diese nicht für die analysierten Tumor- und Kontrollfälle zeigt.



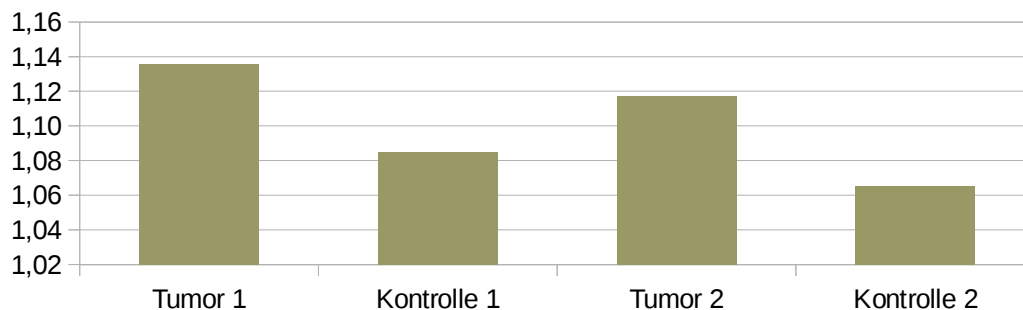
**Abbildung 15:** Western Blots der Proteinlysate-Gelelektrophoresen der fallzugehörigen Proteinlysate

### 3.4.3. *DROSHA*-mRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR

Die quantitative Bestimmung fand mittels einer qRT-PCR am LightCycler statt. Zuvor wurde cDNA aus der *DROSHA*-mRNA synthetisiert, die dann der qRT-PCR zugeführt wurde. Der Cp-Wert der qRT-PCR wurde mit dem gemittelten Cp-Wert dreier cDNAs der Referenzgene *CAPN2*, *CYCC* und *SDHA* verglichen. Tabelle 24 fasst die Messwerte zusammen.

**Tabelle 24: mRNA-Quantifikation mittels qPCR**

		<i>Cp</i> -Werte aus qPCR				Quotienten		
		<i>DROSHA</i>	<i>CAPN2</i>	<i>CYCC</i>	<i>SDHA</i>	Mittelwert (MW)	<i>DROSHA</i> / MW	<i>DROSHA</i> Tumor / Kontrolle
Probe	Tumor 1	34,49	11,1	30,07	29,95	30,37	1,136	1,048
	Kontrolle 1	37,14	34,99	33,55	34,17	34,24	1,085	
	Tumor 2	34,11	31,69	29,84	30,08	30,54	1,117	0,999
	Kontrolle 2	36,29	35,26	33,36	33,58	34,07	1,118	



**Abbildung 16:** Ergebnis der qRT-PCR für *DROSHA*-mRNA. Grafische Darstellung der Quotienten aus Cp *DROSHA* und Mittelwert (MW) der Cp-Werte für Referenzgene *CAPN2*, *CYCC*, *SDHA* für die unterschiedlichen Tumorfälle und jeweiligen Kontrollen.

Das Ergebnis zeigt keine im Vergleich zu Fall 2 nachweisbare Über- und Unterexpression von *DROSHA* in Tumor 1.

### 3.4.4. miRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR

Tabellen 25 und 26 fassen die in den qRT-PCRs ermittelten Cp-Werte der einzelnen untersuchten miRNAs für die Fälle 1 und 2 in jeweils Tumor- und Kontrollgewebe zusammen.

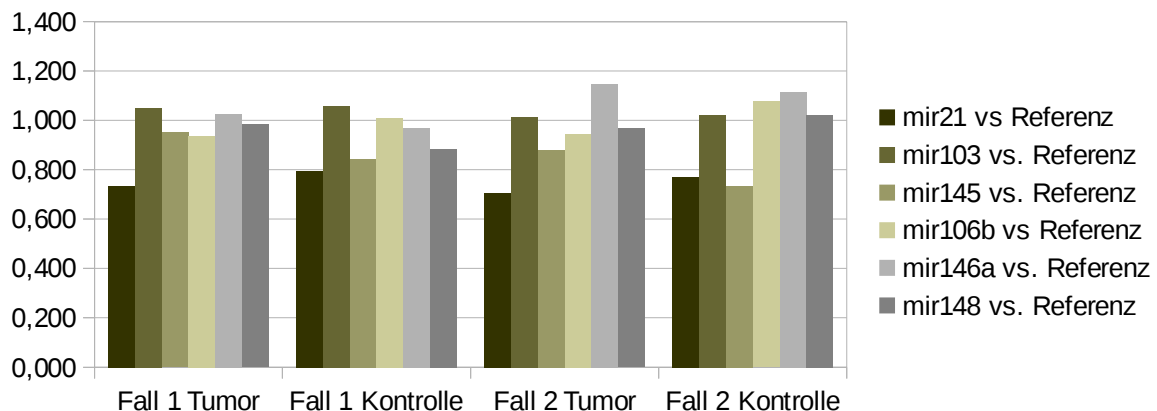
**Tabelle 25: miRNA-Quantifikation von miR-21, miR-103 und miR-145**

		<i>Cp-Werte aus qRT-PCR</i>					<i>Quotienten</i>			
<i>Probe</i>		<i>miR-15a</i>	<i>miR-26b</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>miR-21</i>	<i>miR-103</i>	<i>miR-145</i>	<i>miR-21 / MW</i>	<i>miR-103 / MW</i>	<i>miR-145 / MW</i>
	<i>Probe</i>	<b>Tumor 1</b>	19,02	16,75	17,89	13,15	18,77	17,01	0,735	1,049
<b>Kontrolle 1</b>		20,77	16,52	18,65	14,84	19,72	15,74	0,796	1,058	0,844
<b>Tumor 2</b>		20,69	15,90	18,30	12,92	18,56	16,12	0,7069	1,014	0,881
<b>Kontrolle 2</b>		27,48	17,42	22,45	17,29	22,97	16,50	0,770	1,023	0,735

**Tabelle 26: miRNA-Quantifikation von miR-106b, miR-146a und miR-148**

		<i>Cp-Werte aus qRT-PCR</i>					<i>Quotienten</i>			
<i>Probe</i>		<i>miR-15a</i>	<i>miR-26b</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>miR-106b</i>	<i>miR-146a</i>	<i>miR-148</i>	<i>miR-106b / MW</i>	<i>miR-146a / MW</i>	<i>miR-148 / MW</i>
	<i>Probe</i>	<b>Tumor 1</b>	18,89	17,04	17,97	16,80	18,45	17,67	0,935	1,027
<b>Kontrolle 1</b>		20,83	16,02	18,43	18,61	17,85	16,29	1,010	0,969	0,782
<b>Tumor 2</b>		29,24	15,80	18,02	17,02	20,65	17,42	0,945	1,146	0,861
<b>Kontrolle 2</b>		27,16	16,96	22,06	23,77	24,57	22,56	1,078	1,114	0,831

Auch auf miRNA-Ebene zeigt sich bei der Auswertung keine auffällige Veränderung der Expression für den mutationstragenden Tumor 1. Somit findet sich in den mittels qRT-PCR gewonnenen Daten kein Hinweis auf eine durch die Mutation in *DROSHA* ausgelöste Deregulation der miRNAs.



**Abbildung 17:** Grafische Darstellung der Quotienten aus Cp-Werten unterschiedlicher miRNAs in der qRT-PCR im Verhältnis zum Mittelwert aus den Cp-Werte der miRNAs 15a und 26b.

### 3.4.5. Immunhistochemische Färbung von GNAS1 am Gesamtkollektiv

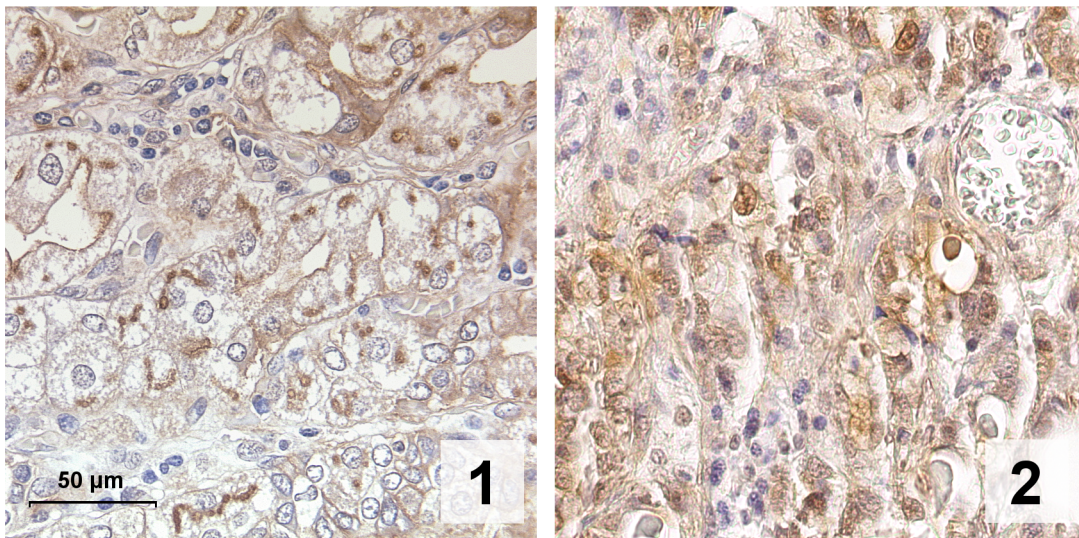
Vom Gesamtkollektiv lagen nach GNAS1-Immunfärbung der TMAs 454 auswertbare Tumorfälle vor. Die Differenz bilden Fälle, die entweder nicht auf den TMAs vorhanden waren oder deren Gewebeschnitte sich im Rahmen des Färbeprozesses von den Objektträgern gelöst hatten. Die stärkste Immunreaktion lag hier an den Zellmembranen, jedoch weist in einigen Fällen auch das Zytoplasma eine schwache Immunreaktion auf (→ Abb. 18).

Unterschiedliche Ausprägungen klinischer Parameter der 454 ausgewerteten Fälle und der GNAS1-Expression wurden mit dem exakten Test nach Fisher und mit Kendall's Tau Test auf signifikante Zusammenhänge untersucht. Die Auswertung wurde mit einem immunhistologischen Score analog zur Auswertung bei DROSHA durchgeführt. Aufgrund der Seltenheit einer positiven Immunfärbung wurde bei der Dichotomisierung in positive und negative Fälle jede Immunreaktion, unabhängig von der Intensität und Quantität, als positiv gewertet, die restlichen Fälle als negativ (→ Tabelle 27). Die Statistik erfolgte für dichotomisierte Variablen anhand von Vierfeldertafeln und Korrelationsprüfung mit dem exakten Test nach Fisher für nominal skalierte und Kendall's-Tau-Test für ordinal skalierte Parameter. Einzelne Parameter wurden durch Trennung am Median dichotomiert. Tabelle 18 fasst die analysierten Variablen und deren Korrelation mit dem Ergebnis der Immunfärbung zusammen.

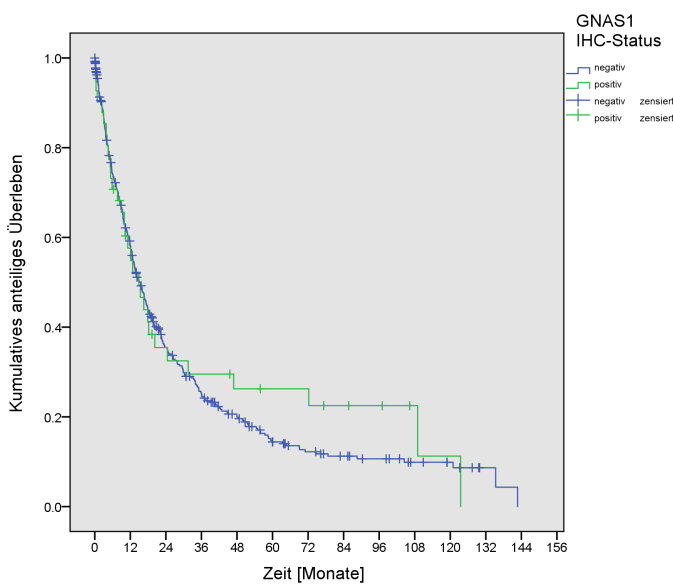
Bei der Analyse der Gesamtüberlebenszeit abhängig vom GNAS1-Immunscore findet sich kein signifikanter Zusammenhang (→ Abb. 19). Die Signifikanzprüfung mittels Log-Rank-Test nach Mantel-Cox ergab einen p-Wert von  $p = 0,556$ .

**Tabelle 27: Übersicht über das Ergebnis der GNAS1-IHC-Färbung**

		Anzahl [n]	Anteil [%]	Anteil valide [%]	Gesamt [%]
Valide Fälle	negativ	413	85.9	91.0	91.0
	positiv	41	8.5	9.0	100.0
Fehlende		27	5.6		
Gesamt		481	100.0		



**Abbildung 18:** Exemplarische Darstellung des IHC-Färberegebnisses anhand der Färbung von Tumor 2 (1). Phänotypisch zeigt Tumor 2 im Vergleich zu anderen GNAS1-positiven Fällen, von denen hier einer (2) exemplarisch dargestellt ist, keinen klaren Unterschied im Verteilungsmuster. Originalvergrößerung 400x.



**Abbildung 19:** Kumulative Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier für das in positive und negative Fälle dichotomisierte Patientenkollektiv. Dargestellt ist der Anteil der Patienten, für die Überlebenszeitdaten vorhanden sind. Die Signifikanzprüfung mittels Log-Rank-Test nach Mantel-Cox ergibt einen p-Wert von  $p = 0,556$ .

**Tabelle 28: Übersicht Korrelation einzelner klinischer Parameter mit dem immunhistochemischen GNAS1-Status**

Klinischer Parameter	Ausprägungen				Skalierung	P-Werte	
						Exakter Test nach Fisher	Kendall's Tau
Geschlecht	weiblich		männlich		nominal	0,617	
Altersgruppe	< 68 a		≥ 68 a		nominal	1,000	
Lokalisation	proximal		distal		nominal	0,296	
Laurén-Klassifikation	diffus	intestinal	Mischtyp	unklass.	nominal	0,157 <sup>⊛</sup>	
Mucintypus	intestinal	gastrisch	Mischtyp	unklass.	nominal	0,174 <sup>⊛</sup>	
T-Kategorie	T1	T2	T3	T4	ordinal	0,654 <sup>⊛</sup>	0,545 <sup>⊛</sup>
N-Kategorie	N0	N1	N2	N3	ordinal	0,705 <sup>⊛</sup>	0,819 <sup>⊛</sup>
M-Kategorie	M0		M1		ordinal	0,838 <sup>⊛</sup>	
TNM-Stadium	IA,B	IIA,B	IIIA,B,C	IV	ordinal	0,205 <sup>⊛</sup>	0,995 <sup>⊛</sup>
N-Ratio	< 0,895		≥ 0,895		ordinal	0,705	
Grading	G1, G2		G3, G4		ordinal	<u>0,002</u>	
L-Kategorie	L0		L1		ordinal	0,714	
V-Kategorie	V0		V1		ordinal	1,000	
Helicobacter-Status	positiv		negativ		nominal	0,138	
EBV-Status	positiv		negativ		nominal	1,000	
Mikrosatellitenstatus	stabil (MSS)		instabil (MSI)		nominal	0,756	

<sup>⊛</sup>Angaben unter Zuhilfenahme einer Monte-Carlo-Simulation zur Ermittlung eines Näherungswertes.

Die einzige, als signifikant ( $p \leq 0,05$ ) zu bewertende, Korrelation zwischen GNAS1-Status und klinischen Falldaten ist der Differenzierungsgrad (Grading). Es zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen hoher GNAS1-Expression und niedrigem Differenzierungsgrad bei einem p-Wert von 0,002 (exakter Test nach Fisher).

Bei allen anderen geprüften Variablen wurde keine signifikante Korrelation zur *GNAS1*-Expression gefunden. Insbesondere ergab sich kein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben.

**Tabelle 29: Vierfeldertafel für Grading vs. *GNAS1*-Status**

		GNAS1-Status [n]		
		negativ	positiv	
Grading [n]	G1, G2	86	18	104
	G3, G4	326	23	349
		412	41	453

### **3.5. Zweites Zwischenfazit**

Die Validierung der zugrundeliegenden NGS-Methodik gelang erst nachdem einem zunächst analysierten WES-Datensatz die Daten aus einem zusätzlichen WGS hinzugefügt und anschließend nur solche SNPs herausgefiltert wurden, die durch beide Methoden in mindestens 5% der Reads detektiert wurden. Die weiteren Ergebnisse des hier gezeigten NGS-Ansatzes und die Immunhistochemie von *GNAS1* wurden 2017 im Fachmagazin BMC Genomics veröffentlicht.<sup>70</sup> Es konnten mit drei unabhängigen Sequenziermethoden SNPs in 5 Genen (*DROSHA*, *GNAS1*, *TYRO3*, *TACC2* und *REER*) bestätigt werden. Zudem wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt um die Expression von *DROSHA* und *GNAS1* differenziert auswerten zu können. Die Expression von *GNAS1* wies hierbei eine hochsignifikante Korrelation mit niedrigem Differenzierungsgrad auf. Die Immunfärbung von *DROSHA*, welche an einem MSS/MSI-Fallkollektiv durchgeführt wurde, zeigte keine Korrelation zwischen Expression und Mikrosatellitenstatus, darüber hinaus waren weder auf Ebene der *DROSHA*-mRNA, noch bei der Untersuchung der von *DROSHA* prozessierten miRNAs Unterschiede zwischen Mutation und Wildtyp erkenntlich.



## 4. DISKUSSION

---

Next Generation Sequencing ist ein Hochdurchsatzverfahren, das sehr große Datenmengen generiert und eine Fülle neuer genetischer Alteration bei soliden Tumoren nachweist. Die untersuchten Patientenkohorten sind meist klein und die biologische und potentielle Wertigkeit der genetischen Alterationen muss durch unabhängige Fallserien validiert werden. Dies war der Grundansatz der hier vorliegenden Dissertation. Die Auswahl der zu validierenden Genmutationen erfolgte einerseits über eine Literaturrecherche und andererseits auf zwei Fällen des Kieler Kollektivs, die mit NGS sequenziert wurden. Die Validierung erfolgte auf genetischer Ebene mit zwei unabhängigen Methoden (Pyrosequenzierung, Sanger-Sequenzierung) und auf translationaler Ebene (Immunhistochemie und Western Blot).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen zum einen eine methodische Diskussion zu, zum anderen ergeben sich aus ihnen neue Fragen und Anhaltspunkte, die in Zusammenhang mit dem bislang noch unzureichenden Verständnis der molekularbiologischen Pathomechanismen des Magenkarzinoms stehen.

Die Frage, in wie weit es einer regelmäßigen Verifikation von tumorzellenspezifischen Mutationsdaten aus NGS-Ansätzen bedarf, ergibt sich aus der Falsifikation der dem ersten dieser Arbeit zugrunde gelegten NGS-Ansatzes. Zugleich müssen auch der begrenzten Sensitivität und Spezifität der konventionellen Sequenziermethoden Sorge getragen werden. Misyura et al. veröffentlichten 2016 eine Studie, in der sie die Ergebnisse zweier kommerziell erhältlicher Gen-Panels, basierend auf zwei unterschiedlichen NGS-Plattformen, miteinander und mit konventioneller Sequenzierung abglichen. Hierbei betrug die Konkordanz zwischen den Ergebnissen der beiden NGS-Plattformen für alle 644 geprüften Fälle 100% der genetischen Varianten. Da für die Sanger-Sequenzierung ein sensibler Nachweis erst ab einer Allelfrequenz von 10-15% angenommen wird, greifen die Autoren für den Nachweis mit konventionellen Sequenziermethoden bei den Mutationen mit einer NGS-detektierten Allelfrequenz unter 15% auf andere hochspezifische Methoden zurück. Diese sind die auch hier genutzte mutationsspezifische PCR, auch als Amplification Refractory Mutation System (ARMS) bezeichnet, die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse (RFLP) und massenspektroskopische Verfahren wie „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight“ (MALDI-TOF).<sup>71</sup> Diese Verfahren sind zwar hochsensibel und spezifisch, dafür allerdings durch die Notwendigkeit des jeweils speziellen Assaydesigns mit hohem Arbeitsaufwand verknüpft. Für die zwischen den NGS-Plattformen konkordanten Varianten geben Misyura et al. 87% und 88% Übereinstimmung der NGS-Ergebnisse mit den alternativen, konventionellen

Sequenziermethoden an. Somit stellt sich die Frage, ob die genutzten NGS-Plattformen MiSeq-ACP (Illumina; San Diego, CA, USA) und Ion Proton-CHP (Thermo Fisher; Waltham, MA, USA) sogar sensitiver bei der Detektion genetischer Varianten geringer Allelfrequenz sind als die genutzten Alternativmethoden. Die hier am weitesten genutzte Methode der Pyrosequenzierung wird im Vergleich zur mutationsspezifischen PCR als ähnlich leistungsstark gewertet und erscheint bei geringen Mengen geeigneten Analysats dieser sogar überlegen. Hingegen vermag die ARMS-Technologie bereits bei Allelfrequenzen um 2% zuverlässige Mutationsnachweise zu ermöglichen, während diese Schwelle für die Pyrosequenzierung eher um die Größenordnung um 10% Allelfrequenz zu liegen scheint.<sup>72</sup> Die unterschiedlichen Sequenziermethoden in zuverlässigen Maßzahlen miteinander zu vergleichen fällt allerdings schwer, da die Plattformen für qualitativ unterschiedlich beschaffene Analysate unterschiedlich gute Leistungen bei der Sequenzierung aufweisen. Die unterschiedlich beschaffenen Amplifikations- und Detektionsmethoden eignen sich nicht alle gleichermaßen für jede beliebige Fragestellung, da sie technisch bedingt jeweils unterschiedliche Fehlerquellen bei bestimmten Beschaffenheiten der DNA-Sequenz, beispielsweise Wiederholungen, bergen. Da sich mutationsspezifische PCR auch für die Multiplex-PCR und somit für mehrere Varianten gleichzeitig eignet, sind Test-Arrays für bestimmte klinische Fragestellungen sogar kommerziell erhältlich. Dies eignet sich vor allem für das Screening auf das Vorliegen von Hotspot-Mutationen.

#### **4.1. Generelle tumorbiologische Gesichtspunkte**

Mit der hier durchgeführten Methodik ist stets nur eine Momentaufnahme in einem evolutionären Tumorprozess möglich, darüber hinaus wird vom Gesamttumor nur ein kleiner räumlicher Anteil untersucht, der unmöglich den Gesamtprozess stellvertretend abbilden kann.

Ein getestetes Tumorareal kann zwar der Klärung dienen, welchen Genotyp ein Tumor enthält, aber dies lässt sich nicht auf den Gesamttumor extrapolieren. Da Karzinome mit zunehmender Größe und tumorbiologischer Komplexität einer zunehmenden evolutionären Selektion unterliegen, ist die Wahrscheinlichkeit, Mutationen innerhalb eines polyklonalen Analysats zu übersehen, sehr hoch. Nicht beachtet wird möglicherweise, dass selbst kleinste Tumorteile pathobiologisch relevant sind oder es im zeitlichen Verlauf werden können. Dies ist jedoch ein allgemeingültiges Problem der heutigen Mutationsdiagnostik. Schwankende Allelfrequenzen erschweren zudem die Auswahl geeigneter Filterkriterien bei der Suche nach realen SNPs aus den NGS-Rohdaten. Die hier überprüften Daten wurden im Vorfeld durch digitale Datenverarbeitung stratifiziert und gefiltert. Eine zu hoch gewählte Detektionsschwelle kann bei kleinen Tumorarealen oder normalgewebsreichem Material zu falsch-negativen Ergebnis-

sen führen, da geringe Mutationsfrequenzen herausgefiltert werden. Eine zu niedrig gewählte Schwelle jedoch ist in verstärktem Maße fehleranfällig, wie sich im ersten Ansatz der hier durchgeführten Überprüfung der detektierten SNPs zeigte, und führt zur Anhäufung falsch-positiver SNPs. Es ist zu bedenken, dass der Anteil der SNP-unterstützenden Reads immer kritisch im Verhältnis zur Coverage betrachtet werden sollte, da diese auch innerhalb eines Gens und zwischen einzelnen Fällen erheblich schwanken kann, wie auch → Tabellen 17 und 19 illustrieren. Insgesamt gestaltet sich die Bewertung der Rohdaten schwierig und sie bedarf einer guten bioinformatischen Expertise. Inzwischen ist eine Vielzahl von Softwares und Algorithmen zur Verarbeitung der NGS-Primärdaten auf dem Markt<sup>73</sup>, die zum Teil voneinander abweichende Ergebnisse liefern.<sup>71</sup> Ab welcher Allelfrequenz von einem realen SNP gesprochen werden kann, ist im biologisch heterogenen Tumor schwer zu bewerten. Zudem ist die Qualität der DNA und der anschließenden Prozessierung entscheidend für die Interpretierbarkeit der Daten.

Wie auf molekulargenetischer Ebene, spielt auch auf Proteinebene und somit in der immunhistochemischen Färbung der Aspekt der Tumorerogenität eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Das Magenkarzinom ist eine überaus heterogene Tumorentität mit hoher genetischer Variabilität innerhalb einer Erkrankung<sup>1,2,24</sup>. Die Arbeitsgruppe von Röcken beschrieb bei EBV-positiven Magenkarzinomen eine intratumorale genetische Heterogenität innerhalb des Mutationsstatus von *PIK3CA* und zeigte auch auf Proteinebene eine heterogene *ERBB2* Expression.<sup>74</sup> Dies lässt vermuten, dass auch andere genetische Alterationen auf molekularer und funktioneller Ebene räumliche Unterschiede aufweisen. Während die Sequenzierung anhand von DNA aus Frischgewebe durchgeführt wurde, fand die immunhistochemische Färbung an Formalin-fixiertem Material des selben Tumors statt. Dementsprechend werden stets unterschiedliche Tumorbereiche untersucht.

Bei der Suche tumorrelevanter SNPs bei hereditären Neoplasie-Syndromen unterscheidet sich die tumorbiologische Relevanz der Funde und auch der technische Hintergrund, da nach Keimbahnmutationen gesucht wird und entsprechend durch das ubiquitäre Vorhandensein der Mutation(en) deutlich höhere Read-Anzahlen für SNPs erreicht werden als bei tumorspezifischen (somatischen) Mutationen. Zudem finden Untersuchungen normalerweise nicht an Tumormaterial statt, sondern an Blutzellen, die leicht zu gewinnen sind und qualitativ hochwertige DNA zur Sequenzierung liefern. Eine aktuelle Studie von Mu et al. zeigt bei an 20000 Patienten routinemäßig über NGS-Panels detektierten Keimbahnmutationen bei hereditären Neoplasie-Syndromen eine Konkordanzrate von 98,7% mit konventioneller Sequenzieretechnik (Sanger). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass 1,3% der detektierten Mutationen falsch-positiv sind. In einer anschließenden Simulation mit strenger gewählten Parame-

tern in der Qualitäts-Filterung wählten Mu et al. die Detektionsschwellen gerade so hoch, dass keine falsch-positiven Ergebnisse mehr auftraten. Hierdurch wurde jedoch die Sensitivität 100% auf 97,8% herabgesetzt.<sup>75</sup> Für die Routinediagnostik empfehlen Mu et al. nur Daten zu beachten, die eine Coverage von mindestens 100x und eine SNP-unterstützende Read-Anzahl von mindesten 40% der Coverage aufweisen. Diese Sequenzierqualität ist jedoch mit DNA aus Tumorbiopsaten oder -exzisaten genetisch heterogener Tumore nicht zu erreichen. Insbesondere bei SNPs, die in technisch begründet schwierig zu sequenzierenden Abschnitten des Genoms liegen, rechtfertigen Mu et al. den stichprobenartigen Einsatz konventioneller Sequenzieretechnik auch für Keimbahnmutationen.<sup>75</sup>

#### **4.2. Validität der hier überprüften NGS-Methodik**

Es bleibt beim Magenkarzinom somit besonders herausfordernd, neue Therapieansätze und prognostische Marker zu etablieren. Für andere Tumorentitäten, beispielsweise für das Mammakarzinom, gibt es bereits Ansätze, frei im Blut zirkulierende, also nicht-zelluläre Tumor-DNA durch NGS zu sequenzieren und therapeutische Targets, beispielsweise Mutationen in Her2/neu beim Mammakarzinom, zu identifizieren.<sup>76</sup> Da gegenwärtig aber nur der immunhistochemisch und in situ-Hybridisierung geführte Nachweis der Her2/neu-Überexpression entscheidungsrelevante Größe ist, haben diese neuen Ansätze noch keinen Stellenwert in der klinischen Routine erlangt.

Bei der auch beim Magenkarzinom bereits etablierten zielgerichteten Antikörper- oder Small-Molecule-Therapie gilt es zu bedenken, dass diese mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im gesamten Tumor eine identische Wirksamkeit erlangen kann. Dies hat unweigerlich auch die Selektion resistenter Zellklone zur Folge, was vermutlich mitursächlich für die bislang eher geringe Überlebenszeitverlängerung durch „Targeted Therapy“ ist. Während aktuell in der Regel nur einzelne therapeutische Targets für die individualisierte Therapie genutzt werden, werden zukünftig vermutlich Kombinationstherapien etabliert werden, die ein niedrigeres Risiko einer schnellen Resistenzbildung bergen.<sup>77</sup>

Bei der zukünftigen therapeutischen und prognostischen Einordnung des Magenkarzinoms erscheint es auch aufgrund dieser genetischen Heterogenität sinnvoll, die Klassifikationssysteme nicht an einzelnen Biomarkern im Sinne von Mutationen oder der Expression von Einzelproteinen festzumachen, sondern vielmehr mit molekulargenetischen Profilen zu arbeiten, da diese die tumorbiologische Realität vermutlich besser abbilden können. Zudem spielt möglicherweise die Immunologie des Tumors hier eine übergeordnete Rolle.<sup>25</sup> Weiterhin gibt

es Hinweise darauf, dass sich die immunologischen Profile des Magenkarzinoms auch zwischen asiatischen und kaukasischen Bevölkerungsgruppen unterscheiden.<sup>78</sup>

Beim Vergleich zweier Tumorfälle war in keinem der acht untersuchten Gene eine Bestätigung der gefundenen Mutationen über konventionelle Methoden möglich. Dies führt erneut vor Augen, dass eine in hohem Maße bioinformatisch gestützte Methodik einer gründlichen Etablierung mit regelmäßiger Validierung bedarf.

Die anschließende Bestätigung von vier SNPs gelang erst nach optimierter bioinformatischer Filterung und Hinzunahme eines WGS-Datensatzes. Dies unterstreicht die Rolle der Bioinformatik bei wachsenden Mengen an Rohdaten bei der Sequenzierung großer Mengen an DNA. Nach sorgfältiger Validierung erscheint die Methodik jedoch hochgradig attraktiv bei der Identifikation tumorspezifischer Mutationen, was am Beispiel von *GNAS1* sogar bis zur Herstellung einer signifikanten Korrelation zwischen Expression und Tumordifferenzierungsgrad (Grading) gelungen ist. Ein Paper unserer Arbeitsgruppe, welches sich neben den Ergebnissen des NGS, besonders auch auf die Praktikabilität der Methode und die gefundenen „Fallstricke“ bezieht, befindet sich aktuell (Stand: 22. Mai 2017) noch in der Revision.<sup>70</sup>

Die *DROSHA*-Mutation in unserem MSI-Tumorfall konnte sowohl bei der Pyro-, als auch bei der Sanger-Sequenzierung nur mit geringer Signalintensität nachgewiesen werden. Alle Sequenzierungen fanden an Aliquots desselben DNA-Extraktes statt. Hieran zeigt sich, dass technisch bedingt von Methode zu Methode Sensibilität und Spezifität unterschiedlich sind und dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

Eine möglichst hohe Sensibilität ist bei der Sequenzierung von Tumorgenomen ausschlaggebend. Aufgrund der genetischen Beschaffenheit des Tumors, der wie erläutert heterogen sein und auch nur eine geringe Kopienzahl mutationstragender DNA im Verhältnis zur Gesamt-DNA aufweisen kann, muss die Routine-Sequenzierung ggf. sogar um hochsensible, aber aufwändige Methoden wie ARMS-PCR ergänzt werden.

Optimal bezüglich des Verständnisses der genetischen Tumorerheterogenität wäre eine räumlich aufgelöste Sequenzierung unterschiedlicher Tumoranteile, welche jedoch technisch aufwändig und mit höheren Kosten verbunden wäre. Unter Berücksichtigung bisheriger Erkenntnisse wäre diese Methodik für den Einsatz in der Krankendiagnostik zur Therapieentscheidung zu fordern. In der Regel werden im Rahmen der Krankenversorgung Patientenproben formalinfixiert. Dies führt zu weiteren Problemen, wie der Entstehung formalinbedingter Cytosin-Deamination und damit verbundenen Sequenzierartefakten, die sich als „falsche“ SNPs äußern.<sup>79</sup> Auch die Notwendigkeit einer hochqualitativen DNA für diese Untersuchungsmethode stellt einen anwendungslimitierenden Faktor dar. Insgesamt lässt sich daraus schluss-

folgern, dass eine Verifikation mittels konventioneller Sequenziermethoden erforderlich wäre bzw. ein Ersetzen dieser, im diagnostischen Kontext, noch nicht zu empfehlen ist.<sup>75</sup> Zudem stellt sich die Frage, welchen Stellenwert die gefundenen Mutationen bei heterogenen Tumoren haben und ob eine selektive Therapie langfristig erfolgreich sein kann.

### 4.3. Postranskriptionelle und -translationelle Aspekte

Nach der Verifikation der *DROSHA*-Mutation c.3589C>T (NM\_001100412), welche auf Proteinebene an Position 1052 der Aminosäurekette einen vorzeitigen Kettenabbruch bewirkt, fand zusätzlich eine Sequenzierung der mRNA statt, um die Transkription der Mutation zu beweisen. Durch eine mutationsspezifische PCR konnte die Sensitivität erhöht werden, da nur geringe Signalstärken zu erwarten waren. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation auf mRNA-Ebene transkribiert wird. Um die posttranslationelle Ebene beurteilen zu können, wurde ergänzend ein immunhistochemischer Nachweis der Expression des Proteins durchgeführt. Die Interpretation der Drosha-Immunfärbung fällt vor dem Gesichtspunkt der vier genutzten Antikörpern und deren erheblich voneinander abweichenden Ergebnisse der Immunfärbungen besonders schwer. Die von Tchernitsa et al. vorbeschriebene Korrelation zwischen hoher Drosha-Expression und gutem Gesamtüberleben konnte aufgrund der mangelnden Reproduzierbarkeit der immunhistochemischen Färbegergebnisse zwischen einzelnen kommerziell erhältlichen Antikörpern nicht reproduziert werden. Die Autoren nutzten den gleichen polyklonalen Drosha-Antikörper wie den hier verwendeten „Drosha 1“ (→ Tabelle 9).

Die SNP-unterstützende Read-Anzahl in den NGS-Daten kann verwendet werden, um eine Aussage über die Mutationsprävalenz innerhalb des Tumors zu treffen. Der verwendete DNA-Extrakt enthält eine nicht genau definierte Zusammensetzung von Tumor- und Nichttumor-DNA. Das immunhistochemisch gefärbte, formalinfixierte Gewebe ist nicht exakt identisch mit dem molekulargenetisch untersuchten Tumoranteil. In Tumor 1 würde bei Vorliegen einer *DROSHA*-Mutation und bei fortgesetzter Transkription und Translation wahrscheinlich ein verändertes Protein vorliegen (SIFT-Score<sup>45</sup> 0,01). Interessanterweise zeigt sich das gesamt erfasste Tumoreal in der IHC-Färbung immunnegativ. Ein kleiner Anteil des Normalgewebes innerhalb des gastralen Drüsenkörpers verhielt sich spezifisch und deutlich immunpositiv. Antikörper 4 besitzt sein Bindungsepitop C-terminal der Mutation, sodass möglicherweise im strukturveränderten Protein auch keine Bindung mehr erfolgen kann. Ein ähnliches Immunreaktionsmuster fand sich jedoch auch in anderen Fällen. Diese Beobachtung überrascht, da Drosha über die Regulation von miRNAs ubiquitär funktionell relevant ist und entsprechend auch eine ubiquitäre Expression beschrieben ist.<sup>80</sup> Auch wenn Antikörper 4 im Vergleich mit Antikörper 1-3 die verlässlichste Färbung in der Immunhistochemie ergab, ist

das Verteilungsmuster nicht erklärbar. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das zweite *DROSHA*-Allel weiterhin eine Wildtypsequenz aufweist und somit neben dem mutierten Allel auch noch ein nichtmutiertes Protein translatiert und nachgewiesen wird. Zusammenfassend muss in Anbetracht der widersprüchlichen Ergebnisse hinterfragt werden, in wie weit die bislang durchgeführten Immunfärbungen überhaupt eine valide Aussage über die Expression ermöglichen.

Drosha spielt eine Schlüsselrolle bei der Prozessierung von pri-miRNA zu pre-miRNA. Anschließend erfolgt nach dem Exportin-5-vermittelten Export aus dem Nukleus ins Zytoplasma die Verarbeitung der pre-miRNA zur reifen miRNA durch das Enzym Dicer. Drosha ist somit eine maßgebliche RNase im Regulationsmechanismus der miRNAs. Inzwischen sind mehrere hundert miRNAs bekannt, die spezifisch durch Bindung der 3'-UTR der mRNA die Translation einzelner mRNAs hemmen können. Aufgrund vielfältiger regulatorischer Rollen, mehren sich Hinweise, dass eine Deregulation von miRNAs an der Pathogenese unterschiedlicher Tumorentitäten beteiligt ist. Beim Magenkarzinom ist eine Überexpression von sowohl Drosha als auch Dicer, insbesondere beim intestinalen Subtyp, immunhistochemisch belegt worden.<sup>69</sup> Da zudem einzelne miRNAs entweder onkogene oder tumorsuppressive Eigenschaften zugesprochen werden konnten, werden miRNAs als mögliche therapeutische Targets diskutiert.<sup>81</sup>

Der miRNA-Status ermöglicht sogar Aussagen zu prognostischen Zwecken.<sup>82</sup> Beim kolorektalen Karzinom im Rahmen des Lynch-Syndroms besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Alterationen im Stoffwechsel der miRNAs und dem Mikrosatellitenstatus.<sup>35,83</sup> Weiterhin ist auch für das sporadische kolorektale Karzinom ein Zusammenhang zwischen dem miRNA-Profil und dem Mikrosatellitenstatus beschrieben.<sup>84</sup>

Die hier durchgeführte Quantifizierung unterschiedlicher miRNAs zeigte ebenfalls keine Unterschiede im Vergleich des mutationstragenden Falles mit den Wildtypkontrollen auf. Demnach erschiene es nicht begründet, aus dem Vorhandensein allein auf eine miRNA-vermittelte Funktionalität zu schießen. Zudem erscheint bereits auf Ebene der mRNA die Expression von Drosha im mutationstragenden Tumorfall nicht relevant beeinflusst.

Beim Magenkarzinom konnte bislang kein sicherer Zusammenhang zwischen Mikrosatellitenstatus und Drosha-Expression nachgewiesen werden. Trotz zahlreicher Analogien zum kolorektalen Karzinom gibt es auf molekularbiologischer Ebene offenbar relevante Unterschiede zum Magenkarzinom.

Die Analyse der am Patientengesamt- oder -teilkollektiv durchgeführten immunhistochemischen Färbungen lässt zusammenfassend keine prognostisch oder bislang therapeutisch re-

levanten Schlussfolgerungen zu. Die Expression von WNK1 und GNAS1 eignen sich somit nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht als Biomarker für das Gesamtüberleben oder andere für den Verlauf der Erkrankung maßgeblichen klinischen Falldaten wie beispielsweise Metastasierung oder Tumorstadium. Bei Fehlen eines entsprechenden statistischen Zusammenhangs mit den gängigen Parametern, wie Metastasierung, Tumorgroße, Erkrankungsstadium oder Gesamtüberleben, ist auch eine Beeinflussbarkeit des Erkrankungsverlaufs durch Auswahl von WNK1 oder GNAS1 als therapeutische Targets nach aktuellem Kenntnisstand eher nicht erfolgversprechend. Obwohl die GNAS1-Expression in der Immunohistochemie keine Bedeutung im prognostischen Sinne hat, stellten Alakus, Mönig et al., einen grenzwertig signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des häufigen GNAS1-Polymorphismus T393C und einem schlechten Gesamtüberleben bei Magenkrebs fest.<sup>64</sup> Zum genaueren Verständnis dieses Sachverhalts wären funktionelle Studien der mit GNAS1 verknüpften Signalproteine und deren zellulären Zielstrukturen und -funktionen wünschenswert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein hoher IHC-Score für WNK1 und Mikrosatelliteninstabilität eine signifikante Korrelation aufweisen ( $p=0,022$ ). Möglicherweise analog hierzu ist eine entsprechende Assoziation zwischen der Überexpression des Proteins DUSP4, welches als MAP-Kinase-Phosphatase ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des MAP-Signalweges spielt, zum Mikrosatellitenstatus beim kolorektalen Karzinom bereits hergestellt worden.<sup>28</sup> Möglicherweise spielt WNK1 folglich auch eine Rolle bei der Regulation MSS/MSI-relevanter Gene. Methodisch einschränkend erscheint die mangelnde Vergleichbarkeit der einzelnen Immunfärbungen mit unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Drosha-Antikörpern. Dies deckt sich mit den völlig unterschiedlich zur Darstellung kommenden Western Blots zweier verwendeter Antikörper.

#### **4.4. Bisherige Erfolge bei der Suche nach einzelnen Biomarkern**

NGS ist eine Methode, die zwar molekulargenetische Untersuchungen als umfassendes Screening der SNP-Landschaft erlaubt, jedoch sind trotz intensiver Forschung keine einzelnen SNPs mit klinischer Relevanz für die Therapie gefunden worden. Her2/neu, dessen Bedeutung jedoch nicht primär über die Sequenzierung des ERBB2-Gens entdeckt wurde, bildet mit einigen einzelnen Biomarkern, z.B. den Proteinen VEGFR2, Troy und PD-L1, eine Ausnahme. Die Entdeckung der Relevanz dieser Biomarker gelang jedoch mithilfe der Immunhistochemie und fußt nicht auf der NGS-basierten Detektion von SNPs. Wie auch bei Her2/neu konnte die Expression von Troy und PD-L1 jüngst mit dem Gesamtüberleben der untersuchten Population von Magenkrebs-Fällen korreliert werden.<sup>25,85</sup> Für PD-L1-Antikörper sind zudem beim Urothelkarzinom im Rahmen einer in Nature veröffentlichten Phase-1-Stu-



die vielversprechende Therapieerfolge beschrieben worden.<sup>86</sup> Es bleibt Gegenstand der Forschung, in wie weit diese sich auch beim Magenkrebs innerhalb von neuen Klassifikationssystemen einsetzen lassen und ob einige dieser potenziellen Ziel-Moleküle sich tatsächlich für die therapeutische Nutzung im Rahmen einer zielgerichteten Therapie eignen.

#### 4.5. Schlussfolgerung

Aktuell ist ein Trend zur NGS-basierten Routinediagnostik in der Molekularpathologie zu beobachten. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen jedoch vor Augen, dass mit NGS nachgewiesene SNPs beim Magenkarzinom nicht ohne weiteres für einen ganzen Tumor oder gar eine Erkrankung als valide angenommen werden können. Dies hat zum einen methodische Gründe, zum anderen ist beim Magenkarzinom eine räumlich und zeitlich aufgelöste genetische Variabilität anzunehmen und inzwischen auch für mehrere Gene (*HER2/neu*, *MET*, *PIK3CA*) von der Arbeitsgruppe um Prof. Röcken belegt worden.<sup>87</sup> Nachfolgende Studien der Arbeitsgruppe und deren Herangehensweise bei Validierungsstudien beruht maßgeblich auf Erkenntnissen, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gewonnen worden waren. Die Detektion tumorspezifischer SNPs erfordert daher ein hohes Maß an Sensitivität und Spezifität bei der Detektion, was die aktuelle NGS-Technologie an ihre Grenzen führt. Zudem ist auch bei der Bestätigung eines SNP durch konventionelle Sequenzieretechnologie noch keine Aussage über die tatsächliche translationelle Relevanz bzw. die Expression des betroffenen Gens möglich, wie die Sequenzierung der cDNA am Beispiel von *DROSHA* und vor allem die Immunhistochemie von *GNAS1* und *Drosha* gezeigt haben. Folglich bedarf es bei der Erforschung neuer tumorgenomischer Varianten unbedingt sorgfältiger Validierungsstudien, in wie fern eine Variante auch tatsächlich phänotypisch bzw. funktionell relevant ist. NGS-gestützte Sequenzierungen haben bei Keimbahnmutationen bereits ein hohes Maß an Zuverlässigkeit erreicht. Die Verifizierung über andere Sequenzieretechnologien wird nur in speziellen genomischen Regionen oder Fragestellungen empfohlen.<sup>3,75</sup> Diese Sicherheit darf keinesfalls auch bei somatischer Mutationsdiagnostik, wie der hier durchgeführten, für gegeben erachtet werden.

#### 4.6. Ausblick

Es bleibt beim Magenkarzinom somit besonders herausfordernd, neue Therapieansätze und prognostische Marker zu etablieren. Für andere Tumorentitäten, beispielsweise für das Mammarkarzinom, gibt es bereits Ansätze, frei im Blut zirkulierende, also nicht-zelluläre TumordNA durch NGS zu sequenzieren und therapeutische Targets, beispielsweise Mutationen in

Her2/neu beim Mammakarzinom, zu identifizieren.<sup>76</sup> Da gegenwärtig aber nur der immunhistochemisch und in situ-Hybridisierung geführte Nachweis der Her2/neu-Überexpression entscheidungsrelevante Größe ist, haben diese neuen Ansätze noch keinen Stellenwert in der klinischen Routine erlangt.

Bei der auch beim Magenkarzinom bereits etablierten zielgerichteten Antikörper- oder Small-Molecule-Therapie gilt es zu bedenken, dass diese mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im gesamten Tumor eine identische Wirksamkeit erlangen kann. Dies hat unweigerlich auch die Selektion resistenter Zellklone zur Folge, was vermutlich mitursächlich für die bislang eher geringe Überlebenszeitverlängerung durch „Targeted Therapy“ ist. Während aktuell in der Regel nur einzelne therapeutische Targets für die individualisierte Therapie genutzt werden, werden zukünftig vermutlich Kombinationstherapien etabliert werden, die ein niedrigeres Risiko einer schnellen Resistenzbildung bergen.<sup>77</sup>

Bei der zukünftigen therapeutischen und prognostischen Einordnung des Magenkarzinoms erscheint es auch aufgrund dieser genetischen Heterogenität sinnvoll, die Klassifikationssysteme nicht an einzelnen Biomarkern im Sinne von Mutationen oder der Expression von Einzelproteinen festzumachen, sondern vielmehr mit molekulargenetischen Profilen zu arbeiten, da diese die tumorbiologische Realität vermutlich besser abbilden können. Zudem spielt möglicherweise die Immunologie des Tumors hier eine übergeordnete Rolle.<sup>25</sup> Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass sich die immunologischen Profile des Magenkarzinoms auch zwischen asiatischen und kaukasischen Bevölkerungsgruppen unterscheiden.<sup>25,78</sup>

Der rasante Zugewinn diagnostisch und therapeutisch wertvoller genetischer Informationen wird zukünftig kaum ohne den konsequenten Ausbau einer vernetzten Daten-Infrastruktur und molekularer Tumorboards auskommen. Eine im April 2017 von der Deutschen Gesellschaft für Pathologie herausgegebene Pressemeldung spricht vom „Vormarsch“ molekularer Tumorboards. Sie thematisiert aber auch künftige und aktuelle Herausforderungen, zu denen besonders Qualitätsstandards, die Schaffung neuer Studienkonzepte und die Etablierung von durch das Gesundheitssystem finanzierbaren Therapien in der Praxis zählen.<sup>88</sup>

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

---

Next Generation Sequencing ist eine Methode, die einen zunehmenden Stellenwert bei der Erforschung tumorspezifischer Mutationen erlangt hat. Durch den Vormarsch zielgerichteter Therapieformen zur Behandlung unterschiedlicher Malignome, einschließlich des Magenkarzinoms, werden große Hoffnungen in die Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen für die Pharmakotherapie gesetzt. Zudem erlauben genetische Einzelmarker oder Profile, Aussagen zur Prognose und zu weiteren tumorbiologischen Eigenschaften eines Tumors zu treffen.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch kaum Daten aus Hochdurchsatzsequenzierungen von Magenkarzinomen vor. Vor der Zielsetzung, Erkenntnisse über die Validität der Methodik zu gewinnen, wurde zunächst eine immunhistochemische Validierung von Literaturdaten vorgenommen. Eine Veröffentlichung von Zang et al.<sup>27</sup> ließ auf eine hohe Mutationsfrequenz in einigen Kinase-Genen schließen, besonders häufig wurden Mutationen in *WNK1* beschrieben. Über den MAP-Kinase-Signalweg erschien eine mögliche Relevanz für die Pathobiologie des Magenkarzinoms plausibel, sodass in einem ersten Ansatz zunächst eine immunhistochemische Untersuchung eines größeren Kollektives an Magenkarzinomen (n= 470) erfolgte. Diese lieferte keinerlei Hinweis auf das Vorliegen einer relevanten Korrelation zwischen der Expression von *WNK1* und klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. In einem zweiten Ansatz erfolgte im Sinne einer Proof-of-Principle-Studie die Validierung von Daten aus einer Whole Exome – und einer anschließenden Whole Genome Sequenzierung. Diese wurden parallel im Rahmen einer Kooperation mit dem Kieler Institut für Klinische Molekularbiologie durchgeführt. Zunächst konnte überraschend festgestellt werden, dass die Daten aus dem Whole Exome Sequencing mit konventioneller Sequenzieretechnik nicht reproduzierbar waren, was erst gelang, als die Daten des Whole Genome Sequencing in die bioinformatische Analyse einbezogen und die Filterkriterien in Hinblick auf die Datenqualität deutlich strenger gewählt worden waren. Nach der genetischen Validierung von Mutationen in insgesamt 5 Genen wurden zwei Kandidaten anhand ihrer bekannten tumorbiologischen Relevanz ausgewählt und stufenweise weiteren Untersuchungen unterzogen. Hierbei zeigte sich für den ersten Kandidaten *DROSHA* bei bestätigter Mutation keinerlei Hinweise auf eine Veränderung der Expression auf mRNA-Ebene. Weiterhin zeigten sich keine relevanten Korrelationen zu klinischen Falldaten in der Immunhistochemie. Ergänzend konnte für den mutationstragenden Fall keine Veränderung des Expressionsmuster im Western Blot festgestellt werden. Schließlich fanden sich über die Quantifizierung der von *DROSHA* prozessierten miRNAs auch keine Hinweise auf eine funktionelle Relevanz der vorliegenden Mutation. Für die zweite ausgewählte Mutation in *GNAS1*, die näherer immunhistochemischer Studien am Ge-

samtkollektiv unterzogen wurde, zeigte sich ebenfalls kein Beweis, dass eine unterschiedliche Expression von GNAS1 einen Einfluss auf die Prognose oder sonstige klinisch relevante Parameter hat.

Aus den Ergebnissen des hier verfolgten mehrstufigen Ansatzes lässt sich schlussfolgern, dass NGS-Daten unbedingt einer sorgfältigen Validierung auf genetischer und Expressions-ebene bedürfen, bevor sich Aussagen über die tatsächliche tumorbiologische Relevanz treffen lassen. Weiterhin liefert die Arbeit auch weitere Indizien dafür, dass es sich beim Magenkarzinom um eine zeitlich und räumlich stark heterogene Tumorentität handelt, was inzwischen durch weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe gut belegt werden konnte.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

---

1. Bria E, Pilotto S, Simbolo M, et al. Comprehensive molecular portrait using next generation sequencing of resected intestinal-type gastric cancer patients dichotomized according to prognosis. *Sci Rep*. 2016;6(February):22982. doi:10.1038/srep22982.
2. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-209. doi:10.1038/nature13480.
3. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat*. 2013;34(7):1035-1042. doi:10.1002/humu.22332.
4. Method of the Year. *Nat Methods*. 2008;5(1):1-1. doi:10.1038/nmeth1153.
5. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-337. doi:10.1038/nature11252.
6. Kim T-M, Lee S-H, Chung Y-J. Clinical applications of next-generation sequencing in colorectal cancers. *World J Gastroenterol*. 2013;19(40):6784-6793. doi:10.3748/wjg.v19.i40.6784.
7. Wild C, Steward B. *World Cancer Report 2014.*; 2014.
8. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078>.
9. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin*. 1999;49(2):1,33-64. doi:10.3322/caac.20107.Available.
10. Lee K, Inoue M, Otani T, et al. Gastric cancer screening and subsequent risk of gastric cancer: a large-scale population-based cohort study, with a 13-year follow-up in Japan. *Int J cancer*. 2006;118(9):2315-2321. doi:10.1002/ijc.21664.
11. Berlth F, Bollschweiler E, Drebber U, Hoelscher AH, Moenig S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value. *World J Gastroenterol*. 2014;20(19):5679-5684. doi:10.3748/wjg.v20.i19.5679.
12. Sano T, Coit DG, Kim HH, et al. Proposal of a new stage grouping of gastric cancer for TNM classification: International Gastric Cancer Association staging project. *Gastric Cancer*. February 2016. doi:10.1007/s10120-016-0601-9.
13. Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(12):3077-3079. doi:10.1245/s10434-010-1362-z.
14. Orditura M, Galizia G, Sforza V, et al. Treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1635-1649. doi:10.3748/wjg.v20.i7.1635.
15. Moehler M, Al-Batran S-E, Andus T, et al. S3 Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. *Z Gastroenterol*. 2011;49(4):461-531. doi:10.1055/s-0031-1273201.

16. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol*. 2006;24(18):2903-2909. doi:10.1200/JCO.2005.05.0245.
17. Bang Y, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9742):687-697. doi:10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
18. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2008;19(9):1523-1529. doi:10.1093/annonc/mdn169.
19. Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2005;16(2):273-278. doi:10.1093/annonc/mdi064.
20. Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52(7):797-805. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03028.x.
21. Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):1224-1235. doi:10.1016/S1470-2045(14)70420-6.
22. Li J, Qin S, Xu J, et al. Apatinib for chemotherapy-refractory advanced metastatic gastric cancer: results from a randomized, placebo-controlled, parallel-arm, phase II trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(26):3219-3225. doi:10.1200/JCO.2013.48.8585.
23. Li J, Qin S, Xu J, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Apatinib in Patients With Chemotherapy-Refractory Advanced or Metastatic Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction. *J Clin Oncol*. 2016;34(13):1448-1454. doi:10.1200/JCO.2015.63.5995.
24. Kuboki Y, Yamashita S, Niwa T, et al. Comprehensive analyses using next-generation sequencing and immunohistochemistry enable precise treatment in advanced gastric cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(1):127-133. doi:10.1093/annonc/mdv508.
25. Böger C, Behrens H, Mathiak M, Krüger S, Kalthoff H, Röcken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*. 2016;7(17):24269-24283. doi:10.18632/oncotarget.8169.
26. Qing Y, Li Q, Ren T, et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:901-909. doi:10.2147/DDDT.S75152.

27. Zang ZJ, Ong CK, Cutcutache I, et al. Genetic and structural variation in the gastric cancer kinome revealed through targeted deep sequencing. *Cancer Res.* 2011;71(1):29-39. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1749.
28. Gröschl B, Bettstetter M, Giedl C, et al. Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation. *Int J cancer.* 2013;132(7):1537-1546. doi:10.1002/ijc.27834.
29. Sun X, Gao L, Yu RK, Zeng G. Down-regulation of WNK1 protein kinase in neural progenitor cells suppresses cell proliferation and migration. *J Neurochem.* 2006;99(4):1114-1121. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04159.x.
30. Jiang ZY, Zhou QL, Holik J, et al. Identification of WNK1 as a substrate of Akt/protein kinase B and a negative regulator of insulin-stimulated mitogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 2005;280(22):21622-21628. doi:10.1074/jbc.M414464200.
31. Lai J-G, Tsai S-M, Tu H-C, et al. Zebrafish WNK lysine deficient protein kinase 1 (wnk1) affects angiogenesis associated with VEGF signaling. *PLoS One.* 2014;9(8):e106129. doi:10.1371/journal.pone.0106129.
32. Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology.* 2010;56(2):167-179. doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03392.x.
33. Mathiak M, Warneke VS, Behrens H, et al. Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2015;00(00):1-13. doi:10.1097/PAI.0000000000000264.
34. Valeri N, Gasparini P, Fabbri M, et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(15):6982-6987. doi:10.1073/pnas.1002472107.
35. Lanza G, Ferracin M, Gafà R, et al. mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2007;6:54. doi:10.1186/1476-4598-6-54.
36. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-531. doi:10.1038/nrg1379.
37. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>.
38. Valeri N, Gasparini P, Braconi C, et al. MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(49):21098-21103. doi:10.1073/pnas.1015541107.
39. Melo SA, Moutinho C, Roperio S, et al. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell.* 2010;18(4):303-315. doi:10.1016/j.ccr.2010.09.007.

40. Holbrook JD, Parker JS, Gallagher KT, et al. Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. *J Transl Med*. 2011;9(1):119. doi:10.1186/1479-5876-9-119.
41. US National Library of Medicine. PubMed. www.pubmed.gov. Published 1950. Accessed April 1, 2011.
42. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D945-D950. doi:10.1093/nar/gkq929.
43. Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Hum Mutat*. 2000;15(1):57-61. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G.
44. Cooper DN, Krawczak M. Human Gene Mutation Database. *Hum Genet*. 1996;98(5):629. <http://www.hgmd.cf.ac.uk>.
45. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 2001;11(5):863-874. doi:10.1101/gr.176601.
46. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248.
47. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 1987;166(2):368-379. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2449095>.
48. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989;17(7):2503-2516. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2785681>.
49. Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, et al. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D756-D763. doi:10.1093/nar/gkt1114.
50. Huhta H, Helminen O, Lehenkari PP, Saarnio J, Karttunen TJ, Kauppila JH. Toll-like receptors 1, 2, 4 and 6 in esophageal epithelium, Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(17):23658-23667. doi:10.18632/oncotarget.8151.
51. McCormick JA, Ellison DH. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol Rev*. 2011;91(1):177-219. doi:10.1152/physrev.00017.2010.
52. Yoshimura T, Tomita T, Dixon MF, Axon ATR, Robinson PA, Crabtree JE. ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa. *J Infect Dis*. 2002;185(3):332-340. doi:10.1086/338191.



53. Miyazaki K, Inokuchi M, Takagi Y, Kato K, Kojima K, Sugihara K. EphA4 is a prognostic factor in gastric cancer. *BMC Clin Pathol*. 2013;13(1):19. doi:10.1186/1472-6890-13-19.
54. Park J, Young Yoon S, Kim J-M, Yeom Y, Kim YS, Kim N. Identification of novel genes associated with the response to 5-FU treatment in gastric cancer cell lines using a cDNA microarray. *Cancer Lett*. 2004;214(1):19-33. doi:10.1016/j.canlet.2004.04.012.
55. Gou W, Sun H, Zhao S, et al. Downregulated inhibitor of growth 3 (ING3) expression during colorectal carcinogenesis. *Indian J Med Res*. 2014;139(4):561-567. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927342>.
56. Kanda M, Shimizu D, Nomoto S, et al. Prognostic impact of expression and methylation status of DENN/MADD domain-containing protein 2D in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(2):288-296. doi:10.1007/s10120-014-0372-0.
57. Deng J, Liang H, Zhang R, et al. Applicability of the methylated CpG sites of paired box 5 (PAX5) promoter for prediction the prognosis of gastric cancer. *Oncotarget*. 2014;5(17):7420-7430. doi:10.18632/oncotarget.1973.
58. Niu L, Qin H-Z, Xi H-Q, Wei B, Xia S-Y, Chen L. RNF43 Inhibits Cancer Cell Proliferation and Could be a Potential Prognostic Factor for Human Gastric Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(5):1835-1846. doi:10.1159/000430154.
59. Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, et al. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D670-D681. doi:10.1093/nar/gku1177.
60. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-291. doi:10.1038/nature19057.
61. Guo X, Liao Q, Chen P, et al. The microRNA-processing enzymes: Drosha and Dicer can predict prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(1):49-56. doi:10.1007/s00432-011-1058-1.
62. Zhang H, Hou Y, Xu L, et al. Cytoplasmic Drosha Is Aberrant in Precancerous Lesions of Gastric Carcinoma and Its Loss Predicts Worse Outcome for Gastric Cancer Patients. *Dig Dis Sci*. 2016;61(4):1080-1090. doi:10.1007/s10620-015-3986-0.
63. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419. doi:10.1038/nature01957.
64. Alakus H, Mönig SP, Warnecke-Eberz U, et al. Association of the GNAS1 T393C polymorphism with tumor stage and survival in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2009;15(48):6061-6067. doi:10.3748/wjg.15.6061.
65. Jin H, Jung S, DebRoy AR, Davuluri R V. Identification and validation of regulatory SNPs that modulate transcription factor chromatin binding and gene expression in prostate cancer. *Oncotarget*. August 2016. doi:10.18632/oncotarget.10520.

66. Onodera Y, Takagi K, Miki Y, et al. TACC2 (transforming acidic coiled-coil protein 2) in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with cell proliferation. *Cancer Med*. 2016;5(8):1973-1982. doi:10.1002/cam4.736.
67. Chien C-W, Hou P-C, Wu H-C, et al. Targeting TYRO3 inhibits epithelial-mesenchymal transition and increases drug sensitivity in colon cancer. *Oncogene*. 2016;(January):1-10. doi:10.1038/onc.2016.120.
68. UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D204-D212. doi:10.1093/nar/gku989.
69. Tchernitsa O, Kasajima A, Schäfer R, et al. Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. *J Pathol*. 2010;222(3):310-319. doi:10.1002/path.2759.
70. Esser D, Holze N, Haag J, et al. Interpreting whole genome and exome sequencing data of individual gastric cancer samples. *BMC Genomics*. 2017;18(1):517. doi:10.1186/s12864-017-3895-z.
71. Misyura M, Zhang T, Sukhai MA, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Panels and Platforms for Detection and Verification of Somatic Tumor Variants for Clinical Diagnostics. *J Mol Diagn*. 2016;18(6):842-850. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.06.004.
72. Alqahtani QM, Crowley A, Rapp S, Cushman-Vokoun AM. QIAGEN Therascreen KRAS RGQ Assay, QIAGEN KRAS Pyro Assay, and Dideoxy Sequencing for Clinical Laboratory Analysis of KRAS Mutations in Tumor Specimens. *Lab Med*. 2016;47(1):30-38. doi:10.1093/labmed/lmv009.
73. Ding L, Wendl MC, McMichael JF, Raphael BJ. Expanding the computational toolbox for mining cancer genomes. *Nat Rev Genet*. 2014;15(8):556-570. doi:10.1038/nrg3767.
74. Böger C, Krüger S, Behrens H, Röcken C. EBV-positive Magenkarzinome weisen eine intratumorale Heterogenität von PIK3CA-Mutationen auf. *Z Gastroenterol*. 2016;54(08). doi:10.1055/s-0036-1587218.
75. Mu W, Lu H, Chen J, Li S, Elliott AM. Sanger Confirmation Is Required to Achieve Optimal Sensitivity and Specificity in Next-Generation Sequencing Panel Testing. *J Mol Diagn*. 2016;18(6):923-932. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.07.006.
76. Ma F, Zhu W, Guan Y, et al. ctDNA dynamics: a novel indicator to track resistance in metastatic breast cancer treated with anti-HER2 therapy. *Oncotarget*. September 2016:1-12. doi:10.18632/oncotarget.11791.
77. Meldrum C, Doyle M a, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev*. 2011;32(4):177-195. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219767/>[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219767/pdf/cbr\\_32\\_4\\_177.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219767/pdf/cbr_32_4_177.pdf).

78. Lin SJ, Gagnon-Bartsch JA, Tan IB, et al. Signatures of tumour immunity distinguish Asian and non-Asian gastric adenocarcinomas. *Gut*. 2015;64(11):1721-1731. doi:10.1136/gutjnl-2014-308252.
79. Do H, Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. *Oncotarget*. 2012;3(5):546-558. doi:10.18632/oncotarget.503.
80. Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem*. 2000;275(47):36957-36965. doi:10.1074/jbc.M005494200.
81. Peric D, Chvalova K, Rousselet G. Identification of microprocessor-dependent cancer cells allows screening for growth-sustaining micro-RNAs. *Oncogene*. 2012;31(16):2039-2048. doi:10.1038/onc.2011.391.
82. Dong Y, Yu J, Ng SS. MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Cancer Manag Res*. 2014;6:405-422. doi:10.2147/CMAR.S35164.
83. Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, et al. Interrelationship between micro satellite instability and micro RNA in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(22):2745-2755. doi:10.3748/wjg.v18.i22.2745.
84. Balaguer F, Moreira L, Lozano JJ, et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display unique miRNA profiles. *Clin Cancer Res*. 2011;17(19):6239-6249. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1424.
85. Wilhelm F, Böger C, Krüger S, Behrens H, Röcken C. Troy is expressed in human stomach mucosa and a novel putative prognostic marker of intestinal type gastric cancer. *Oncotarget*. July 2016. doi:10.18632/oncotarget.10672.
86. Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014;515(7528):558-562. doi:10.1038/nature13904.
87. Böger C, Krüger S, Behrens HM, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric cancer reveals intratumoral heterogeneity of PIK3CA mutations. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017;28(5):1005-1014. doi:10.1093/annonc/mdx047.
88. Brähler G. Molekulare Tumorboards auf dem Vormarsch. 2017;(April).
89. Link S, Grund SE, Diederichs S. Alternative splicing affects the subcellular localization of Drosha. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(11):5330-5343. doi:10.1093/nar/gkw400.

## **7 . D A N K S A G U N G**

---

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Röcken möchte ich für die stets freundliche, wertschätzende und motivierende Betreuung danken. Besonders die Aufgeschlossenheit und Flexibilität, die durch die zum Teil unerwarteten Ergebnisse der Arbeit unter Beweis gestellt wurden, sowie die gewährte Freiheit und das Vertrauen bei der Bearbeitung des Themas gingen weit über die Erwartungen hinaus.

Besonderer Dank gilt Frau Sandra Krüger, die mit Rat und Tat und unter Aufwendung von viel Zeit und Mühe im Labor Beistand leistete. Ihr möchte ich auch für Ideen und Denkanstöße danken, die maßgeblich zur methodischen Abdeckung der bearbeiteten Fragestellung beigetragen haben. Besonders dankbar bin ich ihr auch für die Korrekturlesung und produktive Hinweise bei der Textarbeit.

Herrn Dr. Hans-Michael Behrens danke ich für Unterstützung bei der Auswertung und informatischen Verarbeitung meiner Rohdaten.

Frau Dr. Victoria Warneke danke ich für die Vorarbeit bei der Zusammenstellung des Fallkollektives.

Für die Durchführung der NGS-Sequenzierungen und die freundliche Überlassung der Daten danke ich Frau Daniela Esser und der übrigen Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Rosenstiel.

Meiner Familie und all meinen Freunden möchte ich für das Verständnis und die Zeit danken, die die Bearbeitung des Themas erforderte.

Zuletzt möchte ich mich allen hier erwähnten gegenüber noch ausdrücklich für die aufgebrauchte Geduld bedanken, die während meiner Promotionszeit aufgebracht wurde.