

GNAS1 Mutationen in myxoiden Weichteil- und Knochtumoren

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Ina Walther

geboren am 28.06.1989 in Bad Langensalza

Gutachter

- 1. Herr Prof. Dr. med. Stefan Schulz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Herr Prof. Dr. med. Thomas Knösel, Pathologisches Institut der LMU München**
- 3. Herr Prof. Dr. med. Iver Petersen, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. Mai 2015

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
COLD-PCR	Coamplification at lower denaturation temperature - PCR
CDK4	Cyclin dependent kinase 4
DMR's	Differentially methylated regions
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FD	Fibröse Dysplasie
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Growth Hormone
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Gs α	α -Untereinheit stimulatorischer G-Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
MDM2	Mouse double minute 2 homolog (Regulator des Tunorsuppressorgens p53)
MUC4	Mucin 4
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das GNAS1 Gen	3
2.2	Aktivierende missense-Mutationen im GNAS1 Gen	4
2.3	Fibröse Dysplasie	6
2.4	Intramuskuläre Myxome.....	8
2.5	Mazabraud Syndrom.....	9
3	Ziele der Arbeit	11
4	Publizierte Originalarbeit	12
	<i>Analysis of GNAS1 mutations in myxoid soft tissue and bone tumors, Walther I, Walther BM, Chen Yuan, Petersen I, Pathology - Research and Practice, 210, 1, 1-4, 2014</i>	
5	Diskussion	13
5.1	Die Bedeutung der GNAS1 Mutationsanalyse in der Diagnostik der fibrösen Dysplasie	13
5.2	Die Bedeutung der GNAS1 Mutationsanalyse in der Diagnostik der intramuskulären Myxome.....	15
6	Schlussfolgerungen	17
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	18
8	Anhang	23
8.1	Lebenslauf	23
8.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	24
8.3	Danksagung	25

1 Zusammenfassung

Hintergrund:

Das GNAS1 Gen, welches sich auf Chromosom 20 befindet und sich über 13 Exons erstreckt, kodiert für die α -Untereinheit der stimulatorischen G-gekoppelten Proteine. Somit nimmt es durch deren ubiquitäres Vorkommen an einer Vielzahl von Regulations- und Signaltransduktionswegen sowie metabolischen Vorgängen im menschlichen Körper teil. Vorangegangene Studien zeigen, dass das GNAS1 Gen durch bestimmte aktivierende Mutationen in einigen Abschnitten des Gens eine Rolle in der Entwicklung bestimmter Erkrankungen sowie in der Tumorgenese vorrangig von Weichgewebstumoren spielt. Das Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen einer aktivierenden missense-Mutation in den beiden Hotspots R201H und R201C in Codon 201 des Exon 8 des GNAS1 Gens an einem Spektrum myxoider Weichteil- und Knochentumoren zu untersuchen. Zudem sollte die Prävalenz der Mutation in intramuskulären Myxomen und der diagnostische Aussagewert der GNAS1 Mutationsanalyse in Bezug auf die Differentialdiagnostik zu anderen myxoiden Weichteilerkrankungen verifiziert werden.

Methoden:

Insgesamt wurden 97 Fälle untersucht, wobei sich das Kollektiv aus acht Patienten mit einer sporadisch auftretenden fibrösen Dysplasie des Knochens, 63 intramuskulären Myxomen, 19 Fällen verschiedener myxoider Weichteiltumoren und sieben Vorhofmyxomen aus dem linken Atrium zusammensetzt. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte aus formalinfixierten Paraffinblöcken oder mittels Mikrodissektion vom Objektträger. Unter Nutzung eines Primerpaares wurde ein 252 bp umfassender Abschnitt des GNAS1 Gens auf Exon 8 amplifiziert. Positiv- und Negativkontrollen wurden dabei eingeschlossen. Die Prüfung des Erfolgs der PCR erfolgte mittels gelRED-gefärbter 1,5-prozentiger Agarose-Gel-Elektrophorese. Die aufgereinigte DNA wurde abschließend durch Kapillarelektrophorese direkt sequenziert und mit Finch TV ausgewertet.

Ergebnis:

Von den acht analysierten Fällen der in Femur und Tibia lokalisierten fibrösen Dysplasien des Knochens zeigten fünf eine Mutation in Codon 201 des GNAS1 Gens, was einer Mutationsrate von 62,5% entspricht. Es zeigten sich dabei drei R201H- und zwei R201C-

Mutationen in der Hotspot-Region. Mit einer Prävalenz von 36,5% zeigten 23 der 63 intramuskulären Myxome eine GNAS1 Mutation. Es ergab sich wiederum eine ähnliche Verteilung im Hotspot-Codon 201, in 12 Fällen lag eine R201C und in 11 Fällen eine R201H Mutation vor. Alle mutierten intramuskulären Myxome hatten ihre Lokalisation vorrangig in größeren Muskelpartien, wie beispielsweise Oberschenkel- und Rückenmuskulatur, während die Fälle ohne Mutation eher aus kleineren Muskelgruppen, wie Schulter- und Unterarmmuskulatur entstammten. Bei keinem der 19 anderen myxoiden Weichteiltumoren und auch bei keinem der 7 linksatrialen Myxome wurde eine GNAS1 Mutation gefunden.

Schlussfolgerung:

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Aussagen vorangegangener Studien in Bezug auf die hohe Prävalenz der GNAS1 Mutation sowohl in sporadisch auftretenden fibrösen Dysplasien des Knochens als auch in intramuskulären Myxomen. Zudem scheint die GNAS1 Mutationsanalyse als zusätzliche diagnostische Option neben histopathologischen und mikroskopischen Untersuchungen auch wertvoll bei der Differentialdiagnose zwischen einigen benignen und malignen Knochen- und Weichgewebserkrankungen zu sein. So kann die Analyse bei der Unterscheidung zwischen intramuskulärem Myxom und dem low grade Myxofibrosarkom hilfreich sein, bei welchem im Gegensatz zum intramuskulären Myxom bisher keine GNAS1 Mutation detektiert werden konnte. Damit gewinnt die GNAS1 Mutationsanalyse einen unterstützenden Stellenwert zu anderen diagnostischen Verfahren bei der Differenzierung myxoider Knochen- und Weichgewebstumoren.

2 Einleitung

2.1 Das GNAS1 Gen

Das GNAS1 Gen liegt am Telomerende des langen Armes von Chromosom 20 (20q13.2-20q13.3) und weist eine hohe Komplexität auf (Levine et al. 1991, Bastepe 2007). Es erstreckt sich über 13 Exons und ist aufgrund eines komplizierten Imprintingmechanismus und dem Unterliegen eines alternativen Spleißens Ausgangspunkt mehrerer Genprodukte. Durch das Vorhandensein von alternativen ersten Exons, alternativen Promotoren und verschiedenen methylierten Regionen (DMR's) kodiert das Gen unter anderem das der maternalen Expression unterliegende NESP55 Protein. Hierbei handelt es sich um ein neuroendokrines sekretorisches Protein, das sowohl im peripheren als auch zentralen Nervensystem, sowie in neuroendokrinen und einigen endokrinen Geweben vorkommt (Bastepe 2007, Ischia et al. 1997). Weitere Genprodukte sind die Majorformen der α -Untereinheit der stimulatorischen G-Proteine XL α s, XXL α s und das A/B-Protein, welche paternalen Ursprungs sind und deren Funktion bisher nicht eindeutig geklärt ist (Hayward et al. 1998, Aydin et al. 2009). Das Genprodukt, durch welches das GNAS1 Gen seine umfassende Teilnahme an den verschiedensten Stoffwechselwegen gewinnt, ist allerdings die α -Untereinheit der stimulatorischen heterotrimeren G-gekoppelten Proteine (G α). Dabei verläuft die Expression von G α in den meisten Geweben biallelisch, mit Ausnahme der Hypophyse, Schilddrüse, der Gonaden und Anteilen der proximalen Nierentubuli, welche einer vorwiegend maternalen G α -Expression unterliegen (Mariot et al. 2011, Weinstein et al. 2004). Für das ubiquitär vorkommende G α sind jeweils zwei lange und zwei kurze Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die Spleißvarianten unterscheiden sich durch die An- oder Abwesenheit des von Exon 3 kodierten Bereichs des GNAS1 Gens und durch die An- oder Abwesenheit eines für Serin kodierenden Triplets (Bastepe and Jüppner 2005, Bray et al. 1986). G α nimmt durch sein ubiquitäres Vorkommen in Verbindung mit den G-gekoppelten Rezeptoren eine zentrale Stellung im menschlichen Organismus ein. Es hat beispielsweise Anteil an Zellwachstum, -differenzierung und -proliferation, Membranumbau, Hormonsekretion, Knochenresorption und Glykogenhaushalt (Helms 1995, Morris and Malbon 1999). Damit stellt es gleichzeitig Ausgangspunkt für pathophysiologische Mechanismen und Störungen in Stoffwechselvorgängen dar.

2.2 Aktivierende missense-Mutationen im GNAS1 Gen

Stimulatorische heterotrimere Guaninnukleotidbindende Proteine (G-Proteine), für welche das GNAS1 Gen die α -Untereinheit kodiert, sind im menschlichen Körper ubiquitär vorkommende Bestandteile von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an der Plasmamembran (siehe Abb. 1).

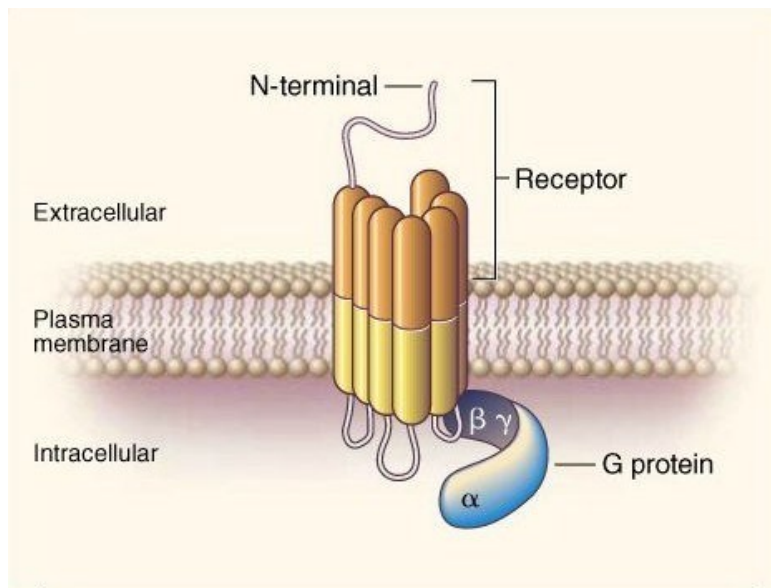


Abb. 1: Schema eines G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptors (GPCR). Blau dargestellt ist das aus α -, β - und γ -Untereinheit bestehende G-Protein, das an den 7 Transmembrandomänen umfassenden Rezeptor (GPCR) gebunden ist (nach Lamberts et al. 1996).

Im Grundzustand liegen die G-Proteine als Heterotrimer vor, bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit, wobei das katalytische Zentrum der α -Untereinheit in der Lage ist, GDP zu binden (Brandt and Ross 1985, Higashijima et al. 1987). Bei Bindung eines Liganden am Rezeptor wird eine Konformationsänderung bewirkt, welche zu einer effektiven Interaktion von Rezeptor und G-Protein führt. Dies hat zur Folge, dass das an die α -Untereinheit gebundene GDP dissoziiert und durch freies, in der Zelle in höherer Konzentration vorkommendes GTP ersetzt wird (Spiegel 2000). Durch die daraus entstehende erneute Konformationsänderung kommt es sowohl zur Dissoziation des α -Komplexes ($G\alpha$) als auch des Komplexes aus β - und γ -Untereinheit ($G\beta\gamma$). Der $G\alpha$ -Komplex ist dann über verschiedene Effektormoleküle in der Lage, die Adenylatcyclase zu aktivieren, die über die Umwandlung von zytosolischem ATP in cAMP einen wichtigen sekundären Botenstoff freisetzt. Der second messenger cAMP greift dann im Anschluss in multiple Stoffwechselforgänge im Organismus ein (Levine 1999). Nach Aktivierung der verschiedenen Effektormoleküle kehrt der $G\alpha$ -Komplex durch seine intrinsische GTPase-Aktivität wieder in den Grundzustand zurück, in dem GTP gegen GDP getauscht wird und der Komplex mit $G\beta\gamma$ reassoziert (siehe Abb. 2).

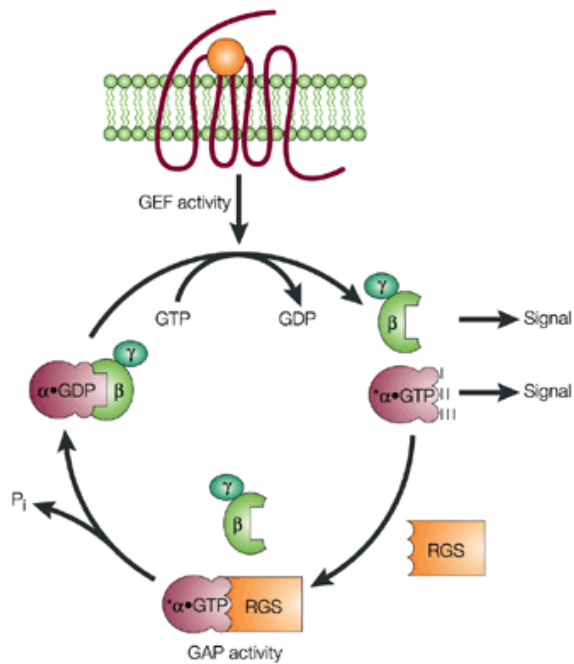


Abb. 2: Schema der Funktionsweise des G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Durch Konformationsänderung bei Ligandenbindung kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP im katalytischen Zentrum der $G\alpha$. Die Komplexe $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ dissoziieren und lösen Signale über Effektormoleküle aus. Durch die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ erfolgt die Rückkehr in den Grundzustand und die Reassoziierung der Komplexe mit dem Rezeptor (nach Neubig and Siderovski 2002).

Die Fähigkeit zur Rückkehr in den Grundzustand der $G\alpha$ und damit zur Beendigung der Signaltransmission kann durch aktivierende missense-Mutationen in bestimmten Abschnitten des *GNAS1* Gens gestört sein. Vorangegangene Studien zeigen, dass beispielsweise der Austausch von Arginin gegen Cystein (R201C) oder Histidin (R201H) im Codon 201 oder der Austausch von Glutamin gegen Arginin im Codon 227 im Rahmen einer missense-Mutation zu einer Verringerung der GTPase-Aktivität der $G\alpha$ führt (Masters et al. 1989). Dies zieht eine dauerhaft erhöhte $G\alpha$ -Aktivität sowie erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen nach sich (Weinstein et al. 1991). Die beschriebenen aktivierenden Mutationen wurden zunächst in GH-produzierenden Hypophysentumoren beschrieben (Landis et al. 1989) und bislang in einigen weiteren Tumoren und Erkrankungen detektiert, darunter Hypophysenadenome, Schilddrüsenadenome und -karzinome, Nebenschilddrüsenadenome, Leydigzell-Tumoren und dem Phäochromozytom (Aldred and Trembath 2000, Lania et al. 2001, Ringel et al. 1996, Vandeva et al. 2010) (siehe Tabelle 1). Eine mit einer aktivierenden *GNAS1* Mutation assoziierte Erkrankung ist das McCune-Albright-Syndrom. Bei der erstmals von Fuller Albright and Donovan McCune beschriebenen Erkrankung handelt es sich um ein seltenes neurokutanes Syndrom (Diaz et al. 2007), welches sich durch das Auftreten der typischen Trias aus multiplen autonomen Endokrinopathien, Café-au-lait-Flecken der Haut und einer meist polyostotischen fibrösen Dysplasie des Knochens auszeichnet (Weinstein et

al. 1991). Später konnten aktivierende missense-Mutationen im GNAS1 Gen auch bei sporadisch auftretenden fibrösen Dysplasien unabhängig vom McCune-Albright-Syndrom detektiert werden (Lee et al. 2012). Weitere Manifestationen der Mutationen zeigen sich in intramuskulären Myxomen und im Rahmen des Mazabraud's Syndrom, auf welche im Folgenden eingegangen werden soll.

Tabelle 1: Übersicht der mit aktivierenden GNAS1 Mutationen assoziierten klinischen Syndrome und endokrinen sowie Knochen- und Weichteiltumoren (nach Levine 1999, modifiziert nach Walther et al. 2014)

McCune-Albright Syndrome	100%
Pituitary adenomas	4-50%
Growth hormone-secreting adenomas	35-40%
ACTH-secreting adenomas	4-9%
Clinically non-functioning adenomas	rare
Thyroid neoplasms	3-70%
Hyperfunctioning and nonfunctioning follicular adenomas	
Papillary and follicular carcinomas	
Parathyroid neoplasms	<5%
Parathyroid adenomas	
Adrenocortical disorders	<5%
Aldosterone-producing adenomas	
Adrenal hyperplasia	
Pheochromocytoma	
Leydig cell and ovarian neoplasms	66%
Intramuscular myxoma	61%
Fibrous dysplasia	>70%
Mazabraud Syndrome	

2.3 Fibröse Dysplasie

Bei der fibrösen Dysplasie (FD) handelt es sich um eine gutartige intraossäre tumoröse Knochenerkrankung (DiCaprio and Enneking 2005), welche zunächst nur im Zusammenhang mit dem McCune-Albright-Syndrom beschrieben wurde (Shenker et al. 1994). Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei der fibrösen Dysplasie um eine Erkrankung mit großer Variabilität hinsichtlich ihrer klinischen, morphologischen und radiologischen Manifestation handelt (Wirth 2012), welche auch sporadisch auftreten kann (Lee et al. 2012) (Kiss et al. 2010). Das Manifestationsalter liegt meist unter dem 30. Lebensjahr und Frauen

scheinen häufiger betroffen zu sein als Männer (Idowu et al. 2007). Durch den nicht selten klinisch stummen Verlauf der fibrösen Dysplasie ist es schwer, eine genaue Aussage zur Prävalenz zu geben, vorangegangene Studien schätzen diese aber auf ca. 5-7% (DiCaprio and Enneking 2005, Wirth 2012). Die fibröse Dysplasie kann als monoostotische Form nur einen Knochen oder als polyostotische Form mehrere Knochen befallen, wobei die häufigste Lokalisation in den langen Röhrenknochen, den Rippen und den kraniofazialen knöchernen Strukturen zu verzeichnen ist (DiCaprio and Enneking 2005). Mit ca. 70% überwiegt die monoostotische Form der sporadischen fibrösen Dysplasie (Weinstein et al. 2002). Die polyostotische Form scheint wiederum mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Auftretens von klinischen Symptomen assoziiert zu sein, was sich vorrangig durch lokale Schmerzen, Schwellungen, Knochendeformitäten und dem Auftreten pathologischer Frakturen zeigt (Wirth 2012). Das Risiko einer malignen Entartung zu einem Osteosarkom liegt laut vorangegangener Studien zwischen 0,4% und 4% (DiCaprio and Enneking 2005). Histopathologisch kennzeichnet die fibröse Dysplasie eine hohe Variabilität. Neben eher osteolytischen Formen sind auch sklerosierende oder osteolytisch-sklerotische Mischformen beobachtet worden, wobei die Größenausdehnung des Tumors stark variieren kann. Mikroskopisch zeigen sich eine aufgelockerte Knochenmatrix, spindelförmige Zellen mit niedrigen Mitoseraten und Ausziehungen der kollagenen Fasern (Lee et al. 2012, Wirth 2012) (siehe Abb. 3).

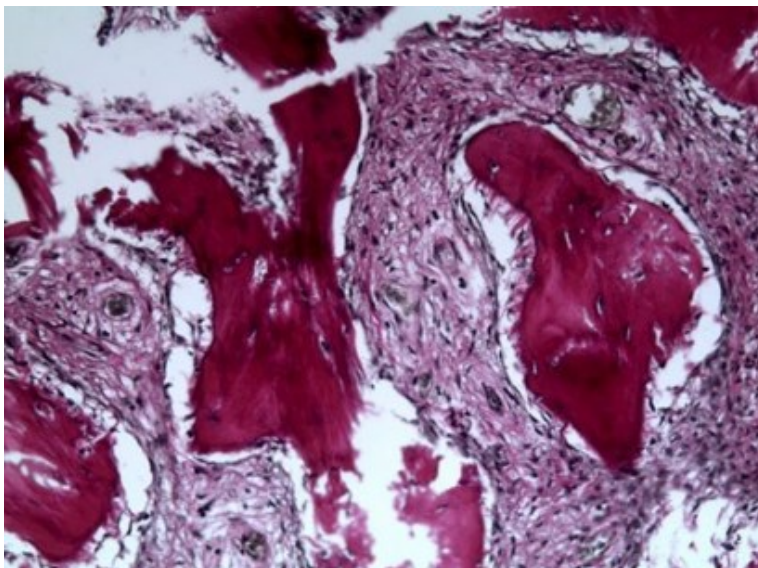


Abb. 3: Histologie einer fibrösen Dysplasie. Aufgelockerte Knochenmatrix mit spindelförmigen Zellen und radiär eingelagerten Kollagenfasern (nach Wirth 2012).

Aufgrund der histologischen Überschneidung mit einigen anderen benignen fibroossären Knochenveränderungen kann die Differentialdiagnose zur fibrösen Dysplasie (FD) zuweilen sehr schwierig sein (Liang et al. 2011). Eine der wichtigsten Differentialdiagnosen ist dabei das FD-ähnliche niedrig maligne Osteosarkom, welches äußerst schwer von der fibrösen Dysplasie abzugrenzen ist und insbesondere wegen seines malignen Potentials einer korrekten Diagnose bedarf (Lee et al. 2012). Als Ursache der Entstehung der sporadisch auftretenden fibrösen Dysplasie konnte parallel zur Entstehung der fibrösen Knochenläsionen im Rahmen eines McCune-Albright-Syndroms die aktivierende postzygotische Mutation im Exon 8 des *GNAS1* Gens detektiert werden (Wirth 2012). Die häufigsten Mutationen sind dabei die missense-Mutationen im Codon 201, jedoch wurden auch einige wenige fibröse Dysplasie-Fälle mit missense-Mutationen in Codon 227 beschrieben (Idowu et al. 2007, Lee et al. 2012). Lee et al. detektieren die Prävalenz der aktivierenden *GNAS1* missense Mutationen in einer großen Metaanalyse auf über 70% (Lee et al. 2012).

2.4 Intramuskuläre Myxome

Das intramuskuläre Myxom ist ein seltener benigner Weichgewebstumor, der in der aktuellen WHO-Klassifikation den Weichgewebstumoren mit unklarer Differenzierung zugeordnet wird (Luebke et al. 2012). Die Inzidenz der Erkrankung wird mit 0,1-0,13 pro 100 000 Einwohner angegeben (Heymans et al. 1998). Bisher wurde in der Literatur kein malignes Entartungspotential des Tumors beschrieben (Willems et al. 2009). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen der fünften und achten Lebensdekade und Frauen sind mit 60-70% häufiger betroffen als Männer (Heymans et al. 1998, Luebke et al. 2012). Die Tumoren haben ihre Lokalisation vorrangig in den großen stammnahen Muskelpartien, wie Rücken-, Oberschenkel-, Gluteal- und Schultermuskulatur, können aber auch seltener in kleineren Muskelarealen vorkommen. Ihre Größe bewegt sich in den meisten Fällen zwischen 5-10 cm Durchmesser (Yamashita et al. 2013). Die intramuskulären Myxome liegen als isolierte Läsion vor und können sporadisch oder im Zusammenhang mit einem McCune-Albright-Syndrom oder einer fibrösen Dysplasie vorkommen (Delaney et al. 2009, Luebke et al. 2012, Silver et al. 2002). Es handelt sich um einen langsam wachsenden Tumor, der wegen seiner häufig blanden Klinik meist als Zufallsbefund detektiert wird (Luebke et al. 2012). Histologisch ist das intramuskuläre Myxom gekennzeichnet durch stern- und spindelförmige Zellen, welche eingebettet sind in ein hypovaskuläres und hypozelluläres myxoides Stroma.

Es kann die angrenzende Muskulatur infiltrieren und dabei Pseudozysten ausbilden. Zelluläre Atypien fehlen (Charron and Smith 2004, Yamashita et al. 2013) (siehe Abb. 4).

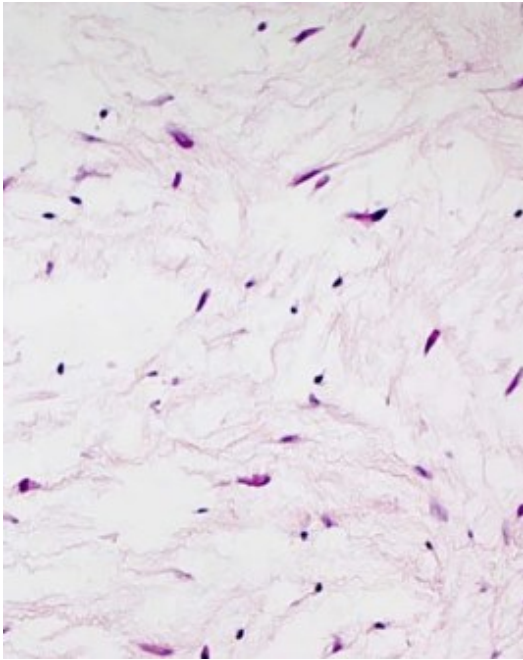


Abb. 4: Histologie eines intramuskulären Myxoms. Zellarmes hypovaskularisiertes myxoides Stroma mit eingelagerten stern- und spindelförmigen Zellen (nach Luebke et al. 2012).

Wichtige Differentialdiagnosen, von denen es das intramuskuläre Myxom zu unterscheiden gilt, sind das juxtaartikuläre Myxom und das low grade Myxofibrosarkom (Luebke et al. 2012, Yamashita et al. 2013). Beide zeigen eine dem intramuskulärem Myxom sehr ähnliche Histologie und sind von diesem nur schwer zu differenzieren. Ein wesentlicher Unterschied dieser beiden Entitäten zum intramuskulären Myxom ist allerdings, dass bei ihnen bisher keine Mutationen im Codon 201 des GNAS1 Gens detektiert wurde, sodass dieser Umstand zur Stellung der korrekten Diagnose einbezogen werden könnte (Luebke et al. 2012, Yamashita et al. 2013). Das intramuskuläre Myxom zeigt im Gegenzug dazu die aktivierenden missense-Mutationen im Codon 201 des Exons acht des GNAS1 Gens mit einer Prävalenz von bis zu 61% (Delaney et al. 2009).

2.5 Mazabraud Syndrom

Treten die fibröse Dysplasie und das intramuskuläre Myxom in Kombination auf, spricht man von dem sehr seltenen Mazabraud Syndrom. Erstmals beschrieben von Henschen 1926 und von Mazabraud im Jahre 1967 (Petersen et al. 2012), sind bis heute erst knapp über 80

beschriebene Fälle in der Literatur bekannt (Gaumétou et al. 2012, Schimmöller et al. 2012). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 45 Jahren und Frauen sind wesentlich häufiger betroffen als Männer (Pollandt et al. 2002). Die fibröse Dysplasie kann bei dieser Erkrankung sowohl in mono- als auch polyostotischer Form vorliegen. Außerdem ist auffallend, dass die intramuskulären Myxome, die sonst nur solitär auftreten, im Rahmen des Mazabraud Syndrom multipel vorliegen können (Gaumétou et al. 2012). Die Verbindung eines solitären intramuskulären Myxoms mit einer monoostotischen fibrösen Dysplasie ist eine sehr seltene Variante des Syndroms (Endo et al. 2007). Beide Läsionen liegen häufig im gleichen anatomischen Gebiet, ein Zusammenhang zum Mazabraud Syndrom wird aber meist erst nach der Diagnose eines intramuskulären Myxoms hergestellt, welches in anatomischer Nähe zu einer meist Jahre zuvor diagnostizierten fibrösen Dysplasie liegt (Kabukcuoglu et al. 2004). Ein wichtiger Aspekt des Syndroms stellt die Tatsache dar, dass das maligne Potential der fibrösen Dysplasie erhöht scheint. Liegt die Entartungsrate zum Osteosarkom bei sporadisch auftretenden fibrösen Dysplasien bei max. 4%, so ist sie im Rahmen des Mazabraud Syndroms auf bis zu 8,3% erhöht (Gaumétou et al. 2012, John et al. 2013, Munksgaard et al. 2013). Eine maligne Entartung eines in das Mazabraud Syndrom involvierte intramuskuläre Myxom ist bis heute nicht beschrieben. Entsprechend des Auftretens der Mutationen in den beiden sporadisch auftretenden Entitäten, wurden die Punktmutationen im GNAS1 Gen auch beim Mazabraud Syndrom beschrieben (Gaumétou et al. 2012, Munksgaard et al. 2013).

3 Ziele der Arbeit

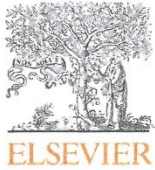
Die vorangegangene ausführliche Schilderung der aktuellen Datenlage bezüglich des Vorkommens der aktivierenden GNAS1 Mutation wirft die Frage auf, welchen diagnostischen Stellenwert die GNAS1 Mutationsanalyse bei der Diagnose und der Differentialdiagnose von myxoiden Knochen- und Weichteiltumoren einnimmt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Prävalenz der GNAS1 Mutationen in dem Hotspot-Codon 201 (R201H und R201C) bei der fibrösen Dysplasie und dem intramuskulären Myxom zu verifizieren. Desweiteren sollte der diagnostische Stellenwert der GNAS1 Mutationsanalyse in Hinsicht auf die Differentialdiagnose dieser Entitäten, sowie auf das Vorkommen der GNAS1 Mutation bei dem Vorhofmyxom, analysiert werden.

4 Publierte Originalarbeit

Analysis of GNAS1 mutations in myxoid soft tissue and bone tumors

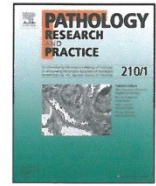
Ina Walther, Bernhard Maria Walther, Yuan Chen, Iver Petersen

Pathology – Research and Practice, 210, 1, 1-4, 2014



Contents lists available at ScienceDirect

Pathology – Research and Practice

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prp

Original Article

Analysis of GNAS1 mutations in myxoid soft tissue and bone tumors



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

Institute of Pathology, University Hospital Jena, Friedrich-Schiller-University Jena, Ziegelmühlenweg 1, 07740 Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2013

Received in revised form 8 July 2013

Accepted 3 September 2013

Keywords:

GNAS1 mutations

Myxoid soft tissues

Bone tumors

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the prevalence of GNAS1 mutations in various tumor types, including intramuscular myxomas, fibrous dysplasias, and other myxoid tumors and implications for malignant transformation.

PCR and direct sequencing were applied to analyze GNAS1 mutation status using genomic DNA isolated from 97 formalin-fixed and paraffin-embedded samples, including 63 intramuscular myxomas, 19 various myxoid lesions, 8 cases of sporadically occurring fibrous dysplasia, and 7 cases of atrial myxoma.

Mutations of GNAS1 were detected in 23 out of 63 (36.5%) intramuscular myxoma patients, with mutational hotspots R201H and R201C being equally affected. GNAS1 mutations in codon 201 were found in 5 out of 8 fibrous dysplasias (62.5%), while no mutations of GNAS1 were detected in the other studied entities, including atrial myxomas.

GNAS1 mutation analysis has diagnostic value in screening patients with intramuscular myxoma and patients with fibrous dysplasia.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The aim of our work was the study of two activating mutation hotspots of the GNAS1 gene, R201C and R201H. The gene is located on chromosome 20q13.2–q13.3. It harbours 13 exons, shows alternative splicing and is involved in genomic imprinting. [1,2]. It is controlled by four alternative promoters, alternative 5' first exons and differently methylated regions [3–5]. The gene plays an important role in many different metabolic and regulatory pathways by encoding the alpha subunit of G protein, G α , which couples receptor binding by several hormones to the activation of adenylate cyclase. The gene also encodes for several gene products, including paternally expressed XL α s, XXL α s, A/B-transcript and maternally expressed NESP55 [6]. The G α expression is biallelic in most tissues, with a few exceptions like the pituitary gland, thyroid gland, parts of the renal tubules, and the gonads [7]. G-proteins are ubiquitous and are an essential part of transmembrane signaling. The G proteins forward an extracellular signal through nucleotide exchange into a cell and can regulate further functions. Loss of signals from the extracellular environment or erratic stimulation of signals from the extracellular environment may cause significant changes in transmembrane signaling. Small mutations of the G α protein can result in the alteration of widespread downstream

intracellular signaling pathways. Thus GNAS1 gene mutations may play a role in various disease processes and tumorigenesis of several tissue tissues.

An activating mutation in the GNAS1 gene results in an enhanced stimulation of adenylyl cyclase and an augmented intracellular activity of cAMP [8,9]. Diseases associated with GNAS1 activating mutations include: (1) McCune–Albright syndrome, a rare genetic disorder of the bone combined with skin pigmentation, premature puberty, and endocrine disorders [10,11]; (2) sporadic fibrous dysplasia of the bone [12–14]; (3) intramuscular myxomas; (4) growth hormone producing pituitary adenomas [15,16]; (5) thyroid nodules [1,17]; and (6) adrenocortical hyperplasia [18].

GNAS1 mutations associated with fibrous dysplasia of the bone were initially described only in cases of polyostotic fibrous dysplasias found in McCune–Albright syndrome [8,9]. Later, GNAS1 mutations were found in over 70% of sporadic fibrous dysplasias of the bone [7]. Intramuscular myxomas are rare benign soft tissue tumors characterized by spindle cells embedded in a hypovascular and hypocellular myxoid stroma (Fig. 1). Intramuscular myxomas arise mainly in women in their 5th–8th decade and are found predominately in large axial muscles, including the back, thigh, and gluteal muscles. There are no reported cases of malignant progressions of intramuscular myxomas. However, it is difficult to distinguish intramuscular myxomas from low-grade malignant myxofibrosarcomas [19,20]. Furthermore, Mazabraud's syndrome is a rare syndrome in which patients have both multiple intramuscular myxomas and polyostotic fibrous dysplasia of the bones, first described by Henschen in 1926 and by Mazabraud in 1967 [21]. There have only been 80 reported cases [22,23]. Mazabraud's

* Corresponding author at: Institute of Pathology, University Hospital Jena, Friedrich-Schiller-University Jena, Ziegelmühlenweg 1, 07743 Jena, Germany. Tel.: +49 03641 933120; fax: +49 03641 933111.

E-mail address: iver.petersen@med.uni-jena.de (I. Petersen).

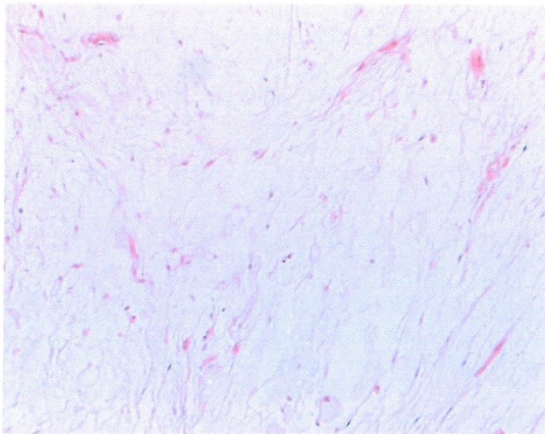


Fig. 1. Histological morphology of intramuscular myxoma.

syndrome affects women twice as often as men, the average age of diagnosis being 45 years.

In both solitary intramuscular myxoma and multiple intramuscular myxomas as seen in Mazabraud’s syndrome, activating missense mutations R201H and R201C are detected in exon 8 at codon 201 of the GNAS1 gene [20].

These data raise the question of whether mutation analysis of the GNAS1 gene can help to distinguish between fibrous dysplasia of the bone and malignant bone lesions, as well as between intramuscular myxoma and other myxoid soft tissue lesions. Therefore, the aim of our work was to verify the prevalence of the GNAS1 mutations in codon 201 in intramuscular myxoma, fibrous dysplasia of the bone, and a spectrum of various myxoid lesions, including atrial myxomas.

Materials and methods

Tumor samples

Eight samples of fibrous dysplasia of the bone originated from from the tibia and femur. Sixty-three intramuscular myxomas were derived primarily from excisions of thigh muscles, calf muscle, gluteal muscles, and back muscle. Additionally, a spectrum of 19 various myxoid lesions, including 2 angiomyxomas, 1 ossified fibromyxoid tumor, 1 myxoid chondrosarcoma, 1 chondrolipoma, 2 myxoid liposarcomas, 2 myxofibrosarcomas, 1 angiofibroma, 1 fibromyxoma, 1 myxoid neurothekeoma, 1 spindle cell lipoma, 1 nodular fasciitis, 1 chronic scarring sinusitis, 1 atypical lipoma with fibrous component, and 3 not otherwise specified myxoid tumors were enrolled in the study (Table 1). Furthermore, we analyzed 7

Table 1
Study cohort.

Entity	Case number
Intramuscular myxoma	63
Atrial myxoma	7
Fibrous dysplasia of the bone	8
Various myxoid lesions	19 [2 Angiomyxomas, 1 ossifying fibromyxoid tumor, 1 myxoid chondrosarcoma, 1 chondrolipoma, 2 myxoid liposarcomas, 2 myxofibrosarcomas, 1 angiofibroma, 1 fibromyxoma, 1 myxoid neurothekeoma, 1 spindle cell lipoma, 1 nodular fasciitis, 1 chronic scarring sinusitis, 1 atypical lipoma with fibrous component, 3 not otherwise specified myxoid tumors]

atrial myxomas originating from the left atrium. All the samples were retrieved from the database of the Institute of Pathology of Jena University Hospital from 2005 to 2012.

Genomic DNA extraction, PCR, and mutation analysis

Genomic DNA was extracted from FFPE tissues using a QiAmp® DNA Mini Kit according to the manufacturer’s instructions (QIAGEN, Germany). In 32 cases, manual microdissection was performed. PCR amplification was carried out with the following primer pair: 5’-CTCTTCCAAACTACTCCAGACC-3’ (sense) and 5’-AGCTGGTATTCCAGAGGGACT-3’ (antisense). PCR was performed in a 50 µl volume (50–100 ng genomic DNA, 2.0 mM dNTPs, and 10 pmol of each primer) with the following condition: 94 °C 1 min, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s, for 40 cycles, with initial denaturation at 95 °C for 15 min and final elongation at 72 °C for 7 min. Positive and negative controls were included. The expected size of PCR product for GNAS1 is 252-bp. All PCR products were visualized on a 1.5% agarose gel stained with gelRED for 20–30 min (VWR, Germany). PCR products were purified using a DNA Clean&Concentrator™ 5-KIT (Zymo Research, Germany) according to the manufacturer’s guide. One hundred nanograms of purified PCR products were applied for direct sequencing by capillary electrophoresis (LGC Genomics, Berlin, Germany).

Results

Five out of eight analyzed fibrous dysplasia of the bone proved positive for GNAS1 mutation in codon 201, resulting in a mutation rate of 62.5% in this entity, with three cases bearing R201H mutations (60%) and two cases (40%) showing R201C mutations. The 63 intramuscular myxoma cases originated from 48 female (76.2%) and 15 male patients (23.8%). The mutation analysis showed that 23 out of 63 (36.5%) intramuscular myxomas harbored mutations at codon 201 in the GNAS1 gene. In the 23 positive mutation cases, 12 cases showed a R201C mutation (52.2%) while the other 11 cases exhibited a R201H mutation (47.8%). With regard to gender difference, 19 out of the 23 mutated cases were from women (82.6%) and four cases were from men (17.4%). The mean age of patients with GNAS1 mutation was 61.4 years, the mean age of patients without was 59.6 years. No differences could be found in patients with or without GNAS1 mutation. Analysis of the site of the lesions showed that 15 out of 23 mutated samples were localized in the muscles of the thigh, 4 cases in the gluteal muscle, 2 cases in the calf, and 2 cases in the back muscles. Furthermore, we noticed that the samples of intramuscular myxomas without GNAS1 mutation derived primarily from smaller, peripheral muscles. Other clinical features could not be obtained for this study. Additionally, none of the 19 various myxoid lesions showed a GNAS1 mutation at codon 201 and no mutation of GNAS1 was detected in the 7 atrial myxomas (Figs. 2 and 3).

Discussion

Mutation detection can be a powerful adjunct to diagnostic histopathology when combined with microscopic features [20]. In this study, we found that 62.5% of the sporadic occurring fibrous dysplasia had GNAS1 exon 8 mutations. Lee et al. observed similar percentages of mutations at the hotspot 201 (58.3–71.9%) These findings support the notion that GNAS1 mutation is a frequent molecular event in fibrous dysplasia. One of the most difficult differential diagnoses of fibrous dysplasia is the fibrous-dysplasia-like low-grade osteosarcoma. There is a radiological and histological overlap between both entities and the prevalence of GNAS1 mutations in the sarcoma is very low. Only one case of R201C

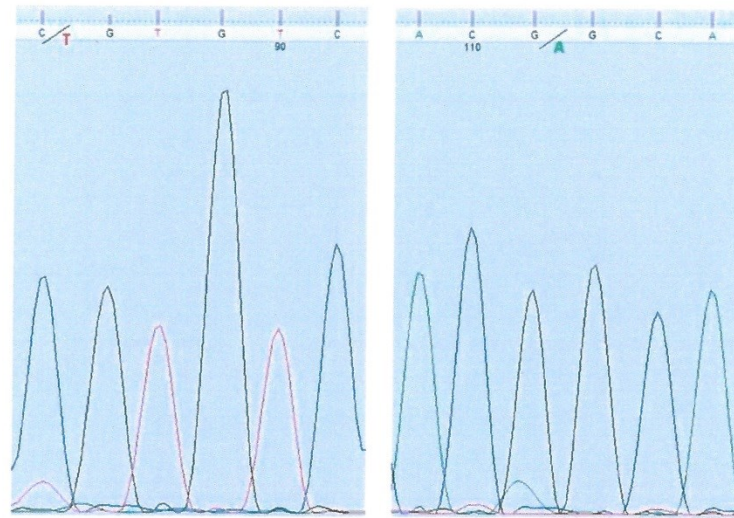


Fig. 2. Sequence analysis of GNAS1 R201H mutation with forward (left) and reverse primers (right) in intramuscular myxoma.

mutation in fibrous-dysplasia-like low-grade osteosarcoma could be demonstrated by Pollandt et al. [24]. However, it must be said that other criteria, such as the radiological setting, clinical criteria and immunohistochemical analysis of MDM2 and CDK4, are considerably more important to determine the correct diagnosis. Although the value of the mutation analysis for distinguishing between fibrous dysplasia and malignant bone lesions is limited it might provide relevant support for establishing the correct diagnosis. Other studies have also shown the importance of the GNAS1 mutation status in codon 201 in relation to the differential diagnosis between fibrous dysplasia and other benign fibro-osseous lesions [25]. Our case of an ossifying fibromyxoid tumor, which was negative for the mutation, supports this hypothesis.

Intramuscular myxoma, a rare benign soft tissue tumor, is characterized by the appearance of a missense mutation in codon 201 (exon 8) of the GNAS1 gene, where arginine is exchanged to histidine or cysteine (R201H and R201C). Our investigation of 63 cases has shown a prevalence of this mutation of 36.5% by using conventional PCR and direct sequencing. This result is in good agreement with data published up to now [20]. Certainly, there are reasons to believe that the prevalence of the mutation is vastly higher. Delaney et al. detected a higher mutation rate of 61% by using

coamplification at lower denaturation temperature PCR as a more sensitive examination method [20]. In this context it should be mentioned that the mutation is usually represented by a small peak in the sequence profile (see Fig. 2) which may impede its correct identification. The distinction between intramuscular myxoma and grade I myxofibrosarcoma can be difficult because of their histological overlap. Both are characterized by a myxoid matrix. Utilization of a sensitive method to analyze the GNAS1 mutation status in codon 201 can be helpful in distinguishing between the two entities since the GNAS1 mutation does not seem to exist in low grade myxofibrosarcoma [26]. Our two cases of myxofibrosarcoma were also negative for the GNAS1 mutation, thus corroborating the observation. Moreover, in contrast to the mutation analysis of fibrous dysplasia, our analysis of intramuscular myxoma shows an approximately uniform distribution of R201C (52.17%) and R201H (47.8%) missense mutations.

On the other hand, it is also possible that at least some of the GNAS1 mutation-negative intramuscular myxomas harbor a Q227 mutation, which occurs in a small proportion of cases of fibrous dysplasia [27]. However, in this study, we only focused on the mutation status of GNAS1 at codon 201. It would be interesting to analyze GNAS1 mutations at other codons in the future.

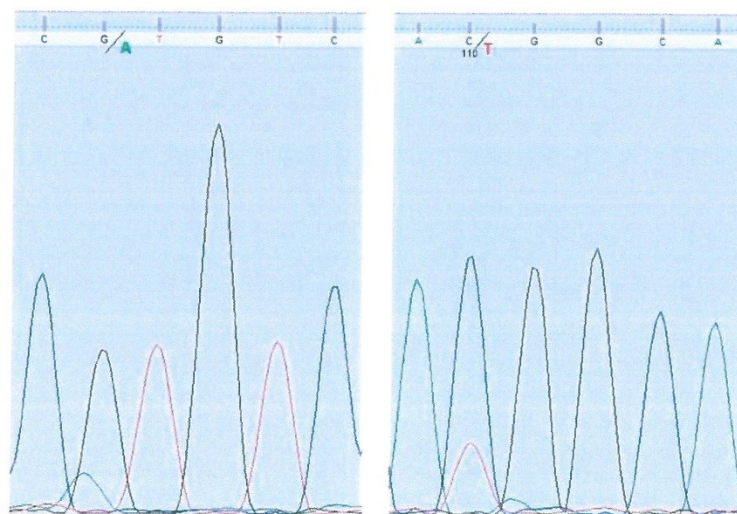


Fig. 3. Sequence analysis of GNAS1 R201C mutation with forward (left) and reverse primers (right) in intramuscular myxoma.

Furthermore, it is highly advisable to consider the possibility of an occurrence of Mazabraud's syndrome after finding a GNAS1 mutation-positive intramuscular myxoma. It could be advantageous to test patients who have either isolated intramuscular myxoma or isolated fibrous dysplasia for the other tumor entity for a potential diagnosis of a Mazabraud's syndrome because an increased risk of malignant transformation of the fibrous dysplasia to osteosarcoma exists. By contrast, no case of malignant transformation of intramuscular myxoma in Mazabraud's syndrome has been identified [23,28]. It is particularly critical to consider Mazabraud's syndrome if the two lesions are localized the same region [23]. Additionally, we analyzed the mutation status of GNAS1 in 19 other myxoid lesions and 7 atrial myxomas. It turned out that all of these cases were negative for GNAS1 mutation. Consequently, it can be stated once more that the mutation analysis may be useful to distinguish among several myxoid lesions, and that GNAS1 mutations are non-existing or at least rare in atrial myxoma.

Analysis of tumors using a simple biopsy for their malignant potential is critical for the affected person. It can be very reassuring to a clinician to possess that knowledge before deciding whether to pursue a surgical or conservative treatment. We hope that our findings can help guide patients and doctors to the right diagnosis and therapy of fibromyxoid lesions of the bone and soft tissue.

Take home messages

- (1) The GNAS1 gene plays an important role in different pathways and metabolic procedures. It encodes for the alpha subunit of the ubiquitously expressed stimulatory G-proteins. Mutations in the gene are associated with a broad range of different diseases and may cause significant changes in cell signaling.
- (2) The mutation analysis of exon 8 at codon 201 of the gene may help to distinguish between low grade myxofibrosarcoma and intramuscular myxoma.

Acknowledgements

The technical assistance of Kristin Zöller and Carola König is gratefully acknowledged. The work was supported by the BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Grant no. 0315509C).

References

- [1] L.S. Weinstein, M. Chen, J. Liu, Gs(alpha) mutations and imprinting defects in human disease, *Ann. NY Acad. Sci.* 968 (2002) 173–197.
- [2] S. Krechowec, A. Plagge, Physiological dysfunctions associated with mutations of the imprinted Gnas locus, *Physiology (Bethesda)* 23 (2008) 221–229.
- [3] M. Bastepe, The GNAS locus: quintessential complex gene encoding Gsalpha, XLalphas, and other imprinted transcripts, *Curr. Genomics* 8 (2007) 398–414.
- [4] A. Plagge, G. Kelsey, Imprinting the Gnas locus, *Cytogenet. Genome Res.* 113 (2006) 178–187.
- [5] S. Wadhawan, B. Dickins, A. Nekrutenko, Wheels within wheels: clues to the evolution of the Gnas and Gnal loci, *Mol. Biol. Evol.* 25 (2008) 2745–2757.
- [6] V. Mariot, J.Y. Wu, C. Aydin, G. Mantovani, M.J. Mahon, A. Linglart, M. Bastepe, Potent constitutive cyclic AMP-generating activity of XL α s implicates this imprinted GNAS product in the pathogenesis of McCune–Albright syndrome and fibrous dysplasia of bone, *Bone* 48 (2011) 312–320.
- [7] S.E. Lee, E.H. Lee, H. Park, J.Y. Sung, H.W. Lee, S.Y. Kang, S. Seo, B.H. Kim, H. Lee, A.N. Seo, G. Ahn, Y.L. Choi, The diagnostic utility of the GNAS mutation in patients with fibrous dysplasia: meta-analysis of 168 sporadic cases, *Hum. Pathol.* 43 (2012) 1234–1242.
- [8] P. Bianco, M. Riminucci, A. Majolagbe, S.A. Kuznetsov, M.T. Collins, M.H. Mankani, A. Corsi, H.G. Bone, S. Wientroub, A.M. Spiegel, L.W. Fisher, P.G. Robey, Mutations of the GNAS1 gene, stromal cell dysfunction, and osteomalacic changes in non-McCune–Albright fibrous dysplasia of bone, *J. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 120–128.
- [9] A. Shenker, L.S. Weinstein, D.E. Sweet, A.M. Spiegel, An activating Gs alpha mutation is present in fibrous dysplasia of bone in the McCune–Albright syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 750–755.
- [10] A. Shenker, L.S. Weinstein, A. Moran, O.H. Pescovitz, N.J. Charest, C.M. Boney, J.J. Van Wyk, M.J. Merino, P.P. Feuille, A.M. Spiegel, Severe endocrine and nonendocrine manifestations of the McCune–Albright syndrome associated with activating mutations of stimulatory G protein GS, *J. Pediatr.* 123 (1993) 509–518.
- [11] L.S. Weinstein, A. Shenker, P.V. Gejman, M.J. Merino, E. Friedman, A.M. Spiegel, Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune–Albright syndrome, *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1688–1695.
- [12] P. Bianco, P.G. Robey, An animal model of fibrous dysplasia, *Mol. Med. Today* 5 (1999) 322–323.
- [13] T. Wirth, Fibrous dysplasia, *Orthopade* 41 (2012) 993–1006.
- [14] S. Zhang, F.S. Kaplan, E.M. Shore, Different roles of GNAS and cAMP signaling during early and late stages of osteogenic differentiation, *Horm. Metab. Res.* 44 (2012) 724–731.
- [15] S. Vandeva, M.L. Jaffrain-Rea, A.F. Daly, M. Tichomirowa, S. Zacharieva, A. Beckers, The genetics of pituitary adenomas, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24 (2010) 461–476.
- [16] G. Mantovani, A.G. Lania, A. Spada, GNAS imprinting and pituitary tumors, *Mol. Cell. Endocrinol.* 326 (2010) 15–18.
- [17] E. Nishihara, N. Amino, K. Maekawa, H. Yoshida, M. Ito, S. Kubota, S. Fukata, A. Miyauchi, Prevalence of TSH receptor and Gsalpha mutations in 45 autonomously functioning thyroid nodules in Japan, *Endocrinol. J.* 56 (2009) 791–798.
- [18] M.Q. Almeida, M.F. Azevedo, P. Xekouki, E.I. Bimpaki, A. Horvath, M.T. Collins, L.P. Karaviti, G.S. Jeha, N. Bhattacharyya, C. Cheadle, T. Watkins, I. Bourdeau, M. Nesterova, C.A. Stratakis, Activation of cyclic AMP signaling leads to different pathway alterations in lesions of the adrenal cortex caused by germline PRKAR1A defects versus those due to somatic GNAS mutations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) E687–E693.
- [19] A.M. Luebke, C. Gocke, M. Priemel, T.J. Grob, J. Zustin, Intramuscular myxoma of the lower leg, *Pathologe* (2012).
- [20] D. Delaney, T.C. Diss, N. Presneau, S. Hing, F. Berisha, B.D. Idowu, P. O'Donnell, J.A. Skinner, R. Tirabosco, A.M. Flanagan, GNAS1 mutations occur more commonly than previously thought in intramuscular myxoma, *Mod. Pathol.* 22 (2009) 718–724.
- [21] T.O. Petersen, T. Kahn, M. Reiss-Zimmermann, Simple and yet so difficult: common occurrence of fibrous dysplasia and myxomas – the Mazabraud syndrome, *Rofo* 184 (2012) 831–832.
- [22] L. Schimmöller, N. Lehwald, G. Antoch, P. Kröpil, Polyostotic fibro-osseous lesions associated with intramuscular soft tissue neoplasms, *Radiologe* 52 (2012) 934–936.
- [23] E. Gaumétou, B. Tomeno, P. Anract, Mazabraud's syndrome. A case with multiple myxomas, *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 98 (2012) 455–460.
- [24] K. Pollandt, C. Engels, E. Kaiser, M. Werner, G. Dellling, Gsalpha gene mutations in monostotic fibrous dysplasia of bone and fibrous dysplasia-like low-grade central osteosarcoma, *Virchows Arch.* 439 (2001) 170–175.
- [25] Q. Liang, M. Wei, L. Hodge, J.C. Fanburg-Smith, A. Nelson, M. Miettinen, R.D. Foss, G. Wang, Quantitative analysis of activating alpha subunit of the G protein (Gs α) mutation by pyrosequencing in fibrous dysplasia and other bone lesions, *J. Mol. Diagn.* 13 (2011) 137–142.
- [26] S.M. Willems, A.B. Mohseny, C. Balog, R. Sewrajsing, I.H. Briaire-de Bruijn, J. Knijnenburg, A.M. Cleton-Jansen, R. Sciort, C.D. Fletcher, A.M. Deelder, K. Szuhai, P.J. Hensbergen, P.C. Hogendoorn, Cellular/intramuscular myxoma and grade I myxofibrosarcoma are characterized by distinct genetic alterations and specific composition of their extracellular matrix, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 1291–1301.
- [27] B.D. Idowu, M. Al-Adnani, P. O'Donnell, L. Yu, E. Odell, T. Diss, R.E. Gale, A.M. Flanagan, A sensitive mutation-specific screening technique for GNAS1 mutations in cases of fibrous dysplasia: the first report of a codon 227 mutation in bone, *Histopathology* 50 (2007) 691–704.
- [28] M.R. DiCaprio, W.F. Enneking, Fibrous dysplasia, pathophysiology, evaluation, and treatment, *J. Bone Joint Surg. Am.* 87 (2005) 1848–1864.

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung der GNAS1 Mutationsanalyse in der Diagnostik der fibrösen Dysplasie

In vorliegender Studie wurde eine Mutationsanalyse auf Exon 8 des GNAS1 Gens bei acht Fällen einer sporadisch auftretenden fibrösen Dysplasie durchgeführt. Der Focus lag dabei auf Codon 201, bei dem es durch eine Punktmutation zum Austausch von Arginin gegen Histidin (R201H) oder Cystein (R201C) kommen kann, was zu einer erhöhten Aktivität von cAMP und damit im Knochen zu gesteigerter Zellproliferation und abnormaler Zelldifferenzierung führt (Idowu et al. 2007). Fünf der von uns getesteten acht sporadischen fibrösen Dysplasien waren positiv für die detektierte Mutation, dies entspricht einer Prävalenz von 62,5%. In drei der Fälle erfolgte dabei ein Austausch von Arginin gegen Histidin (60%), in zwei Fällen gegen Cystein (40%). Diese Ergebnisse sind mit den Daten anderer Studien vergleichbar. In einer Metaanalyse beschrieben Lee et al. die Prävalenz der GNAS1 Mutation in Codon 201 mit 58,3%-71,9%. Die Verteilung der Hotspots R201H zu R201C ähnelte mit 66,4% für den Austausch gegen Histidin und 30,8% für den Austausch gegen Cystein unseren Daten (Lee et al. 2012). Kritisch muss angemerkt werden, dass die Fallzahl unseres Kollektivs recht klein war, um eine fundierte und valide Aussage zu Häufigkeit und Verteilung (R201C versus R201H) treffen zu können. Gleichwohl bestätigt unsere Arbeit die in vorangegangenen Studien gemachte Beobachtung, dass die aktivierende GNAS1-missense-Mutation ein frequentes genetisches Ereignis in der Entwicklung einer fibrösen Dysplasie darstellt (Lee et al. 2012). Zudem gibt es Grund zu der Annahme, dass die Prävalenz der GNAS1 Mutation in vielen bisherigen Studien unterschätzt wurde. Dies hat seine Begründung darin, dass die meist verwendete direkte Sequenzierung der durch PCR amplifizierten DNA-Abschnitte weniger sensitiv als einige andere Methoden zu sein scheint, wie beispielsweise die Pyrosequenzierung oder ein mutationsspezifischer Restriktionsenzymverdau (Idowu et al. 2007, Liang et al. 2011, Lietman et al. 2005, Puls et al. 2014). Unabhängig davon stellt sich allerdings die Frage, welche Position die GNAS1 Mutationsanalyse bei der Diagnosestellung einer fibrösen Dysplasie einnimmt. Der Goldstandard zur Diagnosesicherung einer fibrösen Dysplasie umfasst neben dem klinischen Bild der Erkrankung die radiologische Diagnostik und die mikroskopische Untersuchung (Idowu et al. 2007, Wirth 2012), womit in den meisten Fällen die sichere Diagnosestellung möglich ist (Tabareau-Delalande et al. 2013). Bei Fällen, die ein atypisches klinisches, morphologisches oder radiologisches Bild zeigen, könnte die

GNAS1 Mutationsanalyse allerdings sinnvoll sein, insbesondere auch in Hinsicht auf den Ausschluss der wichtigsten Differentialdiagnosen der fibrösen Dysplasie, dem FD-ähnlichen niedrig malignen Osteosarkom und anderen benignen fibroossären Läsionen (Lee et al. 2012, Tabareau-Delalande et al. 2013). Bei einigen vorangegangenen Studien wurde ein möglicher Zusammenhang der GNAS1 Mutation im Codon 201 mit dem FD-ähnlichen niedrig malignen Osteosarkom untersucht, wobei in keiner dieser Studien eine solche im genannten Osteosarkom nachgewiesen wurde (Lee et al. 2012, Puls et al. 2014, Tabareau-Delalande et al. 2013). Lediglich Pollandt et al. gelang der Nachweis einer R201C-Mutation in einem FD-ähnlichen niedrig malignen Osteosarkom (Pollandt et al. 2001). Nach aktueller Kenntnis ist dies allerdings der bisher einzig dokumentierte Fall einer solchen Mutation in einem FD-ähnlichen niedrig malignen Osteosarkom, sodass von einer sehr geringen Prävalenz der Mutation bei dieser Erkrankung ausgegangen werden muss. Dies impliziert, dass die GNAS1-Mutationsanalyse durch die im Vergleich dazu hohe Prävalenz der Mutation bei der fibrösen Dysplasie als unterstützende Diagnosemethode in der Differentialdiagnose beider Erkrankungen genutzt werden kann (Idowu et al. 2007). An dieser Stelle sollte allerdings kritisch darauf hingewiesen werden, dass andere supplementäre diagnostische Verfahren existieren, welche in der Differentialdiagnostik der fibrösen Dysplasie und des FD-ähnlichen niedrig malignen Osteosarkoms genutzt werden können. Einige Studien zeigen, dass die immunhistochemische Untersuchung auf MDM2 und CDK4 eine sensitive Methode darstellt, ein FD-ähnliches niedrig malignes Osteosarkom zu diagnostizieren. Demnach konnten die Marker bei dieser Erkrankung in bis zu 90% der Fälle detektiert werden, während MDM2 und CDK4 in benignen Knochenläsionen einschließlich der fibrösen Dysplasie nicht nachweisbar waren (Dujardin et al. 2011, Gilg et al. 2013). Damit stellt die immunhistochemische Untersuchung dieser beiden Marker eine sensitivere Methode dar, die beiden Entitäten voneinander zu unterscheiden. Einen höheren, aber in der Differentialdiagnose immer noch nur unterstützenden Part, scheint die GNAS1 Mutationsanalyse bei der Differentialdiagnose der fibrösen Dysplasie von anderen benignen fibroossären Läsionen inne zu haben. Bei diesen konnten keine aktivierenden GNAS1 Mutationen im Codon 201 nachgewiesen werden und Tabareau-Delalande et al. schlossen daraus, dass die entsprechende GNAS1 missense-Mutation innerhalb der benignen Knochenläsionen spezifisch für die fibröse Dysplasie ist. Dabei sollte bedacht werden, dass der fehlende Nachweis einer Mutation das Vorliegen einer fibrösen Dysplasie nicht ausschließt. Bei positiv getestetem Gewebe kann jedoch bei passender Histomorphologie von einer fibrösen Dysplasie ausgegangen werden. Schlussfolgernd könnte man sagen, dass die GNAS1 Mutationsanalyse der aktivierenden

missense-Mutationen im Codon 201 auf Exon 8 eine wichtige supplementäre Rolle in der Diagnose und Differentialdiagnose der fibrösen Dysplasie und benigner und maligner fibroossärer Knochenläsionen einzunehmen vermag.

5.2 Die Bedeutung der GNAS1 Mutationsanalyse in der Diagnostik der intramuskulären Myxome

In der Gruppe der intramuskulären Myxome umfasste unsere Studie ein Fallkollektiv von 63 Tumoren. Davon zeigten 23 Fälle eine aktivierende Mutation im Codon 201 des GNAS1 Gens, was einer Prävalenz von 36,5% entspricht. Auch diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen vorangegangener Studien. So detektierten Delaney et al. bereits im Jahr 2009 unter Nutzung von konventioneller PCR und bei einer kleineren Patientengruppe eine Prävalenzrate der aktivierenden GNAS1 Mutationen auf Exon 8 von 29%, sodass der geringe Unterschied in der Mutationsrate am ehesten auf die unterschiedliche Fallzahl beider Studien zurück zu führen sein dürften (Delaney et al. 2009). Wie auch bei der Mutationsanalyse der fibrösen Dysplasie des Knochens scheint allerdings die Probensequenzierung der mittels konventioneller PCR amplifizierten DNA weniger sensitiv als andere Analysemethoden zu sein. Delaney et al. detektierten unter Nutzung einer sogenannten COLD-PCR mit geringerer Amplifikationstemperatur und anschließendem spezifischen Restriktionsenzymverdau eine Prävalenz der GNAS1 Mutation im Codon 201 von 61% (Delaney et al. 2009). Daher scheint auch beim intramuskulären Myxom die Häufigkeit der GNAS1 Mutation bisher unterschätzt worden zu sein. Im Bezug auf die Verteilung der beiden Mutationen konnten wir mit 52,2% für die R201C-Mutation und mit 47,8% für die R201H-Mutation bei den getesteten intramuskulären Myxomen eine annähernde Gleichverteilung feststellen. Auch dieser Umstand korreliert mit den publizierten Daten von Delaney et al. (Delaney et al. 2009). Die relativ hohe Mutationsrate rechtfertigt damit die Frage, inwiefern die Analyse der aktivierenden GNAS1 Mutationen in Diagnostik und Differentialdiagnostik des benignen Tumors zu anderen Entitäten genutzt werden kann. Diese Frage gilt es besonders in Bezug auf die Unterscheidung von intramuskulärem Myxom und low grade Myxofibrosarkom zu klären (Luebke et al. 2012). Das Myxofibrosarkom zeigt im Gegensatz zum intramuskulären Myxom eine Wahrscheinlichkeit der Metastasierung und der Rezidivbildung (Willems et al. 2009), weshalb es einer korrekten Diagnosestellung und Unterscheidung zum intramuskulärem Myxom bedarf. Ähnlich der Diagnostik der fibrösen Dysplasie kann die korrekte Diagnose eines intramuskulären Myxoms meist durch das Zusammenspiel von klinischem und

radiologischem Bild, Histologie und Immunhistochemie gestellt werden. Nichtsdestotrotz kann die Abgrenzung der beiden Entitäten bei Tumorrezidiven oder nur kleinen atypischen Gewebeproben zuweilen schwierig sein (Luebke et al. 2012). An dieser Stelle könnte die GNAS1 Mutationsanalyse zum entscheidenden diagnostischen Schritt beitragen, da bisher bei keinem der untersuchten low grade Myxofibrosarkome in der publizierten Literatur eine GNAS1 Mutation nachgewiesen wurde (Delaney et al. 2009, Luebke et al. 2012, Willems et al. 2009, Yamashita et al. 2013). Die zwei in dieser Studie exemplarisch untersuchten und für die GNAS1 Mutation negativen low grade Myxofibrosarkome unterstützen diese Feststellung. Delaney et al. analysierten zusätzlich ein Kollektiv von 19 high grade Myxofibrosarkomen, die ebenfalls negativ für die GNAS1 Mutationen im Codon 201 waren (Delaney et al. 2009). Eine weitere potentielle Differentialdiagnose des intramuskulären Myxoms ist das niedrig maligne fibromyxoide Sarkom (low grade fibromyxoid sarcoma, LGFMS). Es kommt zwar nur selten innerhalb der Muskulatur vor, doch kann die Histomorphologie ähnlich sein. Das LGFMS ist durch eine andere Mutation gekennzeichnet, die Fusion des FUS-Gens mit dem CREB3L2 oder seltener dem CREB3L3 Gen. Diese Mutation kann durch einen Chromosomenbruch im Bereich des FUS-Gens mittels einer sogenannten "Break-apart" Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) detektiert werden. Zudem konnte der immunhistologische Nachweis einer MUC4-Expression als Surrogatmarker für das Vorliegen eines Sarkoms mit Rearrangierung des FUS-Gens etabliert werden (Doyle et al. 2012, Yamashita et al. 2013).

Im Hinblick auf das bereits ausführlich beschriebene Mazabraud Syndrom könnte es von Vorteil sein, das medizinische Bewusstsein auf das Vorkommen dieser Erkrankung zu schärfen. Durch die bisher sehr geringe Zahl beschriebener Fälle (Gaumétou et al. 2012) und dem dadurch noch geringen Bekanntheitsgrad des Syndroms steht zu vermuten, dass es Fälle und Krankheitsverläufe gibt, bei denen die Diagnose des Mazabraud Syndroms nicht korrekt gestellt wird. Aufgrund der beschriebenen gesteigerten Entartungsrate der in ein Mazabraud Syndrom involvierten fibrösen Dysplasie des Knochens kann es jedoch von hohem Wert sein, bei Auftreten eines intramuskulären Myxoms bei einem Patienten mit bekannter fibröser Dysplasie an ein solches Syndrom zu denken und durch die adäquate Behandlung eventuelle maligne Krankheitsverläufe rechtzeitig zu erkennen und zu verhindern.

6 Schlussfolgerungen

Es kann als gesichert gelten, dass die aktivierenden missense-Mutationen im Codon 201 des Exons 8 des GNAS1 Gens ein frequentes Ereignis in der Pathogenese der fibrösen Dysplasie des Knochens und des intramuskulären Myxoms darstellen. Die vorliegende Arbeit korreliert dabei mit den Prävalenzangaben vorangegangener Studien, wobei davon ausgegangen werden muss, dass die Mutationshäufigkeit der GNAS1 Mutation in genannten Tumorgeweben aufgrund der Verwendung von Analysemethoden mit geringerer Sensitivität bisher noch unterschätzt wird. Neben klinischen, radiologischen, histologischen und immunhistochemischen Methoden kann die GNAS1 Mutationsanalyse sowohl in der Differentialdiagnostik zwischen fibröser Dysplasie, benignen fibroosären Knochenläsionen und dem FD-ähnlichen niedrig malignen Osteosarkom als auch zwischen intramuskulärem Myxom und low grade Myxofibrosarkom einen supportiven Stellenwert einnehmen. Für eine bessere Behandlung und schnellere und sicherere Diagnostik einer eventuellen malignen Entartung einer in ein Mazabraud Syndrom involvierten fibrösen Dysplasie sollte die Sensibilität für das Existieren dieser Erkrankung geschärft werden.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aldred MA, Trembath RC. 2000. Activating and Inactivating Mutations in the Human *Gnas1* Gene. *Hum Mutat*, 16(3):183-189.
- Aydin CN, Aytan N, Mahon MJ, Tawfeek HA, Kowall NW, Dedeoglu A, Bastepe M. 2009. Extralarge *Xl(Alpha)S* (*Xxl(Alpha)S*), a Variant of Stimulatory G Protein Alpha-Subunit (*Gs(Alpha)*), Is a Distinct, Membrane-Anchored *Gnas* Product That Can Mimic *Gs(Alpha)*. *Endocrinology*, 150(8):3567-3575.
- Bastepe M. 2007. The *Gnas* Locus: Quintessential Complex Gene Encoding *Gsalpha*, *Xlalphas*, and Other Imprinted Transcripts. *Curr Genomics*, 8(6):398-414.
- Bastepe M, Jüppner H. 2005. *Gnas* Locus and Pseudohypoparathyroidism. *Horm Res*, 63(2):65-74.
- Brandt DR, Ross EM. 1985. Gtpase Activity of the Stimulatory Gtp-Binding Regulatory Protein of Adenylate Cyclase, *Gs*. Accumulation and Turnover of Enzyme-Nucleotide Intermediates. *J Biol Chem*, 260(1):266-275.
- Bray P, Carter A, Simons C, Guo V, Puckett C, Kamholz J, Spiegel A, Nirenberg M. 1986. Human Cdna Clones for Four Species of G Alpha S Signal Transduction Protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(23):8893-8897.
- Charron P, Smith J. 2004. Intramuscular Myxomas: A Clinicopathologic Study with Emphasis on Surgical Management. *Am Surg*, 70(12):1073-1077.
- Delaney D, Diss TC, Presneau N, Hing S, Berisha F, Idowu BD, O'Donnell P, Skinner JA, Tirabosco R, Flanagan AM. 2009. *Gnas1* Mutations Occur More Commonly Than Previously Thought in Intramuscular Myxoma. *Mod Pathol*, 22(5):718-724.
- Diaz A, Danon M, Crawford J. 2007. Mccune-Albright Syndrome and Disorders Due to Activating Mutations of *Gnas1*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 20(8):853-880.
- DiCaprio MR, Enneking WF. 2005. Fibrous Dysplasia. Pathophysiology, Evaluation, and Treatment. *J Bone Joint Surg Am*, 87(8):1848-1864.
- Doyle LA, Wang WL, Dal Chin P, Lopez-Terrada D, Mertens F, Lazar AJ, Fletcher CD, Hornick JL. 2012. *Muc4* Is a Sensitive and Extremely Useful Marker for Sclerosing Epithelioid Fibrosarcoma: Association with *Fus* Gene Rearrangement. *Am J Surg Pathol*, 36(19):1444-1451.

- Dujardin F, Binh MB, Bouvier C, Gomez-Brouchet A, Larousserie F, Muret A, Louis-Brennetot C, Aurias A, Coindre JM, Guillou L, Pedeutour F, Duval H, Collin C, de Pinieux G. 2011. Mdm2 and Cdk4 Immunohistochemistry Is a Valuable Tool in the Differential Diagnosis of Low-Grade Osteosarcomas and Other Primary Fibro-Osseous Lesions of the Bone. *Mod Pathol*, 24(5):624-637.
- Endo MA, Kawai A, Kobayashi E, Morimoto Y, Yamaguchi U, Nakatani F, Chuman H, Seki K, Beppu Y. 2007. Solitary Intramuscular Myxoma with Monostotic Fibrous Dysplasia as a Rare Variant of Mazabraud's Syndrome. *Skeletal Radiol*, 36(6):523-529.
- Gaumétou E, Tomeno B, Anract P. 2012. Mazabraud's Syndrome. A Case with Multiple Myxomas. *Orthop Traumatol Surg Res*, 98(4):455-460.
- Gilg MM, Liegl B, Wibmer C, Maurer-Ertl W, Leithner A. 2013. Central Low-Grade Osteosarcoma with an Unusual Localization in the Diaphysis of a 12-Year Old Patient. *Radiol Oncol* 47(2):192-196.
- Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. 1998. Bidirectional Imprinting of a Single Gene: Gnas1 Encodes Maternally, Paternally, and Biallelically Derived Proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(26):15475-15480.
- Helms JB. 1995. Role of Heterotrimeric Gtp Binding Proteins in Vesicular Protein Transport: Indications for Both Classical and Alternative G Protein Cycles. *FEBS Lett*, 369(1):84-88.
- Heymanns O, Gebhart M, Alexiou J, de Saint Aubain N, Larsimont D. 1998. Intramuscular Myxoma. *Acta Chir Belg*, 98(3):120-122.
- Higashijima, T, Ferguson KM, Sternweis PC, Smigel MD, Gilman AG. 1987. Effects of Mg²⁺ and the Beta Gamma-Subunit Complex on the Interactions of Guanine Nucleotides with G Proteins. *J Biol Chem*, 262(2):762-766.
- Idouw BD, Al-Adnani M, O'Donnell P, Yu L, Odell E, Diss T, Gale RE, Flanagan AM. 2007. A Sensitive Mutation-Specific Screening Technique for Gnas1 Mutations in Cases of Fibrous Dysplasia: The First Report of a Codon 227 Mutation in Bone. *Histopathology*, 50(6):691-704.
- Ischia R, Lovisetti-Scamihorn P, Hogue-Angeletti R, Wolkersdorfer M, Winkler H, Fischer-Colbrie R. 1997. Molecular Cloning and Characterization of Nesp55, a Novel Chromogranin-Like Precursor of a Peptide with 5-Ht1b Receptor Antagonist Activity. *J Biol Chem*, 272(17):11657-11662.
- John A, Behera KK, Mathai T, Parmar H, Paul TV. 2013. Mazabraud Syndrome. *Indian J Endocrinol Metab*, 17(4):740-742.
- Kabukcuoglu F, Kabukcuoglu Y, Yilmaz B, Erdem Y, Evren I. 2004. Mazabraud's Syndrome: Intramuscular Myxoma Associated with Fibrous Dysplasia. *Pathol Oncol Res*, 10(2):121-123.

- Kiss J, Balla B, Kósa PJ, Borsy A, Podani J, Takács I, Lazáry A, Nagy Z, Bácsi K, Szlávy E, Szendrői M, Speer G, Orosz L, Lakatos P. 2010. [Changes of Gene Expression and Its Role in Pathogenesis in Fibrous and Non-Fibrous Dysplastic Bone Tissues in Women]. *Orv Hetil*, 151(40):1656-1665.
- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. 1996. Octreotide. *N Engl J Med*, 334(4):246-254.
- Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. 1989. Gtpase Inhibiting Mutations Activate the Alpha Chain of Gs and Stimulate Adenylyl Cyclase in Human Pituitary Tumours. *Nature*, 340(6236):692-696.
- Lania A, Mantovani G, Spada A. 2001. G Protein Mutations in Endocrine Diseases. *Eur J Endocrinol*, 145(5):543-559.
- Lee SE, Lee EH, Park H, Sung JY, Lee HW, Kang SY, Seo S, Kim BH, Lee H, Seo AN, Ahn G, Choi YL. 2012. The Diagnostic Utility of the Gnas Mutation in Patients with Fibrous Dysplasia: Meta-Analysis of 168 Sporadic Cases. *Hum Pathol*, 43(8):1234-1242.
- Levine MA. 1999. Clinical Implications of Genetic Defects in G Proteins: Oncogenic Mutations in G Alpha S as the Molecular Basis for the Mccune-Albright Syndrome. *Arch Med*, 30(6):522-531.
- Levine MA, Modi WS, O'brien SJ. 1991. Mapping of the Gene Encoding the Alpha Subunit of the Stimulatory G Protein of Adenylyl Cyclase (Gnas1) to 20q13.2---Q13.3 in Human by in Situ Hybridization. *Genomics*, 11(2):478-479.
- Liang Q, Wei M, Hodge L, Fanburg-Smith JC, Nelson A, Miettinen M, Foss RD, Wang G. 2011. Quantitative Analysis of Activating Alpha Subunit of the G Protein (G α) Mutation by Pyrosequencing in Fibrous Dysplasia and Other Bone Lesions. *J Mol Diagn*, 13(2):137-142.
- Lietmann SA, Ding C, Levine MA, 2005. A Highly Sensitive Polymerase Chain Reaction Method Detects Activating Mutations of the Gnas Gene in Peripheral Blood Cells in Mccune-Albright Syndrome or Isolated Fibrous Dysplasia. *J Bone Joint Surg Am*, 87(11):2489-2494.
- Luebke AM, Gocke C, Priemel M, Grob TJ, Zustin J. 2012. [Intramuscular Myxoma of the Lower Leg.]. *Pathologe*.
- Mariot V, Wu JY, Aydin C, Mantovani G, Mahon MJ, Linglart A, Bastepe M. 2011. Potent Constitutive Cyclic Amp-Generating Activity of Xl α s Implicates This Imprinted Gnas Product in the Pathogenesis of Mccune-Albright Syndrome and Fibrous Dysplasia of Bone. *Bone*, 48(2):312-320.
- Masters SB, Miller RT, Chi MH, Chang FH, Beidermann B, Lopez NG, Bourne HR. 1989. Mutations in the Gtp-Binding Site of Gs Alpha Alter Stimulation of Adenylyl Cyclase. *J Biol Chem*, 264(26):15467-15474.

- Morris AJ, Malbon CC. 1999. Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling. *Physiol Rev*, 79(4):1373-1430.
- Munksgaard PS, Salkus G, Iyer VV, Fisker RV. 2013. Mazabraud's Syndrome: Case Report and Literature Review. *Acta Radiol Short Rep*, 2(4): 2047981613492532.
- Neubig RR, Siderovski DP. 2002. Regulators of G-Protein Signalling as New Central Nervous System Drug Targets. *Nat Rev Drug Discov*, 1(3):187-197.
- Petersen TO, Kahn T, Reiss-Zimmermann M. 2012. [Simple and yet So Difficult: Common Occurrence of Fibrous Dysplasia and Myxomas - the Mazabraud Syndrome]. *Rofo*, 184(9):831-832.
- Pollandt K, Engerks C, Kaiser E, Werner M, Delling G. 2001. Gsalpha Gene Mutations in Monostotic Fibrous Dysplasia of Bone and Fibrous Dysplasia-Like Low-Grade Central Osteosarcoma. *Virchows Arch*, 439(2):170-175.
- Pollandt K, Lohmann CH, Werner M, Delling G. 2002. [Clinical Pathological Aspects of Mazabraud's Syndrome]. *Pathologe*, 23(5):357-360.
- Puls F, Niblett AJ, Mangham DC. 2014. Molecular Pathology of Bone Tumours: Diagnostic Implications. *Histopathology*, 64(4):461-476.
- Ringel MD, Schwindinger WF, Levine MA. 1996. Clinical Implications of Genetic Defects in G Proteins. The Molecular Basis of McCune-Albright Syndrome and Albright Hereditary Osteodystrophy. *Medicine (Baltimore)*, 75(4):171-184.
- Schimmöller L, Lehwald N, Antoch G, Kröpil P. 2012. [Polyostotic Fibro-Osseous Lesions Associated with Intramuscular Soft Tissue Neoplasms]. *Radiologe*, 52(10):934-936.
- Shenker A, Weinstein LS, Sweet DE, Spiegel AM. 1994. An Activating Gs Alpha Mutation Is Present in Fibrous Dysplasia of Bone in the McCune-Albright Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 79(3):750-755.
- Silver WP, Harrelson JM, Scully SP. 2002. Intramuscular Myxoma: A Clinicopathologic Study of 17 Patients. *Clin Orthop Relat Res*, 403:191-197.
- Spiegel AM. 2000. G Protein Defects in Signal Transduction. *Horm Res*, 53(3):17-22.
- Tabareau-Delalande F, Collin C, Gomez-Brouchet A, Decouvelaere AV, Bouvier C, Larousserie F, Marie B, Delfour C, Aubert S, Rosset P, de Muret A, Pagès JC, de Pinieux G. 2013. Diagnostic Value of Investigating Gnas Mutations in Fibro-Osseous Lesions: A Retrospective Study of 91 Cases of Fibrous Dysplasia and 40 Other Fibro-Osseous Lesions. *Mod Pathol*, 26(7):911-921.
- Vandeva S, Jaffrain-Rea ML, Daly AF, Tichomirowa M, Zacharieva S, Beckers A. 2010. The Genetics of Pituitary Adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24(3):461-476.

- Weinstein LS, Chen M, Liu J. 2002. Gs(Alpha) Mutations and Imprinting Defects in Human Disease. *Ann NY Acad Sci*, 968:173-197.
- Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. 2004. Minireview: Gnas: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology*, 145(12):5459-5464.
- Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedmann E, Spiegel AM. 1991. Activating Mutations of the Stimulatory G Protein in the McCune-Albright Syndrome. *N Engl J Med*, 325(24):1688-1695.
- Willems SM, Mohseny AB, Balog C, Sewrajsing R, Briaire-de Bruijn IH, Knijnenburg J, Cleton-Jansen AM, Sciort R, Fletcher CD, Deelder AM, Szuhai K, Hensbergen PJ, Hogendoorn, PC. 2009. Cellular/Intramuscular Myxoma and Grade I Myxofibrosarcoma Are Characterized by Distinct Genetic Alterations and Specific Composition of Their Extracellular Matrix. *J Cell Mol Med*, 13(7):1291-1301.
- Wirth, T. 2012. [Fibrous Dysplasia]. *Orthopade*, 41(12):993-1006.
- Yamashita H, Endo K, Takeda C, Teshima R, Osaki M, Yoshida H. 2013. Intramuscular Myxoma of the Buttock Mimicking Low-Grade Fibromyxoid Sarcoma: Diagnostic Usefulness of Muc4 Expression. *Skeletal Radiol*, 42(10):1475-1479.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum und –ort	28.06.1989 in Bad Langensalza/Thüringen
Familienstand	verheiratet, eine Tochter
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

08/1995 – 07/1999	Novalis-Grundschule Bad Tennstedt
08/1999 – 05/2007	Salza-Gymnasium Bad Langensalza Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Bisherige medizinische Ausbildung

seit 10/2007	Studium der Humanmedizin an der FSU Jena
09/2009	Abschluss des ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
10/2012 – 08/2013	Beurlaubung wegen Inanspruchnahme von Elternzeit

Famulaturen

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

Erfurt, den

Ina Walther

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

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

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

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

- Prof. Dr. Iver Petersen
- Dr. Yuan Chen
- Kristin Zöller
- Karola König

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

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

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

Erfurt, den

Ina Walther

8.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Iver Petersen für die Vergabe des Dissertationsthemas bedanken.

Ein besonderer Dank gilt ebenso Prof. Dr. Iver Petersen und Dr. Yuan Chen für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung meiner Arbeit, für das Lösen fachlicher Probleme und nicht zuletzt für die Motivation und die Geduld, die sie mir während des Schreibens der Dissertation entgegengebracht haben. Für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danke ich Kristin Zöller und Frau Karola König.

Desweiteren danke ich meiner Schwester Christin Romberger und deren amerikanischen Gasteltern Linda Chen, Simon Heeps, Andre Razzino und Lindsay Barrett für die sprachliche Unterstützung zu meiner Publikation.

Zuletzt möchte ich von Herzen meinem Mann Bernhard Maria Walther und meinen Eltern Arndt und Elke Romberger danken, die mir während meines Studiums und auch in turbulenten Zeiten immer mit Rat und Tat zur Seite standen und so die Entstehung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.