

Molekulare Routinediagnostik in der Endokrinologie

Molecular Routine Diagnostics in Endocrinology

W. Höppner

Zusammenfassung: Endokrinologische Erkrankungen sind oft recht komplexer Natur. Die Aktivitätsminderung sowie die Zunahme der Aktivität eines Hormons oder seiner Signalübertragung betrifft in den meisten Fällen mehr als ein Zielorgan und hat wegen der mannigfaltigen Verknüpfungen von Signalwegen untereinander (Crosstalk) Auswirkungen, die im Detail nicht vorherzusehen sind. Ein Rückschluß von der Art der Mutation auf die genauen klinischen Auswirkungen (Genotyp-Phänotyp-Korrelation) ist daher schwierig. Genetische Defekte in Genen, die für Hormone, Hormonrezeptoren oder Komponenten der hormonellen Signaltransduktionswege kodieren, führen in aller Regel zu komplexen Krankheitsbildern. Diese sind charakterisiert durch den Befall mehrerer Organe und unterschiedlich starker Ausprägung der Symptome. Komplexe genetische Störungen wie z. B. numerische Chromosomenaberrationen (z. B. Trisomien), Gentranslokationen oder Mutationen in wichtigen Schlüsselgenen (auch wenn deren Produkte nicht direkt in hormonellen Signalsystemen involviert sind) führen häufig zu klinischen Symptomen, bei denen u. a. Störungen der Geschlechtsdifferenzierung oder Stoffwechselstörungen wie beim Diabetes mellitus auftreten.

Soweit molekulare Ursachen von Endokrinopathien aufgeklärt sind, ist eine direkte molekulargenetische Diagnostik möglich. Sie ist insbesondere dann indiziert, wenn die molekulare Diagnostik dazu führt, daß die Erkrankungen differentialdiagnostisch gegeneinander abgegrenzt werden können oder wenn wirkungsvolle präventive Maßnahmen zur Verfügung stehen. Die im vorliegenden Artikel dargestellten endokrinologischen Erkrankungen demonstrieren den Zugewinn an Sensitivität und Spezifität der Diagnostik und verdeutlichen den Nutzen für den Patienten und mittelbar auch für die Kostenträger. Bei der Multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 ist eine eindeutige Identifizierung derjenigen Familienmitglieder möglich, die genetisch gefährdet sind. Als präventive Maßnahme zur Verhinderung medullärer Schilddrüsenkarzinome wird die prophylaktische Thyreoidektomie empfohlen. Bei der

molekularen Diagnostik des adrenogenitalen Syndroms (21-Hydroxylase-Mangel) hilft die molekulare Diagnostik in der gynäkologischen Endokrinologie Verdachtsfälle eindeutig zu bestätigen, bei denen die Hormonanalytik uneindeutige Ergebnisse liefert. Der Nutzen des Nachweises von Mutationen im 21-Hydroxylase-Gen liegt aber vor allem in der Pränataldiagnostik bei Paaren mit Kinderwunsch, bei denen die genetische Veranlagung für das AGS bekannt ist. Die pränatale Dexamethasontherapie zur Vermeidung der Virilisierung des Genitals weiblicher Föten wird heute nicht mehr ohne Analyse des Gendefektes aus Chorzotten durchgeführt.

Schlüsselwörter: 21-Hydroxylase-Mangel; Onkogen; Suprenorgan; MEN; RET.

Summary: Endocrine diseases are often of very complex nature. Reduced or enhanced activities of hormones, hormone receptors or signal transduction pathways usually affect more than one organ. Due to the crosstalk of different signalling pathways, altered activities may lead to effects which are difficult to predict. It is nearly impossible to draw conclusions from one particular mutation as to the clinical outcome (genotype phenotype correlation).

Genetic defects in genes encoding hormones, hormone receptors or polypeptides of the signalling pathways usually cause complex disease manifestations characterized by the involvement of several tissues and variable expression. Genetic aberrations, like chromosome aneuploidy, gene translocations or mutations in key regulatory proteins (even if not directly affecting genes of the endocrine system) often lead to clinical symptoms, including central endocrine functions like sexual differentiation or metabolic disturbances, like diabetes mellitus. If the underlying molecular defects of endocrinopathies are known, direct molecular diagnosis can be performed. This is particularly useful if it helps to solve difficult differential diagnosis problems or if there exist effective preventive therapeutic options.

The present paper presents examples for endocrine diseases in which molecular testing significantly increases the specificity and sensitivity of diagnostics and demonstrates the benefits for the patients and the health care system. In multiple endocrine neoplasia type 2, an unambiguous identification of gene carriers in affected families can be achieved by genetic testing.

Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg, Deutschland
Korrespondenzadresse: Wolfgang Höppner, Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg, Grandweg 64, 22529 Hamburg, Deutschland.
E-mail: Wolfgang.Hoepfner@web.de

As a preventive measure to avoid medullary thyroid carcinoma, prophylactic thyroidectomy is recommended for individuals carrying the disease causing mutation. In adrenogenital syndrome (AGS), sequence analysis of the steroid 21-hydroxylase gene has become an important tool to confirm or exclude suspected late-onset forms of the disease, where hormone measurements are not informative. The major benefit, however, lies in identifying heterozygous carriers and providing a reliable prenatal test for couples carrying a defect in the 21-hydroxylase gene. Today, prenatal treatment with dexamethasone, which prevents the virilisation in female foetuses, should always be based on results from molecular diagnosis performed from chorionic villus samples.

Keywords: 21-hydroxylase deficiency; onkogene; suprenorgan; MEN; RET.

Molekularbiologische Diagnostik des Steroid 21-Hydroxylase-Mangels

Klinik des Steroid 21-Hydroxylase-Mangels

Mit dem Begriff congenitale adrenale Hyperplasie wird ein Syndrom (adrenogenitales Syndrom, AGS) bezeichnet, das auf vererbten Defekten in Enzymen der Kortisolbiosynthese beruht [1]. Jedes der an der Biosynthese beteiligte Enzym kann betroffen sein. In jedem Fall führt die beeinträchtigte Kortisolsynthese zu einem Ausbleiben der Feedback Regulation auf die ACTH-Freisetzung in der Hypophyse und damit zu einer Erhöhung des ACTH und einer ständigen Stimulation der Nebennierenrinde. Die auftretenden Symptome erklären sich durch die verminderte Synthese von Kortisol und die vermehrte Sekretion der Steroidhormonvorstufen. Am häufigsten ist die Steroid-21-Hydroxylase von genetischen Defekten betroffen [2, 3].

Je nach der Schwere des genetischen Defektes manifestiert sich die Erkrankung in einer allgemeinen Virilisierung, einem Salzverlustsyndrom oder in Mißbildungen der Sexualorgane (Pseudohermaphroditismus) [4]. Der Androgenüberschuß resultiert aus der ACTH-Erhöhung, da die Androgensynthese durch den enzymatischen Defekt nicht beeinträchtigt ist. Bereits *in utero* kann eine Virilisierung der Sexualorgane des weiblichen Fötus erfolgen von Vergrößerung der Klitoris und Verschmelzung der Labien bis hin zu einem phänotypisch männlichen Genital. Durch rechtzeitige Gabe eines plazentagängigen Cortisolderivats (Dexamethason), das die ACTH-Produktion des Fötus und der Mutter blockiert, kann die Erkrankung schon während der Schwangerschaft behandelt werden. Nach der Geburt kann zusätzlich zu den Virilisierungsscheinungen vorübergehend ein Salzverlustsyndrom beobachtet werden, das auf den ebenfalls vorhandenen relativen Mangel an Aldosteron zurückzuführen ist.

Die Erkrankung kommt auch als Late-Onset-Form oder nicht klassische Form vor. Die Verlaufsformen sind deutlich milder. Symptome, die auf einen Andro-

genexzeß hindeuten, zeigen sich klinisch erst im Kindesalter oder in der Pubertät. Knaben und Männer sind meist asymptomatisch. Beobachtet werden prämatüre Pubarche, Akne, Seborrhoe, Hirsutismus, Großwuchs, akzeleriertes Knochenalter und Klitorishypertrophie. Trotz des bestehenden biochemischen Defektes können die klinischen Symptome bisweilen vollständig verschwinden.

Molekularbiologie des Steroid 21-Hydroxylase-Mangels

Der Steroid 21-Hydroxylase-Mangel wird autosomal rezessiv vererbt und kommt in der westlichen weißen Bevölkerung etwa einmal auf 5.000-15.000 Geburten vor. Das Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert und seine Struktur vollständig aufgeklärt (Abbildung 1A), wodurch eine direkte Genanalyse möglich ist.

Allerdings ist die molekularbiologische Diagnostik erheblich erschwert durch die Existenz eines Pseudogens (nicht funktionelle 2. Kopie des Gens, die durch zahlreiche Mutationen inaktiv geworden ist) in unmittelbarer Nachbarschaft des aktiven Gens und durch die Tatsache, daß zahlreiche verschiedene Arten von Gendefekten (Deletionen, Genkonversionen mit dem Pseudogen, Mutationen in verschiedenen Exons) vorkommen können.

Die verschiedenen Mutationen führen in homozygoter Form je nach ihrer Auswirkung zur schweren Form des AGS mit Salzverlust (SW: salt wasting), nur virilisierenden Formen (SV: simple virilizing) oder der late onset Form (NC: non-classical AGS) (Abbildung 1B).

Die Late-Onset-Form des AGS beruht auf dem Vorliegen einer schwerwiegenden Mutation in einem Allel des Steroid 21-Hydroxylase-Gens und eines gesunden Allels (Heterozygoter Genotyp). Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß eine milde Mutation auf dem zweiten Allel vorkommt (komplexe Heterozygotie). Auch das gleichzeitige heterozygote Auftreten von Defekten in zwei verschiedenen Enzymen der Steroidbiosynthese wird als Ursache für Late-Onset-Formen des AGS diskutiert. Bei der kryptischen Form treten milde Mutationen homozygot auf.

Molekularbiologische Diagnostik des Steroid 21-Hydroxylase-Mangels

Die verschiedenen Arten von möglichen Mutationen und die Anwesenheit des Pseudogens (CYP21A) mit hoher Sequenzhomologie zum aktiven Gen (CYP21B) machen die molekulare Diagnostik des 21-Hydroxylase-Mangels sehr kompliziert.

Um komplette oder partielle Deletionen oder Duplikationen zu erfassen, ist eine quantitative PCR notwendig. Dabei müssen die verwendeten Oligonukleotid-Primer sowohl im Pseudo- als auch im aktiven Gen binden. Die Amplifikate müssen aber unterscheidbar sein, um ihre Herkunft zuordnen zu können.

Zum Nachweis von Punktmutationen oder kleineren Genkonversionen müssen die Primer spezifisch im aktiven Gen binden. Aus den CYP21B-Gen spezifischen

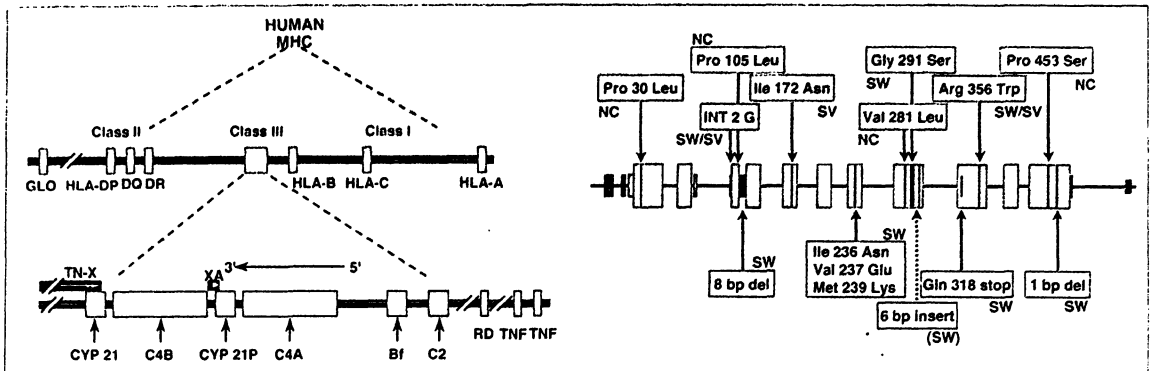


Abbildung 1 Das Gen für die Steroid-21-Hydroxylase (Cyp 21B) ist auf dem Chromosom 6 im Bereich des MHC-Locus lokalisiert. Zusammen mit dem benachbarten Gen für den Komplementfaktor C4 (C4B) hat sich im Laufe der Entwicklungsgeschichte eine Region von ca. 30.000 Basenpaaren dupliziert, so daß sich sowohl zu dem Cyp21B als auch zu dem C4B inaktive Pseudogene gebildet haben (Cyp 21A und C4A) (Abb. 1A). Bei der Meiose kann es zur fehlerhaften Paarung der Schwesterchromosomen kommen, so daß bei der homologen Rekombination Abschnitte zwischen Pseudogen und aktivem Gen ausgetauscht werden können. Die Pseudogene unterscheiden sich von den aktiven Genen lediglich in wenigen Basenpaaren. Beim 21-Hydroxylase-Mangel liegen in ca. 60% der Fälle im aktiven Gen Mutationen vor, die durch Genkonversion aus dem Pseudogen stammen (Abb. 1B).

Amplifikaten kann dann die direkte Sequenzierung erfolgen.

Die molekulare Diagnostik ist indiziert, wenn klinisch und/oder biochemisch der Verdacht auf einem 21-Hydroxylase-Mangel besteht. Wegen der relativ hohen Frequenz von heterozygoten Genträgern in unserer Bevölkerung, sollte bei einem nachgewiesenen Defekt im CYP21B-Gen immer auch der Heterozygotenstatus bei der Partnerin oder dem Partner überprüft werden, insbesondere wenn Kinderwunsch besteht. Auch geradlinig Verwandte 1. und 2. Grades sollten nach humangenetischer Beratung dem Test unterzogen werden.

Eine Pränataldiagnostik ist möglich und indiziert, wenn der begründete Verdacht besteht, daß ein weiblicher Fötus homozygoter Träger eines Gendefektes sein könnte. Als therapeutische Maßnahme wäre dann eine termingerechte pränatale Cortisolsubstitutionstherapie mit einem plazentagängigen Derivat durchzuführen (Abbildung 2). Die Late-Onset-Form des AGS beruht auf dem Vorliegen einer schwerwiegenden Mutation in einem Allel des 21-Steroid-Hydroxylase-Gens und eines gesunden Allels (heterozygoter Genotyp) oder einer milden Mutation in dem dem zweiten Allel (Compound-Heterozgotie), während die nicht-klassische Form wohl homozygot oder gemischt heterozygot auf milden Mutationen beruhen. Auch das gleichzeitige heterozygote Auftreten von Defekten in zwei verschiedenen Enzymen der Steroidbiosynthese wird als Ursache für Late-Onset Formen des AGS diskutiert.

Krebsentstehung, Onkogene und Tumorsuppressor-Gene

Die Entstehung von Krebszellen beruht auf der Transformation ursprünglich intakter Zellen. Dabei verän-

dern sich Differenzierungszustand, Wachstumsverhalten und Lokalisation der Zellen. Das Ergebnis sind undifferenzierte Zellen mit einer erhöhten Proliferation. Durch eine Verminderung der intrazellulären Bindungskräfte kann es zur Aussiedlung der Zellen aus dem Gewebeverband und zur Ansiedlung in fremden Geweben kommen. Dort entstehen erhebliche Schädigungen durch die proliferierenden Zellen. Die molekulare Ursache dieser neu erworbenen Eigenschaften ist die Akkumulation von molekulargenetischen Veränderungen in den Genen verschiedener Regulatorproteine, wodurch die Kontrolle der zelltypischen Funktionen verloren geht.

Diese Veränderungen werden bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Genprodukte, deren genetischer Defekt dominant ist, d. h. wenn nur ein Allel betroffen ist zur Tumorentstehung führen, werden als Protoonkogene bezeichnet. Gene, bei denen erst die Funktion beider Allele zum Verlust der Kontrollfunktion führt, werden als Tumorsuppressorgene bezeichnet. Auslöser der molekulargenetischen Veränderungen in diesen wichtigen Kontrollgenen können neben Fehlern bei der Replikation der DNA vor allem Umwelteinflüsse wie ionisierende Strahlen oder mutagene Substanzen sein. Tumorauslösende Viren exprimieren in den infizierten Zellen virale Proteine, die den zellulären Proteinen stark ähneln, aber ihre Funktion so verändert haben, daß sie zugunsten der Integration oder Vermehrung des Virus aktiv sind. Durch Untersuchungen an Retroviren wurden die Onkogene bekannt. Sie integrieren Teile des Wirtsgenoms, u. a. Protoonkogene, in ihr eigenes Genom und ersetzen dort Bereiche der retroviralen Sequenzen. Die Expression der Protoonkogene, die mit der Vermehrung der Viren einhergeht, führt zur Transformation der Zellen.

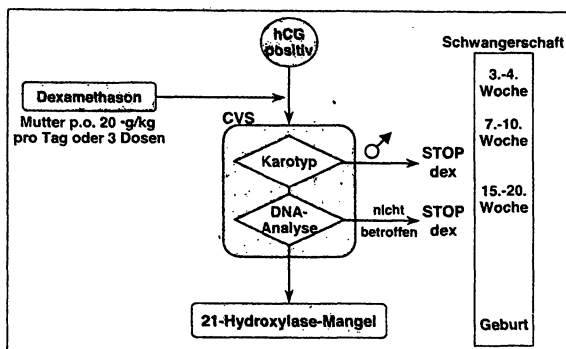


Abbildung 2 Im Zentrum der Verhinderung der pränatalen Virilisierungserscheinungen steht die DNA-Analyse aus Chorionzotten, durch die eine Geschlechtsbestimmung und die Genotyp-Analyse des 21-Hydroxylase Gens möglich ist. Wenn aufgrund des Genotyps der Eltern die Gefahr für ein AGS besteht, wird ab Feststellung der Schwangerschaft Dexamethason als plazentagängiges Glucocorticoid verabreicht. Um die Patientin nicht während der gesamten Schwangerschaft dem Risiko der Nebenwirkungen des Medikaments auszusetzen, sollte sobald feststeht daß es sich um ein männliches Kind oder um ein genetisch nicht gefährdetes Mädchen handelt, die Medikation abgebrochen werden. Liegt ein Risikogenotyp bei einem weiblichen Fötus vor, ist das Dexamethason bis zur Geburt weiter zu geben. Die Virilisierung des weiblichen Genitals wird dadurch sicher verhindert.

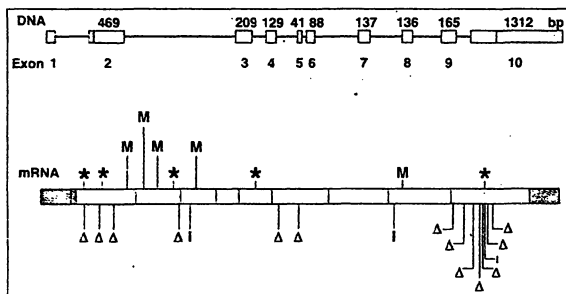


Abbildung 3 Das MEN 1-Gen besteht aus 10 Exons, wobei Exon 2 bis 10 die kodierende Information für das Menin genannte Genprodukt enthält.

Mutationen wurden in allen-kodierenden Exons des Gens gefunden, so daß eine komplette Sequenzierung für die molekulare Diagnostik bei MEN 1-Patienten notwendig ist.

Molekularbiologische Diagnostik der Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1

Klinik der Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN 1)

Die multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN 1) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch isolierte oder kombinierte Neoplasien der Nebenschilddrüse, der neuroendokrinen Zellen von Pankreas und Duodenum sowie der Hypophyse charakterisiert wird. Häufig treten auch Karzinome und eine hormonell inaktive Hyperplasie der Nebennierenrinde auf.

Die Klinik der Erkrankung wird einerseits bestimmt durch Tumorbildung der betroffenen Organe, andererseits durch Hypersekretion oder Ausfall der entsprechenden Hormone. Hyperkalzämien als Folge der übermäßigen Parathormonsekretion ist eine der häufigsten biochemischen Anomalien bei der MEN 1. Die Hypersekretion von pankreatischen Peptidhormonen wie z. B. Gastrin oder Insulin führt zu definierten Syndromen (Zollinger-Ellison mit Gastrin-Hypersekretion; Hypoglykämie mit Insulin-Hypersekretion). Die Hypophysenüberfunktion manifestiert sich am häufigsten als Hyperprolaktinämie mit spezifischen klinischen Symptomen. Seltener kommen Agromegalie (Wachstumshormon-Hypersekretion), Hyperthyreose (TSH-Hypersekretion) oder Cushing-Syndrom (ACTH-Hypersekretion) vor.

Die Inzidenz der MEN 1 wird mit 1:65000 bis 1:100.000 geschätzt. Es gibt keine Präferenz zwischen den Geschlechtern ethnischen Gruppen oder geographischen Regionen.

Molekularbiologie der MEN 1

Der prädisponierende genetische Defekt, der für die Erkrankung verantwortlich ist, wurde 1988 auf dem langen Arm des Chromosom 11 (11q13) lokalisiert und das identifizierte Gen als Menin-Gen bezeichnet. Dieses hat eine Größe von 9181 Basenpaaren und enthält 10 Exons (Abbildung 3). Die mRNA, die von dem Gen gebildet wird, besteht aus 2772 Basen und kodiert ein Protein mit 619 Aminosäuren.

Das Gen weist keine Homologien zu bisher bekannten Sequenzen auf. Das von ihm kodierte Protein konnte noch nicht vollständig charakterisiert werden. Bekannt ist, daß es sich um ein Zellkernprotein handelt und dieses eine Tumor-Suppressor-Funktion besitzt. Vermutlich spielt es eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und ein Ausfall dieser Funktion führt zur unkontrollierten Proliferation der betroffenen Zellen. Das Menin-Gen gehört somit zu den Tumorsuppressorgen. Dafür spricht, daß in MEN 1-assoziierten Tumoren häufig zusätzlich zur vererbten Keimbahnmutation im Bereich des MEN 1-Locus größere somatische Deletionen (loss of heterozygosity; LOH) vorhanden sind. Diese Deletionen betreffen MEN 1-Loci des Chromosom 11, welche nicht vom erkrankten Elternteil stammen. Die Zellen, in denen ein solcher LOH vorkommt, verfügen dann nur noch über die defekte Kopie des MEN 1-Gens, was einen kompletten Funktionsverlust zur Folge hat [5, 6].

Molekularbiologische Diagnostik bei MEN 1

Bei Verdacht auf eine MEN 1 kann man mit Hilfe von biochemischen Untersuchungen die Diagnose mehrere Jahre vor der ersten klinischen Manifestation stellen. Das z.T. umfangreiche biochemische Screening hat erheblich an Bedeutung verloren, da durch den Nachweis der Mutationen im Menin-Gen die Genträgerschaft früh zu ermitteln ist. Nicht-Genträger können aus der weiteren klinischen Überwachung entlassen werden, während bei den genetisch betroffenen Familien

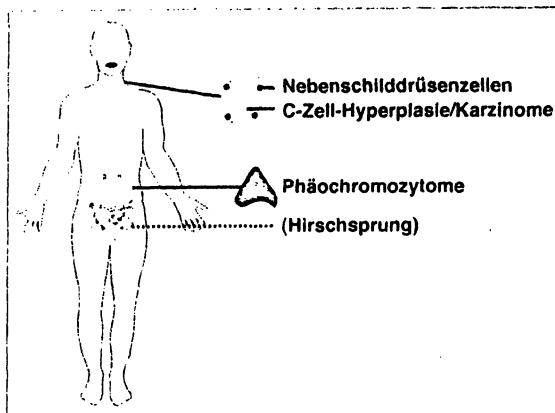


Abbildung 4 Bei der Multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2a treten neuroendokrine Tumore der C-Zellen der Schilddrüse (> 85%), Zellen des Nebennierenmarks (ca. 40 %) und der Nebenschilddrüse (ca. 15 %) auf. Die bösartigen C-Zell-Karzinome stellen die lebensbedrohende Komponente der Erkrankung dar. In seltenen Fällen tritt eine Mißbildung des Darms auf, die als Hirschsprung-Erkrankung bezeichnet wird und auf die Fehlbildung von Ganglien bei der Innervierung des Darms zurückzuführen ist.

lienmitgliedern eine intensive biochemisch/klinische Überwachung erfolgen muß [7].

Für MEN 1-Familien wurden in der Literatur bereits ca. 250 verschiedene heterozygote Mutationen in den Exons 2-10 des Gens beschrieben, die den kodierenden Abschnitt des Gens darstellen. Dabei sind missense-Mutationen (Aminosäureaustausch), frameshift-Mutationen (Verschiebung des Leserasters), nonsense-Mutationen (Stopcodons, die zum Abbruch der Proteinsynthese führen, Insertionen und Deletionen vertreten. Aber auch Übergänge zwischen den Introns und Exons sind betroffen, bei denen Mutationen zur fehlerhaften Synthese der mRNA führen.

Der Nachweis der Mutationen im Menin-Gen erfolgt aus genomischer DNA, die aus Leukozyten gewonnen werden kann. Die Exons, sowie die flankierenden Sequenzen der Introns werden durch die Polymerase-Kettenreaktion selektiv amplifiziert, durch direkte Sequenzierung die Basensequenz ermittelt und mit der publizierten Sequenz verglichen. Da die Mutationen in allen Bereichen der kodierenden Region des Gens auftreten können, ist die komplette Sequenzierung notwendig. In der Regel wird in jeder MEN 1-Familie eine unterschiedliche Mutation nachgewiesen. Sogenannte Hot-Spots für Mutationen, wie sie z. B. im RET-Protoonkogen bei MEN 2-Patienten vorliegen, gibt es nicht. Der Nachweis einer Mutation bei einem Index-Patienten einer MEN 1-Familie ermöglicht eine effiziente Untersuchung der übrigen Familienmitglieder, da diese nur noch auf das Vorliegen dieser Mutation überprüft werden müssen.

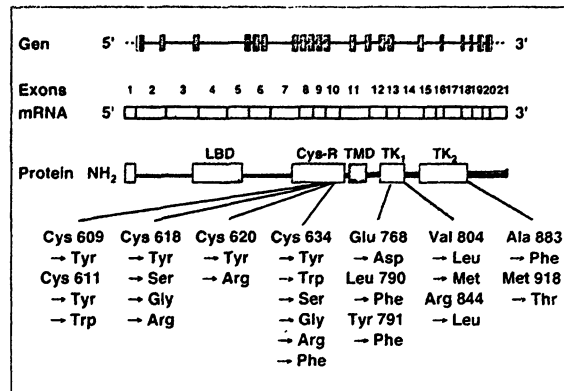


Abbildung 5 Für die MEN 2-Erkrankung sind aktivierende Mutationen im RET-Protoonkogen verantwortlich. Das Gen besteht aus 21 Exons, aus denen durch alternatives Spleißen drei verschiedene mRNAs gebildet werden können. Das Genprodukt ist ein Membranprotein, das als Rezeptor für neurotrophe Wachstumsfaktoren fungiert. Der Rezeptor besteht in seinem extrazellulären Teil aus der Ligandenbindungsdomäne und einem Cystein-reichen Abschnitt. Mit der Transmembrandomäne (TMD) ist er in der Zellmembran verankert. Intrazellulär findet man die für die Signübertragung wichtige Tyrosinkinase-Domäne.

Molekularbiologische Diagnostik des Ret-Proto-Onkogens bei Patienten mit Multipler Endokriner Neoplasie Typ 2

Klinik der Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN 2)

25 % der medullären Schilddrüsenkarzinome treten familiär gehäuft auf. Diese hereditäre Form des medullären Schilddrüsenkarzinoms findet sich häufig in Kombination mit anderen neuroendokrinen Tumoren und neuroektodermalen Mißbildungen [8]. Charakteristisch für die MEN 2A ist die Kombination von medullären Schilddrüsenkarzinomen (in nahezu 100 % aller Fälle), Phäochromozytomen (ca. 50 %) und primären Hyperparathyreoidismus (ca. 20 %) (Abbildung 4). Eine Subform der MEN 2 ist das Familiäre Medulläre Schilddrüsenkarzinom (FMTc), bei dem weder Phäochromozytome noch primärer Hyperparathyreoidismus auftreten. Die Variante MEN 2B zeigt zusätzlich neuroektodermale Mißbildungen. Das C-Zellkarzinom dieses MEN 2-Subtypes stellt die aggressivste Form mit schlechter Prognose dar. Es entwickelt sich oft schon in früher Kindheit.

Die MEN 2A wird autosomal dominant vererbt. Träger entwickeln mit hoher Wahrscheinlichkeit (70 % bis zum 60. Lebensjahr) ein klinisch manifestes medulläres Schilddrüsenkarzinom. Die Erkrankung bricht in den meisten Fällen zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr aus, kann aber in Einzelfällen bereits im frühen Kindesalter. Für die erkrankten Patienten ist

Tabelle 1 Häufigkeitsverteilung der wichtigsten Mutationen im Ret-Protoonkogen bei Patienten mit multipler endokriner Neoplasie Typ 2

Exon	Codon	Aminosäuren-austausch	Phänotyp	Häufigkeit
10	609	Cys → x*	MEN 2A, FMTC	609 - 620 insgesamt 23 %
	610	Cys → x	MEN 2A, FMTC	
	618	Cys → x	MEN 2A, FMTC	
	620	Cys → x	MEN 2A, FMTC	
11	634	Cys → x	MEN 2A	66 %
13	768	Gln → Asp	FMTC	< 1 % 790 und 791 insgesamt 8 % < %
	790	Leu → Phe	MEN 2A, FMTC	
	791	Tyr → Phe	MEN 2A, FMTC	
	804	Val → Leu Val → Met	FMTC	
14	844	Arg → Leu	FMTC	< 1 %
15	883	Ala → Phe	MEN 2B	5 %
16	918	Met → Thr	MEN 2B	95 %

* „x“ steht für die Umwandlung des Cysteins in eine beliebige andere Aminosäure

vor allem die Metastasierung der medullären Schilddrüsenkarzinomzellen lebensbedrohend.

Molekularbiologie der MEN 2

Das RET-Protoonkogen: Das RET-Protoonkogen ist auf Chromosom 10q11.2 lokalisiert und enthält 21 Exons (Abbildung 5).

Es codiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor, der nach Bindung eines Liganden eine intrazelluläre Signalkette auslöst. Für das RET-Gen sind einige Mutationen beschrieben, die mit der Entwicklung der MEN 2 assoziiert sind. Alle drei Subtypen der MEN 2 entstehen durch aktivierende Keimbahnmutationen im RET-Protoonkogen (Tabelle 1) [9]. Die klassischen MEN 2A-auslösenden Mutationen werden in einem von 5 Cysteinresten in der extrazellulären, cysteinreichen Domäne des Rezeptors nachgewiesen. Die Um-

wandlung des Cystein-Codons 634 (Exon 11) in eine beliebige andere Aminosäure führt in aller Regel zum Vollbild der MEN 2A. Mutationen in den Cystein-Codons 609, 611, 618 oder 620 (Exon 10) lassen eher den FMTC Phänotyp erwarten. Mutationen, die kein Cystein-Codon betreffen, werden meist in im intrazellulären Teil des *ret* Proteins gefunden und sind eher mit dem FMTC Phänotyp verknüpft. Nicht-Cystein-Mutationen betreffen am häufigsten die Codons 790 und 791 (Exon 13) [10]. Die MEN 2B Erkrankung ist in 95 % der Fälle auf die Mutation Methionin nach Threonin in Codon 918 zurückzuführen, 5 % der Fälle weisen eine Mutation in Codon 883 auf.

Molekularbiologische Diagnostik bei MEN 2

Die molekulare Diagnostik ist für die Versorgung der MEN II-Familien bereits heute ein unverzichtbares Kriterium zum therapeutischen Vorgehen [11, 12]. Es hat sich aber auch gezeigt, daß Patienten mit Tumoren, wie sie bei MEN II vorkommen (insbesondere medulläre Schilddrüsenkarzinome und Phäochromocytome), jedoch ohne offensichtliche familiäre Häufung, auch in die molekulare Diagnostik einzubeziehen sind. In einigen Fällen ist die Familienanamnese nicht ausreichend und es handelt sich tatsächlich um eine hereditäre Form. Die Untersuchung von anscheinend sporadischen Patienten mit neuroendokrinen Tumoren, die mit der MEN 2-Erkrankungen assoziiert sind, hat ergeben, daß in über 10 % der Fälle eine Keimbahnmutation vorliegt und diese somit als familiär einzustufen sind. Dieses ermöglicht wiederum die Untersuchung von potentiell betroffenen Familienangehörigen. Außerdem ist eine signifikante Neumutationsrate beobachtet worden (bei MEN 2B bis zu 40 %).

Für die möglichst frühzeitige Erkennung des Ausbruchs der Krankheit steht ein biochemisches Screeningverfahren zur Verfügung. Es basiert auf der erhöhten Pentagastrin-induzierten Stimulation von Calcitonin beim Vorliegen von C-Zell-Hyperplasien und/oder medullären Schilddrüsenkarzinomen. Diesem Test müssen sich alle Mitglieder von MEN 2A-Familien in etwa 6- bis 12monatigem Abstand unterziehen.

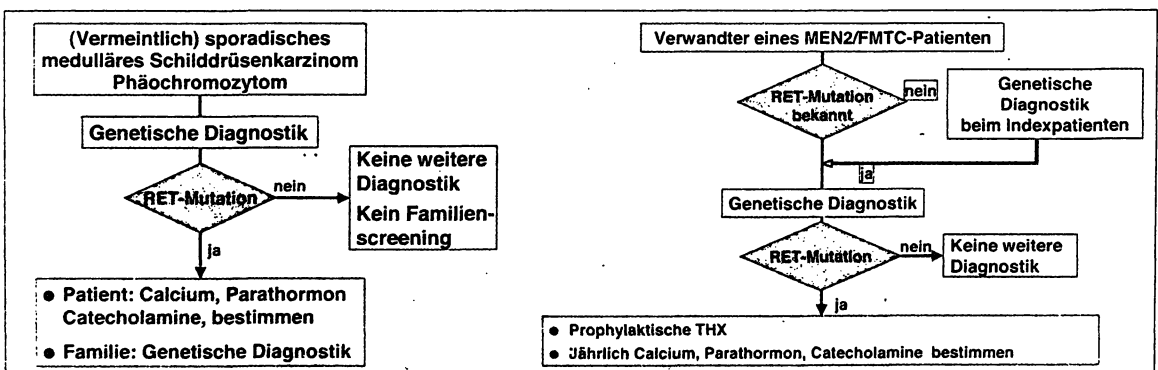


Abbildung 6 Beim diagnostischen Vorgehen spielt sowohl bei sporadischen medullären Schilddrüsen-Tumoren (Abb. 6A) als auch bei familiären Erkrankungen (z. B. MEN2, Abb. 6B) die Molekulargenetik eine zentrale Rolle.

In den letzten Jahren hat der Nachweis von pathogenen Mutationen im RET-Protoonkogen in der Betreuung von betroffenen Familien eine außerordentlich wichtige Bedeutung erlangt (Abbildung 6, A und B) [13, 14]. In jeder betroffenen MEN 2a oder FMTC Familie wird heute zunächst bei einem Indexpatient durch Sequenzierung der Exons 10, 11 und 13 die Mutation ermittelt. Danach wird bei allen Verwandten ein mögliches Vorliegen dieser Mutation überprüft. Wenn die Indikation für die molekulargenetische Untersuchung im Verdacht auf MEN 2B besteht, werden nur die Exons 15 und 16 auf die Mutation in Codon 883 und 918 routinemäßig untersucht.

Die Genträger erkranken mit einer hohen Wahrscheinlichkeit an den Symptomen der MEN 2. Die präsymptomatische Ermittlung des Genträgerstatus ermöglicht als präventive Maßnahme eine prophylaktische Thyreoidektomie, die im Alter von 5–6 Jahren empfohlen wird, bei der MEN 2B im Säuglingsalter. Die Erfahrung zeigt, daß bei praktisch allen prophylaktisch thyreoidektomierten Genträgern bereits morphologische Veränderungen vorliegen.

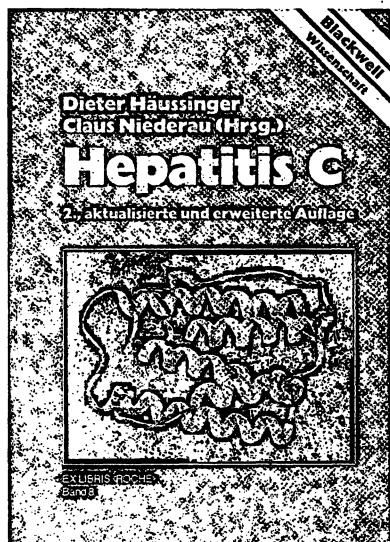
Zum kompletten molekularen Diagnostikprogramm der MEN 2-Familien gehört auch die Möglichkeit, verwandte hereditäre Tumorerkrankungen mit überlappenden Symptomatik (wie z. B. von Hippel-Lindau-Syndrom, Neurofibromatose 1, familiäre Phäochromozytome) analysieren zu können, deren Gene bekannt sind.

Literatur

1. Lee H. CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet* 2001;59(5):293-301.

2. Keegan CE, Killeen AA. An overview of molecular diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Mol Diagn* 2001;3(2):49-54.
3. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000;21(3):245-91.
4. Speiser PW, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes JA, Azziz R. A multicenter study of women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia: relationship between genotype and phenotype. *Mol Genet Metab* 2000;71(3):527-34.
5. Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, Simonds WF, Burns AL, Spiegel AM, Marx SJ. Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(4):173-8.
6. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29(3):541-67.
7. Karges W, Schaaf L, Dralle H, Boehm BO. Concepts for screening and diagnostic follow-up in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108(5):334-40.
8. Stratakis CA. Clinical genetics of multiple endocrine neoplasias, Carney complex and related syndromes. *J Endocrinol Invest* 2001;24(5):370-83.
9. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Visconti R, De Vita G, Lupoli G, Fusco A, Vecchio G. Molecular biology of the MEN2 gene. *J Intern Med* 1998;243(6):505-8.
10. Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grussendorf M, Raue F, Ritter MM, Höppner W. A new hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2 A. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:770-774.
11. Modigliani E, Franc B, Niccoli-Sire P. Diagnosis and treatment of medullary thyroid cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000;14(4):631-49.
12. Komminoth P. Multiple endocrine neoplasia type 1 and 2. 1997 diagnostic guidelines and molecular pathology. *Pathologie* 1997;18(4):286-300.
13. Engelbach M, Kunt T, Kann P, Manfras B, Hankeln T, Forst T, Pflutzner A, Heerdt S, Walgenbach S, Lehnert H, Beyer J. Predictive genetic investigations. Individualization of diagnosis and treatment in families with multiple endocrine neoplasia type II. *Dtsch Med Wochenschr* 2000;125(3):37-44.
14. Goretzki PE, Höppner W, Dotzenrath C, Clark OH, Simon D, Cupisti K, Schulte H, Roher HD. Genetic and biochemical screening for endocrine disease. *World J Surg* 1998;22(12):1202-7.

Jetzt neu erschienen:



Dieter Häussinger / Claus Niederau (Hrsg.)

Hepatitis C

EX LIBRIS <ROCHE>, Band 8

2., aktualisierte und erweiterte Auflage

2001. 397 Seiten mit 81 Abb. und 68 Tab.

17 x 24 cm. Gebunden.

€ 69,95 / DM 136,81 / sFr 119,-

ISBN 3-89412-484-9

Das Hepatitis-C-Virus ist weltweit eine der Hauptursachen der Hepatitis, der Leberzirrhose und des Leberzellkarzinoms. Obwohl der Erreger erst vor 10 Jahren identifiziert werden konnte, sind inzwischen enorme Fortschritte im Verständnis der Molekularbiologie der Hepatitis-C-Viren erzielt sowie neuere Erkenntnisse zu den Übertragungswegen gewonnen worden. Gleiches gilt für neue diagnostische Techniken und Therapieansätze, die in den letzten Jahren grundlegende Veränderungen erfahren haben. Aus diesem Grund ist eine aktualisierte Gesamtdarstellung in Form einer zweiten Auflage dieses Werkes erforderlich geworden. Alle Beiträge wurden in Hinblick auf neueste Erkenntnisse überarbeitet und darüber hinaus drei neue Kapitel zu Begutachtungsfragen und neuen Therapieformen aufgenommen. Die Autoren sind ausnahmslos führende Experten auf dem Gebiet der Hepatologie in Deutschland und garantieren für die Berücksichtigung modernster Entwicklungen und fachlich kompetente Darstellungen sämtlicher Facetten der Thematik.

In allen Buchhandlungen erhältlich!

Ausführliche Informationen zum Gesamtprogramm erhalten Sie auch direkt bei:
 Blackwell Wissenschafts-Verlag / Parey Buchverlag · Kurfürstendamm 57 · 10707 Berlin
 Tel.: 030 / 32 79 06-27/28 · Fax: 030 / 32 79 06-44 · e-mail: vertrieb@blackwis.de
<http://www.blackwell.de> · <http://www.narev.de>