

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Unfallchirurgie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H.-D. Röher

**Analyse des Heterozygotiestatus auf Chromosom 11q13 und  
Sequenzanalyse des Menin Gens bei Patienten mit gutartigen  
Nebennierentumoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Matthias Oliver Heinze

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger  
Dekan

Referent: Universitätsprofessor Dr. med. Röher

Korreferent: Universitätsprofessor Dr. med. Grabensee

# **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS** **5**

---

## **A. EINLEITUNG** **6**

---

## **B. MATERIAL UND METHODEN** **10**

---

<b>B. I. PATIENTEN</b>	<b>10</b>
B. I. 1. TABELLARISCHE DARSTELLUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	11
B. I. 2. FESTLEGUNG VON STAMMBAUM UND FAMILIENANAMNESE	12
<b>B. II. ARBEITSGANGSCHEMA</b>	<b>13</b>
<b>B. III. UNTERSUCHUNGSMATERIAL</b>	<b>14</b>
B. III. 1. GEWINNUNG DER GEWEBEPROBEN	14
B. III. 2. GEWINNUNG DER BLUTPROBEN	14
<b>B. IV. ISOLATION VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE</b>	<b>14</b>
B. IV. 1. ANFERTIGUNG VON OBJEKTTRÄGERSCHNITTEN	14
B. IV. 2. ISOLATION VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE AUS GEWEBE	15
B. IV. 3. ISOLATION VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE AUS BLUT	15
B. IV. 4. QUANTIFIZIERUNG DER DESOXYRIBONUKLEINSÄURE MITTELS AGAROSEGELELEKTROPHORESE	16
B. IV. 4. a. Herstellung einer Tris-Borat-EDTA-Stammlösung	16
B. IV. 4. b. Herstellung eines Agarosegeles 1% w/v	16
B. IV. 4. c. Elektrophorese	16
B. IV. 4. d. Färbung und Photodokumentation	17
<b>B. V. AMPLIFIKATION DES MENIN GENS AUS GENOMISCHER DNS</b>	<b>17</b>
B. V. 1. AMPLIFIKATION DER DESOXYRIBONUKLEINSÄURE DER EXONE 2 BIS 8 DURCH VERSCHACHELTE POLYMERASEKETTENREAKTION	19
B. V. 1. a. Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 8 in der 1. Runde der PCR	20
B. V. 1. b. Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 8 in der zweiten Runde der Polymerasekettenreaktion	21
B. V. 2. AMPLIFIKATION DER DESOXYRIBONUKLEINSÄURE DER EXONE 9+10 UND DER EXONE 2-8 BEI AMPLIFIKATIONSSCHWIERIGKEITEN DER VERSCHACHELTEN POLYMERASEKETTENREAKTION	22
B. V. 2. a. Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 10	23
B. V. 3. KONTROLLE UND QUANTIFIZIERUNG DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE	25
<b>B. VI. AUFREINIGUNG DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE VOR DER SEQUENZIERUNG</b>	<b>25</b>
B. VI. 1. SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE ABTRENNUNG DER OLIGONUCLEOTIDE	25
B. VI. 2. AUFREINIGUNG SPEZIFISCHER DESOXYRIBONUCLEINSÄUREFRAKTIONEN DURCH ELUTION AUS AGAROSEGELEN	26
<b>B. VII. CYCLE SEQUENZING DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE UNTER VERWENDUNG VON M13- OLIGONUKLEOTIDEN</b>	<b>28</b>

B. VII. 1. THERMOSEQUENASEREAKTION	29
B. VII. 2. FÄLLUNG DER REAKTIONSPRODUKTE	29
<b>B. VIII. POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER SEQUENZIERPRODUKTE MIT FLUORESZENZDETEKTION IM HALBAUTOMATISCHEN SEQUENATOR</b>	<b>30</b>
<b>B. IX. AUSWERTUNG DER CHROMATOGRAMME DER SEQUENZIERPRODUKTE</b>	<b>31</b>
B. IX. 1. REGELUNG DER SIGNALSTÄRKEVERHÄLTNISSE	31
B. IX. 2. AUSWERTUNG DER SEQUENZCHROMATOGRAMME UNTER VERWENDUNG VON DATENVERARBEITUNGSPROGRAMMEN	31
<b>B. X. DIFFERENZIELL QUANTITATIVE POLYMERASEKETTENREAKTION ZUR AMPLIFIKATION ALLELSPEZIFISCHER DNS SEQUENZEN</b>	<b>33</b>
B. X. 1. AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN DER HETEROZYGOTIEMARKER	33
B. X. 2. KONTROLLE UND QUANTIFIZIERUNG DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE	34
B. X. 3. QUANTIFIZIERUNG DER ALLELSPEZIFISCHEN AMPLIFIKATIONSPRODUKTE DURCH KAPILLARELEKTROPHORESE	35
B. X. 4. BESTIMMUNG DER ALLELVERHÄLTNISSE	35
<b>C. ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>C. I. DARSTELLUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS</b>	<b>36</b>
<b>C. II. HETEROZYGOTIEVERLUSTANALYSE</b>	<b>39</b>
<b>C. III. MUTATIONSANALYSE</b>	<b>42</b>
<b>D. DISKUSSION</b>	<b>47</b>
<b>E. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>51</b>
<b>F. LITERATUR</b>	<b>52</b>
<b>G. TABELLARISCHER LEBENSLAUF</b>	<b>58</b>
<b>H. DANKSAGUNG</b>	<b>59</b>

## Abkürzungsverzeichnis

DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
LOH	Heterozygotieverlust (loss of heterozygotie)
MEN I	multiple endokrine Neoplasie Typ-I
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
VNTR	variable number of tandem repeats

## **A. Einleitung**

Asymptomatische, nur zufällig entdeckte Nebennierentumoren finden sich jenseits des 50. Lebensjahres mit einer Häufigkeit von 0,5 - 9% (Russell et al., 1972; Penn, 1987; Latronico & Chrousos, 1997). Sie sind oft gutartig. Genannt seien zum Beispiel adrenokortikale Adenome, Phäochromozytome und seltener Myelolipome. Metastasen okkulten Karzinome und primäre Nebennierenkarzinome machen weniger als 10% dieser Tumorerkrankungen aus (Kasperlik-Zaluska, 1997). Die genetische Basis sowohl der benignen als auch der malignen Geschwülste bedarf einer Klärung. Sicher ist, daß die Ätiopathogenese heterogen ist (Reincke, 1998; Bornstein et al., 1999). Nachgewiesen wurden zum Beispiel Deletionsmutanten des ACTH-Rezeptors und Mutationen von zellzyklusmodulierenden Genen wie p53 (Ohgaki et al., 1993), p21 (Iida et al., 1997) und auch erbliche Tumordispositionen wie das Makroglossie-Omphalozelen-Syndrom von Beckwith-Wiedemann (Beckwith, 1969) und Li-Fraumeni (Li & Fraumeni, 1969) oder der Carney-Komplex (Carney, 1995).

Benigne adrenokortikale Tumore zeigen nicht selten Heterozygotieverluste, die unter anderem den Chromosomenabschnitt 11q13 betreffen. Die Literatur weist bei insgesamt 133 Patienten 25 mit dem Verlust mindestens eines Mikrosatellitenmarkers in dieser Bande auf, also etwa jeder 5. Patient. Die Häufigkeit schwankt dabei zwischen 0 und 50%, je nach verwendetem Mikrosatellitenmarker (Beckers et al., 1992; Skogseid et al., 1992; Gordon et al., 1994; Iida et al., 1995; Gordon et al., 1996; Kjellmann et al., 1996; Görtz et al., 1999; Heppner et al., 1999; Kjellmann et al., 1999). Bei Patienten mit multipler endokriner Neoplasie Typ-I (MEN I), die an Nebennierentumoren leiden, findet sich ein Heterozygotieverlust eher selten (Skogseid et al., 1992; Heppner et al., 1999). Größere systematische Untersuchungen zu diesem Thema fehlen allerdings. Die Möglichkeit, daß an der Genese adrenokortikaler

Tumoren ein Tumorsuppressorgen beteiligt ist, das auf dem Chromosomenabschnitt 11q13 lokalisiert ist, wird durch die Tatsache unterstrichen, daß sich auch bei sporadischen Nebennierenkarzinomen in etwa der Hälfte der Fälle Heterozygotieverluste in diesem Abschnitt nachweisen lassen (Skogseid, 1992; Gordon, 1994; Iida, 1995; Kjellmann, 1996; Görtz, 1999; Heppner, 1999; Kjellmann, 1999). Für die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens ist nach gegenwärtiger Auffassung zu fordern, daß das erste Allel durch Mutation inaktiviert wird, während das Zweite typischerweise durch Heterozygotieverlust inaktiviert wird, so daß die komplette Genfunktion und somit auch die tumorsupprimierende Wirkung fehlen (Knudson, 1971; Haber & Harlow, 1997). Das für die Entstehung der MEN I Erkrankung verantwortliche Gen konnte kürzlich auf Chromosom 11q13 lokalisiert werden (Chandrasekharappa et al., 1997), wobei es sich offensichtlich um einen nukleären Regulationsfaktor handelt (Guru et al., 1998). Etwa 30-40% der MEN I Patienten weisen Tumorerkrankungen des Nebennierenkortex auf, wobei adrenokortikale Adenome und gegebenenfalls bilaterale noduläre hyperplastische Erkrankungen gegenüber den seltenen Karzinomen im Vordergrund stehen (Beckers et al., 1992; Skogseid et al., 1992; Skogseid et al., 1995; Burgess et al., 1996). Es ist bekannt, daß inaktivierende Mutationen des MEN I Gens nicht nur in Familien mit typischer MEN I Erkrankung und durch Keimbahnmutationen entstandenen sporadischen MEN I Erkrankungen vorkommen (Chandrasekharappa et al., 1997), sondern gleichfalls in sporadischen Geschwülsten, die auch im Zusammenhang mit der MEN I beobachtet werden. Hier seien Nebenschilddrüsenadenome mit 21% (Heppner et al., 1997), Gastrinome mit 33% (Zhuang et al., 1997) und bronchiale Karzinoide mit 36% (Debelenko et al., 1997) genannt. Vor diesem Hintergrund stellen wir die Frage, ob Mutationen des MEN I Gens an der Entstehung sporadischer, gutartiger Tumoren der Nebennierenrinde beteiligt sind.

Erbliche aldosteronproduzierende Tumore im Sinne des familiären Hyperaldosteronismus Typ I entstehen unter anderem durch Fusionshybride des CYP11B1 Gens mit dem CYP11B2 Gen (Lifton, 1992). Die Steroidproduktion geht dabei typischerweise auch mit einer Tumorbildung in der Nebennierenrinde einher (Dluhy, 1994). Allerdings kommen solche familiären aldosteronproduzierenden Tumoren auch unabhängig von der Bildung solcher Fusionshybride vor (Torpy, 1999). Daß insbesondere aldosteronsezernierende adrenale Adenome auch familiär gehäuft als Bestandteil der MEN I Erkrankung auftreten, ist ein Hinweis auf die genetische Vielfalt bei der Entstehung solcher Geschwülste (Beckers, 1992).

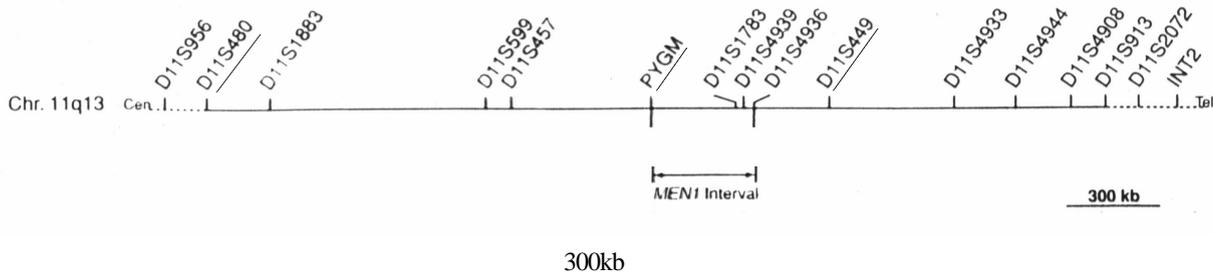
Zur Charakterisierung des MEN I Gendefekts untersuchten wir Blut und Gewebe von 15 Patienten mit sporadischen, isolierten adrenokortikalen Adenomen, einer Patientin mit unilateraler nodulärer adrenokortikaler Hyperplasie und einer Patientin einer Familie mit erblicher arterieller Hypertonie durch Conn-Syndrom in Kombination mit hypophysären Tumoren durch Heterozygotieanalyse auf Chromosom 11q13 und direkte Desoxyribonukleinsäuresequenzierung aller kodierenden Exone des MEN I Gens.

# Übersicht über Chromosom 11



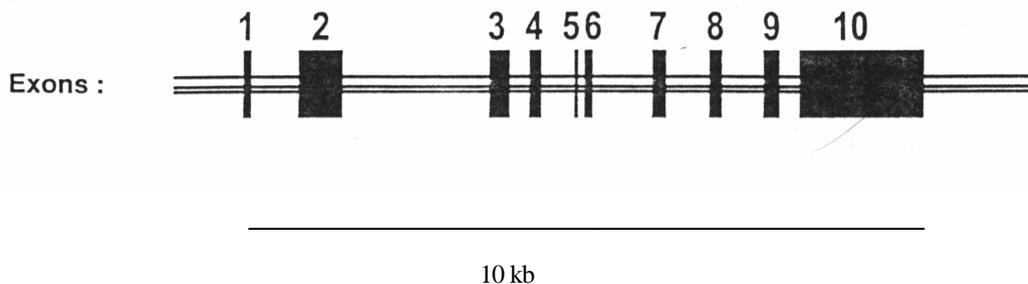
## Ausschnitt aus dem Chromosomenabschnitt 11q13

Chr.: Chromosom, Cen.: zentromerisch, Tel.: telomerisch; kb: Kilobasen



## Übersicht über das MEN I Gen

Exons: Exone, kb: Kilobasen



Das Menin Gen wurde auf Chromosom 11q13 lokalisiert (Chandrasekharappa et al., 1997). Es ist für die Entstehung der MEN I verantwortlich. Das Gen hat eine Größe von 10 Kilobasen und umfasst 10 Exone, von denen das Erste nicht kodierend ist.

## **B. Material und Methoden**

### **B. I. Patienten**

Die Patienten wurden in der Abteilung für Allgemeine Chirurgie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zwischen 1987 und 1998 operiert. Die Patienten wurden vor ihrer Zustimmung persönlich über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt. Die Patientenauswahl ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen. Die mittlere Nachbeobachtungszeit im Kollektiv betrug 36 Monate (Median 35 Monate). Einschlusskriterium war die Erkrankung an einem gutartigen Nebennierentumor mit histologischer Diagnosestellung durch das Institut für Pathologie (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. E. Gabbert). Ausschlusskriterien waren eine nicht sichere histologische Klassifikation, unzureichendes Tumormaterial, eine unzureichende Aktendokumentation und die fehlende Zustimmung des Patienten.

### B. I. 1. Tabellarische Darstellung des Patientenkollektivs

A: Alter in Jahren, G: Geschlecht, M: männlich, W: weiblich, ADX: Adrenalektomie, Lap ADX : laparoskopische Adrenalektomie, DHEAS: Dihydroepiandrosteron, Mon.: Monat, art.: arteriell

NR	HISTOLOGISCHE DIAGNOSE	TUMOR-GRÖßE	A	G	KLINISCHE DIAGNOSE	HORMON PRODUKTION	NACHBEOBACHTUNG IN MON.	THERAPIE
1	Adenom	4,5x4,5cm	42	W	Cushing Syndrom	Kortisol	35	ADX
4	Adenom	4,1x3,5cm	63	M	Inzidentalom	Kortisol, 17-OH- Progesteron	37	ADX, dorsaler Zugang
13	Adenom	3x3cm	51	W	Morbus Conn	Aldosteron	26	Lap. ADX
20	Adenom	2,5cm	54	M	Inzidentalom	hormoninaktiv	48	ADX, dorsaler Zugang
22	Adenom	5x5cm	24	W	Cushing Syndrom, Hirsutismus	Kortisol, Testosteron, DHEAS, 17-OH- Progesteron	31	ADX, trans- peritoneal
27	Adenom	2,5x2,5cm	45	W	Morbus Conn	Aldosteron	41	ADX
32	Adenom	3x3cm	60	M	Hypertonus, Inzidentalom, Diabetes mellitus II	Androstendion, 17-OH- Progesteron, 11-Desoxykortisol	34	ADX, lateraler Zugang
33	Adenom	3,5x2,5cm	45	M	Hypertonus, Diabetes mellitus II	Kortisol	52	ADX, dorsaler Zugang
38	Adenom	4,5x3,8cm	51	W	Inzidentalom	hormoninaktiv	41	ADX
40	Adenom	2,2x1,4cm	61	W	Morbus Conn	Aldosteron	29	ADX, dorsaler Zugang
46	Adenom	7x6cm	46	M	Hypertonus	17-OH- Progesteron	22	ADX

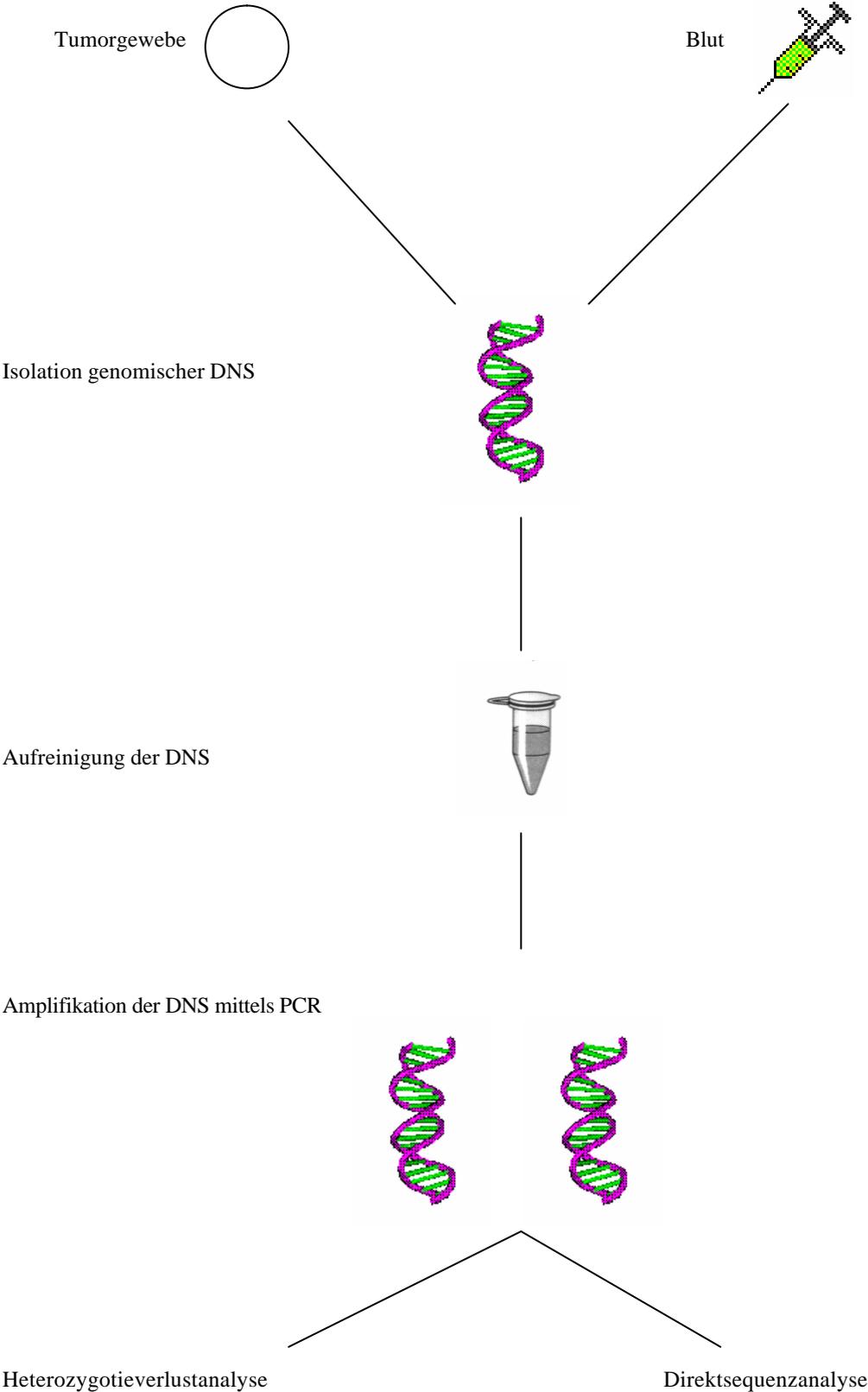
NR	HISTOLOGISCHE DIAGNOSE	TUMOR-GRÖßE	A	G	KLINISCHE DIAGNOSE	HORMON PRODUKTION	NACHBEOBACHTUNG IN MON.	THERAPIE
47	Adenom	4x2cm	40	W	angeborener art. Hypertonus	Aldosteron	70	ADX
60	Adenom	4x4cm	45	W	Inzidentalom	hormoninaktiv	36	ADX, dorsaler Zugang
61	Adenom	5x4,5cm	50	W	Hypertonus	hormoninaktiv	33	ADX, dorsaler Zugang
69	noduläre unilaterale Hyperplasie	14g	56	W	Hirsutismus, Rezidivstruma	Testosteron	26	ADX
88	Adenom	4x3,5cm	66	W	Hypertonus, Hirsutismus	17-OH- Progesteron, 17-OH- Pregnenolon, Kortisol	26	ADX, dorsaler Zugang
118	Adenom	3x4cm	18	M	Morbus Conn	Aldosteron	10	Lap. ADX

### B. I. 2. Festlegung von Stammbaum und Familienanamnese

Der Stammbaum wurde durch mündliche Befragung der Patienten erstellt. Wo immer möglich, wurden Krankenakten und Arztbriefe erkrankter Angehöriger zugezogen.

Die Erhebung der Patientenanamnese beinhaltete die Frage nach Tumoren der Nebenniere, der Nebenschilddrüse, der Hirnanhangdrüse, der Bauchspeicheldrüse, der Schilddrüse, des Dünndarms, der Haut und anderen Tumorerkrankungen beim Patienten und seinen blutsverwandten Familienangehörigen über mindestens drei Generationen.

# B. II. Arbeitsgangschema



## **B. III. Untersuchungsmaterial**

### **B. III. 1. Gewinnung der Gewebeproben**

Die nativen Gewebeproben wurden von einem erfahrenen Endokrin-Chirurgen aus dem Zentrum der intraoperativ lokalisierten Tumoren gewonnen. Sie wurden in etwa 5x5x3 mm große Fragmente zerkleinert, auf Korkplättchen aufgebracht und bei  $-80\text{ °C}$  unter Tissue Tek (Miles Inc., USA) gelagert.

### **B. III. 2. Gewinnung der Blutproben**

Die Blutproben der Patienten wurden zum Teil bei deren Aufenthalt entnommen und durch Zusatz von EDTA ungerinnbar gemacht. Ein weiterer Teil der Proben wurde ambulant entnommen und bei Raumtemperatur versandt. Die Lagerung erfolgte nach Aliquotierung bei  $-20\text{ °C}$ .

## **B. IV. Isolation von Desoxyribonukleinsäure**

### **B. IV. 1. Anfertigung von Objektträgerschnitten**

Die circa 5 mm durchmessenden Objektträgerschnitte wurden mit einem Kyrostaten der Firma SLEE MTE (Mainz, Deutschland) bei einer Schnitttemperatur von  $-55\text{ °C}$  hergestellt. Die Schnittdicke betrug  $6\text{ }\mu\text{m}$ .

20-25 mg des Tumorpräparates wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingebracht. Ein weiterer Gewebeschnitt wurde auf einen Objektträger aufgezogen und zur Färbung mit Hämatoxylin-Eosin verwendet.

#### **B. IV. 2. Isolation von Desoxyribonukleinsäure aus Gewebe**

Die Isolation der Desoxyribonukleinsäure aus Gewebe erfolgte mit Hilfe des QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Proben wurden mit 180 µl Verdauungspuffer versetzt, nach Zusatz von 20 µl Proteinase K (0,8 mAU/µl) auf dem Vortex durchmischt und bei 55 °C für 10 Minuten inkubiert. Sodann wurde ein weiterer Puffer zugesetzt und erneut für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach Zusatz von 210 µl Äthanol 99% p.a. (Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte die säulenchromatographische Reinigung der DNS unter mehrfachen Wasch- und Elutionsschritten. Einzelheiten der Prozedur finden sich in der Arbeitsanleitung des Herstellers.

#### **B. IV. 3. Isolation von Desoxyribonukleinsäure aus Blut**

Die Isolation der Desoxyribonukleinsäure aus Blut erfolgte mit Hilfe des QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Das 200 µl Probenaliquot wurde mit 200 µl Verdauungspuffer versetzt, nach Zusatz von 25 µl Protease (0,8 mAU/µl) auf dem Vortex durchmischt und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach Zusatz von 210 µl Äthanol 99% p.a. (Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte die säulenchromatographische Reinigung der DNS unter mehrfachen Wasch- und Elutionsschritten. Einzelheiten der Prozedur finden sich in der Arbeitsanleitung des Herstellers.

## **B. IV. 4. Quantifizierung der Desoxiribonukleinsäure mittels Agarosegelelektrophorese**

### **B. IV. 4. a. Herstellung einer Tris-Borat-EDTA-Stammlösung**

Es wurde ein 10 x Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer verwendet, der nach einer Verdünnung von 1 : 10 sowohl zur Herstellung des Gels, als auch als Laufpuffer benutzt wurde.

Zusammensetzung des 10 x TBE:

- Tris Ultra One, p.a. Endkonzentration 890 mM	108,0 g
- Borat, p.a. Endkonzentration 890 mM	55,0 g
- Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O 20 mM	7,4 g
- Aqua bidest.	ad 1,0 l

### **B. IV. 4. b. Herstellung eines Agarosegels 1% w/v**

Drei Gramm Agarose Ultra Pure (GibcoBRL, Ebersberg, Deutschland) und 300 ml 1 x TBE-Puffer wurden in der Mikrowelle auf Siedetemperatur erhitzt. Unter Durchmischung mit dem Magnetrührer kühlte das Gel auf eine Temperatur von circa 60 °C ab und wurde in die Gelkammer gegossen.

### **B. IV. 4. c. Elektrophorese**

Nach der Polymerisierung wurde der Kamm gezogen und der Gelschlitten in die mit 1 x TBE Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer GNA 200 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) eingesetzt.

In die durch den Kamm entstandenen Geltaschen wurden die mit 10 v/v Ladungspuffer (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA) versetzten Proben und der Molekulargewichtsstandard 1 Kbplus (Gibco, Ebersberg, Deutschland), 1 µg pro Spur, aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über

zwei Stunden bei einer Spannung von 100 V und einem Stromfluß von etwa 140 mA.

#### **B. IV. 4. d. Färbung und Photodokumentation**

Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) 15 Minuten auf einem Schwenktisch gefärbt. Es folgten zwei Waschvorgänge mit destilliertem Wasser für jeweils 7 Minuten. Die Ansicht des gefärbten Agarosegels erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 354 nm (8 mW/cm<sup>2</sup>). Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines Polaroid-Photodokumentationssystems dokumentiert.

#### **B. V. Amplifikation des Menin Gens aus genomischer DNS**

Aufgrund des hohen Cytosin-Guanin-Gehalts der Proben bis zu 90% und der Desoxyribonukleinsäurenqualität aus sehr fettreichen Geweben wurden zur Herstellung der in die Sequenzierung einzubringenden Amplimere zwei verschiedene Polymerasekettenreaktionsamplifikationssysteme benutzt. Zum Einsatz kam eine verschachtelte Polymerasekettenreaktion („nested-PCR“) (B.V.1.) oder eine einschrittige Amplifikationsreaktion (B.V.2.)

Die Oligonukleotide (Primer) der Amplifikationsreaktionen wurden gemäß dem Basenpaarungsprinzip anhand der Sequenz des MEN I Gens (Chandrasekharappa, 1997) für die jeweils zu amplifizierenden Exonbereiche ausgewählt und von den Firmen Biometra (Göttingen, Deutschland), GibcoBRL (Ebersberg, Deutschland), MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) (siehe Tabelle 1 und 4) synthetisiert. Die Kopplungseffizienz der Synthese wurden von den Herstellern mit > 99 % angegeben. Jedes Oligonukleotid wurde in verschiedenen Kombinationen bei verschiedenen PCR-Bedingungen zur Amplifikation

verwendet. Trotz der Mehrfachsynthese einzelner Primer durch verschiedene Firmen konnten zahlreiche, von den Erstbeschreibern publizierte (Chandrasekharappa, 1997) Primer nicht zur Amplifikation von spezifischen Sequenzabschnitten des MEN I Gens verwendet werden. Die Sequenzen der spezifisch bindenden und für die Herstellung von sequenzierbaren MEN I Genabschnitten verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 1 und 4 aufgeführt. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte im Stufenzyklusverfahren auf dem Thermalcycler GeneAmp 2400 der Firma Perkin Elmer (Branchburg, USA). Zum Ansatz wurden autoklavierte und nukleasefreie 200 µl Eppendorfgefäße verwendet. Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und die Polymerasekettenreaktion durch einen Heißstart eingeleitet. Für den Heißstart wurde der Thermoblock vor dem Einsetzen der Proben auf 94 °C erhitzt.

**B. V. 1. Amplifikation der Desoxyribonukleinsäure der Exone 2 bis 8 durch verschachtelte Polymerasekettenreaktion**

**Tabelle 1: Verwendete Oligonucleotide; nach Exonen sortiert**

BP: Amplimerlänge in Basenpaaren

Exon	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	BP
2 1. Runde	2LFM13	tgt aaa acg acg gcc agt gcc gcc cac cgc ccg ccg cc	553
	2LRM13	cag gaa aca gct atg acc gtt ttg aag aag tgg gtc atg	
2 2. Runde	2MFM13	tgt aaa acg acg gcc agt gcc atg ggg ctg aag gcc	533
	2LRM13	cag gaa aca gct atg acc gtt ttg aag aag tgg gtc atg	
3 1. Runde	3A	ggt gga cat aga ggg tgt aaa cag	611
	4ERM13	cag gaa aca gct atg acc gtg cct gct tca ggg aat gac ag	
3 2. Runde	3AFM13	tgt aaa acg acg gcc agt gtt gga cat aga ggg tgt aaa cag	575
	4ERM13	cag gaa aca gct atg acc gtg cct gct tca ggg aat gac ag	
4 1. Runde	4DFM13	tgt aaa acg acg gcc agt ctg tca ttc cct gaa gca ggc ac	291
	4C	ggt ccc aca gca agt caa gtc tgg	
4 2. Runde	4DFM13	tgt aaa acg acg gcc agt ctg tca ttc cct gaa gca ggc ac	256
	4CRM13	cag gaa aca gct atg acc ggt ccc aca gca agt caa gtc tgg	
5 u. 6 1. Runde	5C	cct gtt ccg tgg etc ata act etc	418
	3B	aca gtt gac aca aag tga gac tgg	
5 u. 6 2. Runde	5CFM13	tgt aaa acg acg gcc agt cct gtt ccg tgg etc ata act etc	392
	3BRM13	cag gaa aca gct atg acc aca gtt gac aca aaa tga gac tgg	
7 1. Runde	7A	gga cga ggg tgg ttg gaa act g	411
	7B	cct cag cca gca gtc ctg tag a	
7 2. Runde	7AFM13	tgt aaa acg acg gcc agt cct cag cca gca gtc ctg tag a	406
	7DRM13	cag gaa aca gct atg acc gaa gaa agg aca ggc tgc agg c	
8 1. Runde	8CFM13	tgt aaa acg acg gcc agt tgg tga gac ccc ttc aga tcc tac	314
	8B	cca tcc cta atc tgc tac atg c	
8 2. Runde	8CFM13	tgt aaa acg acg gcc agt tgg tga gac ccc ttc aga tcc tac	278
	8BRM13	cag gaa aca gct atg acc cca atc cct aat ccc gta cat gc	

### B. V. 1. a. Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 8 in der 1. Runde der PCR

Die exonspezifischen Amplifikationsbedingungen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

#### **Tabelle 2: exonspezifische Polymerasekettenreaktionsbedingungen**

Denat.: Denaturierung, Anl.: Anlagerung der Oligonukleotide, Syn.: Synthese, Ext.: Extension, Temp.: Temperatur in Grad Celsius, Zeit: Zeit in Sekunden

EXON	DENAT. TEMP.	DENAT. ZEIT	DENAT TEMP.	DENAT ZEIT	ANL. TEMP.	ANL. ZEIT	SYN. TEMP.	SYN. ZEIT	EXT. TEMP.	EXT. ZEIT	ZYKLEN- ANZAHL
2	94	60	94	30	69	30	72	90	72	600	35
3					63	30					36
4					63	30					36
5+6					63	30					36
7					74	30					36
8					60	30					36

Die 25 µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten für alle Amplifikationen folgende Reagenzien:

Matrize (DNS, 10-20 ng/µl)	5,0 µl
Oligonukleotid (1 pmol/µl)	5,0 µl
Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP) 2mM (Boehringer Mannheim)	2,5 µl
10 X PCR Puffer (Perkin Elmer)	2,5 µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer)(1U/0,2 µl)	0,3 µl
Nukleasefreies Wasser (Promega Corp., Madison, USA)	9,7 µl

**B. V. 1. b. Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 8 in der zweiten Runde der Polymerasekettenreaktion**

Als Template der zweiten Runde wurden 25 µl des jeweiligen Amplifikats der ersten Runde verwendet, welches zuvor ad 100 µl mit nukleasefreiem Wasser verdünnt worden war.

Die exonspezifischen Amplifikationsbedingungen der zweiten Runde der verschachtelten Polymerasekettenreaktion sind Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3: exonspezifische Polymerasekettenreaktionsbedingungen**

Denat.: Denaturierung, Anl.: Anlagerung der Oligonukleotide, Syn.: Synthese, Ext.: Extension, Temp.: Temperatur in Grad Celsius, Zeit: Zeit in Sekunden

EXON	DENAT. TEMP.	DENAT. ZEIT	DENAT TEMP.	DENAT ZEIT	ANL. TEMP.	ANL. ZEIT	SYN. TEMP.	SYN. ZEIT	EXT. TEMP.	EXT. ZEIT	ZYKLEN- ANZAHL
2	94	60	94	30	69	30	72	90	72	600	32
3					72	15	72	30			25
4					72	15	72	30			25
5+6					72	15	72	30			25
7					79,5	15	79,5	30			25
8					79,5	15	79,5	30			25

Die 25 µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten für alle Amplifikationen folgende Reagenzien:

Matrize (DNS, 10-20 ng/µl)	5,0	
µl		
Oligonukleotid (1 pmol/µl)	2,5	µl
Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP) 2mM (Boehringer Mannheim)	2,5	µl
10 X PCR Puffer (Perkin Elmer)	2,5	µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer)(1U/0,2ml)	0,2	µl
Nukleasefreies Wasser (Promega Corp., Madison, USA)	12,3	µl

**B. V. 2. Amplifikation der Desoxyribonukleinsäure der Exone 9+10 und der Exone 2-8 bei Amplifikationsschwierigkeiten der verschachtelten Polymerasekettenreaktion**

Wegen Schwierigkeiten in der Amplifikation der Exone 9 und 10 benutzten wir zur Amplifikation dieser Exone ein anderes Verfahren. Hierzu unterteilten wir Exon 10 in 2 Teilstücke (Exon 10/1 und Exon 10/2). Bei Schwierigkeiten in der Amplifikation der Exone 2 bis 8 bei einzelnen Patienten benutzten wir auch dort dieses Schema.

**Tabelle 4: Verwendete Oligonucleotide; nach Exonen sortiert**

BP: Amplimerlänge in Basenpaaren

EXON	POSITION	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	BP
2 (2288-2732)	2285-2302	tgt aaa acg acg gcc agt gcc atg ggg ctg aag gcc	536
	2782-2762	cag gaa aca gct atg acc gtt ttg aag aag tgg gtc atg	
3 (4297-4505)	4096-4119	tgt aaa acg acg gcc agt gtt gga cat aga ggg tgt aaa cag	611
	4671-4649	cag gaa aca gct atg acc gtg cct get tca ggg aat gac ag oder	
	4176-4195	tgt aaa acg acg gcc agt atc tga ggt tgg gtc aca gg	436
	4576-4558	cag gaa aca gct atg acc aaa tgg agt ccc ttg ggt g	
4 (4716-4844)	4649-4671	tgt aaa acg acg gcc agt ctg tca ttc cct gaa gca ggc ac	291
	4904-4881	cag gaa aca gct atg acc ggt ccc aca gca agt caa gtc tgg	
5+6 (5177-5217, 5298-5385)	5138-5161 5520-5497	tgt aaa acg acg gcc agt cct gtt ceg tgg etc ata act etc cag gaa aca gct atg acc aca gtt gac aca aaa tga gac tgg	318
7 (6025-6161)	5828-5849	tgt aaa acg acg gcc agt cct cag cca gca gtc ctg tag a	411
	6203-6182	cag gaa aca gct atg acc gaa gaa agg aca ggc tgc agg c	
8 (6623-6758)	6577-6600	tgt aaa acg acg gcc agt tgg tga gac ccc ttc aga tcc tac	312
	6853-6834	cag gaa aca gct atg acc cca atc cct aat ccc gta cat gc	
9 (7196-7360)	7151-7174	tgt aaa acg acg gcc agt ggt gag taa gag act gat ctg tgc	311
	7426-7404	cag gaa aca gct atg acc gtc tga caa gcc cgt ggc tgc tg	
10/1 (7578-8060)	7554-7573	tgt aaa acg acg gcc agt acc ttg etc tcc cca ctg gc	404
	7922-7903	cag gaa aca gct atg acc cag cag etc ctt cat gcc ct	

10/2 (7578-8060)	7718-7737 8021-8002	tgt aaa acg acg gcc agt gcc agc act gga caa ggg cc cag gaa aca gct atg acc gta gtc act agg ggt gga ca	339
---------------------	------------------------	--	-----

### B. V. 2. a. Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 10

Die exonspezifischen Amplifikationsbedingungen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

#### Tabelle 5: exonspezifische Polymerasekettenreaktionsbedingungen

Denat.: Denaturierung, Anl.: Anlagerung der Oligonukleotide, Syn.: Synthese, Ext.: Extension, Temp.: Temperatur in Grad Celsius, Zeit: Zeit in Sekunden

EXON	DENAT. TEMP.	DENAT. ZEIT	DENAT TEMP.	DENAT ZEIT	ANL. TEMP.	ANL. ZEIT	SYN. TEMP.	SYN. ZEIT	EXT. TEMP.	EXT. ZEIT	ZYKLEN- ANZAHL
2	94	180	94	30	57	30	72	90	72	600	35
3					63	30					36
4					57	30					35
5+6					57	30					35
7					68	30					35
8					57	30					35
9					57	30					35
10/1					58	30					36
10/2					58	30					36

Die Polymerasekettenreaktionsansätze unterschieden sich exonspezifisch in der Zusammensetzung ihrer Reagenzien.

Die 30 µl Reaktionsvolumen der **Exone 2, 4, 5+6, 7, 8 und 9** enthielten folgende Reagenzien:

Matrize (DNS, 10-20 ng/µl)	4,0	µl
Oligonukleotid (5 pmol/µl)	1,5	µl
TaqMasterMix (Qiagen, Hilden, Deutschland)	15,0	µl
Nukleasefreies Wasser (Promega Corp., Madison, USA)	9,5	µl

Die 16 µl Reaktionsvolumen von **Exon 3** enthielten folgende Reagenzien:

Matrize (DNS, 10-20 ng/µl)	5	µl
Oligonukleotid (5 pmol/µl)	3	µl
TaqMasterMix (Qiagen, Hilden, Deutschland)	8	µl

Die 15 µl Reaktionsvolumen von **Exon 10/1** enthielten folgende Reagenzien:

Matrize (DNS, 10-20 ng/µl)	3,0	µl
Oligonukleotid (5 pmol/µl)	2,0	µl
TaqMasterMix (Qiagen, Hilden, Deutschland)	7,5	µl
GC-Rich Lösung (Boehringer, Mannheim, Deutschland)	2,5	µl

Die 25 µl Reaktionsvolumen von **Exon 10/2** enthielten folgende Reagenzien:

Matrize (DNS, 10-20 ng/µl)	5,0	µl
Oligonukleotid (5 pmol/µl)	5,0	µl
TaqMasterMix (Qiagen, Hilden, Deutschland)	12,5	µl
Nuklease freies Wasser (Promega Corp., Madison, USA)	2,5	µl

### **B. V. 3. Kontrolle und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte durch Agarosegelelektrophorese**

Alle Amplimere wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Dazu wurden 1 % Agarosegele mit 5 µl Polymerasekettenreaktionsgemisch nach erfolgter Polymerasekettenreaktion beschickt und die Fragmente für 2 Stunden bei 100 V einer Elektrophorese unterworfen. Die Banden wurden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht und auf dem UV-Tisch nach Polaroid-Photodokumentation gegen den aufgetragenen Molekulargewichtsstandard 1 Kbplus (GibcoBRL, Ebersberg, Deutschland) verglichen. Der Molekulargewichtsstandard wurde in drei verschiedenen Mengen aufgetragen (0,25, 0,5 und 1 µg, entsprechend 25, 50 und 100 ng in der 1650 bp-Bande), so daß eine quantitative Abschätzung der Desoxyribonukleinsäure möglich war.

### **B. VI. Aufreinigung der Amplifikationsprodukte vor der Sequenzierung**

Um eine eindeutige Exonsequenz zu gewährleisten, mußten die bei der Polymerasekettenreaktion aufgetretenen unspezifischen Nebenprodukte und Oligonukleotide entfernt werden. Hierzu standen zwei Verfahren zur Verfügung.

#### **B. VI. 1. Säulenchromatographische Abtrennung der Oligonucleotide**

Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland).

Die Amplifikationsprodukte wurden mit 100 µl Bindungspuffer versetzt. Dann folgte die säulenchromatographische Reinigung der DNS unter mehrfachen

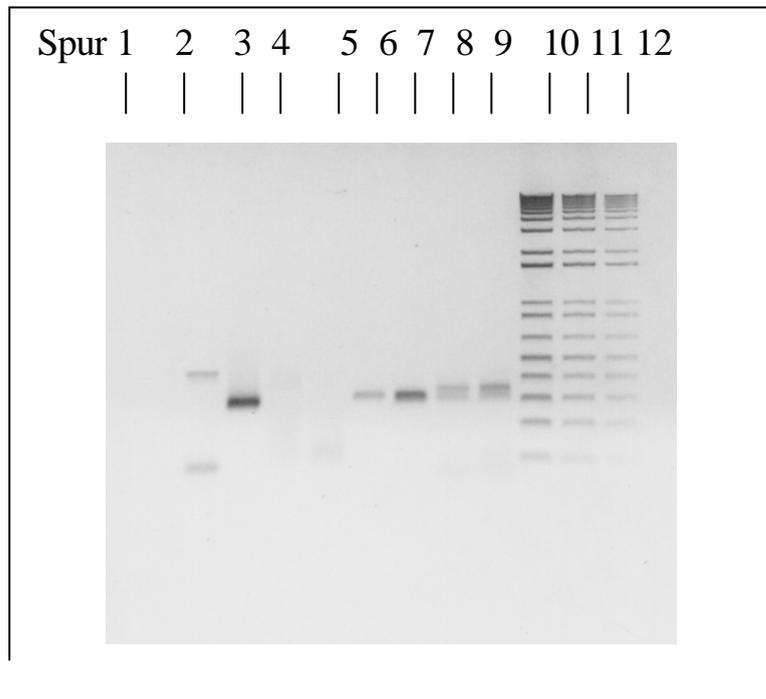
Wasch- und Elutionsschritten. Einzelheiten der Prozedur finden sich in der Arbeitsanleitung des Herstellers.

#### **B. VI. 2. Aufreinigung spezifischer Desoxyribonucleinsäurefraktionen durch Elution aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Die exonspezifischen Amplifikationsprodukte wurden nach Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, mit 3 Volumenteilen Gellysepuffer versetzt und für 10 Minuten bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zusatz von einem Volumenteil Isopropanol p.a. (Sigma, St.Louis, USA) erfolgte die säulenchromatographische Reinigung der DNS unter mehrfachen Wasch- und Elutionsschritten. Einzelheiten der Prozedur finden sich in der Arbeitsanleitung des Herstellers.

## Abbildung 1: Polaroid-Photodokumentation eines Agarosegels



Die Abbildung zeigt exemplarisch ein Polaroid-Photo eines 1%igen Agarosegels nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR Amplifikate der kodierenden Exone des Menin Gens eines Patienten. Nach der PCR wurden Oligonukleotidreste mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entfernt. Sodann wurde ein 1%iges Agarosegel mit jeweils 5 µl des Polymerasekettenreaktionsgemischs, das mit 2% Ladungspuffer (Sigma, St.Louis, USA) versetzt worden waren, beschickt und für 2 Stunden bei 100 Volt einer Elektrophorese unterworfen. Die Banden wurden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Polaroid-Photodokumentationssystems dokumentiert. Spur 1 des Gels wurde mit dem Amplifikat von Exon 2 beschickt, Spur 2 mit dem Exon 3 Amplifikat, Spur 3 mit dem Exon 4 Amplifikat, Spur 4 mit dem Amplifikat von Exon 5+6, Spur 5 mit dem Exon 7 Amplifikat, Spur 6 mit dem Amplifikat von Exon 8, Spur 7 mit dem Exon 9 Amplifikat, Spur 8 mit dem Exon 10/1 Amplifikat, Spur 9 mit dem Amplifikat von Exon 10/2. Die Spuren 10-12 zeigen den Molekulargewichtsstandard 1Kb plus (GibcoBRL, Ebersberg, Deutschland), der in drei verschiedenen Mengen aufgetragen wurde (1, 0,5 und 0,25 µg entsprechend 100, 50 und 25 ng in der 1650 Basenpaar-Bande), so daß eine quantitative Abschätzung der DNS möglich war. Exon 2 (Spur 1), Exon 5+6 (Spur 4) und Exon 7 (Spur 5) zeigten kein beziehungsweise nur ein geringes PCR Produkt, so daß die PCR wiederholt werden mußte. Das PCR-Reaktionsgemisch von Exon 3 (Spur 2) enthielt noch zu viele Oligonukleotidreste, so daß das die Bande mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt wurde. Exon 8 und 9 (Spur 6 und 7) konnten in die Sequenzierung eingebracht werden. Exon 10/1 (Spur 8) und Exon 10/2 (Spur 9) wurden zur Trennung von unspezifischen Nebenprodukten ebenfalls mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und dann in die Sequenzierung eingebracht.

## **B. VII. Cycle-Sequencing der Amplifikationsprodukte unter Verwendung von M13-Oligonukleotiden**

Der ABI 377 DNS Sequencer detektierte die Fluoreszenz der vier verschiedenen Farbstoffe, die für die Identifikation der Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin in der Thermosequenasereaktion in das Polymerasekettenreaktionsprodukt integriert wurden. Jeder Farbstoff emittiert bei Anregung durch den Laser Licht verschiedener Wellenlänge, so daß alle vier basenspezifischen Farbstoffe in einer Gelspur detektiert werden konnten. Der Kettenabbruch der Cycle-Sequencing PCR-Reaktion erfolgte durch Farbstoffterminatoren. Die Thermosequenasereaktion wurde durch universelle Primer (M13) initiiert, die folgende Basensequenz hatten:

M13 Sequenz vorwärts (5'→3'): TGT AAA ACG ACG GCC AGT

M13 Sequenz rückwärts (5'→3'): CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Dadurch konnten unmarkierte und individuelle Oligonukleotide (Primer), hier die M13-Oligonukleotide, verwendet werden.

”Dye”-Terminatoren, AmpliTaq DNS Polymerase und dNTP's wurden dem Reaktionsansatz als fertiger Reaktionsansatz (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) der Firma Perkin Elmer (Branchburg, USA) zugesetzt. Einzelheiten finden sich in der Arbeitsanleitung des Herstellers.

### B. VII. 1. Thermosequenasereaktion

Die Thermosequenasereaktion erfolgte im Stufenzyklusverfahren auf dem Thermalcycler GeneAmp 2400 der Firma Perkin Elmer (Branchburg, USA). Zum Ansatz wurden autoklavierte und nukleasefreie 200 µl Eppendorfgefäße verwendet. Das Volumen eines Thermosequenasansatzes betrug 10 µl.

Denaturierung	96 °C	10 sec.
Anlagerung der Oligonucleotide	50 °C	5 sec.
Extension	60 °C	4 min.

Die Reaktion durchlief jeweils 25 Zyklen.

10 µl des Thermosequenasereaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

Matrize [DNS, 10-20 ng/µl]	1 – 7	µl
Terminator Mix	2	µl
Oligonukleotid [10 pmol/µl]	1	µl
Nukleasefreies Wasser (Promega Corp., Madison, USA)	ad 10	µl

### B. VII. 2. Fällung der Reaktionsprodukte

Zehn µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2, und 250 µl absoluter Alkohol (p. a., Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland) wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei Raumtemperatur vorgelegt. 10 µl Sequenzierprodukt wurden mit 90 µl H<sub>2</sub>O bidest. versetzt. Dieses Gemisch wurde der alkoholischen Natriumacetatlösung zugesetzt. Nach Mischung auf dem Vortex folgte die Zentrifugation bei 5030 x g für 30 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert und sorgfältig abgehoben. Das Sediment wurde mit 350 µl Äthanol p.a. 70 % v/v gewaschen, anschließend unter Vakuum getrocknet und dann mit

Ladungspuffer versetzt. Alle Schritte der Fällungsreaktion erfolgten bei Raumtemperatur.

Als Ladungspuffer wurde Dextranblau (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zu einer Konzentration von 50 mg/ml in EDTA-Lösung, 25 mM, pH 8,0, gelöst. Als Gebrauchslösung wurde ein Teil der Stammlösung mit 5 Teilen Formamid (pH 8,3) (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA) verdünnt. Das Formamid war zuvor über Amberlite (Serva, Heidelberg, Deutschland) deionisiert und dann filtriert worden (Filter: Nalgene, Rochester, USA; Porengröße 0,2 µm).

### **B. VIII. Polyacrylamidgelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierprodukte mit Fluoreszenzdetektion im halbautomatischen Sequenator ABI 377 (PE Biosystems, Branchburg, USA)**

Die beiden Glasplatten der Elektrophoreseeinheit wurden zunächst in mehreren Reinigungsschritten unter Verwendung von fließendem Wasser, destilliertem Wasser, NaOH, 5 M, und Isopropanol p.a. (Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt. Nach dem Zusammenbau der Gelkammer erfolgte das Gießen des Polyacrylamidgels.

Das Polyacrylamidgel setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Harnstoff (GibcoBRL)	21,0	g
PAA (40% Stammlösung, Sigma)	6,3	ml
Aqua bidest.	22,1	ml
10 x TBE	6,0	ml

Die Reagenzien wurden für 30 Minuten auf dem Magnetrührer mit 1 g Amberlite (Serva, p. a.) durchmischt und nach Vorgabe von 6 ml 10 x TBE-Puffer über eine Vakuumpumpe durch einen Filter (Nalgene, Rochester, USA; Porengröße 0,2 µm) abgesaugt. Dann wurde das Gemisch für 5 Minuten

entgast. Nach Zugabe von 350 µl Ammoniumpersulfat, 10 % w/v, und 15 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) (Sigma, St.Louis, USA) folgte das Gießen des Gels mit Hilfe einer Gießapparatur.

Nach einer Polymerisierungszeit von 2 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur folgte der Einbau der Gelkammer in das Sequenziergerät und das Beladen des Gels mit den in 1 µl Ladungspuffer gelösten Reaktionsprodukten der Thermosequenasereaktion.

## **B. IX . Auswertung der Chromatogramme der Sequenzierprodukte**

### **B. IX. 1. Regelung der Signalstärkeverhältnisse**

Zur Optimierung der internen Kalibrierung der spurspezifischen Signalstärkeverhältnisse wurden die Farbstoffartefakte im Voreluat sowie auch die nicht sequenzspezifischen Signale im hochmolekularen Bereich (> 600 Basenpaare) entfernt. Die Kalibrierung der Spur erfolgte somit durch das Sequenzsignal.

### **B. IX. 2. Auswertung der Sequenzchromatogramme unter Verwendung von Datenverarbeitungsprogrammen (Lasergene Navigator)**

Die Rohdaten der in der Datenverarbeitungsversion (ABI Prism 377 XL collection, PE Biosystems, Branchburg, USA) vorliegenden Sequenzen wurden in das Programm EditSeq der Firma GATC überführt. Dort wurden sie zusammen mit der in der Genbank publizierte Sequenz des Menin Gens eingelesen (GenBank Zugangsnummer U93237) (Chandrasekharappa et

al.,1997). Das Chromatogramm wurde Basenpaar um Basenpaar gelesen und mit der Wildtypsequenz verglichen. Sequenzanteile ohne absolut eindeutige Sequenzfestlegung über  $\geq 2$  Basenpaare wurden aus der Sequenzanalyse entfernt. Wurde dadurch der lesefähige Sequenzteil so beschränkt, daß nicht mehr das komplette Exon auswertbar war, so wurde eine neue Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung des Exons durchgeführt. Eine Sequenz wurde als nicht eindeutig definiert, wenn der Hintergrund  $> 5\%$  der minimalen Sequenzamplitude betrug. Alle zur Verfügung stehenden eindeutigen Sequenzdaten eines Patienten wurden nach Entfernung fehlerhafter Sequenzabschnitte in ein sogenanntes Contig überführt. In jedes Contig gingen die Daten eines individuellen Patienten ein. Dabei wurden die Sequenzergebnisse des Vorwärts- und Rückwärtsstranges sowie allfällige Sequenzdaten wiederholter Amplifikationen vom selben Patienten in den sequenzhomologen Abschnitten übereinander gelegt. Die Daten von Blut und Tumorgewebe eines Patienten wurden so zusammengeführt und mit der in jede Einzeldatei eingeladenen vollständigen genomischen Sequenz des humanen MEN I Gens verglichen.

## **B. X. Differenziell quantitative Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation allelspezifischer DNS Sequenzen (LOH Marker)**

### **B. X. 1. Amplifikationsbedingungen der Heterozygotiemarker**

Für die Amplifikation der VNTR-tragenden (variable number of tandem repeats) Sequenzen wurden folgende Oligonukleotide verwendet.

**Tabelle 6: Oligonukleotidsequenz der 4 Heterozygotiemarker**

<b>MARKER</b>		<b>OLIGONUKLEOTIDSEQUENZ 5' ® 3'</b>
<b>PYGM</b>	<b>Vorwärts</b>	<b>cta gca gag tcc acc tac tg</b>
<b>PYGM</b>	<b>Rückwärts</b>	<b>gtc gtc agg tag caa ctg ac</b>
<b>D11S480</b>	<b>Vorwärts</b>	<b>ccc tct tgc ctg tgt tga aat</b>
<b>D11S480</b>	<b>Rückwärts</b>	<b>ttt gag gta ggc ttc gta ta</b>
<b>D11S987</b>	<b>Vorwärts</b>	<b>gac tcc agt ctg ggc aat aaa agc</b>
<b>D11S987</b>	<b>Rückwärts</b>	<b>ggg ggc age atg acc tct aaa g</b>
<b>D11S449</b>	<b>Vorwärts</b>	<b>ggg gaa aaa aca cac ttg tct g</b>
<b>D11S449</b>	<b>Rückwärts</b>	<b>ggc gac ata gtg aga tcc tgt</b>

Alle Oligonukleotide wurden durch die Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert. Jeder Vorwärtsprimer war am 5'-Ende mit Fluorescein Phosphoramidid markiert.

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte im Stufenzyklusverfahren auf dem Thermalcycler GeneAmp 2400 der Firma Perkin Elmer (Branchburg, USA). Zum Ansatz wurden autoklavierte und nukleasefreie 200 µl Eppendorfgefäße verwendet. Das Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 25 µl.

Die PCR-Bedingungen und Reaktionsansätze waren für alle Heterozygotiemarker identisch:

1.Denaturierung	94°C	60	sec
2.Denaturierung	94°C	45	sec
3.Anlagerung der Oligonukleotide	60°C	45	sec
4.Synthese	72°C	60	sec
5.Extension	72°C	600	sec

Die Reaktionsschritte 2 bis 4 wurden in jeweils insgesamt 33 Zyklen wiederholt.

25µl des Polymerasekettenreaktionansatzes enthielten folgende Reagenzien:

Matrize [DNS, 10-20 ng/µl]	5,0	µl
Oligonukleotidgemisch [5 pmol/µl]	3,0	µl
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) 2mM (Boehringer Mannheim)	2,5	µl
10 X PCR Puffer (Perkin Elmer)	2,5	µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer)(1U/0,2µl)	0,2	µl
Nukleasefreies Wasser (Promega Corp., Madison, USA)	11,8	µl

#### **B. X. 2. Kontrolle und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte durch Agarosegelelektrophorese**

Die Amplimere wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Dazu wurden Agarosegele, 1 % w/v, mit 5 µl Polymerasekettenreaktionsgemisch nach erfolgter Polymerasekettenreaktion beschickt und die Fragmente für 2 Stunden bei 100 V einer Elektrophorese unterworfen. Die Banden wurden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht und auf dem UV-Tisch nach Polaroid-Photodokumentation gegen den aufgetragenen Molekulargewichtsstandard 1 Kbplus (GibcoBRL), 1 µg pro Spur, quantifiziert.

### **B. X. 3. Quantifizierung der allelspezifischen Amplifikationsprodukte durch Kapillarelektrophorese**

1 µl der fluoreszenzmarkierten Amplimere wurden nach Zusatz von 12 µl deionisiertem Formamid und 0,5 µl des internen Größenstandards unter Denaturierungsbedingungen kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Als internen Größenstandard benutzten wir Gene Scan 350 (PE Biosystems, Branchburg, USA), der TAMRA markiert ist. Als Laufpuffer diente 1 x konzentrierter, mit EDTA versetzter Genetic Analyzer Buffer (PE Biosystems, Branchburg, USA). Die gewonnenen Daten wurden mittels des Datenverarbeitungsprogramms Gene Scan Analyzer Software (Version 2.0.2.) (PE Biosystems, Branchburg, USA) verarbeitet.

### **B. X. 4. Bestimmung der Allelverhältnisse**

Die Allelratio R berechnete sich wie folgt: das Integral des spezifischen Detektionssignals der Allele 1 und 2 wurde bei informativen Patienten für DNS aus Blut und DNS aus Gewebe ermittelt. Durch Teilung des aus Blut erhaltenen Wertes durch den für Gewebe erhaltenen Wert ergab sich die Allelratio als dimensionslose Größe. Die Berechnung wurde für jeden VNTR-Marker (variable number of tandem repeats) getrennt durchgeführt. Wir definierten einen Heterozygotieverlust bei einer Allelratio von < 0,4.

$$\frac{\mathbf{P}(\text{Allel 1, Blut}) / \mathbf{P}(\text{Allel 2, Blut})}{\mathbf{P}(\text{Allel 1, Tumor}) / \mathbf{P}(\text{Allel 2, Tumor})} = \mathbf{R}$$

P: Integral des spezifischen Detektionssignals

## **C. Ergebnisse**

### **C. I. Darstellung des Patientenkollektivs**

Das Patientenkollektiv umfaßte 15 Patienten (9 Frauen und 6 Männer) mit adrenokortikalen Adenomen, eine Patientin mit unilateraler nodulärer Nebennierenrindenhyperplasie und zusätzlich eine Patientin einer Familie mit hereditärer arterieller Hypertonie auf dem Boden eines Conn Syndroms in Kombination mit hypophysären Tumoren.

Das mittlere Alter der Patienten mit sporadischen Nebennierenadenomen betrug bei Operation  $48 \pm 13$  Jahre, Median 50 Jahre, wobei die Altersspanne von 18-66 Jahren reichte. Die mittlere Tumorgröße betrug 40 mm mit einer Spanne von 22-70 mm im maximalen Durchmesser. 13/15 (87%) der Tumore waren hormonsezernierend. 5/15 (33%) der Patienten litten an einem Conn Syndrom, 6/15 (40%) hatten einen Morbus Cushing, 2/15 (13%) zeigten Virilisierungserscheinungen durch männliche Sexualhormonproduktion des Tumors, bei 6/15 (40%) war eine Überproduktion von Progesteronderivaten nachweisbar. Nur 4/15 (27%) hatten asymptotische, hormoninaktive Nebennierenadenome (Inzidentalome).

Besonders hervorzuheben ist Patientin Nummer 69, die den seltenen Befund einer unilateralen nodulären Hyperplasie aufwies. Der Tumor produzierte Testosteron. Klinisch äußerte sich dies in einem Hirsutismus. Als Nebendiagnosen fanden sich eine rezidivierende Struma nodosa und ein Uterus myomatosus. Bei der chirurgischen Tumorentfernung war die Patientin 56 Jahre alt, der Tumor wog 14 Gramm und zeigte histologisch keinen Anhalt für Malignität.

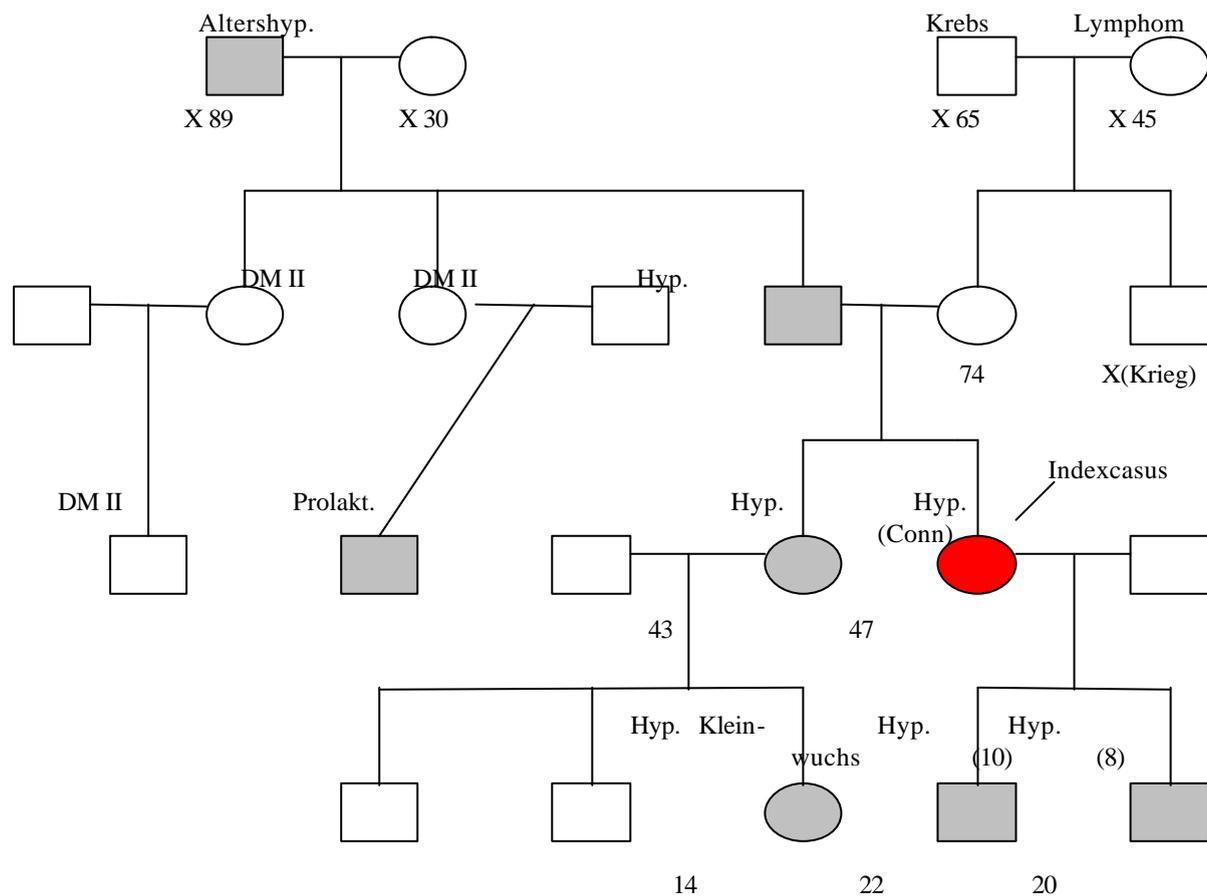
Weiterhin beinhaltet diese Studie eine Patientin einer Familie mit erblicher arterieller Hypertonie auf dem Boden eines Conn Syndroms. Der Stammbaum dieser Familie enthält desweiteren eine Anamnese für ein Prolaktinom und Diabetes Mellitus II (Abbildung 2).

## Abbildung 2: Stammbaum der Familie 47

Der Stammbaum der Familie enthält eine Anamnese für arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus II und auch ein Prolaktinom.

Zahlen geben das Lebensalter an, X: Tod mit Altersangabe, Altershyp.: Altershypertonie, Hyp.: arterielle Hypertonie, Hyp. mit Altersangabe gibt an, in welchem Lebensalter der Hypertonus erstmals diagnostiziert wurde,

Hyp.(Conn): arterieller Hypertonus auf dem Boden eines Morbus Conn, DM II: Diabetes Mellitus Typ II, Prolakt.: Prolaktinom



## C. II. Heterozygotieverlustanalyse

Von 13 Patienten mit sporadischen adrenokortikalen Tumoren und unserer Indexpatientin der Familie mit hereditärer arterieller Hypertonie auf dem Boden eines Morbus Conn bei Nebennierenadenom konnten wir Desoxyribonukleinsäure sowohl aus Tumorgewebe als auch aus Leukozyten gewinnen. Tabelle 7 zeigt die Heterozygotieverlustuntersuchungen auf Chromosomenabschnitt 11q13 für alle 4 Mikrosatellitenmarker in Synopse mit dem Sequenzierergebnis der intragenischen Polymorphiestellen. Abbildung 3 zeigt den einzigen Fall, bei dem der Heterozygotieverlust nicht genau bestimmt werden konnte (Patient 61). Die Direktsequenzinformation dieses Patienten an der intragenischen Polymorphiestelle an Position 7264 in Exon 9 spricht gegen einen Heterozygotieverlust. Es kann sich auch um eine Verunreinigung durch Normalgewebe handeln. 3 Patienten zeigten definitiv einen Heterozygotieverlust am Genlocus D11S 480 (Tabelle 7). Die Untersuchungen der benachbart gelegenen Mikrosatelliten zeigten Heterozygotie. Bei 2 dieser Patienten (4 und 13) ließ sich auch an der intragenischen Polymorphiestelle an Position 7264 in Exon 9 des Menin Gens Heterozygotie am identischen Desoxyribonukleinsäureisolat nachweisen. Patient 88 zeigte eine intragenische Heterozygotie an Position 6052 des Menin Gens.

Patientin 47 wies einen Heterozygotieverlust des Mikrosatellitenmarkers D11S480 auf. Auch hier zeigte der intragenische Heterozygotiemarker an Position 7264 in Exon 9 keinen Heterozygotieverlust.

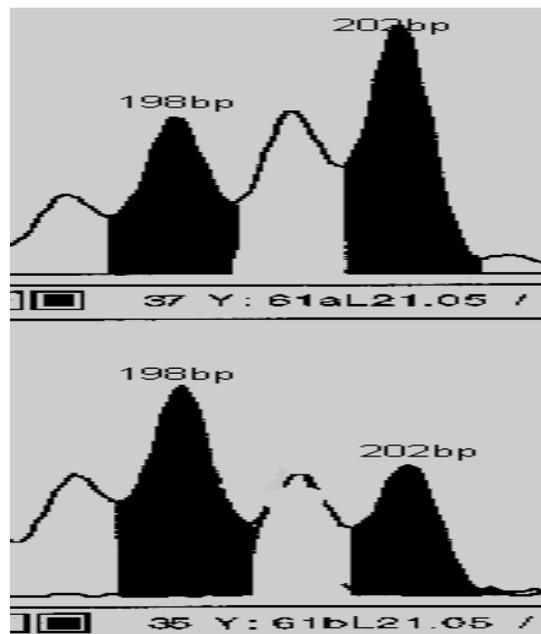
### **Tabelle 7: Heterozygotieverlustanalyse**

LOH:Heterozygotieverlust, ni: nicht informativ, nd: nicht durchgeführt, +: Heterozygotie nachgewiesen, 6052 HET: heterozygote Position in Exon 7 des Menin Gens , 7264 HET: heterozygote Position in Exon 9 des Menin Gens, n: Anzahl der Heterozygotieverluste, LOH MEN I: Beurteilung, inwieweit ein Heterozygotieverlust auf Chromosom 11q13 vorliegt und gleichzeitig das Menin Gen betrifft

NR	D11S480	PYGM	D11S44 9	D11S987	6052 HET	7264 HET	LOH MEN I
13	LOH	+	+	nd	nein	+	ausgeschlossen
4	LOH	+	ni	nd	nein	+	ausgeschlossen
22	+	+	+	ni	nein	nein	unwahrscheinlich
27	ni	+	+	nd	nein	nein	unwahrscheinlich
32	ni	ni	+	nd	nein	+	ausgeschlossen
33	ni	ni	+	nd	nein	+	ausgeschlossen
38	ni	+	+	+	nein	nein	unwahrscheinlich
40	+	+	+	+	nein	+	ausgeschlossen
46	LOH	+	+	+	nein	nein	möglich
47	LOH	+	+	nd	nein	+	ausgeschlossen
60	nd	nd	+	nd	nein	nein	unwahrscheinlich
61	LOH	ni	+	+	nein	+	ausgeschlossen
69	ni	nd	+	+	nein	nein	unwahrscheinlich
88	ni	nd	+	nd	ja	nein	unwahrscheinlich
N	5/ 7 (71%)	0/ 8 (0%)	0/ 13 (0%)	0/ 5 (0%)	1/ 14 (7%)	7/ 14 (50%)	möglich 1/ 14 (7%)

Die Informativität der Mikrosatellitenmarker betrug für den D11S480 Locus 7/13 (54%), für den PYGM Locus 8/11 (73%), für den D11S449 Locus 13/14 (93%) und für den Locus D11S987 5/6 (84%).

### Abbildung 3: Heterozygotieverlustanalyse des Mikrosatellitenmarkers D11S480 an Patient 61



Nach Isolation, Aufreinigung und Amplifikation genomischer DNS aus Tumorgewebe und aus Leukozyten des Patienten führten wir eine kapillarelektrophoretische Heterozygotiestatusanalyse am Mikrosatellitenmarker D11S480 durch. Der Heterozygotiestatus konnte nicht eindeutig bestimmt werden (Ratio 0,5). Der obere Teil der Abbildung zeigt das spezifische Detektionssignal der DNS aus Leukozyten, der untere Teil zeigt das spezifische Detektionssignal der DNS aus Tumorgewebe.

### C. III. Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse des Menin Gens führten wir an 14 Patienten mit adrenokortikalen Adenomen, einer Patientin mit unilateraler nodulärer Nebennierenrindenhyperplasie und einer Patientin einer Familie mit hereditärer arterieller Hypertonie auf dem Boden eines Conn Syndroms anhand Direktsequenzierung von Strang und Gegenstrang der Desoxyribonukleinsäure durch. Wir analysierten die kodierenden Exone des Menin Gens (Exon 2-10) inklusive der Exon/Intron Grenzen und der Splice Positionen. Die Analyse der angrenzenden Intronsequenzen der Exone 2-10 ergab keinen Anhalt für Mutationen der Splicestellen der Patienten mit sporadischen Nebennierenadenomen. In Position 4243 (Intron 2) identifizierten wir regelmäßig die Sequenz *tggccccctttc* und nicht *tggcccc\_tttc*, in Position 6821 (Intron 8) identifizierten wir regelmäßig die Sequenz *aca\_ggcca* und nicht *acagggcca*, wie in der Genbank ( GenBank U93237) veröffentlicht.

Bei Patient 61, der ein Inzidentalom hatte, fand sich eine heterozygote Mutation in Codon 552 (Exon 10) mit Basenaustausch von Adenin gegen Thymin (Abbildung 4). Der Basenpaaraustausch führt zu einem Aminosäurenaustausch von Threonin gegen Serin.

Patient 69, die einzige Patientin mit unilateraler nodulärer Hyperplasie der Nebenniere, zeigte einen Polymorphismus im Intronbereich 4 Basenpaare proximal des Starts von Exon 10 in Codon 451 (entsprechend der Position 7574 der in der Genbank hinterlegten genomischen Menin Gensequenz) (Abbildung 5).

Die Analyse von Patientin 47 aus der Familie mit hereditärer arterieller Hypertonie, die wegen eines Conn Syndroms auf dem Boden eines isolierten adrenokortikalen Adenoms chirurgisch therapiert wurde, ergab eine

heterozygote Mutation in Codon 176 (Exon 3) mit Basenaustausch von Adenin gegen Guanin (Abbildung 6). Dieser führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin gegen Glutamin.

Alle weiteren Sequenzen wiesen keine Mutationen auf (Tabelle 8).

**Tabelle 8. Übersicht über die Analysedaten der Exone 2-10 durch Direktsequenzierung von Strang und Gegenstrang**

oB: ohne Befund, Ex: Exon, PAT.NR.: Patienten Nummer

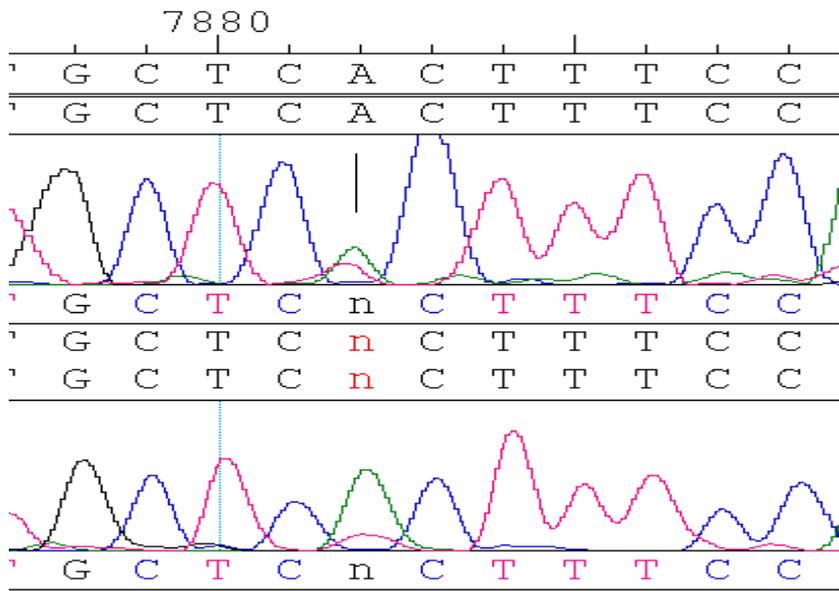
PAT	EX																	
NR.	3'→	5'→	3'→	5'→	3'→	5'→	3'→	5'→	3'→	5'→	3'→	5'→	3'→	5'→	3'→	5'→	3'→	5'→
	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'
1	oB																	
4	oB																	
13	oB																	
20	oB																	
22	oB																	
27	oB																	
32	oB																	
33	oB																	
38	oB																	
40	oB																	
46	oB																	
47	oB	oB	1	1	oB													
60	oB																	
61	oB	2	2	2	2													
69	oB	3	3	oB	oB													
88	oB																	

**1:** heterozygote Mutation an Position 4364

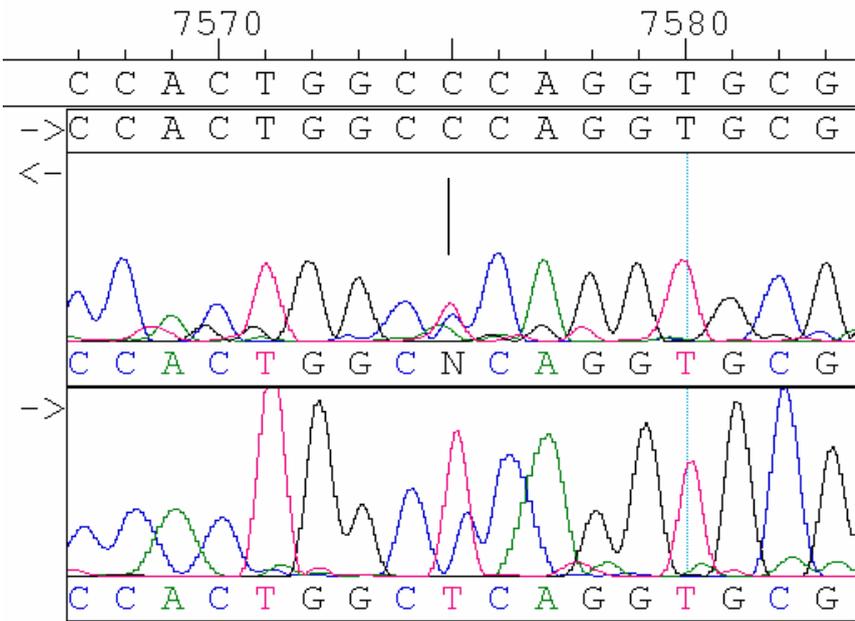
**2:** heterozygote Mutation an Position 7882

**3:** Polymorphismus an Position 7574

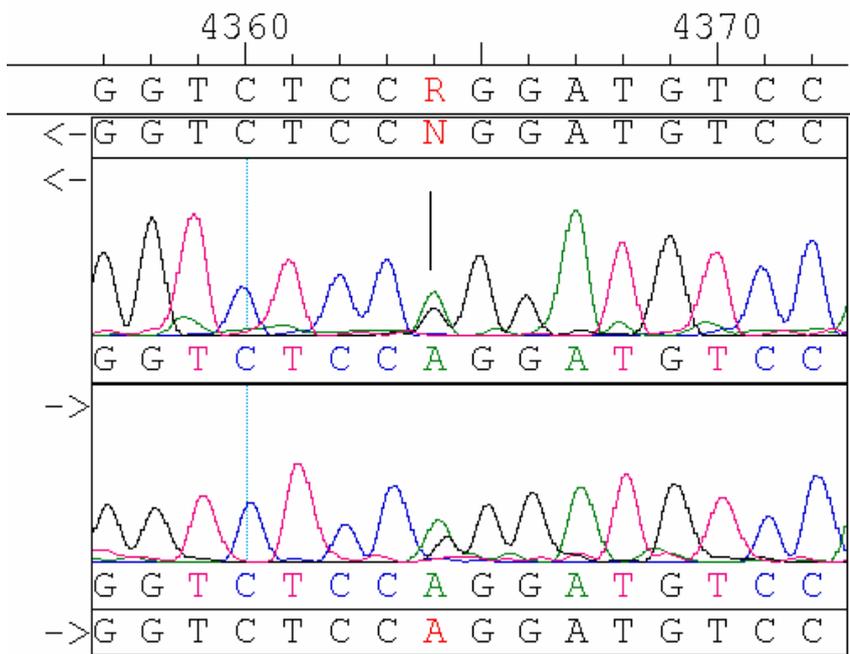
**Abbildung 4: heterozygote Mutation an Position 7882 (Codon 552)  
(Patient 61)**



**Abbildung 5: Polymorphismus an Position 7574 (Codon 451)  
(Patientin 69)**



**Abbildung 6: heterozygote Mutation an Position 4364 (Codon 176)  
(Patientin 47)**



Nach Isolation, Aufreinigung und Amplifikation von genomischer DNS aus Tumorgewebe und Leukozyten der Patienten führten wir eine Mutationsanalyse durch Direktsequenzierung von Strang und Gegenstrang der DNS durch. Wir analysierten die kodierenden Exone des Menin Gens (Exon 2-10) inklusive der Exon/Intron Grenzen und der Splice Positionen.

## D. Diskussion

Blut- und Gewebematerial zur Untersuchung der Heterozygotie durch Polymerasekettenamplifikation polymorpher Mikrosatellitenloci mit Differenzierung von Allelen mit verschiedener Anzahl von Tandemwiederholungen stand bei 13 Patienten mit sporadischen Nebennierentumoren und der Indexpatientin der Familie mit angeborener arterieller Hypertonie auf dem Boden eines Conn Syndroms zur Verfügung. Wir verwendeten 4 Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 11q13, wobei D11S480 zentromerisch vom PYGM Locus und dieser wiederum zentromerisch vom MEN I Gen liegt. D11S449 und D11S987 liegen telomerseitig des MEN I Gens. 4 der 13 Patienten mit sporadischen Nebennierentumoren wiesen einen Heterozygotieverlust für den Locus D11S480 auf. In keinem Fall betraf dieser Verlust auch den PYGM Locus, so daß das Deletionsintervall das Menin Gen nicht mit einschloß. Das Deletionsintervall endete somit zentromerisch vom Menin Gen. Die in Exon 9 des MEN I Gens lokalisierte polymorphe Position wies in Codon 418 (Basenpaar 7264 der in der Genbank deponierten Kompletsequenz des MEN I Gens) eine heterozygote Konstellation auf. Die Heterozygotierate in dieser Position wurde von früheren Untersuchern mit 35-50% angegeben (Chandrasekharappa et al.,1997; Mutch et al., 1999). Beim verbleibenden Patienten war der PYGM Marker heterozygot, so daß keiner der oben genannten Heterozygotieverluste das MEN I Gen betrifft (Tabelle 7). Ein möglicher, aber nicht bewiesener Heterozygotieverlust, der das MEN I Gen einschließt, lag nur in 1/13 Fällen (8%) vor. Die mit 4 von 13 Patienten (31%) dennoch bedeutsame Anhäufung von Heterozygotieverlusten im zentromerischen Teil der Chromosomenbande 11q13 weist auf ein mögliches,

eben dort lokalisiertes Tumorsuppressorgen mit Bedeutung für die adrenokortikale Tumorentstehung hin.

Die direkte Desoxyribonukleinsäuresequenzierung aller kodierenden Exone des MEN I Gens wies eine Mutation und einen Polymorphismus unter 15 Patienten mit sporadischen adrenokortikalen Tumoren nach. Patient 61 litt an einem nicht hormonproduzierenden asymptomatischen Nebennierengeschwulst von 50 mm Durchmesser, der zum Ausschluß des Malignomverdachts chirurgisch entfernt worden war. Hier fand sich eine Mutation in Codon 552, wobei der Basenpaaraustausch einen Austausch von Threonin gegen Serin zur Folge hat. Die Mutation lag in heterozygoter Konstellation vor. Dies läßt sich vermutlich durch die Beimischung von Normalgewebe erklären, da auch die Heterozygotieverlustanalyse einen Zustand zwischen Verlust und Erhalt des Allels aufzeigte (Ratio 0,5). Inwieweit der beobachtete Aminosäureaustausch auch zu einem Funktionsverlust des Menin Gens führt, kann zur Zeit nicht festgestellt werden, da es noch keinen Funktionstest für das Menin Gen gibt. Nach unserer Kenntnis wurde der hier genannte Basenaustausch im Menin Gen bisher noch nicht beschrieben. Für das Kollektiv benigner sporadischer Nebennierentumoren ermittelten wir somit eine Mutationsrate von 7%. Dieser Befund bestätigt und sichert die Ergebnisse die mit verschiedenen Mutationsscreeningmethoden an 45 weiteren Patienten mit Nebennierenadenomen von 3 Arbeitsgruppen erhalten worden waren (Kjellmann et al., 1999; Görtz et al., 1999; Heppner et al., 1999). Die von diesen Gruppen verwendeten Techniken basieren auf Einzelstrangkonnformationsanalysen, deren Sensitivität zur Identifikation einer MEN I Gen Mutation unter der Voraussetzung einer vorgängigen Heterozygotieverlustanalyse auf 60-80% geschätzt wird (Kjellmann et al., 1999; Mutch et al., 1999). Die Dokumentation einer Menin Genmutation bei einem Patienten mit isoliertem, sporadischem, benignem Nebennierenrindentumor ist die erste Beobachtung dieser Art. Unsere Untersuchung schließt 3 Patienten

mit massivem Hyperandrogenismus und 6 Patienten mit Überproduktion von Progesteronmetaboliten mit ein. Solche Patienten waren in anderen Untersuchungen bislang nicht berücksichtigt worden. Die Seltenheit des Auffindens einer Menin Genmutation auch bei Verwendung einer hochsensitiven Sequenzierungsmethode läßt kaum Zweifel, daß MEN I Genmutationen bei der Entstehung sporadischer benigner adrenokortikaler Tumore keine numerisch bedeutsame Rolle spielen.

Bei der Patientin mit unilateraler nodulärer Nebennierenrindenhyperplasie identifizierten wir einen Polymorphismus nur 4 Basenpaare proximal des Starts von Exon 10 mit Codon 451 (entsprechend der Position 7574 der in der Genbank deponierten genomischen MEN I Sequenz). Es ist unklar, inwieweit dieser Basenaustausch auf Spliceprozeße Einfluß nimmt. Position 7574 ist bislang nicht als polymorphe Stelle beschrieben worden.

Die Analyse des MEN I Gens bei einer 47jährigen Patientin mit Conn-Syndrom auf dem Boden eines isolierten adrenokortikalen Adenoms ergab eine Mutation in Codon 176 mit Basenaustausch von Adenin gegen Guanin. Dieser führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin gegen Glutamin. Auch hier ist der Beweis für die biologische Relevanz der Mutation bei Fehlen einer geeigneten Nachweismethode derzeit nicht zu erbringen. Eine Betrachtung des Stammbaums der Patientin legt allerdings eine genetische Komponente nahe (Abbildung 2). Wir wiesen einen Heterozygotieverlust für D11S480 bei erhaltener intragenischer Heterozygotie nach.

In summa weisen unsere Untersuchungen auf die Existenz eines für die Entstehung gutartiger Nebennierenrindentumoren bedeutsamen Tumorsuppressorgens im zentromerischen Abschnitt der Chromosomenbande 11q13 bei einer Rate von 4/13 (31%) Heterozygotieverlusten hin. Dieses ist nicht mit dem MEN I Gen identisch. Die Mutation in Exon 10 des Meningens bei einem Patienten mit hormoninaktivem Nebennierenrindentumor ist die erste dieser Art. Angesichts einer Mutationsrate von nur 7% aller von uns mit einer

hochsensitiven Technik untersuchten Tumoren kann eine numerisch bedeutsame Rolle des Menin Gens für die Entstehung sporadischer benigner adrenokortikaler Tumoren ausgeschlossen werden.

## **Analyse des Heterozygotiestatus auf Chromosom 11q13 und Sequenzanalyse des Menin Gens bei Patienten mit gutartigen Nebennierentumoren**

*Matthias O. Heinze*

Adrenokortikale Tumoren treten bei bis zu 40% der Patienten mit multipler endokriner Neoplasie Typ-I (MEN I) auf. 20% aller sporadischen adrenokortikalen Tumoren zeigen einen Heterozygotieverlust (LOH) auf Chromosom 11q13. Auf Grund dieser Konstellation wurden auch für diese Tumoren Mutationen im Menin Gen angenommen. Wir untersuchten ein Kollektiv von 15 Patienten mit adrenalem Adenom, eine Patientin mit unilateraler nodulärer Hyperplasie der Nebenniere und eine Patientin einer Familie mit erblicher arterieller Hypertonie bei Conn Syndrom. 4 der 16 Patienten mit sporadischen Nebennierentumoren litten an Inzidentalomen, 11 Tumore waren hormonaktiv. LOH-Untersuchungen mit 4 Mikrosatellitenmarkern zeigten in 31% der sporadischen Tumoren und bei der Patientin mit angeborener arterieller Hypertonie bei Conn Syndrom LOH auf Chromosom 11q13. Die Deletion betraf jedoch in keinem Fall das MEN I Gen. Durch komplette und direkte DNS Sequenzierung des Menin Gens von 14 sporadischen Nebennierenrindenadenomen und einer unilateralen nodulären Nebennierenrindenhypertrophie identifizierten wir eine Mutation eines Inzidentaloms, die für einen Aminosäureaustausch verantwortlich ist, und einen Polymorphismus 4 Basenpaare proximal von Exon 10 bei der Patientin mit unilateraler nodulärer Hyperplasie. Die direkte DNS Sequenzierung der Patientin mit hereditärer arterieller Hypertonie ergab eine Mutation in Codon 176 mit Aminosäureaustausch. Unsere Studie zeigt, daß Mutationen im Menin Gen keine führende Rolle bei der Ätiopathogenese sporadischer adrenokortikaler Adenome spielen, weist aber auf ein anderes, auch auf Chromosom 11q13 lokalisiertes, an der Entstehung dieser Geschwülste beteiligtes Tumorsuppressorgen hin.

## **F. Literatur**

**Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, Heppner C, Emmert-Buck MR, Skarulis MC, Doppman JL, Kim YS, Lubensky IA, Zhuang Z, Green JS, Guru SC, et al. 1997** Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Hum Mol Genet* 6:1169-75

**Beckers A, Abs R, Willems PJ, van der Auwera B, Kovacs K, Reznik M, Stevenaert A 1992** Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus. *J Clin Endocrinol Metab* 75:564-70

**Beckwith J 1969** Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism and hyperplastic visceromegalie. *Birth Defects* 5:188-96

**Bornstein SR, Stratakis CA, Chrousos GP 1999** Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. *Ann Intern Med* 130:759-71

**Burgess JR, Harle RA, Tucker P, Parameswaran V, Davies P, Greenaway TM, Shepherd JJ 1996** Adrenal lesions in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Surg* 131:699-702

**Carney JA 1995** Carney complex: the complex of myxomas, spotty pigmentation, endocrine overactivity, and schwannomas. *Semin Dermatol* 14:90-8

**Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Crabtree JS, Wang Y, et al. 1997** Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* 276:404-7

**Debelenko LV, Brambilla E, Agarwal SK, Swalwell JI, Kester MB, Lubensky IA, Zhuang Z, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Chandrasekharappa SC, Crabtree JS, et al. 1997** Identification of MEN1 gene mutations in sporadic carcinoid tumors of the lung. *Hum Mol Genet* 6:2285-90

**Görtz B, Roth J, Speel EJ, Krahenmann A, De Krijger RR, Matias-Guiu X, Muletta-Feurer S, Rutmann K, Saremaslani P, Heitz PU, Komminoth P 1999** MEN1 gene mutation analysis of sporadic adrenocortical lesions. *Int J Cancer* 80:373-9

**Gordon RD, Klemm SA, Tunny TJ, Stowasser M 1994** Genetics of primary aldosteronism. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21:915-8

**Gordon RD, Gartside M, Tunny T, Stowasser M 1996** Different allelic patterns at chromosome 11q13 in paired aldosterone-producing tumours and blood DNA. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:594-6

**Guru SC, Goldsmith PK, Burns AL, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS, Chandrasekharappa SC 1998** Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1630-163

**Haber D, Harlow E 1997** Tumor suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Gen* 16:320-322

**Heppner C, Kester MB, Agarwal SK, Debelenko LV, Emmert-Buck MR, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Skarulis MC, Doppman JL, Alexander RH, Kim YS, et al. 1997** Somatic mutation of the MEN1 gene in parathyroid tumours. *Nat Genet* 16:375-8

**Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, Spiegel AM, Marx SJ 1999** MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 84:216-9

**Iida A, Blake K, Tunny T, Klemm S, Stowasser M, Hayward N, Gordon R, Nakamura Y, Imai T 1995** Allelic losses on chromosome band 11q13 in aldosterone-producing adrenal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 12:73-5

**Iida S, Fujii H, Moriwaki K 1997** A somatic mutation of the p21(Waf1/Cip1) gene in a human adrenocortical adenoma. *Anticancer Res* 17:633-6

**Kanai Y, Ushijima S, AM H, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S 1997** The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 71:355-359

**Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Backdahl M 1996** Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res* 56:4219-23

**Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Hoog A, Gray S, Farnebo LO, Holst M, Backdahl M, Larsson C 1999** Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *J Clin Endocrinol Metab* 84:730-5

**Latronico AC, Chrousos GP 1997** Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1317-24

**Li F, Fraumeni J 1969** Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: A familial syndrome? *Ann Int Med* 71:747-52

**Lubensky IA, Debelenko LV, Zhuang Z, Emmert-Buck MR, Dong Q, Chandrasekharappa S, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS, et al. 1996** Allelic deletions on chromosome 11q13 in multiple tumors from individual MEN1 patients. *Cancer Res* 56:5272-8

**Marx SJ, Agarwal SK, Kester MB, Heppner C, Kim YS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Lubensky IA, Zhuang Z, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, et al. 1998** Germline and somatic mutation of the gene for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Intern Med* 243:447-53

**Mutch MG, Dilley WG, Sanjurjo F, DeBenedetti MK, Doherty GM, Wells SA, Jr., Goodfellow PJ, Lairmore TC 1999** Germline mutations in the multiple endocrine neoplasia type 1 gene: evidence for frequent splicing defects [In Process Citation]. *Hum Mutat* 13:175-85

**Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU 1993** p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer* 54:408-10

**Reincke M, Mora P, Beuschlein F, Arlt W, Chrousos GP, Allolio B 1997** Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3054-8

**Reincke M 1998** Mutations in adrenocortical tumors. *Horm Metab Res* 30:447-55

**Russell RP, Masi AT, Richter ED 1972** Adrenal cortical adenomas and Hypertonus. A clinical pathologic analysis of 690 cases with matched controls and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 51:211-25

**Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS 1992** Dideoxy fingerprinting (ddE): a rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics* 13:441-3

**Skogseid B, Larsson C, Lindgren PG, Kvanta E, Rastad J, Theodorsson E, Wide L, Wilander E, Oberg K 1992** Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 75:76-81

**Skogseid B, Rastad J, Gobl A, Larsson C, Backlin K, Juhlin C, Akerstrom G, Oberg K 1995** Adrenal lesion in multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery* 118:1077-82

**Yano T, Linehan M, Anglard P, Lerman MI, Daniel LN, Stein CA, Robertson CN, LaRocca R, Zbar B 1989** Genetic changes in human adrenocortical carcinomas [published erratum appears in *J Natl Cancer Inst* 1989 Aug 16;81(16):1263]. *J Natl Cancer Inst* 81:518-23

**Zhuang Z, Vortmeyer AO, Pack S, Huang S, Pham TA, Wang C, Park WS, Agarwal SK, Debelenko LV, Kester M, Guru SC, Manickam P, et al. 1997** Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas. *Cancer Res* 57:4682-6

## G. Tabellarischer Lebenslauf

Name: Matthias Oliver Heinze

Geburtstag: 18.05.1973

Geburtsort: Dortmund

Konfession: evangelisch

Schulbildung: 1979-1983 Busenberg Grundschule, Dortmund  
1983-1992 Goethe Gymnasium, Dortmund  
Schulabschluß mit der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst: 1993-1994 Hüttenhospital, Dortmund

Studium: April 1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin,  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
Ärztliche Vorprüfung April 1997  
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung August 1998  
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung April 2000  
April 2000- März 2001 Praktisches Jahr, Klinikum  
Krefeld  
Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung Mai 2001

## **H. Danksagung**

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H.-D. Röher danke ich für die Überlassung des Themas.

Ich danke besonders Herrn Dr. med. K.-M. Schulte für die intensive Betreuung und die aktive Diskussion bei der Lösung von Problemen während des gesamten Zeitraums der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. rer. nat. S. Scheuring und PD Dr. rer. nat. K. Köhrer für ihre technische Assistenz.

Vielen Dank auch an Frau B. Bosilj und Frau K. Alemazkour für ihre Mithilfe.

Zudem danke ich meinen Kollegen für die fröhliche und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.