

**Aus der Klinik für Allgemeinchirurgie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. – D. Röher**

**Untersuchung des Heterozygotie-Status auf Chromosom 11q13
und Sequenzanalyse des *Multiple Endokrine Neoplasie* Typ I Gens
in Nebennierenkarzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von**

Martina Mengel

2001

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

gez.: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger, Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. K. – M. Schulte

Korreferent: Professor Dr. med. D. Bach

A. EINLEITUNG	5
B. MATERIAL UND METHODEN	8
B. I. PATIENTEN	8
B. II. SCHEMA DES ARBEITSGANGES	8
B. III. GEWINNUNG DER MATERIALIEN	9
B. III. 1. GEWINNUNG DER GEWEBEPROBEN	9
B. III. 2. GEWINNUNG DER BLUTPROBEN	9
B. III. 3. FESTLEGUNG VON STAMMBAUM UND FAMILIENANAMNESE	9
B. IV. ISOLATION VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE	10
B. IV. 1. ANFERTIGUNG VON OBJEKTTRÄGERSCHNITTEN	10
B. IV. 2. ISOLATION VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE AUS GEWEBE	10
B. IV. 3. ISOLATION VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE AUS BLUT	10
B. IV. 4. QUANTIFIZIERUNG DER DESOXYRIBONUKLEINSÄURE MITTELS AGAROSEGELELEKTROPHORESE	11
B. V. AMPLIFIKATION DER DESOXYRIBONUKLEINSÄURE DURCH VERSCHACHTELTE POLYMERASEKETTENREAKTION	12
B. V. 1. OLIGONUKLEOTIDSYNTHESE	12
B. V. 2. AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN DER EXONE 2 BIS 10 IN DER 1. RUNDE DER PCR	13
B. V. 3. KONTROLLE UND QUANTIFIZIERUNG DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE AUS DER ERSTEN RUNDE DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE	16
B. V. 4. AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN DER EXONE 2 BIS 10 IN DER 2. RUNDE DER PCR	16
B. V. 5. KONTROLLE UND QUANTIFIZIERUNG DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE AUS DER ZWEITEN RUNDE DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE	18
B. V. 6. ÜBERARBEITETE AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN DER EXONE 2 BIS 10	19

B. VI. AUFREINIGUNG DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE VOR DER SEQUENZIERUNG	22
B. VI. 1. SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE ABTRENNUNG DER OLIGONUCLEOTIDE	22
B. VI. 2. AUFREINIGUNG SPEZIFISCHER DESOXYRIBONUCLEINSÄUREFRAKTIONEN DURCH ELUTION AUS AGAROSEGELEN	22
B. VII. ZYKLO-SEQUENZIERUNG DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE UNTER VERWENDUNG VON M13-OLIGONUKLEOTIDEN	23
B. VII. 1. THERMOSEQUENASEREAKTION	23
B. VII. 2. FÄLLUNG DER REAKTIONSPRODUKTE	24
B. VIII. POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER SEQUENZIERPRODUKTE MIT FLUORESZENZDETEKTION IM HALBAUTOMATISCHEN SEQUENATOR (ABI 377)	24
B. IX . AUSWERTUNG DER CHROMATOGRAMME DER SEQUENZIERPRODUKTE	25
B. IX. 1. REGELUNG DER SIGNALSTÄRKEVERHÄLTNISSE	25
B. IX. 2. AUSWERTUNG DER SEQUENZCHROMATOGRAMME UNTER VERWENDUNG VON DATENVERARBEITUNGSPROGRAMMEN (LASERGENE NAVIGATOR)	25
B. X. DIFFERENTIELL-QUANTITATIVE POLYMERASEKETTENREAKTION ZUR AMPLIFIKATION ALLELSPEZIFISCHER DNS-SEQUENZEN (LOH-MARKER)	26
B. X. 1. AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN DER HETEROZYGOTIEMARKER	26
B. X. 2. KONTROLLE UND QUANTIFIZIERUNG DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE	27
B. X. 3. QUANTIFIZIERUNG DER ALLELSPEZIFISCHEN AMPLIFIKATIONSPRODUKTE DURCH KAPILLARELEKTROPHORESE IM ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER	27
B. X. 6. BESTIMMUNG DER ALLELVERHÄLTNISSE	28
C. ERGEBNISSE	29
C. I. PATIENTENKOLLEKTIV	29

C. II. BANDENMUSTER NACH EXONSPEZIFISCHER AMPLIFIZIERUNG DER DNS-ISOLATE AUS BLUT UND GEWEBE UND NACH CHROMATOGRAPHISCHER REINIGUNG	31
C. III. ANALYSEERGEBNISSE	31
C. III. 1. ÜBERSICHT DER MUTATIONEN UND POLYMORPHISMEN IM MEN I GEN	33
C. III. 2. SEQUENZANALYSE ALS BEISPIEL FÜR EINE HETEROZYGOTIE IN POSITION 7264, CODON 41834	
C. III. 3. SEQUENZANALYSE ALS BEISPIEL FÜR EINE HETEROZYGOTIE IN POSITION 2722, CODON 14536	
C. III. 4. SEQUENZANALYSE ALS BEISPIEL FÜR EINE MUTATION IN POSITION 2665, CODON 126	37
C. III. 5. SEQUENZANALYSE ALS BEISPIEL FÜR EINE MUTATION IN POSITION 4364, CODON 176	38
C. IV. ALLELSPEZIFISCHE QUANTIFIKATION DURCH VNTR-ANALYSE (LOH-ANALYSE)	39
C. IV. 1 VNTR-ANALYSEN DER 5 UNTERSUCHTEN PATIENTEN	40
C. IV. 2. BEISPIEL EINES HETEROZYGOTIEVERLUSTES AN PATIENT 51 (D11S449)	41
D. DISKUSSION	42
<hr/>	
E. ZUSAMMENFASSUNG	45
<hr/>	
F. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	46
<hr/>	
G. LITERATUR	48
<hr/>	
H. TABELLARISCHER LEBENSLAUF	53
<hr/>	
I. DANKSAGUNG	54
<hr/>	

A. Einleitung

Bösartige Nebennierentumoren sind selten. Ihre Inzidenz liegt nur bei etwa 1,79 Fällen pro 1 Million Einwohner und Jahr (Lipsett et al., 1963). Die genetischen Mechanismen, die zur Entstehung eines Nebennierenkarzinoms führen, werden nur teilweise verstanden (Latronico et al., 1997, Reincke et al., 1998, Bornstein et al., 1999). Tumorinduzierende Veränderungen wurden z. B. im p53-Gen (Ohgaki et al., 1993), im p21-Gen (Iida et al., 1997) und im ACTH-Rezeptor beschrieben (Reincke et al., 1997). Einige adrenale Tumoren finden sich auch im Zusammenhang mit erblichen Tumorerkrankungen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom (Li-Fraumeni et al., 1969), dem Beckwith-Widemann Syndrom (Beckwith et al., 1969, Clouston et al., 1989, Kleihues et al., 1997). Sie finden sich gleichfalls beim Carney-Komplex (Carney et al., 1995), einem der *Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ I* (MEN-I-Syndrom) nahe verwandtem Krankheitsbild. Ungefähr 30 bis 40 % der Patienten mit MEN-I-Syndrom weisen Veränderungen der Nebenniere auf. Diese schließen folgende Tumorformen mit ein: Adenome, bilaterale Hyperplasie und schließlich auch Nebennierenkarzinome (Houdelette et al., 1989, Beckers et al., 1992, Skogseid et al., 1992, Skogseid et al., 1995, Burgess et al., 1996).

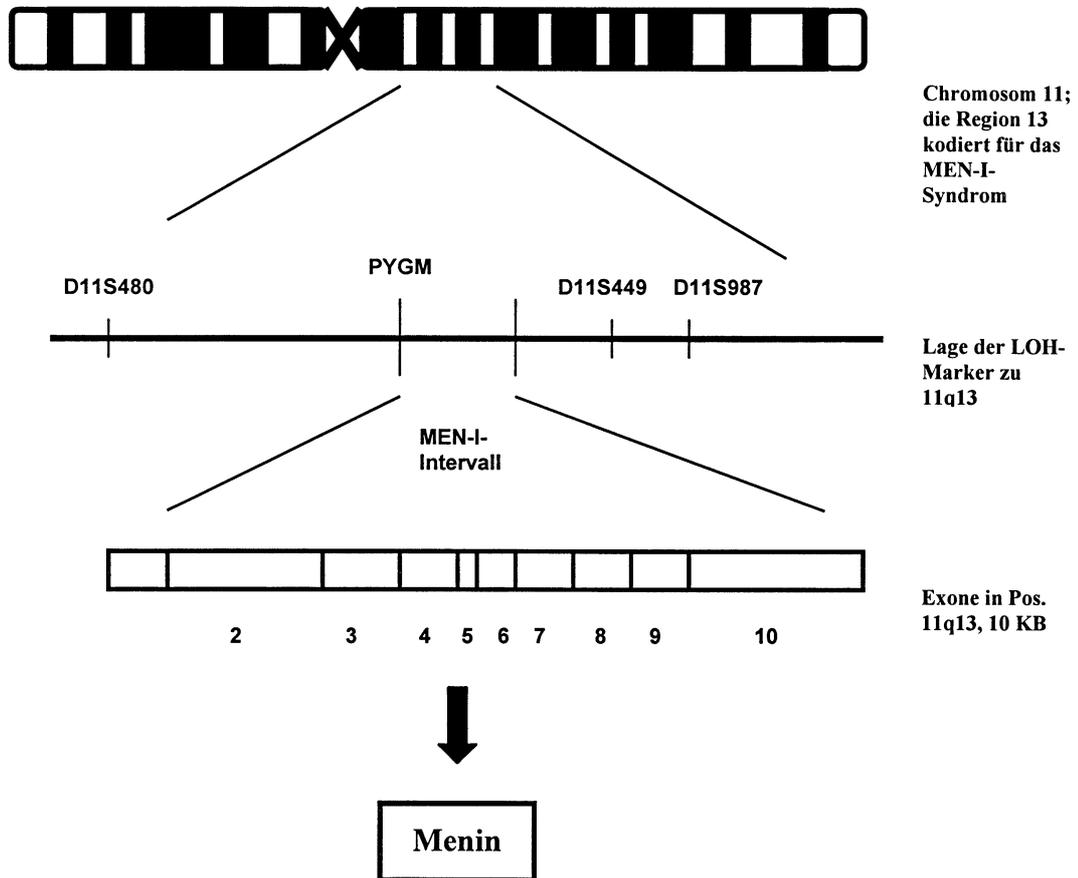
Daß auch für die Genese adrenokorticaler Tumoren die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine Rolle spielen dürfte, ergibt sich aus der Häufigkeit von Heterozygotieverlusten. Diese finden sich besonders auf den Chromosomenarmen 2q, 4p, 13p, 18p (Kjellman et al., 1999), 17p (Yano et al., 1989), 11p und 11q (Yano et al., 1989, Iida et al., 1995, Kjellman et al., 1996, Kjellman et al., 1999,) und 13q (Yano et al., 1989). Betrachtet man allein das Nebennierenkarzinom, so findet sich ein Heterozygotieverlust auf Chromosom 11q13 in etwa der Hälfte der Patienten (Kjellman et al., 1996, Görtz et al., 1999, Kjellman et al., 1999). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß bei einer Heterozygotieanalyse an 6 Patienten mit klinisch offenkundigem MEN-I-Syndrom nur derjenige einen Heterozygotieverlust in der Bande 11q13 aufwies, dessen Tumor ein adrenokortikales Karzinom war (Skogseid et al., 1992).

Das für das MEN-Syndrom Typ I (Wermer-Syndrom) verantwortliche Gen konnte kürzlich auf Chromosom 11q13 lokalisiert werden (Chandrasekharappa et al., 1997, Guru et al., 1997, Guru et al., 1997, Lemmens et al., 1997, Lemmens et al., 1997, Guru et al., 1998). Es handelt sich um ein Tumorsuppressorgen (Chandrasekharappa et al., 1997), dessen Genprodukt wahrscheinlich ein nukleärer Regulationsfaktor ist (Guru et al., 1998). Mutationen des MEN-I Gens finden sich nun aber nicht nur bei Patienten mit der MEN-typischen Konstellation endokriner Tumoren, sondern auch in sporadischen Tumoren, die unabhängig von einer solchen multiglandulären Erkrankung auftreten. Zu nennen sind hier Nebenschilddrüsenadenome 21% (Heppner et al., 1997), Gastrinome 33% (Zhuang et al., 1997), Bronchialkarzinoide 35% (Debelenko et al., 1997), und selten Hypophysentumore (Prezant et al., 1998, Tanaka et al., 1998).

Vor dem genannten Hintergrund ergibt sich der Verdacht, daß Mutationen des MEN-I-Gens mit eben jenem Inaktivierungsmechanismus eines hypothetischen Tumorsuppressorgens identisch sind, auf welchen die zahlreichen Verluste genetischer Substanz auf Chromosomenabschnitt 11q13 hinweisen.

Die vorliegende Arbeit soll die Frage klären, wie häufig Heterozygotieverluste auf Chromosom 11q13 das MEN-I-Gen betreffen und inwiefern eine Mutationsinaktivierung des Menin-Gens für die Entstehung adrenokorticaler Karzinome anzuschuldigen ist. Dazu wurde Blut- und Gewebematerial von 14 Patienten mit sporadischen Nebennierenkarzinomen und 3 Patienten mit multiglandulären endokrinen Tumorerkrankungen untersucht.

Genkarte und Systematik des Chromosoms 11q13



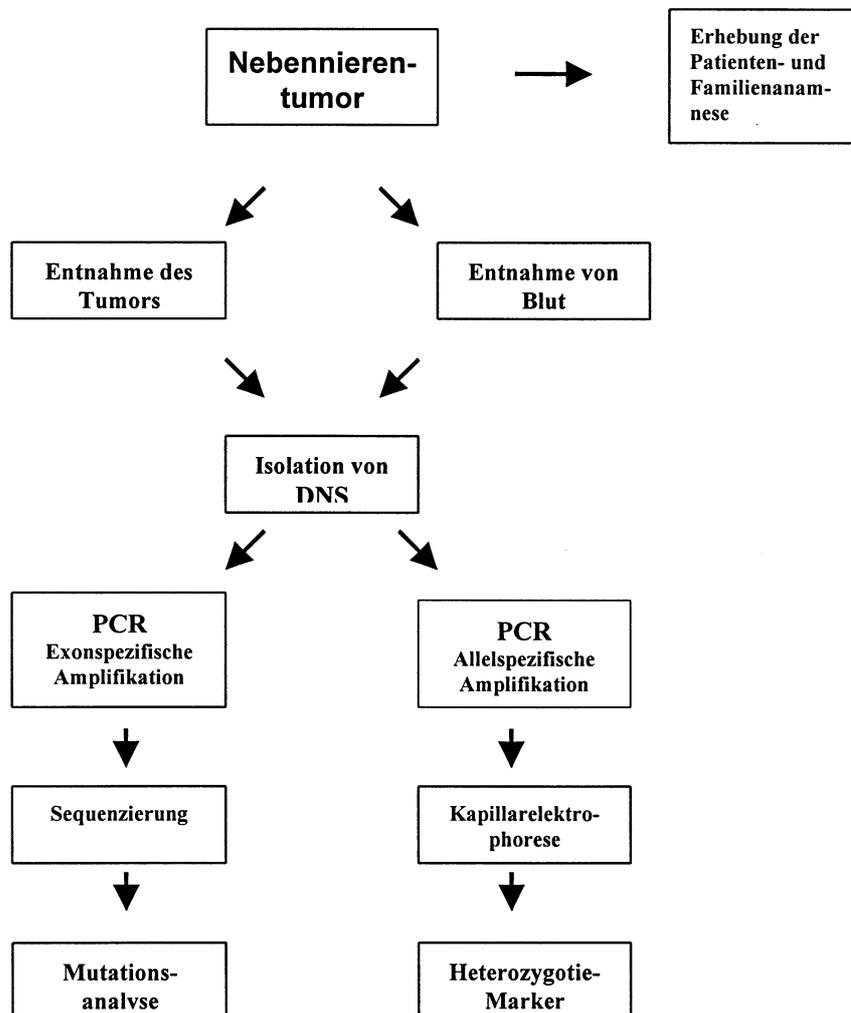
Darstellung des MEN-I-Gens; die ca. 10 KB lange genomische Sequenz kodiert ein 2,8 KB großes Transkript. Das 610 Aminosäuren große Proteinprodukt trägt den Namen Menin. Seine Funktion ist noch unbekannt (Guru et al., 1998).

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 1997 operiert. Die Patienten wurden vor ihrer Zustimmung persönlich über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt. Einschlusskriterien waren die Erkrankung an einem bösartigen Nebennierentumor mit histologischer Diagnosestellung durch das Institut für Pathologie (Direktor Prof. Dr. H. E. Gabbert). Ausschlusskriterien waren eine nicht sichere histologische Klassifikation, unzureichendes Tumormaterial, eine unzureichende Aktendokumentation und die fehlende Zustimmung des Patienten.

B. II. Schema des Arbeitsganges



B. III. Gewinnung der Materialien

Für die Untersuchungen wurde sowohl Blut als auch Gewebematerial gewonnen.

B. III. 1. Gewinnung der Gewebeproben

Die nativen Gewebeproben wurden intraoperativ von einem erfahrenen Endokrin-Chirurgen aus dem zentralen Teil des Tumors gewonnen. Sie wurden in etwa 5x5x3 mm große Fragmente zerkleinert und auf Korkplättchen bei -80°C unter Tissue Tek (Milles Inc., USA) gelagert.

B. III. 2. Gewinnung der Blutproben

Die Blutproben der Patienten wurden durch den Zusatz von EDTA ungerinnbar gemacht. Ein Teil der Proben wurde beim stationären Aufenthalt der Patienten entnommen, der Rest ambulant entnommen und bei Raumtemperatur versandt. Die Lagerung erfolgte nach Aliquotierung bei -20°C .

B. III. 3. 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 Bauchspeicheldrüse, der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Hirnanhangdrüse, des Magens, der Lunge, des Darms sowie jeglichen weiteren Tumorerkrankungen und möglichen endokrinen Erkrankungen beim Patienten und seinen blutsverwandten Familienangehörigen über mindestens drei Generationen.

B. IV. Isolation von Desoxyribonukleinsäure

B. IV. 1. Anfertigung von Objektträgerschnitten

Die ca. 5 mm durchmessenden Objektträgerschnitte wurden mit einem Kyrostaten der Firma SLEE MTE (Mainz, Deutschland) bei einer Schnitttemperatur von -55°C hergestellt. Die Schnittdicke betrug $6\ \mu\text{m}$. 20-30 mg des Tumorpräparates wurden in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß eingebracht. Der direkt benachbarte 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 der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland). Die Proben wurden mit $180\ \mu\text{l}$ Verdauungspuffer versetzt, der Proteinase K ($45\ \text{mU/mg}$) enthielt, 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 $210\ \mu\text{l}$ Äthanol p. a. (Fa. 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 der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland). Das $200\ \mu\text{l}$ Probenaliquot wurden mit $200\ \mu\text{l}$ Verdauungspuffer versetzt, der Protease enthielt, auf dem Vortex durchmischt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zusatz von $210\ \mu\text{l}$ Äthanol erfolgte die säulenchromatographische Reinigung der DNS unter mehrfachen Wasch- und Elutionsschritten. Einzelheiten der Prozedur sind in der Arbeitsanleitung des Herstellers zu finden.

B. IV. 4. Quantifizierung der Desoxyribonukleinsäure mittels Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurde die Gelkammer der Firma BioRad (München, Deutschland) benutzt.

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 Geles, als auch als Laufpuffer benutzt wurde.

Zusammensetzung des 10 x TBE-Puffer:

- Tris ultra one p. a. (GibcoBRL, Ebersberg, Deutschland), Endkonz. 890 mM	108,0 g
- Borsäure p. a. (Merck, Darmstadt, Deutschland), Endkonz. 890 mM	55,0 g
- Na ₂ EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland) x 2 H ₂ O 20 mM	7,4 g
- Aqua bidestillata	ad 1 l

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

Drei Gramm Agarose ultra pure (GibcoBRL, Ebersberg, Deutschland) wurden eingewogen und mit 300 ml 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Unter Durchmischung mit dem Magnetrührer kühlte die Gelmatrix auf eine Temperatur von ca. 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 (BioRad, München, Deutschland) 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 aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über zwei Stunden bei einer Spannung von 100 V und einem Stromfluß von 140 mA.

B. IV. 4. d Färbung und Photodokumentation

Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) (Fa. GibcoBRL, Ebersberg, Deutschland) 15 Minuten auf einem Schwenktisch gefärbt. Es folgten zwei Waschvorgänge mit destilliertem Wasser für jeweils 7 Minuten. Das Trennungsergebnis wurde unter UV-Licht der Wellenlänge 354 nm (8 mW/cm²) mit Hilfe eines Polaroid-Photodokumentationssystems dokumentiert.

B. V. Amplifikation der Desoxyribonukleinsäure durch verschachtelte Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der DNA erfolgte durch eine sogenannte "nested-PCR". Dabei wurden zunächst Amplimere hergestellt, die in einer zweiten PCR-Reaktion mit jeweils 3'-gelegenen-Oligonukleotid-Primern weiter amplifiziert wurden.

B. V. 1. Oligonukleotidsynthese

Die Oligonukleotide (Primer) wurden gemäß dem Basenpaarungsprinzip anhand der Sequenz des MEN I-Gens (Chandrasekharappa et al., 1998) für die jeweils zu amplifizierenden Exonbereiche ausgewählt und von den Firmen Biometra (Göttingen, Deutschland), GibcoBRL (Ebersberg, Deutschland), MWG (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) hergestellt. Die Kopplungseffizienz der Synthese wurde vom Hersteller 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 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-Genabschnitten verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Verwendete Oligonukleotide; nach Exonen sortiert

Exon	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Größe (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	GTT 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 CA	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 TG	
5 u. 6 1. Runde	5C	CCT GTT CCG TGG CTC ATA ACT CTC	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 CTC ATA ACT CTC	392
	3BRM13	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACA GTT GAC ACA AAA TGA GAC TG	
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 TCG 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	
9	9FFM13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGT GAG TAA GAG ACT GAT CTG TGC	313
	9CRM13	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GTC TGA CAA GCC CGT GGC TGC TG	
10	9DFM13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAT GGC CAG AGC AGG GTC CTG GA	540
	10QRM13	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GTA GTC ACT AGG GGT GGA CA	

B. V. 2. Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 10 in der 1. Runde der PCR

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte im Stufenzyklusverfahren auf dem Thermalcycler GeneAmp 2400 der Firma Perkin Elmer (Branchburg, USA). Zum Ansatz wurden autoklavierte und nukleasefreie 200µl-Eppendorfgeläße verwendet. Das Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 25 µl. Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und die Polymerasekettenreaktion durch einen Heißstart eingeleitet. Für den Heißstart wurde der Thermoblock auf 94°C erhitzt und dann die Proben hineingestellt.

Exonspezifische PCR-Bedingungen und Probenansätze:

Exon 2

Denaturierung	94°C	1 min	}	32 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	69°C	30 sec		
Synthese	72°C	1 min 30 sec		
Extension	72°C	10 min		

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

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

Exon 3, Exon 4 und Exon 5+6

Denaturierung	94°C	1 min	}	36 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	63°C	30 sec		
Synthese	72°C	1 min 30 sec		
Extension	72°C	10 min		

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

Matrize [DNS, 10-20 ng/µl]	5,0 µl
Oligonukleotid [5 pmol/µl]	0,5 µl
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) 2mM (Boehringer Mannheim)	2,5 µl
10 X PCR Puffer (Perkin Elmer, Branchburg, USA)	2,5 µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer, 1 U/0,2 µl)	0,3 µl
Nukleasefreies Wasser (Promega, Madison, USA)	14,2 µl

Exon 7

Denaturierung	94°C	1 min	}	36 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	74°C	30 sec		
Synthese	74°C	1 min 30 sec		
Extension	72°C	10 min		

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

Matrize [DNS, 10-20 ng/µl]	5,0 µl
Oligonukleotid [0,5 pmol/µl]	5,0 µl
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) 2mM (Boehringer Mannheim)	2,5 µl
10 X PCR Puffer (Perkin Elmer, Branchburg, USA)	2,5 µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer, 1 U/0,2 µl)	0,6 µl
Nukleasefreies Wasser (Promega, Madison, USA)	9,4 µl

Exon 8

Denaturierung	94°C	1 min	}	36 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	60°C	30 sec		
Synthese	72°C	1 min 30 sec		
Extension	72°C	10 min		

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

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

Exon 9 und 10

Denaturierung	94°C	1 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	
Anlagerung der Oligonukleotide	60°C	30 sec	
Synthese	72°C	1 min 30 sec	
Extension	72°C	10 min	

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

Matrize [DNS, 10-20 ng/µl]	5,0 µl
Oligonukleotid [5 pmol/µl]	2,0 µl
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) 2mM (Boehringer Mannheim)	2,5 µl
10 X PCR Puffer (Perkin Elmer, Branchburg, USA)	2,5 µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer, 1 U/0,2 µl)	0,4 µl
Nukleasefreies Wasser (Promega, Madison, USA)	12,6 µl

B. V. 3. Kontrolle und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte aus der ersten Runde durch Agarosegelelektrophorese

Die Amplimere wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Dazu wurden 1% w/v 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), 1 µg pro Spur, quantifiziert.

B. V. 4. Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 10 in der 2. Runde der PCR

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 Ansätze wurden auf Eis pipettiert und die Polymerasekettenreaktion durch einen Heißstart eingeleitet. Für den Heißstart wurde der Thermoblock auf 94°C erhitzt und dann die Proben hineingestellt.

Exonspezifische PCR-Bedingungen und Probenansätze:

Als Template der zweiten Runde wurden 5 µl des jeweiligen Amplifikats der ersten Runde verwendet, welches zuvor ad 100 µl mit nukleasefreiem Wasser verdünnt worden war.

Exon 2

Denaturierung	94°C	1 min	}	32 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	69°C	30 sec		
Synthese	72°C	1 min 30 sec		
Extension	72°C	10 min		

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

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

Exon 3, Exon 4 und Exon 5+6

Denaturierung	94°C	1 min	}	25 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	72°C	15 sec		
Synthese	72°C	30 sec		
Extension	72°C	10 min		

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten 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, Branchburg, USA)	2,5 µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer, 1 U/0,2 µl)	0,2 µl
Nukleasefreies Wasser (Promega, Madison, USA)	16,3 µl

Exon 7 und 8

Denaturierung	94°C	1 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	
Anlagerung der Oligonukleotide	79,5°C	15 sec	
Synthese	79,5°C	30 sec	
Extension	72°C	10 min	

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

Matrize (DNS, 10-20 ng/µl)	5,0 µl
Oligonukleotid (1 pmol/µl)	2,0 µl
Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP) 2mM (Boehringer Mannheim)	2,5 µl
10 X PCR Puffer (Perkin Elmer, Branchburg, USA)	2,5 µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer, 1 U/0,2 µl)	0,4 µl
Nukleasefreies Wasser (Promega, Madison, USA)	12,6 µl

Exon 9 und Exon 10

Die Amplifikate waren bereits nach dem 1. Durchgang der Polymerasekettenreaktion sequenzierfähig, so daß auf die Reamplifikation verzichtet werden konnte.

B. V. 5. Kontrolle und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte aus der zweiten Runde durch Agarosegelelektrophorese

Die Amplimere wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Dazu wurden 1% Agarosegele mit 5 µl Amplimer 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.

Patient	Klinische Diagnosen	Exon 2 497 bp	Exon 3 575 bp	Exon 4 255 bp	Exon 5+6 382 bp	Exon 7 375 bp	Exon 8 276 bp	Exon 9 275 bp	Exon 10 368/303 bp	D11S 480	PYGM	D11S 449	D11S 987
5	HPT, Hypophysentumor, MEN-I-Syndrom	Mut W126WP	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
10	Inzidentalom	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
14	MEN-I-Syndrom Cushing Syndrom Hypophysenadenom kontralaterale adrenale Hyperplasie	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
15	Radikulitis	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
17	Bluthochdruck	Het	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓	+/-	LOH	+	
24	Cushing Syndrom Hirsutismus, Bluthochdruck	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓	LOH	n. u.	LOH	
29	Cushing Syndrom	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓	NI	LOH	LOH	
34	Cushing Syndrom V. cava Thrombose	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
51	Metastasiertes Nebennierenkarzinom	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓	LOH	NI	LOH	
57	Pubertas praecox (mit 10 Jahren)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
62	Gynäkomastie	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
64	Amenorrhoe, Hirsutismus, Cushing Syndrom	Het	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓	LOH	+	NI	
71	Rückenschmerzen	✓	Mut R176A	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
100	MEN-I-Syndrom Nebenschilddrüsenadenom, foll. Schilddrüsenadenom, sek. Amenorrhoe Vater: HPT (2 Drüsen)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
101	Cushing Syndrom, Struma	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
102	Cushing Syndrom Rez. Nebennierentumor	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				
104	Lebermetastase	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Het	✓				

MUT=Mutation, HET=Heterozygotie, LOH=Heterozygotieverlust, NI=nicht informativ, n.u.=nicht untersucht, ✓=analysiert, jedoch keine Abweichung von der genomischen Sequenz, leere Felder=nicht untersucht, da kein Blut-Gewebe-Paar zur Verfügung stand

Exonspezifische PCR-Bedingungen und Probenansätze:

Exon 2, Exon 4, Exon 5+6, Exon 8 und Exon 9

Denaturierung	94°C	3 min	}	35 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	57°C	30 sec		
Synthese	72°C	90 sec		
Extension	72°C	10 min		

30 µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes 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, Madison, USA)	9,5 µl

Exon 3

Denaturierung	94°C	3 min	}	36 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	63°C	30 sec		
Synthese	72°C	90 sec		
Extension	72°C	10 min		

16 µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes enthielten folgende Reagenzien:

Matrize (DNS, 10-20 ng/µl)	5,0 µl
Oligonukleotid (5 pmol/µl)	3,0 µl
TaqMasterMix (QIAGEN, Hilden, Deutschland)	8,0 µl

Exon 7

Denaturierung	94°C	3 min	}	35 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	68°C	30 sec		
Synthese	72°C	90 sec		
Extension	72°C	10 min		

30 µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes 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, Madison, USA)	9,5 µl

Exon 10/I und Exon 10/II

Denaturierung	94°C	3 min	}	36 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	58°C	30 sec		
Synthese	72°C	90 sec		
Extension	72°C	10 min		

15 µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes für Exon 10/I 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-Lösung (Boehringer, Mannheim, Deutschland)	2,5 µl

25 µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes für Exon 10/II 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
Nukleasefreies Wasser (Promega)	2,5 µl

Die Amplimere dieser überarbeiteten Polymerasekettenreaktion wurden ebenfalls nach oben beschriebener Methode mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert und quantifiziert

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 Oligonukleotide

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

Die Amplifikationsprodukte wurden mit einem Aliquot 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 Desoxyribonukleinsäurefraktionen durch Elution aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland).

Die exonspezifischen Amplifikationsprodukte wurden nach Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, mit 3 Volumenteilen Gellysepuffer versetzt und für 10 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zusatz von 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.

B. VII. Zyklus-Sequenzierung 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. Dabei erfolgt der Kettenabbruch durch die Farbstoffterminatoren. Jeder Farbstoff emittiert bei Anregung durch den Laser Licht verschiedener Wellenlänge, so daß alle vier basenspezifischen Farbstoffe in einer Gelspur detektiert werden konnten.

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

Farbstoffterminatoren, AmpliTaq DNS Polymerase und dNTP's wurden dem Reaktionsansatz als fertiger Reaktions-Mix (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 200µl-Eppendorfgeläße verwendet. Das Volumen eines Thermosequenasereaktionsansatzes betrug 10 µl.

Denaturierung	96°C	10 sec.	} 25 Zyklen
Anlagerung der Oligonukleotide	50°C	5 sec.	
Extension	60°C	4 min.	

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)	ad 10 µl

B. VII. 2. Fällung der Reaktionsprodukte

10 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 Eppendorff-Gefäß bei Raumtemperatur vorgelegt. 10 µl Sequenzierprodukt wurden mit 90 µl H₂O bidest. versetzt. Dieses Gemisch wurde der alkoholischen Natriumacetatlösung zugesetzt. Nach Mischung auf dem Vortex folgte die Zentrifugation bei 5030 g für 30 min. Der Überstand wurde dekantiert und sorgfältig abgehoben. Das Sediment wurde mit 350 µl Äthanol 70% v/v (Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland) 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 (Sigma, St. Louis, USA) pH 8,3, deionisiert über Amberlite (Serva, Heidelberg, Deutschland) mittels eines Filter (Nalgene, Rochester, USA, Porengröße 0,2 µm), verdünnt.

B. VIII. Polyacrylamidgelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierprodukte mit Fluoreszenzdetektion im halbautomatischen Sequenator (ABI 377)

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 Polyacrylamidgeles.

Das Polyacrylamidgel setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

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

Die Reagenzien wurden für 30 Minuten auf dem Magnetrührer mit 1 g Amberlite (p. a., SERVA, Heidelberg, Deutschland) durchmischt und nach Vorgabe von 6 ml 10 x TBE 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 (amresco, Solon, USA), 10% w/v, und 15 µl TEMED p.a. [Tetramethylethyldiamin] (Sigma, St. Louis, USA) folgte das Gießen des Geles mit Hilfe einer Gießapparatur.

Nach einer Polymerisierungszeit von 4 bis 12 Stunden bei Raumtemperatur folgte der Einbau der Gelkammer in das Sequenziergerät und das Beladen des Geles 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 bp) 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 der Fa. ABI vorliegenden Sequenzen wurden in das Programm EditSeq der Firma GATC überführt. Dort wurden sie unter die in der Genbank publizierte Sequenz (Gene Bank Zugangsnummer U93237) (Chandrasekharappa et al., 1997) eingelesen. Das Chromatogramm wurde Basenpaar um Basenpaar von stets dem selben Auswerter gelesen. Sequenzanteile ohne eindeutige Sequenzfestlegung über ≥ 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 erneute 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. Dabei wurden die Sequenzergebnisse des Vorwärts- und Rückwärtsstranges sowie auffällige

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 (GenBank U93237) verglichen.

B. X. Differentiell-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.

Oligonukleotidsequenz der 4 Heterozygotiemarker:

Marker		Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Position zum MEN-I-Gen
PYGM	vorwärts	CTA GCA GAG TCC ACC TAC TG	zentromerisch
PYGM	rückwärts	GTC GTC AGG TAG CAA CTG AC	zentromerisch
D11S480	vorwärts	CCC TCT TGC CTG TGT TGA AAT	zentromerisch
D11S480	rückwärts	TTT GAG GTA GGC TTC GTA TA	zentromerisch
D11S987	vorwärts	GAC TCC AGT CTG GGC AAT AAA AGC	telomerisch
D11S987	rückwärts	GGT GGC AGC ATG ACC TCT AAA G	telomerisch
D11S449	vorwärts	GGT GAA AAA ACA CAC TTG TCT G	telomerisch
D11S449	rückwärts	GGG GAC ATA GTG AGA TCC TGT	telomerisch

Alle Oligonukleotide wurden durch die Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert. Jeder Vorwärtsoligonukleotid 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-Eppendorfgeläße verwendet. Das Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 25 µl.

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

Denaturierung	94°C	1 min	}	33 Zyklen
Denaturierung	94°C	45 sec		
Anlagerung der Oligonukleotide	60°C	45 sec		
Synthese	72°C	1 min		
Extension	72°C	10 min		

25µl des Polymerasekettenreaktionsansatzes 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, Branchburg, USA)	2,5 µl
Thermophilus aquaticus (Taq) Polymerase (Perkin Elmer, 1 U/0,2 µl)	0,2 µl
Nukleasefreies Wasser (Promega, 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 im ABI Prism 310 Genetic Analyzer

1 µl der Fluoreszenzmarkierten Amplimere wurden nach Zusatz von 12 µl deionisiertem Formamid (Sigma, St. Louis, USA) und 0,5 µl des Standards unter Denaturierungsbedingungen kapillarelektrophoretisch (ABI Prism 310 Genetic Analyzer Capillary, Länge 47 cm, Durchmesser 50 µm) mit Hilfe des ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Biosystems, Branchburg, USA) aufgetrennt.

Als interner Größenstandart wurde Gene Scan 350 (Perkin Elmer Biosystems, Branchburg,

USA), TAMRA-markiert, benutzt.

Als Laufpuffer diente 1 x konzentrierter, mit EDTA versetzter Genetic Analyzer Puffer (Perkin Elmer Biosystems, Branchburg, USA).

Die gewonnenen Daten wurden mittels des Datenverarbeitungsprogrammes Gene Scan Analysis Software, Version 2.0.2 (Perkin Elmer Biosystems, Branchburg, USA) verarbeitet.

B. X. 6. Bestimmung der Allelverhältnisse

Die Allelratio R berechnete sich wie folgt: Die Bandenflächen der Allele 1 und 2 wurden 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.

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

C. Ergebnisse

C. I. Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv setzte sich wie folgt zusammen:

Nr.	Tumorgröße	Alter	Geschlecht	Klinische Diagnosen	Hormon-Produktion	Chirurgisches Vorgehen
5	17x12 cm	34	M	HPT, Hypophysentumor, MEN-I-Syndrom	Nein	Adrenalektomie und Nephrektomie en bloc
10	4x4 cm	67	M	Inzidentalom	Nein	Adrenalektomie und Nephrektomie en bloc
14	8 cm	45	W	MEN-I-Syndrom Cushing Syndrom Hypophysenadenom kontralaterale adrenale Hyperplasie	Cortisol	Adrenalektomie links, subtotale Adrenalektomie rechts
15	10x8 cm	73	M	Radikulitis	Nein	Adrenalektomie
17	11x8 cm	42	M	Bluthochdruck	Aldosteron, Cortisol, Renin	Adrenalektomie und Nephrektomie en bloc
24	14x10 cm	47	W	Cushing Syndrom Hirsutismus, Bluthochdruck	Cortisol, DHEAS, Testosteron	Adrenalektomie, transperitoneal
29	6 x 4,5 cm	56	W	Cushing Syndrom	Cortisol	Tumorexzision, transperitoneal
34	9x8 cm	46	W	Cushing Syndrom V. cava Thrombose	Cortisol Aldosteron	Adrenalektomie, transperitoneal
51	9x5 cm	37	W	Metastasierendes Nebennierenkarzinom	Cortisol, DHEAS	Adrenalektomie, transperitoneal
57	8x5 cm	15	M	Pubertas praecox (mit 10 Jahren)	Testosteron	Adrenalektomie, transperitoneal
62	8x4 cm	60	M	Gynäkomastie	Östradiol	Adrenalektomie, transperitoneal
64	8,5 x 6 cm	28	W	Amenorrhoe, Hirsutismus, Cushing Syndrom	Cortisol, DHEAS, Östradiol	Adrenalektomie, transperitoneal
71	9 cm	40	W	Rückenschmerzen	Nein	Tumoresektion und Splenektomie en bloc
100	Lokalrezidiv	32	W	MEN-I-Syndrom Nebenschilddrüsenadenom, fol. Schilddrüsenadenom, sek. Amenorrhoe Vater: HPT (2 Drüsen)	Nein	Probeentnahme
101	4,5x4,5 cm	78	W	Cushing Syndrom goiter	Cortisol	Adrenalektomie
102	7x2 cm	39	W	Cushing Syndrom Rez. Nebennierentumor	Cortisol	Lokalexzision, transperitoneal
104	9x8 cm	49	W	Lebermetastase	Nein	Adrenalektomie transperitoneal, Lebertumoresektion

W=weiblich, M=männlich, HPT=Hyperparathyreoidismus, DHEAS=Dehydroepiandrosteron

Untersucht wurden insgesamt 17 Patientinnen und Patienten. 11 von ihnen waren weiblichen Geschlechts, 6 männlichen Geschlechts.

Der jüngste Patient war bei Operation 15, die älteste Patientin 78 Jahre alt. Das Mittel im Alter bei Operation betrug 44 Jahre und 4 Monate, der Median lag bei 46 Jahren, 6 Monate.

Hormonproduktion fand sich bei 11 von 17 Patienten, das entspricht einem Anteil von 65%.

Besonderheiten in der Anamnese ergaben sich bei den Patienten 5, 14 und 100, welche klinisch multiglanduläre endokrine Tumorerkrankungen aufwiesen.

Patient 5:

Der 35-jährige Patient zeigte eine für ein sporadisches MEN-Syndrom klassische Konstellation mit Hypophysenadenom und multiglandulärem Hyperparathyreodismus. Nur 1 Jahr nach der Operation des Hypophysenadenoms wurde ein 17x12x11 großes, unilaterales und infiltrierend wachsendes Karzinom der Nebennierenrinde mit Metastasierung in die Nierenkapsel und in das lymphatische System entfernt. Bei diesem Patienten fand sich eine heterozygote Stopp-Codon-Mutation in Exon 2.

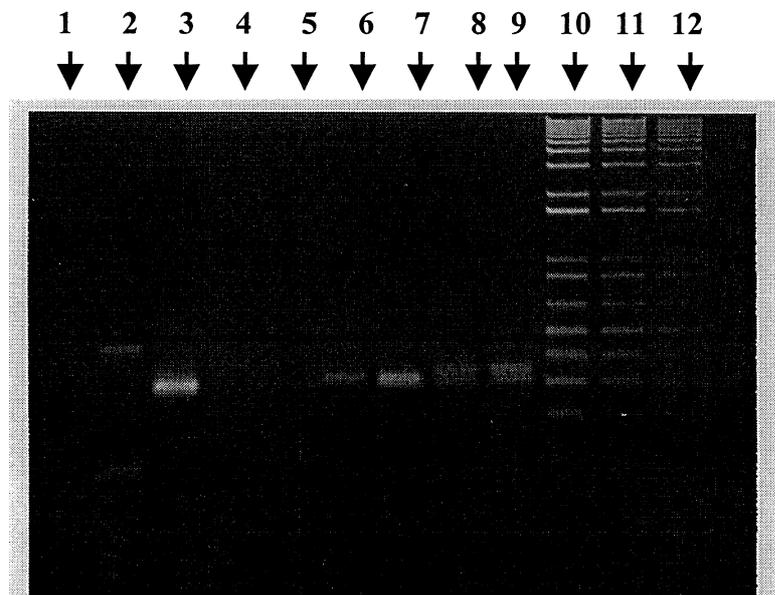
Patient 14:

Bei der 45-jährigen Patientin fand sich ein bilateraler Nebennierenrindentumor mit Kapseldurchbruch. Die histologische Untersuchung ergab für die rechte Seite eine 60 g wiegende noduläre Hyperplasie und für die linke Seite ein 130 g schweres Nebennierenrindenzarzinom. Die Patientin bot eine cushingoide Symptomatik mit Hypercortisolismus. Außerdem wies sie ein Hypophysenadenom (Prolaktinom) auf. Mutationen ließen sich nicht finden, die Familienanamnese war leer.

Patient 100:

Die 32-jährige Patientin wurde bereits mit 25 Jahren an einem primären Hyperparathyreodismus operiert. Jetzt folgte die Operation eines rezidivierenden, metastasierenden Nebennierenrindenzarzinoms. Des weiteren litt die Patientin an einem follikulären Schilddrüsenadenom und einer sekundären Amenorrhoe, deren Ursache ungeklärt war. Der Vater dieser Patientin war wegen eines Hyperparathyreodismus bei 2-Drüsen-Hyperplasie operiert worden. Die Analysen ergaben keine Mutationen.

C. II. Bandenmuster nach Exonspezifischer Amplifizierung der DNS-Isolate aus Blut und Gewebe und nach chromatographischer Reinigung



Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte aus der Polymerasekettenreaktion unter Verwendung exonspezifischer Oligonukleotide.

Hierzu wurden 5 µl des Amplifikationsproduktes mit 2 µl Ladungspuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel 1 Stunde bei 100 V aufgetrennt. Die DNS wurde durch Färbung in einer Ethidiumbromidlösung sichtbar gemacht und das Ergebnis photographisch dokumentiert. Die Spuren 1 bis 9 zeigen die Amplifikationsprodukte der Exone 2 bis 10/II, wobei Exon 5 und 6 zusammenhängend amplifiziert wurden. In den Spuren 10 bis 12 wurde als Molekulargewichtsstandard 1, 0,5 und 0,25 µg, entsprechend 100, 50 und 25ng in der 1650 bp-Bande die 1 Kbplus Leiter (GibcoBRL, Ebersberg, Deutschland) aufgetragen, so daß eine quantitative Abschätzung der Desoxyribonukleinsäure möglich war. Gemäß der bekannten genomischen Sequenz konnte die erwartete Fragmentgröße mit dem Bandenmuster des Molekulargewichtsstandard verglichen werden. Beim Ausbleiben eines Amplifikationsproduktes mußte die Amplifikation wiederholt werden.

C. III. Analyseergebnisse

Es erfolgte eine komplette Sequenzierung der kodierenden Exone 2 bis 10 von sämtlichen Patienten. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die erfolgten Analysen.

B. V. 6. Überarbeitete Amplifikationsbedingungen der Exone 2 bis 10

Amplifikationsprobleme machten eine erneute Überarbeitung aller Amplifikationsbedingungen nötig. Dabei ergaben sich folgende Oligonukleotide und Arbeitsbedingungen:

Exon	Position	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5' → 3')	bp	t (°C)
2 (2288-2732)	2285-2302	2MFM13	tgt aaa acg acg gcc agt gcc atg ggg ctg aag gcc	497	57
	2782-2762	2LRM13	cag gaa aca gct atg acc gtt ttg aag aag tgg gtc atg		
3 (4297-4505)	4096-4119	3AFM13	tgt aaa acg acg gcc agt gtt gga cat aga ggg tgt aaa cag	575	63
	4671-4649	4ERM13	cag gaa aca gct atg acc gtg cct gct tca ggg aat gac ag oder tgt aaa acg acg gcc agt atc tga ggt tgg gtc aca gg cag gaa aca gct atg acc aaa tgg agt ccc ttg ggt g		
4 (4716-4844)	4176-4195	MENBFM13	tgt aaa acg acg gcc agt atc tga ggt tgg gtc aca gg	400	
	4576-4558	MENBRM13	cag gaa aca gct atg acc aaa tgg agt ccc ttg ggt g		
4 (4716-4844)	4649-4671	4DFM13	tgt aaa acg acg gcc agt ctg tca ttc cct gaa gca ggc ac	255	57
	4904-4881	4CRM13	cag gaa aca gct atg acc ggt ccc aca gca agt caa gtc tgg		
5+6 (5177-5217, 5298-5385)	5138-5161	5CFM13	tgt aaa acg acg gcc agt cct gtt ccg tgg ctg ata act ctg	382	57
	5520-5497	3BRM13	cag gaa aca gct atg acc aca gtt gac aca aaa tga gac tgg		
7 (6025-6161)	5828-5849	7AFM13	tgt aaa acg acg gcc agt cct cag cca gca gtc ctg tag a	375	68
	6203-6182	7DRM13	cag gaa aca gct atg acc gaa gaa agg aca ggc tgc agg c		
8 (6623-6758)	6577-6600	8CFM13	tgt aaa acg acg gcc agt tgg tga gac ccc ttc aga tcc tac	276	57
	6853-6834	8BRM13	cag gaa aca gct atg acc cca atc cct aat ccc gta cat gc		
9 (7196-7360)	7151-7174	9FFM13	tgt aaa acg acg gcc agt ggt gag taa gag act gat ctg tgc	275	57
	7426-7404	9CRM13	cag gaa aca gct atg acc gtc tga caa gcc cgt ggc tgc tg		
10 (7578-8060)	7554-7573	10XRM13	tgt aaa acg acg gcc agt acc ttg ctg tcc cca ctg gc	368	58
	7922-7903	10YRM13	cag gaa aca gct atg acc cag cag ctg ctt cat gcc ct		
	7718-7737	10YFM13	tgt aaa acg acg gcc agt gcc agc act gga caa ggg cc	303	58
	8021-8002	10QRM13	cag gaa aca gct atg acc gta gtc act agg ggt gga ca		

Exon 10 mußte wegen seiner Gesamtgröße zur Amplifikation in 2 Hälften geteilt werden, welche sich jedoch überschneiden. Die Temperatur gibt die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide an.

C. III. 1. Übersicht der Mutationen und Polymorphismen im MEN I Gen

Eine Abweichung der Basensequenz wurde dann festgestellt, wenn sich bei Sequenzierung des Vorwärts- und Rückwärtsstranges die beschriebene Alteration eindeutig darstellte. Ein Vergleich der erstellten Sequenzanalysen erfolgte mit der unter der Adresse GenBank U93237 veröffentlichten Sequenz des Genabschnittes 11q13. Bei fehlender Eindeutigkeit wurde die Sequenzierungsreaktion wiederholt. Es erfolgte eine Komplettanalyse aller kodierenden Exone inklusive ihrer Spleiß-Junktionen an den Intron-Exon-Grenzen. Eine Mutation und/oder eine Heterozygotie ließen sich bei insgesamt 9 von 17 Patienten aufdecken; diese fanden sich an folgenden Positionen:

Position 2722	Heterozygotie		Patient 17
Position 7264	Heterozygotie		Patient 10, 34, 64, 101, 102, 104
Position 2665		Mutation	Patient 5
Position 4246		Mutation	Patient 71

Außerdem ließen sich regelmäßig eine Sequenzänderung in Position 4243 (Intron 2, tgg ccc cct ttc und nicht tgg ccc ctt tc, wie in GeneBank Zugangsnummer U93237 veröffentlicht) und eine Sequenzänderung in Position 6821 (Intron 8, aca ggc ca und nicht aca ggg cca, wie in GeneBank Zugangsnummer U93237 veröffentlicht) nachweisen.

C. IV. Allelspezifische Quantifikation durch VNTR-Analyse (LOH-Analyse)

Bei 5 der untersuchten Patienten stand sowohl Blut- als auch Gewebe-DNS zur Verfügung. Diese Patienten wurden einer VNTR-Analyse unterzogen. Jeder Patient wies mindestens für einen der vier verwendeten Marker einen Heterozygotieverlust auf. Der Informativitätsgrad der Marker lag bei 75 – 80 %. Ein Heterozygotieverlust auf Chromosom 11q13 hatte bei 2 von 5 der Patienten sicher keine Auswirkung auf das MEN-I-Gen; diese Patienten wiesen eine Heterozygotie in Position 7264 (Patient 64) bzw. 2722 (Patient 71) auf. Dabei wurde für die VNTR-Analyse und die Sequenzierung die selbe DNS-Matrize verwendet.

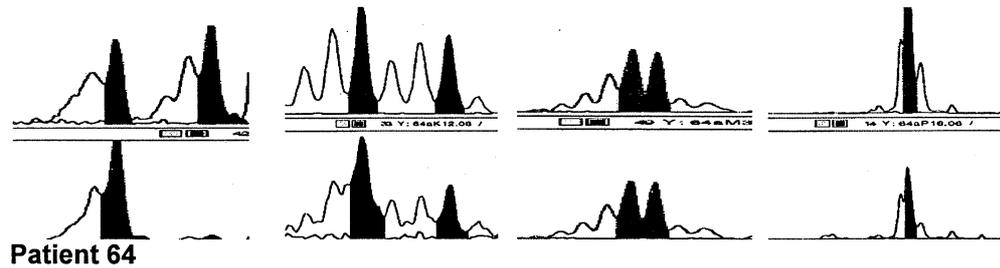
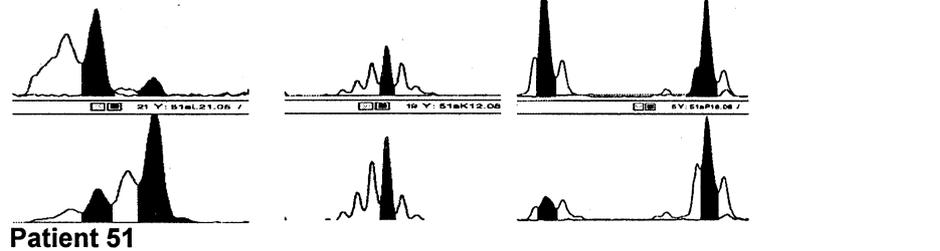
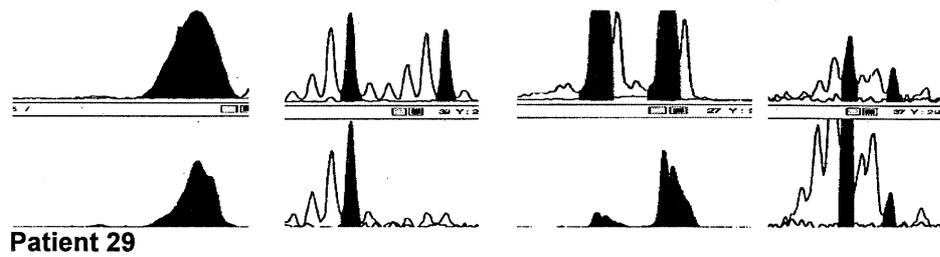
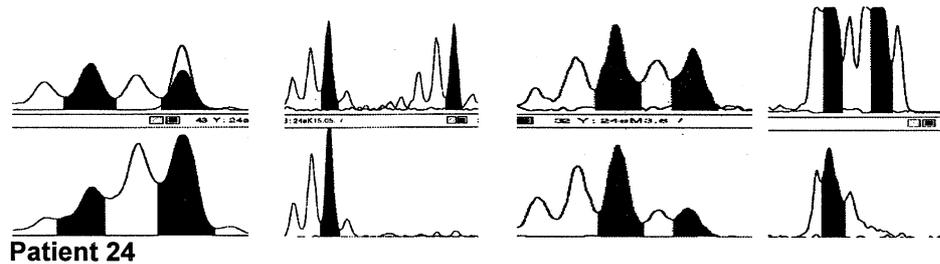
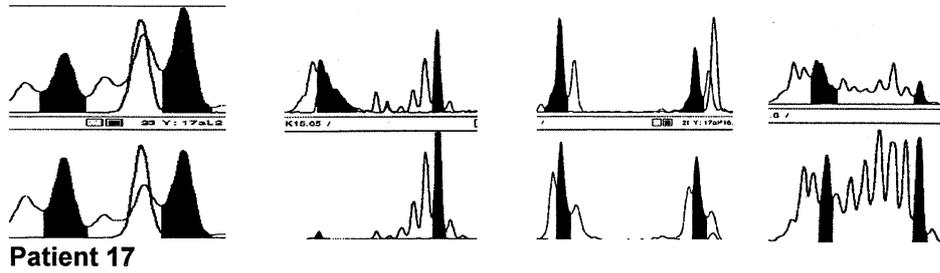
In 12 weiteren Fällen stand keine Blut-DNS der jeweiligen Patienten zur Verfügung. Durch die Ausprägung der intragenischen Polymorphien in Position 2722 und 7264 konnte in 5 dieser Fälle (42%) ein Heterozygotieverlust ausgeschlossen werden. 7 Fälle (58%) ergaben keinerlei Anhalt für oder gegen einen Heterozygotieverlust.

Die Tabelle ergibt Aufschluß über den patientenspezifischen Verlust der Heterozygotie für die LOH-Marker sowie für das Vorliegen (+) einer Heterozygotie an den polymorphen Stellen 2722 und 7264:

Patient	D11S 480	PYGM	D11S 449	D11S 987	2722	7264	LOH im Menin- Gen
5						+	
10						+	
14							
15						+	
17	+/-	LOH	+	+	+	+	ausgeschlossen
24	LOH	LOH	LOH	LOH		+	ausgeschlossen
29	NI	LOH	LOH	LOH		+	ausgeschlossen
34						+	
51	LOH	NI	LOH	NU		+	ausgeschlossen
57						+	
62							
64	LOH	+	NI	NI	+	+	ausgeschlossen
71						+	
100						+	
101						+	
102						+	
104							
Informati- vität %	80	80	80	75			

LOH=Heterozygotieverlust; NI=nicht informativ, NU=nicht untersucht

C. IV. 1 VNTR-Analyse der 5 untersuchten Patienten



D11S480

PYGM

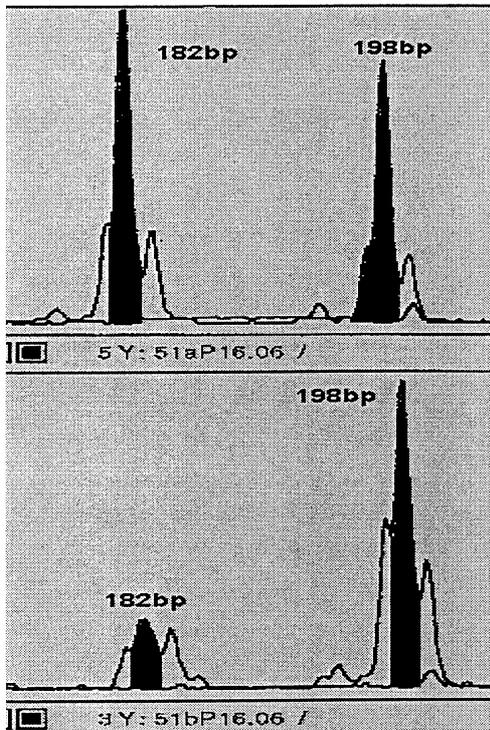
D11S987

D11S449

Die oberen Zeilen zeigen die jeweiligen Amplimere, welche aus Blut-DNS gewonnen wurden, die unteren Zeilen die Amplimere aus dem dazugehörigen Gewebematerial der Nebennierenkarzinom.

C. IV. 2. Beispiel eines Heterozygotieverlustes an Patient 51 (D11S449)

Die oberen Zeilen zeigen das aus Blut gewonnene Amplimer, die untere Zeile das aus dem dazugehörigen Gewebematerial der Nebennierenkarzinom. Die errechnete Allelratio der Bandenflächen betrug 0,27. Ein Heterozygotieverlust war als Allelratio $< 0,40$ definiert.



D. Diskussion

Eine Analyse der Heterozygotieverluste auf Chromosom 11q13 wurde an 5 der insgesamt 17 Patienten durchgeführt. Bei jedem Patienten fand sich zumindest in einer Position auf Chromosom 11q13 ein Allelverlust. Bei keinem Patienten waren alle Loci betroffen, so daß nicht vom Verlust des gesamten Chromosomenarms, sondern von umschriebenen Deletionen ausgegangen werden muß. Die verwendeten Marker D11S480 und PYGM befinden sich zentromerisch vom MEN-I-Gen, während die Marker D11S449 und D11S987 telomerisch vom MEN-I-Gen lokalisiert sind. Deletion von Markern auf beiden Seiten des Gens bedeuten mithin auch den Verlust des MEN-Gens selber. Dieses war bei 3 Patienten der Fall (Patienten 24, 29 und 51). Bei diesen Patienten war auch bei Untersuchungen intragenischer polymorpher Loci, insbesondere in Position 7264 kein Beweis für Heterozygotie zu erbringen. Bei Patient 17 und 64 liegt der Heterozygotieverlust zentromerisch vom MEN-I-Gen. Bei den Patienten 64 ist die erhaltene Heterozygotie des MEN-I-Gens durch den polymorphen Locus 7264 nachgewiesen. Bei Patient 17 besteht Heterozygotie in der intragenischen Position 2722. Beim Vorliegen von Heterozygotieverlusten bei allen 5 Patienten geht dieser zumindest bei 2 Patienten nicht mit einem Verlust des MEN-I-Gens einher. Die Informativitätsraten der verwendeten Microsatellitenloci entsprechen mit 75 bis 80 % zuvor veröffentlichten Ergebnissen (Beckers et al., 1992, Heppner et al., 1999, Iida et al., 1995, Kjellman et al., 1999, Skogseid et al., 1992).

Unter 14 Patienten mit sporadischem adrenokortikalem Karzinom fanden wir bei Sequenzierung der gesamten codierenden Sequenz der 9 Exone des MEN-Gens und ihrer flankierenden Exon-Intron-Übergangsbereiche einschließlich des Spleiß-Junktionen nur eine einzige Mutation. Diese betrifft Patientin 71, eine 40jährige Frau mit großem Nebennierenkarzinom ohne Hormonproduktion. Die Mutation ist in Codon 176 (Exon 3) lokalisiert und führt über einen Basenaustausch von Adenin gegen Guanin zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin (siehe Abbildung C. III. 5.). Die Mutation liegt in heterozygoter Form vor. Diskutiert werden muß also neben der Möglichkeit einer Beimischung von Normalgewebe auch die Möglichkeit, daß dieser Aminosäureaustausch ohne biologische Konsequenzen bleibt und die Genfunktion nicht beeinträchtigt. Ein Funktionstest zur Klärung dieser Frage steht derzeit nicht zur Verfügung. Einstweilen beschreiben wir für das Nebennierenkarzinom eine Mutationsfrequenz von nur 1/14 (7%).

Dieses Ergebnis bestätigt vorläufige Resultate, die mit Hilfe verschiedener Screeningverfahren an 28 Patienten erzielt wurden (Heppner et al., 1997, Kjellmann et al., 1999, Mutch et al., 1999).

Drei weitere von uns untersuchte Patienten wiesen klinisch eine multiglanduläre endokrine Tumorerkrankung auf. Patient 5 zeigte die für ein sporadisches MEN-Syndrom klassische Konstellation mit Hypophysenadenom und multiglandulärem Hyperparathyreodismus. Bei diesem Patienten fand sich eine Stopp-Codon-Mutation vom Typ Amber in Exon 2 im Nebennierenkarzinom. Obwohl eine Normalgewebekontamination oder eine Kontamination mit nicht erkranktem Nebennierengewebe fast sicher ausgeschlossen werden kann, da das Gewebe aus der Mitte eines 17x12 cm großen Tumors gewonnen wurde, liegt die Mutation nur in heterozygoter Konstellation vor. Damit sind die von Knudson (Knudson et al., 1971, Knudson et al., 1996, Haber et al., 1997) aufgestellten Postulate zur Realisierung eines Tumorsuppressorgendefektes nicht erfüllt und es stellt sich die Frage, ob das Auftreten der Mutation in diesen Nebennierenkarzinomen zufälliger Natur ist. Ebenso können Mechanismen in Rede gestellt werden, in denen die Tumorgenese nur einen indirekten Bezug zur Inaktivierung des MEN-I-Gens hat. Patient 14 wies ebenfalls eine MEN-I-typische Konstellation auf; hier findet sich ein Hypophysenadenom mit einer beidseitigen adrenokortikalen Hyperplasie in der sich links ein 8 cm durchmessendes Karzinom mit Kortisolproduktion gebildet hatte. Patient 100 wies neben dem Nebennierenkarzinom ein Nebenschilddrüsenadenom, ein follikuläres Schilddrüsenadenom und eine sekundäre Amenorrhoe auf, deren Ursache nicht mehr geklärt werden konnte. Der Vater dieser Patientin war wegen eines Hyperparathyreodismus bei 2-Drüsen-Hyperplasie operiert worden. Beide Patienten wiesen keine Mutationen auf. Zusammenfassend sprechen diese Befunde nicht dafür, daß das Nebennierenkarzinom durch MEN-I Defekte verursacht wird. Vielmehr scheint es sporadisch zu entstehen (Patient 5) oder mag sogar als Hinweis für eine andere, bisher nicht näher eingegrenzte endokrine Vieldrüsenerkrankung gelten.

In summa bestätigen unsere Untersuchungen häufige Heterozygotieverluste auf Chromosom 11q13 beim Nebennierenkarzinom. Allerdings betreffen diese Heterozygotieverluste in mindestens 40 % der Fälle nicht das Menin-Gen. Eine komplette Sequenzanalyse an 14 Patienten mit Nebennierenkarzinom wies nur eine heterozygote Mutation mit Aminosäureaustausch nach, so daß die Mutationsfrequenz mit 7% niedrig ist. Menin-Gendefekte sind kein führendes Ereignis in der Tumorigenese des adrenokortikalen

Karzinoms. Nebennierenkarzinome bei Patienten mit multiglandulären endokrinen Erkrankungen sind allenfalls indirekt auf MEN-I-Genmutationen zurückzuführen.

E. Zusammenfassung

Das Nebennierenkarzinom ist eine seltene sporadische Erkrankung, die auch im Kontext der *Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1* beschrieben worden ist. Angesichts einer Häufigkeit von 40% von Nebennierentumoren bei MEN-I-Patienten, der Tatsache, daß das MEN-I-Gen auf Chromosom 11q13 lokalisiert ist und die Hälfte der Tumoren von Patienten mit Nebennierenkarzinom Heterozygotieverluste auf Chromosom 11q13 aufweist, haben wir die Häufigkeit von Menin-Genmutationen beim adrenokortikalen Karzinomen untersucht. Während 5/5 (100%) der Patienten mit sporadischen Nebennierenkarzinomen Heterozygotieverluste auf Chromosom 11q13 aufwiesen, konnte bei 2 Patienten angesichts erhaltener Heterozygotie im Menin-Gen ein Verlust dieser Region sicher ausgeschlossen werden. Bei 14 Patienten mit sporadischen isolierten Nebennierenrindenkarzinomen fand sich nur eine einzige Mutation mit Basenaustausch und konsekutivem Aminosäureaustausch in Codon 176 bei einer Patientin mit hormoninaktivem Tumor. Die Mutationsfrequenz liegt damit bei 7%. Bei 3 Patienten mit gleichfalls sporadischen Nebennierenrindenkarzinomen, die allerdings im Rahmen multiglandulärer endokriner Tumorerkrankungen auftraten, fand sich in einem Fall eine Stopp-Codonmutation in Codon 126. Die beiden anderen Patienten wiesen keine Mutationen auf. Die nur heterozygote Konstellation der Stopp-Codonmutation und das Fehlen einer Mutation bei den anderen Karzinomen, spricht gegen die verbreitete Annahme, daß Nebennierenkarzinome dem klinischen Bild des MEN-I-Gendefektes zuzurechnen sind. Menin-Genmutationen sind an der Tumorentstehung in der Nebennierenrinde nur selten maßgeblich beteiligt. Die beiden von uns nachgewiesenen Mutationen in einem sporadischem Nebennierenrindenkarzinom und in einem Nebennierenrindenkarzinom bei MEN-I-Syndrom sind die ersten Beobachtungen dieser Art.

F. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Ampere
bp	Basenpaare
cm ²	Quadratcentimeter
DHEAS	Dihydroepiandrosteron
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HET	Heterozygotie
HPT	Hyperparathyreodismus
KB	Kilobasen
LOH	Heterozygotieverlust (Loss of Heterozygosity)
M	männlich
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MUT	Mutation
n. u.	nicht untersucht
Na	Natrium
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
NI	nicht informativ
nm	Nanometer
p. a.	per analysis

PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomolar
rez.	rezidivierend
sec	Sekunden
sek.	sekundär
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Unit
UV-Licht	Ultraviolette Licht
V	Volt
V.	Vena
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
W	Watt
w	weiblich

G. Literatur

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

Clouston WM, Cannell GC, Fryar BG, Searle JW, Martin NI, Mortimer RH 1989 Virilizing adrenal adenoma in an adult with the Beckwith-Wiedemann syndrome: paradoxical response to dexamethasone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 31:467-73

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

Guru SC, Olufemi SE, Manickam P, Cummings C, Gieser LM, Pike BL, Bittner ML, Jiang Y, Chinault AC, Nowak NJ, Brzozowska A, Crabtree JS, et al. 1997 A 2.8-Mb clone contig of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) region at 11q13. *Genomics* 42:436-45

Guru SC, Agarwal SK, Manickam P, Olufemi SE, Crabtree SE, Weisemann JM, Kester MB, Kim YS, Wang Y, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Spiegel AM, et al. 1997 A transcript map for the 2.8-Mb region containing the multiple endocrine neoplasia type 1 locus (letter). *Genome Res* 7:725-35

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* 95:1630-4

Guru SC, Manickam P, Crabtree JS, Olufemi SE, Agarwal SK, Debelenko LV 1998 Identification and Characterization of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. *J Intern Med* 243:433-9

Haber D, Harlow E. Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age (news). *Nat Genet* 1997; 16: 320-2

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

Houdelette P, Chagnon A, Dumotier J, Marthan E 1989 [Malignant adrenocortical tumor as a part of Wermer's syndrome. Apropos of a case]. *J Chir (Paris)* 126:385-7

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

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

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

Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H 1997 Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* 150:1-13

Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-3

Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 135-40

Lemmens I, Van de Ven WJ, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V, Buisson N, De Witte K, Salandre J, Kenoir G, Pugeat M, Calender A, et al. 1997 Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Hum Mol Genet* 6: 1177-83

Lemmens I, Merregaert J, Van de Ven WJ, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V, Buisson N, De Witte K, Salandre J, Lenoir G, Calender A, et al. 1997 Construction of a 1.2-Mb sequence-ready contig of chromosome 11q13 encompassing the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene.. The European Consortium on MEN1. *Genomics* 44:94-100

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

Lipsett M, Hertz R, Ross G 1963 Clinical and pathophysiologic aspects of adrenocortical adenoma. *Am J Med* 35:374-9

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

Prezant TR, Levine J, Melmed S 1998 Molecular characterization of the men1 tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1388-91

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

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

Tanaka C, Kimura T, Yang P, Moritani M, Yamaoka T, Yamada S, Sano T, Yoshimoto K, Itakura M 1998 Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11 and infrequent inactivation of the MEN1 gene in sporadic pituitary adenomas [see comments]. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2631-4 Haber D, Harlow E. Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age (news). *Nat Genet* 1997; 16: 320-2

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

H. Tabellarischer Lebenslauf

Name	Martina Mengel
Wohnort	Noldenöde 21, 42389 Wuppertal Tel. 0202/604278
Geburtsdatum	02.04.1972
Geburtsort	Wuppertal
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schulischer Werdegang	1978 - 1982 Fritz-Harkort-Schule, Wuppertal 1982 - 1991 Märkisches-Gymnasium, Schwelm
Schulabschluß	Abitur
Beruf	Arzthelferin; Ausbildung vom 01.08.91 bis zum 31.01.94; Arbeitsverhältnis bis zum 31.03.94 bei Dr. med. K. Magiera und Dr. med. M. Seifert, Ärzte für Allgemein- medizin, Sachsenstr. 21, 42389 Wuppertal
Studium	Humanmedizin an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf vom 01.04.1994 bis zum 31.05.2001 mit der Gesamtnote „gut“
Studiumsbezogene Aktivitäten	1995 bis 1998 studentische Nachtwachen in der Chirurgischen Klinik der Universität Düsseldorf Juni 1998 bis Oktober 1999 studentische Hilfskraft in der Kinderklinik Düsseldorf, Prof. Wahn Seit Juli 1998 bis Dezember 1999 außerdem studentische Hilfskraft im Institut für Neuropathologie, ehemals Prof. Wechsler
Praktisches Jahr	Von April 2000 bis Mai 2001 im Klinikum Krefeld mit dem Wahlfach Urologie
Ärztin im Praktikum	Seit 1. Juli 2001 in der Klinikum Wuppertal GmbH, Klinikum Barmen, Klinik für Viszeral- und Gefäßchirurgie

I. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. H. - D. Röher für die Überlassung des Themas sowie Herrn Dr. K. - M. Schulte für die ausgezeichnete Betreuung.

Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. S. Scheuring, Dr. A. Beyer und Dr. K. Köhrer vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf, deren Rat, Hilfe und Mitarbeit bei der Sequenzierung und der Kapillarelektrophorese wertvoll war.

Für die technische Unterstützung möchte ich Frau K. Alemazkour und Frau B. Bosilj danken, welche sehr zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Des weiteren danke ich meinen Eltern Marianne und Bernd Mengel, die mir dieses Studium ermöglicht und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und gefördert haben.

***Untersuchung des Heterozygotie-Status auf Chromosom 11q13 und
Sequenzanalyse des Multiple Endokrine Neoplasie Typ I Gens in
Nebennierenkarzinomen***

aus der Klinik für Allgemein Chirurgie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. – D. Röher)

Das Nebennierenrindenzarzinom ist eine seltene sporadische Erkrankung mit einer Inzidenz von nur etwa 1,79 Fällen pro 1 Million Einwohner und Jahr. Die genetischen Mechanismen, die zur Entstehung eines Nebennierenkarzinoms führen, werden nur teilweise verstanden. Auffällig ist jedoch, daß bis zu 40 % der Patienten mit dem Syndrom der *Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ I* (MEN-I-Syndrom) Veränderungen der Nebenniere aufweisen, darunter auch Nebennierenkarzinome.

Daß auch für die Genese adrenokortikaler Tumoren die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine Rolle spielen dürfte, ergibt sich aus der Häufigkeit vorbeschriebener Heterozygotieverluste. Dabei weist etwa der Hälfte der Patienten mit Nebennierenkarzinom einen Heterozygotieverlust in Position 11q13 auf. Der Verdacht eines Zusammenhangs zwischen Nebennierenkarzinomen und dem MEN-I-Syndrom wird durch eine Untersuchung von 6 Patienten mit offenkundigem MEN-I-Syndrom erhärtet, wo nur der Patient einen Heterozygotieverlust in der Bande 11q13 aufwies, dessen Tumor ein adrenokortikales Karzinom war.

Das für das MEN-Syndrom Typ I (Wermer-Syndrom) verantwortliche Gen konnte 1997 auf Chromosom 11q13 lokalisiert werden. Das 610 Aminosäuren große Proteinprodukt trägt den Namen Menin; seine Funktion ist noch unbekannt. Nachdem sich vor diesem Hintergrund der Verdacht ergibt, daß Mutationen des MEN-I-Gens mit der Inaktivierung eines hypothetischen Tumorsuppressorgens in Verbindung zu bringen sind, soll diese Arbeit Aufschluß darüber geben, in wie weit Heterozygotieverluste, Mutationen und Nebennierenkarzinome einander bedingen.

Untersucht wurde Blut und Tumorgewebematerial von insgesamt 17 Patienten, 3 davon mit bekanntem MEN-I-Syndrom. Ein Heterozygotieverlust konnte bei 5 von 5 untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Bei der Sequenzierung der gesamten codierenden Sequenz der 9 Exone des MEN-Gens und ihrer flankierenden Exon-Intron-Übergangsbereiche einschließlich der Spleiß-Junktionen von 14 Patienten mit sporadischen Nebennierenkarzinomen fand sich nur eine einzige heterozygote Mutation mit Aminosäureaustausch in Exon 3. Lediglich einer der Patienten mit manifestem MEN-I-Syndrom zeigte bei der Sequenzierung eine heterozygote Stopp-Codon-Mutation in Exon 2.

In summa bestätigen die durchgeführten Untersuchungen häufige Heterozygotieverlust auf Chromosom 11q13 bei Nebennierenkarzinomen. Allerdings betreffen diese in mindestens 40 % der Fälle nicht das Menin-Gen, was durch das Vorliegen intragenischer Polymorphismen ausgeschlossen wurde. Bei einer sehr niedrigen Mutationsfrequenz von 7 % (1/14), wobei diese auch nur in heterozygoter Form vorlag, sind Menin-Gendefekte wohl kein führendes Ereignis in der Tumorigenese des adrenokortikalen Karzinoms. Die Entstehung desselben ist, auch im Rahmen multiglandulärer Erkrankungen, wohl allenfalls indirekt auf MEN-I-Genmutationen zurückzuführen. Die nachgewiesenen Mutationen in einem sporadischen Nebennierenkarzinom und einem Nebennierenkarzinom bei MEN-I-Syndrom sind die ersten Beobachtungen dieser Art.



