

Aus der Klinik für Kinderchirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Komm. Direktor: PD Dr. med. L. Wünsch

---

**MEN Typ 2a-assoziierte Mutationen  
im *RET*-Protoonkogen bei Patienten  
mit M. Hirschsprung  
- Prävalenz und prädisponierende Faktoren -**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt  
von  
Franziska Schulze  
aus Delmenhorst

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lucas Wessel  
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med Matthias Klinger  
Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2011  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.09.2011

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Multiple endokrine Neoplasie-Syndrome Typ 2.....	1
1.1.1 Klassifikation und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Diagnostik und Therapie .....	3
1.1.3 Genetik .....	4
1.2 M. Hirschsprung.....	5
1.2.1 Definition und Epidemiologie .....	5
1.2.2 Krankheitsbild .....	6
1.2.3 Klassifikation .....	7
1.2.4 Pathogenese.....	8
1.2.5 Diagnostik.....	9
1.2.6 Therapie.....	10
1.2.7 Genetik .....	11
1.3 <i>RET</i> -Protoonkogen .....	14
1.3.1 Aufbau und Funktion.....	14
1.3.2 <i>RET</i> -Mutationen.....	16
1.4 Koinzidenz von M. Hirschsprung und MEN2a.....	19
1.4.1 Epidemiologie und Mutationen.....	19
1.4.2 Empfehlung der Konsensusgruppe.....	20
1.5 Ziel dieser Arbeit .....	20
2 Patienten, Material und Methoden .....	22
2.1 Patientenkollektiv .....	22
2.2 DNA-Proben.....	24
2.2.1 Gewinnung der Proben .....	24
2.2.2 Klinische Daten der Patienten.....	25
2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.3.1 Testkits .....	25
2.3.2 Chemikalien und Lösungsmittel .....	25

2.3.3	Puffer und Lösungen.....	26
2.3.4	Enzyme.....	26
2.3.5	DNA-Oligonukleotide (Primer).....	26
2.3.6	DNA-Proben.....	26
2.3.7	Verbrauchsmaterialien .....	26
2.3.8	Geräte.....	27
2.3.9	Software.....	27
2.4	Verarbeitung der Proben.....	27
2.4.1	DNA-Isolierung aus den Schleimhautabstrichen.....	27
2.4.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	28
2.4.3	Agarosegelelektrophorese .....	29
2.4.4	Aufreinigung der PCR-Amplifikate .....	30
2.4.5	Sequenz-PCR mit BigDye-Fluoreszenz .....	31
2.4.6	Aufreinigung des Sequenz-PCR-Produktes.....	32
2.4.7	Sequenzierung der DNA .....	32
2.5	Systematische Literaturanalyse .....	33
3	Ergebnisse .....	34
3.1	Patientendaten.....	34
3.1.1	Epidemiologische Daten .....	34
3.1.2	Klinische Daten .....	36
3.1.3	Genetische Daten .....	37
3.2	Literaturrecherche .....	37
3.2.1	Studien.....	38
3.2.2	Fallberichte .....	42
3.2.3	Persönliche Korrespondenz.....	44
4	Diskussion.....	45
4.1	Epidemiologische Daten .....	45
4.1.1	Umfang der Stichprobe .....	45
4.1.2	Alter und Geschlecht.....	45
4.1.3	Familienanamnese.....	45
4.2	Klinische Daten .....	46
4.3	Genetische Daten .....	47
4.4	Literaturrecherche .....	48
4.4.1	Umfang .....	48

4.4.2	Studien mit Hirschsprung-Patienten.....	48
4.4.3	Fallberichte .....	51
4.5	Folgerungen für die Screening-Praxis.....	51
5	Zusammenfassung.....	55
6	Literaturverzeichnis .....	57
	Danksagung .....	74
	Lebenslauf.....	75

## Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
Bp	Basenpaar
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRG	diagnosis related group
ECE-1	endothelin-converting enzyme 1
EDN3	Endothelin-3
EDNRB	endothelin receptor B
FMTC	familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFR $\alpha$	GDNF family receptor $\alpha$
HD	M. Hirschsprung (Hirschsprung disease)
KKS	Krankenhauskommunikationssystem
LJ	Lebensjahr
ls	long segment
MEN	multiple endokrine Neoplasie
MTC	medulläres Schilddrüsenkarzinom
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
OP	Operation
PCR	polymerase chain reaction
PHOX 2B	paired-like homeobox
<i>RET</i>	rearranged during transfection
SOX10	sex-determining region Y-related HMG-box gene 10
ss	short segment
TCA	totale Kolonaganглиnose
ZFHx1B	zink finger homeo box 1B

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeit verschiedener Aganglionoselängen.....	8
Abbildung 2: Enterisches Nervensystem (schematisch).....	9
Abbildung 3: Darstellung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese.....	30
Abbildung 4: Alterstruktur des Patientenkollektivs.....	35

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht MEN2.....	2
Tabelle 2	Risikostufen der MEN2 mit Empfehlungen zum therapeutischen Management.....	3
Tabelle 3	Klinische Manifestationsformen des M. Hirschsprung.....	6
Tabelle 4	Einteilung der Aganglionose.....	7
Tabelle 5	Erkrankungsrisiko für Geschwister nach Geschlecht und Ausmaß der Aganglionose.....	11
Tabelle 6	Beteiligte Gene bei M. Hirschsprung.....	12
Tabelle 7	Suszeptibilitätsloci bei M. Hirschsprung.....	13
Tabelle 8	Anzahl der Patienten in den einzelnen Kliniken.....	24
Tabelle 9	Pipetierschema für einen 50 µl-PCR-Ansatz.....	28
Tabelle 10	Programmablauf der PCR.....	29
Tabelle 11	Pipetierschema für einen 10 µL-Sequenz-PCR-Ansatz.....	31
Tabelle 12	Sequenz PCR-Programm.....	32
Tabelle 13	Anzahl der Patienten in den einzelnen Kliniken.....	34
Tabelle 14	Häufigkeit der verschiedenen Aganglionoselängen nach Geschlecht bezogen auf die Studienpopulation.....	36
Tabelle 15	Häufigkeit von RET-Mutationen in verschiedenen Populationen von Patienten mit M. Hirschsprung.....	40
Tabelle 16	Übersicht Fallbeschreibungen.....	42
Tabelle 17	Mutationen bei Assoziationen von M. Hirschsprung und MEN2a.....	43



# 1 Einleitung

Multiple endokrine Neoplasie-Syndrome (MEN) sind autosomal-dominante Syndrome, bei denen es zur Tumorentstehung in Organen des Neuroektoderms kommt (Peczowska und Januszewicz, 2005). Die zugrunde liegende Ursache ist eine aktivierende („gain-of-function“) Mutation im *RET*-Protoonkogen. Mutationen im *RET*-Protoonkogen sind auch für eine große Anzahl von M. Hirschsprung-Erkrankungen (kongenitales Megakolon) ursächlich; hier handelt es sich jedoch um „loss-of-function“-Mutationen. In einigen Familien und sogar bei einzelnen Patienten ist das koinzidente Auftreten beider Erkrankungen bei bestimmten Mutationen im Exon 10 des *RET*-Protoonkogens beschrieben.

## 1.1 Multiple endokrine Neoplasie-Syndrome Typ 2

### 1.1.1 Klassifikation und Epidemiologie

Die multiplen endokrinen Neoplasien werden unterteilt in MEN1 und MEN2, wobei MEN2 wiederum in MEN2a (55%), MEN2b (5-10%) und alleiniges familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom (FMTC, 35-40%) aufgeteilt wird. Die Inzidenz von MEN2a beträgt 1:70.000 (Raue und Frank-Raue, 2007).

Das Leitsymptom der multiplen endokrinen Neoplasie-Syndrome Typ 2 ist das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC), welches im Unterschied zu anderen Manifestationen stets vorhanden ist. Es geht von den parafollikulären, der Neuralleiste entstammenden C-Zellen der Schilddrüse aus und macht 5% aller malignen Schilddrüsentumoren aus. Es tritt in 85% der Fälle sporadisch auf mit einem Altersgipfel in der 6. Lebensdekade, in 15% tritt es familiär im Rahmen der MEN-Syndrome auf; der Altersgipfel ist hier abhängig vom assoziierten Syndrom. Das Geschlechterverhältnis ist ausgewogen.

MEN2a, bestehend aus zum Teil multiplen medullären Schilddrüsenkarzinomen, Phäochromozytomen und Hyperplasie der Nebenschilddrüsen, wurde erstmals von Sipple beschrieben (Sipple-Syndrom) (Sipple, 1961) und wenig später als erblich bedingt erkannt (Steiner, 1968). Obligat kommt es hierbei zum Auftreten von medullären Schilddrüsenkarzinomen im 3. bis 4. Lebensjahrzehnt sowie in

50% zum Auftreten von Phäochromozytomen und in 15-35% zum primären Hyperparathyreoidismus aufgrund einer Nebenschilddrüsenhyperplasie oder eines Adenoms (Brandi et al., 2001).

Bei der MEN Typ 2b, dem so genannten Gorlin-Syndrom, kommt es zusätzlich zu den MEN2a-Tumoren zu Ganglioneuromatosen von Zunge und Intestinum sowie zu einem marfanoiden Habitus, Pubertas praecox, Fußdeformitäten und Hypotonie, während der Hyperparathyreoidismus jedoch fehlt (Fitze und Schackert, 2004). MEN2b ist die aggressivste Form der MEN2-Syndrome. Der Altersgipfel liegt bei 10 bis 20 Jahren; oft kommt es schon im Kindesalter zum Auftreten der Schilddrüsenkarzinome (Peczkowska und Januszewicz, 2005; Raue und Frank-Raue, 2007).

Bei der dritten Untergruppe von MEN2, dem familiären medullären Schilddrüsenkarzinom (FMTC) – auch „Non-MEN“ genannt, tritt das Schilddrüsenkarzinom isoliert auf, meist im 40. bis 50. Lebensjahr. Die Diagnose eines FMTCs kann nur dann gestellt werden, wenn

- a) in einer Familie mindestens 10 Mutationsträger identifiziert wurden, von denen
- b) mehrere älter als 50 Jahre sind, und
- c) umfangreiche, verlässliche Daten zur Familienanamnese vorliegen (Brandi et al., 2001; Eng et al., 1996).

**Tabelle 1 Übersicht MEN2 (modifiziert nach Fitze und Schackert, 2004; Peczkowska und Januszewicz, 2005)**

	<b>Klinische Manifestationen</b>	<b>Manifestationsalter MTC</b>	<b>Exon</b>
MEN2a	MTC: 100% Phäochromozytom: 50% Hyperparathyreoidismus: 15-30%	5. bis 25. LJ	10, 11, 13, 14
MEN2b	MTC: 100% Phäochromozytom: 50% intestinale Ganglioneuromatose: >98%, marfanoider Habitus: >95% Pubertas praecox, Neurome	10. bis 20. LJ	15,16
FMTC	MTC: 100%	40. bis 50. LJ	10, 11, 13, 14

### 1.1.2 Diagnostik und Therapie

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom im Rahmen des MEN2-Syndroms ist im Gegensatz zu der sporadischen Form meist bilateral und multizentrisch. Die Tumoren wachsen langsam und metastasieren zunächst lymphogen und erst im Spätstadium hämatogen. Bei den medullären Tumoren der MEN2-Gruppe kommt es zunächst zur C-Zell-Hyperplasie (Block et al., 1980) und darauffolgend zur Entwicklung monoklonaler Neoplasien. Diagnostisch wegweisend ist neben der Familienanamnese ein erhöhter spontaner oder pentagastrinstimulierter Calcitoninspiegel von mehr als 1.000 pg/ml (Eng et al., 1996). Zur Diagnosesicherung ist eine Feinnadelpunktion notwendig. Therapeutisch erforderlich ist die totale Thyreoidektomie, ggfs. schon prophylaktisch. Seit der Entdeckung des *RET*-Protoonkogens als Ursache der Erkrankung kann ein Screening der Verwandten ersten Grades durchgeführt werden, um das Vorhandensein der Mutation und somit das Risiko für die Erkrankung zu überprüfen. Diese Methode gilt inzwischen als Goldstandard. Routinemäßig sollten die Exons 10 und 11 sowie 13-16 getestet werden und nur bei negativem Ergebnis die übrigen Genabschnitte (Brandi et al., 2001). Machens et al. zeigten 2003 in einer europäischen Multizenterstudie, dass die unterschiedlichen *RET*-Mutationen Auswirkungen auf den Manifestationszeitpunkt haben. Bei den Betroffenen kann das Risiko für das Manifestationsalter des Karzinoms daher grob anhand der vorliegenden Mutation abgeschätzt werden und bildet so die empirische Grundlage für die Indikation zur Thyreoidektomie (Brandi et al., 2001; Machens et al., 2003). Der Zeitpunkt liegt zwischen dem 1. Lebenshalbjahr und dem 10. Lebensjahr (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2 Risikostufen des MEN2 mit Empfehlungen zum therapeutischen Management**

Risikostufe	Kodon (RET-Gen)	Therapeutisches Management
1 (mittleres Risiko)	609, 768, 790, 791, 804, 891	prophylaktische totale Thyreoidektomie, OP-Zeitpunkt unklar (bis 5. oder 10. LJ oder erst nach erhöhtem pentagastrinstimulierten Kalzitoninwert)
2 (hohes Risiko)	611, 618, 620, 634	prophylaktische totale Thyreoidektomie bis zum 5. LJ
3 (höchstes Risiko)	883, 918, 922	prophylaktische totale Thyreoidektomie innerhalb der ersten 6 Monate mit primärer Lymphknotendissektion

Liegt bereits ein manifestes medulläres Schilddrüsenkarzinom vor, ist die frühzeitige und radikale Operation prognoseentscheidend, da die Tumoren weder chemotherapie- noch strahlensensibel sind. Die durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei 50% für alle Stadien.

Nach erfolgter Thyreoidektomie sollten die Patienten regelmäßig auf das Vorhandensein von Phäochromozytomen sowie eines Hyperparathyreoidismus untersucht werden.

Die Phäochromozytome im Rahmen des MEN2-Syndroms sind meistens gutartig und können uni- oder bilateral auftreten. Neben den klinischen Manifestationen wie Blutdruckkrisen und intermittierenden Kopfschmerzen können sie durch die hohe Ausscheidung von Adrenalin im Urin und den hohen Normetanephrin-Plasmaspiegel diagnostiziert und sowohl konservativ als auch operativ therapiert werden (Peczkowska und Januszewicz, 2005).

Der Hyperparathyreoidismus manifestiert sich klinisch an den Nieren, Knochen und im Gastrointestinaltrakt und kann durch einen erhöhten Parathormonspiegel sowie eine Erhöhung des Serumkalziums diagnostiziert werden. Die Operation ist die Therapie der Wahl (Peczkowska und Januszewicz, 2005).

### 1.1.3 Genetik

Analysiert man das Auftreten medullärer Schilddrüsenkarzinome in Familien, ergibt sich ein dominanter Erbgang mit hoher Penetranz. Die ursächliche Mutation liegt dabei im *RET*-Protoonkogen auf Chromosom 10q11.2, in mehr als 95% in den 6 Cysteinresten der Codons 609, 611, 618, 620, 630 und 634 der Exons 10 und 11 (Fitze und Schackert, 2004). Seltener sind Mutationen in den Exons 13, 14, 15 und 16. Dadurch ist ein molekulares Screening Familienangehöriger möglich, was die Prognose der Erkrankung entscheidend verbessert.

## 1.2 M. Hirschsprung

### 1.2.1 Definition und Epidemiologie

M. Hirschsprung, auch Megacolon congenitum oder kongenitale intestinale Aganglionose genannt, ist definiert als primäre Aganglionose des Dickdarms mit Dauerkontraktion des erkrankten Abschnitts. Das Anorektum ist stets betroffen bei variabler Ausdehnung nach proximal bis zum Befall des gesamten Magen-Darm-Traktes. Proximal der Aganglionose bildet sich dabei ein Megakolon aus. Die Erkrankung wurde 1886 von dem Kopenhagener Pädiater Harald Hirschsprung auf dem Berliner Ärztekongress erstmals beschrieben und 1888 publiziert (Hirschsprung, 1888), doch er vermutete das Problem in dem dilatierten Segment. Erst 1948 wurde das enge Segment von Swenson und Bill für das Krankheitsbild verantwortlich gemacht (Swenson und Bill, 1948), während die histologischen Merkmale (das Fehlen der Ganglienzellen) erst ein Jahr später beschrieben und der klinische Bezug hergestellt wurde (Bodian et al, 1949). Die Ursache des Krankheitsbildes liegt in einer Entwicklungsstörung der der Neuralleiste entstammenden Zellen des enterischen Nervensystems. Der M. Hirschsprung gehört somit zu den Neurochristopathien; dies sind Syndrome oder Tumoren, die Zellen der Neuralleiste betreffen (Bolande, 1974).

Die Inzidenz des M. Hirschsprung beträgt 1:5.000 Lebendgeburten (Bodian und Carter, 1963; Passarge, 1967; Spouge und Baird, 1985; Badner et al., 1990), wobei Knaben bis zu viermal häufiger betroffen sind (Bodian und Carter, 1963; Spouge und Baird, 1985). Je ausgedehnter die Aganglionose ist, desto ausgeglichener wird das Geschlechterverhältnis. Für die seltene Aganglionose über das Sigma hinaus wurde ein Geschlechterverhältnis von 1,5-2:1 beschrieben (Bodian und Carter, 1963; Passarge, 1967). 93% der Kinder werden am Termin geboren und sind normgewichtig (de Lorijn et al., 2007).

Der M. Hirschsprung tritt in 70% der Fälle isoliert auf, kann aber auch Teil eines Syndroms sein. In 18% bestehen assoziierte Fehlbildungen oder weitere genetische Erkrankungen und in 12% chromosomale Störungen, am häufigsten eine Trisomie 21 (Passarge, 2002). Bei Patienten mit M. Down ist die Inzidenz deutlich erhöht und liegt bei 0,6% (Bodian und Carter, 1963; Graivier und Sieber, 1966; Spouge und Baird, 1985). Eine Assoziation besteht ebenso bei Patienten mit Waardenburg-Syndrom (Badner et al., 1990). In 5-10% ist eine familiäre Häufung

beschrieben (Badner et al., 1990). Eine Abhängigkeit der Erkrankungshäufigkeit vom Alter der Mutter konnte nicht gezeigt werden (Bodian und Carter, 1963).

### 1.2.2 Krankheitsbild

M. Hirschsprung ist eine häufige Ursache des Ileus im Neugeborenenalter. Bei über 90% der Patienten manifestiert sich die Erkrankung bereits in den ersten 24 Stunden durch einen verzögerten Mekoniumabgang (Swenson et al., 1973). Die klinischen Hauptmanifestationen sind in der Neugeborenenperiode neben der fehlenden Darmentleerung Erbrechen und abdominelle Distension. In den ausgeprägtesten Fällen entwickeln die Neugeborenen eine Enterokolitis und konsekutiv ein toxisches Megakolon, das sich mit den Symptomen (blutige) Durchfälle, galliges Erbrechen, Fieber, Zeichen der Dehydratation und Schock manifestiert und die häufigste Todesursache beim M. Hirschsprung darstellt. In den selteneren Fällen, in denen der M. Hirschsprung nicht bereits in der Neugeborenenperiode diagnostiziert wird, ist das Hauptsymptom in der Kindheit die chronische Obstipation, die auch durch Laxantien und rektale Manipulationen schwer zu behandeln ist. Sekundäre Manifestationen umfassen Mangel- und Unterernährung, Elektrolytstörungen und Infektanfälligkeit (Passarge, 2002).

**Tabelle 3 Klinische Manifestationsformen des M. Hirschsprung**  
(nach Waldschmidt, 1990)

Manifestationsalter	Verlaufsform	Symptome
Neugeborene	intestinale Obstruktion	verzögerter Mekoniumabgang, abdominelle Distension
Neugeborene	Enterokolitis	Diarrhoe, abdominelle Distension, Erbrechen, Fieber, Dehydratation, Schock
Kleinkinder	chronische Obstipation	Symptome oft erst nach der Stillperiode, niedrige Stuhlfrequenz, paradoxe Diarrhoen

Bei der rektal-digitalen Untersuchung fallen der erhöhte Sphinkterdruck und der enggestellte Analkanal sowie die enge Rektumampulle auf. Teilweise kommt es zu explosionsartigen Stuhlabgängen bei Manipulation (Puri, 1993).

### 1.2.3 Klassifikation

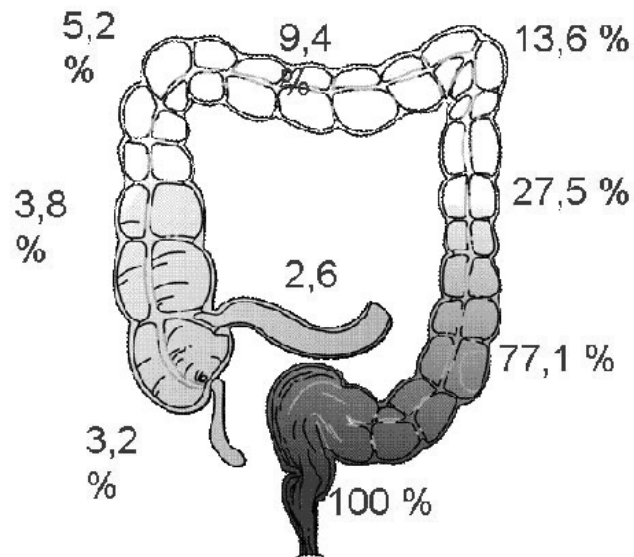
Je nach Länge des aganglionären Darmabschnittes wird der M. Hirschsprung in eine „short-segment“-Form, bei der die Aganglionose maximal bis ins Sigma reicht, und eine „long-segment“-Form mit dem Fehlen von Ganglienzellen über das Sigma hinaus unterteilt (Amiel et al., 2001). Diesen Haupttypen werden drei Sonderformen zugeordnet:

- ultrakurz: betroffen sind nur die distalen 2 bis 5 cm des Rektums
- totale Aganglionose des Kolons
- totale intestinale Aganglionose: betroffen sind hier auch unterschiedliche lange Anteile des Dünndarms (Zuelser-Wilson-Syndrom)

**Tabelle 4 Einteilung der Aganglionose** (nach Swenson et al., 1973)

Länge der Aganglionose	Häufigkeit
short segment - Sonderform: ultrakurz	80%
long segment - Sonderform: totale Kolonaganglionose - Sonderform: totale intestinale Aganglionose	20% 3-8% 1-2%

Der Krankheitsverlauf bei den langen Formen ist oft schwerwiegender und mit einer erhöhten Mortalitäts- und Morbiditätsrate verbunden. Abbildung 1 illustriert die Häufigkeit verschiedener Aganglionoselängen.



**Abbildung 1: Häufigkeit verschiedener Aganglionoselängen**

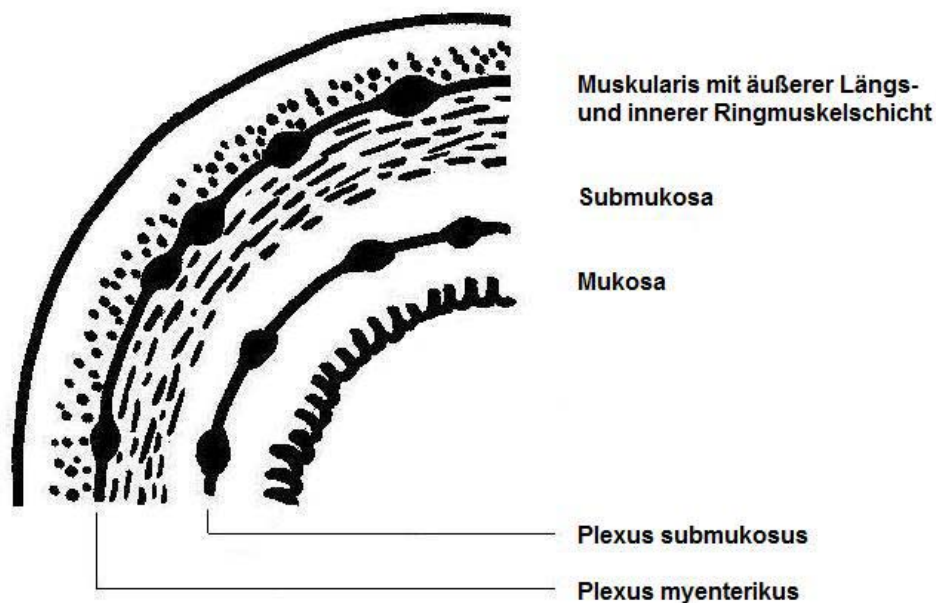
(aus: Waldschmidt, 1990)

#### 1.2.4 Pathogenese

Ursache der Erkrankung ist eine primäre Entwicklungshemmung der parasympathischen Plexus myentericus und submucosus in Form einer kranio-kaudalen Differenzierungs-/Migrationsstörung der Ganglienzellen vor der 12. Embryonalwoche (siehe Abbildung 2). Die der Neuralleiste entstammenden Neuroblasten durchwandern zwischen der fünften und zwölften Embryonalwoche den Magen-Darm-Trakt beginnend im Ösophagus von proximal nach distal (Okamoto und Ueda, 1967; Bolande, 1974). Die Neuroblasten formen dabei zunächst den Plexus myentericus (Auerbach) zwischen der Längs- und der Ringmuskelschicht und anschließend, in der 12. bis 16. Embryonalwoche, den mehrschichtigen Plexus submucosus (Meissner) (Bolande, 1974). Je früher die Migration der Ganglienzellen gestört wird, desto langstreckiger ist das aganglionäre Segment (Okamoto und Ueda, 1967). Das autonome, durch das vegetative Nervensystem modulierte enterische Nervensystem steuert die motorischen, immunologischen und die sekretorischen Funktionen des Gastrointestinaltraktes (Gariepy, 2004). Die präganglionären cholinergen Muskelfasern haben einen aktivierenden Einfluss auf die Muskulatur, die postganglionären adrenergen Fasern des Sympathikus einen hemmenden Einfluss (Puri, 1993). Beim M. Hirschsprung führt vermutlich die erhöhte Acetylcholinausschüttung, die



erhöhte Sensibilität der glatten Muskulatur und die fehlende noradrenerge Modulation zu einer spastischen Dauerkontraktion der Ringmuskulatur des aganglionären Segmentes (Puri, 1993). Den dadurch bedingten Anstieg der Acetylcholinesterase in den parasympathischen Nervenfasern macht man sich diagnostisch zunutze (Meier-Ruge et al., 1972). Die funktionelle Stenose führt zur Koprostase und konsekutiv zur Erweiterung des proximalen Darms bis zum Megakolon und Hypertrophie der Muskulatur.



**Abbildung 2: Enterisches Nervensystem (schematisch)**

### 1.2.5 Diagnostik

Eine erste wegweisende Untersuchung ist die Röntgenübersichtsaufnahme des Abdomens, auf der eine Spiegelbildung durch einen funktionellen Ileus mit Distension des proximalen Dickdarms erkennbar sein kann. Bei fehlender Kontraindikation sollte ein Kolonkontrasteinlauf zur Abgrenzung des M. Hirschsprung von anderen Krankheitsbildern (z.B. Mekoniumileus oder Atresie) durchgeführt werden. Bei Vorliegen eines M. Hirschsprung lässt sich ein Kalibersprung zwischen dem engen Segment und dem proximal angrenzenden Megakolon erkennen. Goldstandard in der Diagnostik sind Etagenbiopsien zur

histochemischen Untersuchung (AChE-Färbung), die entweder als Schnittbiopsien mit Proktoskopie oder als Saugbiopsien entnommen werden (Martucciello et al., 2005). Hierdurch lassen sich auch ultrakurze aganglionäre Segmente entdecken. Die Entnahme der Biopsien erfolgt dabei ab 1 cm distal der Linea anocutanea (de Lorijn et al., 2007), da der Analkanal physiologisch hypoganglionär ist (Tafazzoli et al., 2005). Eine Schnittbiopsie zur Beurteilung auch der tieferen Wandschichten (zu Abgrenzung von Differentialdiagnosen) muss in Vollnarkose durchgeführt werden und hat eine höhere Komplikationsrate als eine Saugbiopsie, bei der nur der oberflächliche submuköse Plexus erfasst wird und die schwieriger zu beurteilen ist. Pathognomonisch für den M. Hirschsprung ist das Fehlen von Ganglienzellen im Plexus submucosus (Meissner) und myentericus (Auerbach), sowie der Nachweis gesteigerter Acetylcholinesterase-Aktivität, da sich AChE in den hypertrophen Nervenfasern der Mukosa ansammelt (Meier-Ruge et al., 1972; Moore und Johanson, 2005). Ein weiteres Untersuchungsverfahren ist die Rektomanometrie. Hier lässt sich beim M. Hirschsprung typischerweise ein fehlender rektoanaler inhibitorischer Reflex feststellen (Callaghan und Nixon, 1964).

#### 1.2.6 Therapie

Die einzige kurative Therapie ist die Resektion des aganglionären Segmentes. Es gibt verschiedene ein- und mehrzeitige OP-Verfahren, u.a. die zuerst beschriebene Rektosigmoidresektion nach Swenson (Swenson und Bill, 1948), die Durchzugsoperation nach Duhamel (Duhamel, 1960), den rektoanal Durchzug nach Soave (Soave, 1964), die im deutschen Sprachraum etablierte anteriore Rektosigmoidresektion nach Rehbein (Rehbein und von Zimmermann, 1960), die posteriore sagittale Anorektoplastik nach Peña (Peña und Hong, 2004) oder der von de la Torre vorgestellte transanale endorektale Durchzug, bei dem keine Laparotomie notwendig ist (de la Torre-Mondragón und Ortega-Salgado, 1998).

Bei Komplikationen wie Ileus, Kolonperforation oder Kolitis ist nach wie vor zunächst eine Kolostomie mit Entnahme von Ganzwandbiopsien und im Verlauf die endgültige Versorgung indiziert; bei komplikationslosen Verläufen bevorzugt man das einzeitige Vorgehen, zunehmend auch als laparoskopische Resektion

nach Georgeson (Georgeson und Robertson, 2004). Postoperative Komplikationen sind im Wesentlichen Enterokolitiden, Obstipation, Anastomosostenosen oder -insuffizienzen und Inkontinenz, seltener auch intestinale Obstruktion und Fisteln (Ikeda und Goto, 1983; Kleinhaus et al., 1979).

### 1.2.7 Genetik

Seitdem die chirurgische Therapie des M. Hirschsprung zu einem deutlichen Abfall der Mortalität führte, konnten in Studien familiäre Fälle von M. Hirschsprung beobachtet und Angaben zur Epidemiologie gemacht werden (Bodian und Carter 1963; Passarge, 1967; Garver et al. 1985). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das durchschnittliche Risiko für Geschwister bei 4% liegt (3% bei kurzem Segment und 17% bei langem Segment) und somit 200mal höher ist als für die Allgemeinbevölkerung (Badner et al., 1990). Das Wiederholungsrisiko für Familienmitglieder ist abhängig vom Geschlecht des Betroffenen und des Kindes sowie von der Länge der Aganglionose: Das höchste Risiko haben Brüder betroffener Schwestern mit ausgedehnter Aganglionose (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5 Erkrankungsrisiko für Geschwister nach Geschlecht und Ausmaß der Aganglionose (Badner et al., 1990)**

Länge des betroffenen Segments	Geschlecht des Patienten	Geschlecht des Geschwisters	Risiko der Geschwister auch betroffen zu sein
kurz	männlich	männlich	5%
		weiblich	1%
	weiblich	männlich	5%
		weiblich	3%
lang	männlich	männlich	17%
		weiblich	13%
	weiblich	männlich	33%
		weiblich	9%

Der M. Hirschsprung zeigt kein einheitliches Vererbungsmuster und wird in der Regel nicht den Mendelschen Regeln folgend vererbt. Man nimmt für den sporadischen M. Hirschsprung ein komplexes, multigenetisches, nicht-mendelsches Vererbungsmuster mit niedriger, geschlechtsabhängiger Penetranz sowie variabler Expression der Länge der Aganglionose an (zusammengefasst in Amiel et al., 2008). Badner und Kollegen schlussfolgerten aufgrund ihrer und vorausgegangener Daten, dass für Familien mit langem Segment das Vererbungsmodell vergleichbar mit einem dominanten Gen mit verminderter Penetranz sei, während in Fällen mit kurzem Segment zwei Vererbungsmodelle plausibel seien: Das Vererbungsmuster könnte sowohl multifaktoriell sein als auch einem rezessiven Gen mit sehr geringer Penetranz folgen (Badner et al., 1990).

**Tabelle 6 Beteiligte Gene bei M. Hirschsprung**

Gen	Genort	Vererbungsmuster	Syndrom	Referenz
<i>RET</i>	10q11.2	dominant, inkomplette Penetranz	nicht-syndromal, MEN2A	Lyonnet et al., 1993; Edery et al., 1994a; Romeo et al., 1994; Angrist, 1995; Attie et al., 1995a
<i>GDNF</i>	5p13.1	nicht-mendelsch	nicht-syndromal	Angrist et al., 1996; Salomon et al., 1996; Ivanchuk et al., 1996
<i>EDNRB</i>	13q22	rezessiv	Shah- Waardenburg- Syndrom	Amiel et al., 1996; Attie et al., 1995b; Auricchio et al, 1996
		dominant, inkomplette Penetranz	nicht-syndromal	Puffenberger et al., 1994; Kusafuka et al., 1996
<i>EDN3</i>	20q13.2	rezessiv	Shah- Waardenburg- Syndrom	McCallion und Chakravarti, 2001; Hofstra et al.,1996
<i>SOX10</i>	22q13	dominant (de novo in 75%)	Shah- Waardenburg- Syndrom	Cantrell et al.,2004; Pingault et al.,1998; Paratore et al.,2002

Gen	Genort	Vererbungsmuster	Syndrom	Referenz
<i>Neurturin</i>	19p13	nicht-mendelsch	nicht-syndromal	Doray et al., 1998
<i>ECE-1</i>	1p36	de novo, dominant	kongenitale Herzfehlbildung	Hofstra et al., 1999
<i>ZFHX1B</i>	2q22	de novo, dominant	Mowat-Wilson-Syndrom	Dastot-LeMoal et al., 2006; Mowat et al., 1998; Cacheux et al., 2001; Charlier et al., 2001
<i>PMX2B</i>	4p12	dominant (de novo in 90%)	Undine-Syndrom	Amiel et al., 2003; Garcia-Barceló et al., 2003
<i>KIAA1279</i>	10q21-q22.1	rezessiv	Goldberg-Shprintzen	Brooks et al., 2005

Bislang wurden zehn verschiedene Gene und fünf Suszeptibilitätsloci gefunden, die an der Entstehung des M. Hirschsprung beteiligt sind.

**Tabelle 7 Suszeptibilitätsloci bei M. Hirschsprung**

Suszeptibilitätsloкус	Phänotyp	Referenz
3p21	short	Bolk et al., 2002
9q31	long	Bolk et al., 2000
19q12	short	Bolk et al., 2002
16q23	Shah-Waardenburg	Carrasquillo et al., 2002
4q31.3-q32.3	short	Brooks et al., 2006

Dabei sind Mutationen im *RET*-Protoonkogen, lokalisiert auf Chromosom 10q11.2, hauptverantwortlich für die Entstehung des M. Hirschsprung in 50% der familiären und 15-35% der sporadischen Fälle mit einer Penetranz von 50-70% (Attie et al., 1995a; Angrist et al., 1995; Bolk et al., 2000).

Die Abhängigkeit des Risikos vom Geschlecht des Betroffenen und des Nachkommens bzw. Geschwisters legt außerdem ein geschlechtsabhängiges Vererbungsmuster nahe (Badner et al., 1990), auch wenn bislang keine

Suszeptibilitätsgene auf dem X-Chromosom gefunden wurden (Parisi und Kapur, 2000). Möglicherweise spielt hier genomisches Imprinting eine Rolle.

Es gibt keine eindeutige Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp beim M. Hirschsprung; die Länge der Aganglionose lässt somit keinen Rückschluss auf die Mutation zu und umgekehrt.

Die Vielzahl der beteiligten Gene und Einflussfaktoren zusammen mit der scheinbaren Geschlechtsabhängigkeit und der variablen Expression und Penetranz zeigen die Komplexität dieser genetisch heterogenen bzw. polygenetischen Erkrankung. Ein molekulares Screening des M. Hirschsprung ist durch die Vielfalt der möglichen Mutationen bei der sporadischen Form kaum möglich, und selbst wenn die Mutation bekannt ist, ist aufgrund der variablen Penetranz keine Vorhersage möglich. Bei den syndromalen Formen hingegen ist ein molekulares Screening Erfolg versprechend.

## 1.3 *RET*-Protoonkogen

### 1.3.1 Aufbau und Funktion

Das *RET*-Protoonkogen (**r**earranged during **t**ransfection) wurde erstmals 1985 durch die Transfektion von NIH 3T3-Zellen mit menschlicher T-Zell-Lymphom-DNA entdeckt (Takahashi et al., 1985). Protoonkogene sind Gene, deren genetischer Defekt dominant ist. Sie führen zur Tumorentstehung, wenn nur ein Allel betroffen ist (Höppner, 2001). Das *RET*-Protoonkogen besteht aus 21 Exons (Manie et al., 2001), die in ihrer Größe zwischen 60 und 287 Bp variieren (Kwok et al., 1993), und ist auf Chromosom 10q11.2 lokalisiert (Ishizaka et al., 1989). Das Genprodukt RET ist ein Transmembran-Rezeptor der Tyrosinkinase-Familie (Manie et al., 2001), der über eine zytoplasmatische tyrosinspezifische Proteinkinase-Aktivität verfügt. Exon 1 bis 10 und zum Teil auch Exon 11 kodieren für die extrazelluläre Domäne, bestehend aus einer cysteinreichen und einer cadherin-ähnlichen Region und der Ligandenbindungsstelle. Exon 11 kodiert für die transmembranäre und Exon 12 bis 21 kodieren für die intrazelluläre Domäne, unterteilt in 2 Subdomänen. Die cysteinreiche Domäne in der Nähe der Membran ist auch in anderen Vertebraten und *Drosophila* konserviert. Ihr wird daher eine

wesentliche Bedeutung für die Funktion des Proteins zugesprochen (Fitze und Schackert, 2004). Im Unterschied zu anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren enthält der RET-Rezeptor vier cadherin-ähnliche Domänen im extrazellulären Anteil, die vermutlich durch die Bindung von Kalzium eine Konformationsänderung initiieren oder stabilisieren, die für die Interaktion mit den Liganden notwendig ist (Manie et al., 2001). Aufgrund unterschiedlicher mRNA-Spliceprodukte besteht der Rezeptor aus 3 verschiedenen Isoformen: einer kurzen aus 1072 Aminosäuren (RET9) und einer langen aus 1114 Aminosäuren (RET51) (Arighi et al., 2004) sowie RET43 aus 1106 Aminosäuren. RET 9 und RET 51 sind die Hauptisoformen und generell ko-exprimiert (Manie et al., 2001).

RET-Expression ist charakteristisch für Zellen aus der Neuralleiste (Schuchardt et al., 1994) und nachweisbar in der sich entwickelnden Niere, im Darm (beginnend an Tag 26-30 im Ösophagus und um Tag 37 und 42 im mittleren bzw. Enddarm) und in Vorgängerneuronen des Rückenmarks (Attie-Bitach et al., 1998).

RET spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen der Neuralleiste. Der Ligand für RET ist GDNF (glial cell-line-derived neurotrophic factor), ein Protein aus 211 Aminosäuren, das zur transforming growth factor- $\beta$  Superfamilie gehört (Airaksinen und Saarma, 2002). Es aktiviert RET in Kulturen und ist während der Entwicklung stark in Maudarm und Nierenmesenchym exprimiert. Weitere lösliche Liganden sind Neurturin, Artemin und Persephin.

Für die Aktivierung des Rezeptors durch seine Liganden ist die Aktivierung eines von vier Korezeptoren notwendig, nämlich GFR $\alpha$  1-4 (GDNF family receptors  $\alpha$ ) aus der Familie der Glycosylphosphatidylinositol-linked Proteine (Manie et al., 2001).

Die Aktivierung führt zur Konformationsänderung mit konsekutiver Bildung von Homodimeren aus 2 RET-Molekülen und nachfolgender Aktivierung der Tyrosinkinase. Über Autophosphorylierung wird eine intrazelluläre Signalkaskade induziert (Manie et al., 2001).

### 1.3.2 *RET*-Mutationen

Unterschiedliche *RET*-Mutationen sind für vier verschiedene Krankheitsbilder verantwortlich: M. Hirschsprung, familiäres Schilddrüsen-Karzinom (FMTC), multiple endokrine Neoplasien Typ 2 (MEN2) und sporadisches papilläres Schilddrüsenkarzinom (van Heyningen, 1994).

#### 1.1.2.1 *RET*-Mutationen bei Schilddrüsentumoren

1987 entdeckte Simpson erstmals eine Kopplung in fünf verschiedenen MEN2a-Familien zu einem DNA-Marker auf Chromosom 10 (Simpson et al., 1987). Gardner et al. sowie Mole et al. wiesen ein 480 kb langes Intervall in der Region 10q11.2 als gemeinsamen Genort für die MEN2a und MEN2b nach, in dem auch das so genannte *RET*-Protoonkogen liegt (Gardner et al., 1993; Mole et al., 1993). Mulligan und Kollegen identifizierten daraufhin in 20 von 23 MEN2a-Familien eine Punktmutation im *RET*-Protoonkogen, welche bei gesunden Probanden nicht auftrat und in 19 der 20 Familien denselben Cysteinrest betraf (Mulligan et al., 1993). Insgesamt wurden über 50 missense-Mutationen im Zusammenhang mit MEN im *RET*-Gen gefunden (Peczkowska und Januszewicz, 2005).

Bei der MEN2a finden sich die Mutationen zu 95% in der extrazellulären Domäne in den Codons 609, 611, 618 und 620 (Exon 10) sowie Codon 630 und 634 (Exon 11), wobei in 87% Codon 634 betroffen ist und in 50% der Fälle die Punktmutation TGC zu CGC nachzuweisen ist (Fitze und Schackert, 2004; Mulligan et al., 1994). Diese Mutation ist signifikant mit dem Auftreten eines Phäochromozytoms und/oder Hyperparathyreoidismus assoziiert. Ein Hyperparathyreoidismus wird gehäuft bei der Mutation C634R gefunden, wenn auch keine signifikante Assoziation besteht (Eng et al., 1996; Zhou et al., 2008).

Beim alleinigen familiären Schilddrüsenkarzinom finden sich die Mutationen ebenfalls in den oben genannten Codons. Sie sind aber gleichmäßiger auf die Codons 618, 620 und 634 verteilt; außerdem wurde auch eine große Anzahl von Mutationen in den Nicht-Cystein-Kodons der Exons 13, 14 und 15 gefunden, die mit einem späteren Erkrankungszeitpunkt und einem weniger aggressiven Verlauf assoziiert sind (Fitze und Schackert, 2004, Niccoli-Sire et al., 2001).



Diese Punktmutationen führen aufgrund des Cysteinverlustes zu einer Ligandenunabhängigen, konstitutiven Dimerisierung des *RET*-Produkts auf der Zelloberfläche über Disulfidbrücken, was wiederum die dauerhafte Aktivierung der Tyrosinkinase zur Folge hat (Santoro et al., 1995; Asai et al., 1995).

Neben der Mutation im kodierenden Bereich des *RET*-Gens haben vermutlich auch Polymorphismen einen Einfluss auf die Krankheitsmanifestation.

In einer spanischen Studie mit 35 MEN2a-Familien wurde ein signifikant gehäuftes Auftreten des Polymorphismus G691S/S904S beobachtet, welches homozygot zu einem deutlich (um 10 Jahre) früheren Auftreten der Erkrankung führt (Robledo et al, 2003).

Anders als beim M. Hirschsprung existiert bei den MEN-Syndromen eine starke Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Die Art der Mutation bestimmt den Zeitpunkt der Tumormanifestation und die Aggressivität des Verlaufs (Mise et al., 2006).

Bei dem familiären medullären Schilddrüsenkarzinom lassen sich häufiger Mutationen im Exon 10 nachweisen als bei MEN2a, wo gehäuft eine Mutation in Codon 634, Exon 11, auftritt. Die Mutation in Codon C634 führt zu einer stärkeren Expression von *RET* auf der Zelloberfläche und konsekutiv zu Dimerisierung und Aktivierung der Tyrosinkinase als die anderen Mutationen und besitzt dadurch möglicherweise stärker transformierende Eigenschaften als die FMTC-Mutationen. Das führt zu einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung mit früherem Beginn und häufigerer Ausprägung des Vollbildes MEN2a unter Einschluss von Phäochromozytomen (Pasini et al., 1997; Santoro et al., 1998; Carlomagno et al., 1997).

### 1.3.2.2 *RET*-Mutationen bei M. Hirschsprung

Zwei verschiedene Arbeitsgruppen wiesen 1993 erstmals die Verbindung eines Gens auf dem langen Arm von Chromosom 10 mit der Erkrankung M. Hirschsprung nach (Lyonnet et al., 1993; Angrist et al., 1993). Ederly zeigte die starke Assoziation von Hirschsprung-Familien zum *RET*-Gen und kurze Zeit später

wurden Mutationen sowohl in familiären als auch in sporadischen Fällen gefunden (Angrist et al., 1995; Ederly et al., 1994b; Pelet et al., 1994).

*RET*-Mutationen sind beim M. Hirschsprung mit langem Segment und auch bei kurzem Segment beschrieben (Angrist et al., 1995), wobei sie häufiger beim langen Segment (70–80% der Fälle) als bei kurzer Aganglionose (17–38%) vorkommen (Attie et al., 1995a; Seri et al., 1997). Es sind mittlerweile 100 verschiedene Mutationen bekannt, verteilt ohne hot spots über das gesamte *RET*-Gen (Sancandi et al., 2000). Dabei handelt es sich um lange Deletionen, Mikrodeletionen, Nonsense-, Missense- und Splicing-Mutationen (Romeo et al., 1994; Ederly et al., 1994a; Attie et al., 1995a), aber auch bestimmte Polymorphismen treten gehäuft auf (Borrego et al., 1999; Borrego et al., 2003; Fitze et al., 2002; Fitze et al., 2003b; Griseri et al., 2004; Pelet et al., 2005; Sancandi, 2003; Sproat-Emison et al., 2005).

Es handelt sich um so genannte „loss-of-function“-Mutationen (Eng et al., 1996, Borrego et al., 2000), die auf unterschiedliche Art und Weise die normale *RET*-Expression und Entwicklung beeinflussen.

Betreffen sie die extrazelluläre cadherin-ähnliche Domäne, führen sie zu einer behinderten Ausreifung des *RET*-Produkts und des Transports an die Plasmamembran (Iwashita et al., 1996; Carlomagno et al., 1996; Asai et al., 1995). Die erniedrigte *RET*-Expression auf der Zelloberfläche verhindert eine normale Migration und Differenzierung der Ganglienzellen (Eng et al., 1996; Iwashita et al., 1996). Betreffen sie hingegen die intrazelluläre Tyrosinkinase, führen sie zu einer verminderten Enzymaktivität (Carlomagno et al., 1996; Pasini et al., 1995) bei gleichbleibender Anzahl von Rezeptoren (Takahashi, 1997). Weiterhin gibt es Mutationen im intrazellulären Abschnitt, die nicht die Tyrosinkinaseaktivität, sondern die Stärke der Bindung von Effektormolekülen an *RET* reduzieren und so die Aktivität von *RET* vermindern (Lorenzo et al., 1997). Das *RET*-Protoonkogen besitzt außerdem eine proapoptotische Aktivität, die durch den Liganden GDNF kontrolliert wird. *RET*-Mutationen, die die Kontrolle von GDNF über *RET* behindern, können aufgrund der Apoptose der *RET*-exprimierenden enterischen Neuroblasten zum M. Hirschsprung führen (Bordeaux et al., 2000; Taraviras et al., 1999).

Mutationen im kodierenden Bereich des *RET*-Gens können trotz Verbindungen vieler Hirschsprung-Familien zum Locus 10q11.2 nur in maximal 50% der Fälle nachgewiesen werden. Es finden sich aber gehäuft Polymorphismen sowohl in den kodierenden als auch in den nichtkodierenden Regionen, die ebenfalls einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben.

## 1.4 Koinzidenz von M. Hirschsprung und MEN2a

### 1.4.1 Epidemiologie und Mutationen

Bereits vor der Entdeckung des *RET*-Protoonkogens berichtete Verdy von einer Familie, in der sowohl M. Hirschsprung als auch MEN2a bzw. FMTC vorkam (Verdy et al., 1982). Moore beschrieb 2008 insgesamt 24 Familien, in denen *RET*-Mutationen beide Krankheitsbilder verursachten (Moore und Zaahl, 2008). Mit einer Ausnahme handelte es sich um MEN2a-typische Mutationen in den im Exon 10 gelegenen cysteinreichen Codons 609, 611, 618 und 620. Es sind sowohl Familien beschrieben, in denen dieselbe Mutation bei unterschiedlichen Familienmitgliedern entweder MTC oder M. Hirschsprung hervorruft, (Pasini et al., 2002; Nishikawa et al., 2003) als auch Familien, in denen MTC und M. Hirschsprung in einer Person vorkommen (Sasaki et al., 2001; Borst et al., 1995).

In systematischen Untersuchungen zur Prävalenz von M. Hirschsprung in MEN2a-Familien wurden Werte von 6 bis 20% ermittelt (Bütter et al., 2007; Borst et al., 1995).

Um die Prävalenz der MEN2a-typischen Mutationen beim vierzehnmal häufigeren M. Hirschsprung zu erfassen, wurden 2 Studien mit 56 bzw. 60 Hirschsprung-Patienten durchgeführt. Dabei ergaben sich für die auf Exon 10 gelegenen Mutationen Prävalenzen von 3,6 bzw. 5% (Sijmons et al., 1998; Skaba et al., 2006). Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse bestätigte sich in einer finnischen Studie, die bei Hirschsprung-Patienten eine erhöhte Inzidenz medullärer Schilddrüsenkarzinome im Vergleich zur Normalbevölkerung nachweisen konnte (Pakarinen et al., 2005).

#### 1.4.2 Empfehlung der Konsensusgruppe

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom ist die Haupttodesursache bei MEN2. Durch das molekulare Screening bestimmter *RET*-Exons in MEN-Familien lässt sich die Prognose der Mutationsträger durch eine prophylaktische Thyreoidektomie entscheidend verbessern (Eng et al., 1996). Eine genetische Untersuchung beim M. Hirschsprung ist hingegen, wie bereits beschrieben, prinzipiell nicht sinnvoll, da der genetische Hintergrund vielschichtig ist und für die Lebenserwartung des Patienten keine Rolle spielt. Die einzige Ausnahme ist die Feststellung einer MEN2a-verursachenden Mutation, da sich bei über 90% der Patienten im Laufe des Lebens ein MTC entwickelt. Da Patienten mit M. Hirschsprung eine gegenüber der Normalbevölkerung erhöhte Mutationsrate aufweisen, wurde von der internationalen Konsensusgruppe „Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2“ eine generelle Untersuchung des Exon 10 auf MEN2a-typische Mutationen bei allen Patienten mit kongenitalem Megakolon empfohlen (Brandi et al., 2001).

Bei einem Mutationsnachweis sollen diese Patienten und ggfs. Familienmitglieder entsprechend den Empfehlungen des „International RET Mutation“-Konsortiums betreut werden (Eng et al., 1996).

### 1.5 Ziel dieser Arbeit

Die Prävalenz von Mutationen im *RET*-Gen bei M. Hirschsprung variiert in Abhängigkeit von Länge der Aganglionose, Geschlecht und Familienanamnese. Die Prävalenz bei den familiären Fällen wird mit 10-50% angegeben (Attie et al., 1995a; Angrist et al., 1995; Ederly et al., 1994a) und mit 10-30% bei den sporadischen Fällen (Attie et al., 1995a; Angrist et al., 1995; Romeo et al., 1994). In einer Studie mit 39 familiären und sporadischen Fällen fanden sich die *RET*-Mutationen dreimal häufiger bei der lang- als bei der kurzstreckigen Aganglionose (Seri et al., 1997; Romeo et al., 1994). In neueren, populationsbasierten Studien, die einen hohen Anteil sporadischer und kurzstreckiger Aganglionosen haben, wurden sowohl bei schwedischen als auch bei englischen Hirschsprung-Patienten *RET*-Mutationen in 7% gefunden (Swenson et al., 1998; Sancandi et al., 2000). Die MEN2a verursachenden Mutationen machen nur einen Teil der *RET*-

Mutationen beim M. Hirschsprung aus und auch hier ist die Penetranz mit 70-80% unvollständig (Attie et al., 1995a; Angrist et al., 1995; Seri et al., 1997). Die Wahrscheinlichkeit, bei einem Hirschsprung-Patienten eine MEN2a-typische *RET*-Mutation zu entdecken, ist insgesamt also gering; das Risiko, bei einer Mutation im Exon 10 ein MTC zu entwickeln, ist demgegenüber sehr hoch. Für ein sinnvolles Screening-Konzept, das Ressourcen schont und unnötige Verunsicherung von Patienten vermeidet, sind möglichst exakte Daten über die Mutationshäufigkeit unter Berücksichtigung aller prädisponierenden Faktoren notwendig; als solche kommen neben der Zugehörigkeit zu einer regionalen Bevölkerung Geschlecht, Aganglionoselänge und familiärer Hintergrund in Betracht.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautet daher:

1. Wie hoch ist die Prävalenz MEN2a-typischer *RET*-Mutationen weltweit?
2. Wie hoch ist die Prävalenz von Mutationen im Exon 10 des *RET*-Gens bei in Norddeutschland lebenden Patienten mit M. Hirschsprung?
3. Lassen sich Faktoren identifizieren, die die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer für die MEN2a prädisponierenden Mutation erhöhen?

## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Nach dem positiven Votum der Ethikkommission (Aktenzeichen 05-127) wurden für unsere Studie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK-SH), Campus Lübeck und Campus Kiel, am Krankenhaus Wilhelmstift, Hamburg, und am Kinderkrankenhaus Altona, Hamburg, Patienten mit der Diagnose M. Hirschsprung untersucht.

Die Identifikation der Patienten erfolgte einerseits über das Krankenhauskommunikationssystem (KKS) unter der DRG Q43.1, andererseits wurden alte OP-Bücher nach Hirschsprung-typischen Operationen durchsucht und die Sprechstundenbücher der letzten Jahre durchgesehen.

Die Akten der Patienten wurden eingesehen und Patienten nach folgenden Kriterien für die Studie ausgewählt:

**Einschlusskriterium:** Histologische Sicherung der Diagnose M. Hirschsprung in einer Rektum-Probepbiopsie

**Ausschlusskriterium:** M. Hirschsprung im Rahmen einer bekannten genetischen Erkrankung wie Trisomie 21, Shah-Waardenburg-Syndrom oder Mowat-Wilson-Syndrom

Bei der Ermittlung der minimalen Stichprobengröße stellten wir die Forderung, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% mindestens einen Patienten mit einer MEN2a-typischen Mutation zu finden. Unter Berücksichtigung der Studienlage gingen wir von einer Häufigkeit von etwa 4% Mutationsträgern aus.

Es gilt  $P_M = 1 - P_W = 1 - p_w^n$ , wobei

$P_M$  die geforderte Wahrscheinlichkeit (0,95),

$P_W$  die Wahrscheinlichkeit, nur Gesunde in der Stichprobe zu finden, und

$p_w$  die Wahrscheinlichkeit, kein Mutationsträger zu sein (0,96), ist.

Für die gesuchte Stichprobengröße ergibt sich nach Umformung  $n=73,4$ .

An den teilnehmenden Kliniken wurden die Patienten mit M. Hirschsprung wie folgt ermittelt:

**Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck:** An den Kliniken für Pädiatrie und Kinderchirurgie wurden im Rahmen dieser Studie die Akten von 187 Patienten, die im Zeitraum von 1970 bis 2005 in der Kinderchirurgie bzw. Pädiatrie des Universitätsklinikums Lübeck behandelt worden waren, eingesehen. In 81 der 187 Fälle lag ein histologisch nachgewiesener M. Hirschsprung vor. Von den 81 Patienten hatten zwei zusätzlich einen M. Down und wurden somit ausgeschlossen. Die 79 Patienten, bei Minderjährigen auch deren Erziehungsberechtigte, wurden angeschrieben und über unsere Studienziele aufgeklärt; die Studienteilnahme wurde angeboten. 27 Patienten waren verzogen und wurden nach Ermittlung der neuen Adressen über die Einwohnermeldeämter erneut angeschrieben.

**Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel:** In der Klinik für Kinderchirurgie sahen wir die Akten von 42 Patienten ein, die im KKS unter der Diagnose M. Hirschsprung geführt wurden. Bei zwei Patienten bestand zusätzlich die Diagnose M. Down. Histologisch gesichert war die Diagnose M. Hirschsprung bei 18 Patienten, die von uns angeschrieben wurden. Sieben Patienten wurden nach Rückfrage an die Einwohnermeldeämter erneut angeschrieben.

**Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg:** Nach Durchsicht von 73 Akten wurden 13 Patienten angeschrieben. Zwei weitere Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose waren unbekannt verzogen.

**Kinderkrankenhaus Altona, Hamburg:** Es wurden 92 Akten von möglichen Hirschsprung-Patienten eingesehen; bei 45 Patienten war die Diagnose histologisch gesichert. In neun Fällen lag zusätzlich ein M. Down vor, in einem Fall ein Undine-Syndrom. Insgesamt wurden 35 Patienten kontaktiert. Vier Patienten waren verzogen, sie wurden nach Ermittlung der neuen Adresse erneut angeschrieben.

Insgesamt wurden 145 Patienten, z.T. wiederholt nach Ermittlung neuer Adressen, angeschrieben.

**Tabelle 8 Anzahl der Patienten in den einzelnen Kliniken**

	<b>Lübeck</b>	<b>Kiel</b>	<b>Wilhelmstift</b>	<b>Altona</b>
<b>Akten</b>	187	42	73	92
<b>Diagnose histologisch gesichert</b>	81	20	15	45
<b>Angeschrieben</b>	79	18	13	35
<b>Mit neuer Adresse angeschrieben</b>	27	7	2	4

## 2.2 DNA-Proben

Von den insgesamt 145 angeschriebenen Patienten antworteten 83 und 82 erklärten sich bereit teilzunehmen.

### 2.2.1 Gewinnung der Proben

Die Studienteilnehmer wurden telefonisch kontaktiert und über das weitere Vorgehen informiert. Der molekulargenetischen Untersuchung ging eine entsprechende humangenetische Beratung voraus. Die Beratung wurde durchgeführt in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik, UK-SH, Campus Lübeck (Ansprechperson Dr. med. Yorck Hellenbroich), dem Institut für Humangenetik UK-SH, Campus Kiel (Ansprechperson Frau Dr. med. Almuth Caliebe) und dem Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (Ansprechperson Frau Kathrin Sommerfeld). Nach individueller Terminabsprache wurden die 82 Studienteilnehmer in den jeweiligen Instituten für Humangenetik vorstellig.

Wir informierten sie, bzw. bei Minderjährigen auch die Erziehungsberechtigten, über das Krankheitsbild M. Hirschsprung, die Ursachen der Erkrankung und das Ziel unserer Studie. Nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung und Beratung sowie Beantwortung aller Fragen wurde nach der schriftlichen Einwilligung mittels eines Wattestäbchens ein Wangenschleimhautabstrich entnommen.



### 2.2.2 Klinische Daten der Patienten

Für jeden Patienten wurde anhand der Patientenakten und der mündlichen Informationen ein Datenblatt erstellt, das Angaben zum Alter bei Diagnosestellung und Operation, zur Länge der Aganglionose und zur histologischen Sicherung der Diagnose enthielt. Im Rahmen der humangenetischen Beratung wurden die Patienten außerdem nach bekannten Erbkrankheiten gefragt und ein Familienstammbaum angefertigt.

## 2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 2.3.1 Testkits

Folgende Testkits kamen zum Einsatz:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- HotStar Taq Polymerase Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, München)

### 2.3.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Wir verwendeten folgende Substanzen:

- Ethanol (99%) (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- HPLC Wasser (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- dNTP-Mix (1,25 mM) (Qiagen GmbH, Hilden)
- pUC8 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- Biozym LE Agarose Biozym (Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
- Ethidiumbromid 1% (10 mg/mL) (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM) HotStar (Qiagen GmbH, Hilden)
- Big Dye® Terminator Mix (Qiagen GmbH, Hilden)
- Sephadex®-G50 (GE Healthcare, München)
- MegaBace Long-Read Matrix (GE Healthcare, München)
- Borsäure (Merck KGaA, Darmstadt)
- DMSO (Merck KGaA, Darmstadt)
- EDTA (Merck KGaA, Darmstadt)

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck KGaA, Darmstadt)

### 2.3.3 Puffer und Lösungen

- 10 x TBE-Puffer (0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 0,02 M EDTA, 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5)
- 10 x PCR-Puffer (HotStar) (Qiagen GmbH, Hilden)
- Big Dye Sequencing Puffer v3.1 (5x) (GE Healthcare, München)
- MegaBace LPA-Running Puffer (10x) (GE Healthcare, München)
- Ladepuffer DNA II (6x) (AppliChem GmbH, Darmstadt)

### 2.3.4 Enzyme

- Proteinase K (Qiagen GmbH, Hilden)
- Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ L) (Qiagen GmbH, Hilden)

### 2.3.5 DNA-Oligonukleotide (Primer)

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried, synthetisiert. Die Konzentration der Stocklösungen betrug 100 mM.

### 2.3.6 DNA-Proben

Die 82 DNA-Proben wurden mittels Schleimhautabstrich gewonnen.

### 2.3.7 Verbrauchsmaterialien

- Mikrotiterplatten (96-Well-Multiply-PCR-Plate (natural, skirted), 96-Multiply-PCR-Platte (natural) (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht)
- Filtrationsplatte: MultiScreen 96-Well-Plate (Millipore, Schwalbach)
- Pipettenspitzen (1-10 / 1-100 / 100-1000  $\mu$ L) (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht)
- Eppendorfreaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2 mL) (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht)
- PCR-Filmfolien (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht)

### 2.3.8 Geräte

- Research® Pipetten 0,5-10 / 2-20 / 5-100 / 50-200 / 100-1000 µL (Eppendorf AG, Hamburg)
- Research® Mehrkanal-Pipetten 0,5-10 / 5-100 / 50-1250 µL (Eppendorf AG, Hamburg)
- Tischzentrifugen (Centrifuge 5415 C / 5415 D) (Eppendorf AG, Hamburg)
- Wärmeblock (Thermomix 5436) (Eppendorf AG, Hamburg)
- Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg)
- Elektrophoresekammer (MWG-Biotech AG, Ebersberg)
- Vorschaltgerät (Biometra GmbH, Göttingen)
- Mikrowellengerät (Siemens AG, München)
- Laborwaage (Sartorius AG, Göttingen)
- UV-Tisch (biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Laborzentrifugen (Rotina 35 / Rotanta 460R) (Andreas Hettich GmbH&Co KG, Tuttlingen)
- Sequenziersystem MegaBACE 1000 (GE Healthcare, München)

### 2.3.9 Software

- Sequence Analyzer 4.0
- Sequencher 4.5
- Argus X1 4.1.10

## 2.4 Verarbeitung der Proben

Die Mundschleimhautabstriche wurden bei Prof. W. Höppner, BioGlobe GmbH, Hamburg, untersucht.

### 2.4.1 DNA-Isolierung aus den Schleimhautabstrichen

Die Extraktion der DNA erfolgte entsprechend dem Protokoll des QIAamp DNA Blood Mini Kit. Die Watteträger wurden abgeschnitten und zur Rehydrierung in eine 2 mL Tube mit 600 µL PBS-Puffer gegeben. Anschließend wurden für die Zellyse 20 µL Proteinase A und 600 µL AL-Lysepuffer dazugegeben. Nach 15 s

Durchmischung auf dem Monomixer wurden die Proben 10 min bei 56°C inkubiert und im Anschluß mit 600 µL Ethanol versetzt, um die Aktivität der Proteinkinase zu stoppen. Das Zellysate wurde erneut kurz durchmischt und anschließend über eine Chromatographiesäule gegeben und die Säule 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert.

Die gebundene DNA wurde nun zunächst mit 500 µL des ersten Waschpuffers (AW1-Puffer) gewaschen und bei 8000 U/min 1 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Filtrat verworfen und die Säule ein zweites Mal mit 500 µL des zweiten Waschpuffers (AW2-Puffer) gewaschen. Nach weiteren 3 min Zentrifugation bei 14000 U/min wurde das Filtrat verworfen und die Säule abschließend in ein neues 1,5 mL Tube gesetzt, die DNA mit 50 µL HLPC-Wasser eluiert und nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Die Lagerung der DNA-Probe erfolgte im Kühlschrank.

#### 2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifizierung des Exon 10 des *RET*-Gens wurde das Hot-Star-Taq-Polymerase-System verwendet. Die Reaktionen mit einem Endvolumen von 50 µL wurden in 96-Mikrotiter-Platten angesetzt.

**Tabelle 9 Pipetierschema für einen 50µl-PCR-Ansatz**

Reagenzien	µL	Konzentration
PCR-Puffer	5	1x
dNTPs (1,25 mM)	3	75 µM
Primer F (25 pmol/µL)	3	1,5 mM
Primer R (25 pmol/ µL)	3	1,5 mM
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	1,5 mM
Q solution (10 µL)	10	20%
Taq Polymerase (50 U/µL)	0,25	12,5 U
dd H <sub>2</sub> O	18,75	
DNA	4	

Es wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, der alle Reagenzien (siehe Tabelle 9) bis auf die genomische DNA enthielt. Von diesem Mastermix wurden 46  $\mu\text{L}$  in die jeweils benötigten Kavitäten der PCR-Platte pipettiert und im Anschluss 4  $\mu\text{L}$  der jeweiligen genomischen DNA dazugegeben. Die Platte wurde zur vollständigen Durchmischung kurz gemischt und zur Entfernung der Luftblasen zentrifugiert und dann im Anschluss in den Thermocycler gestellt und das PCR-Programm gestartet (Tabelle 10).

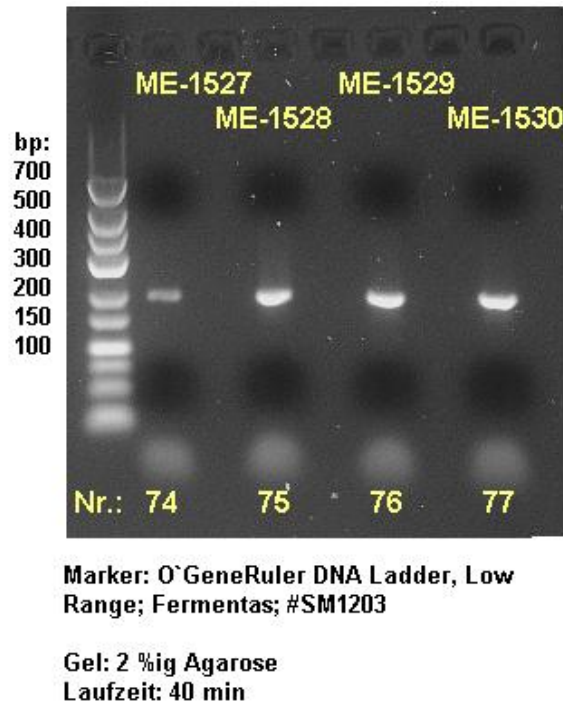
**Tabelle 10 Programmablauf der PCR**

PCR Programm Sequenz		
94°C	15 min	
96°C	1 min	35 Zyklen
63°C	1 min	
72°C	1 min	
15°C	-	

#### 2.4.3 Agarosegelelektrophorese

Es wurden 1%- bis 2%ige Agarosegele mit 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ethidiumbromid sowie 0,5 x TBE-Puffer als Gel- und Laufpuffer für die analytische DNA-Auftrennung eingesetzt. Nach der Auftrennung zeigte der verwendete DNA-Größenstandardmarker eine 10 kb DNA-Leiter.

Die Agarose wurde nach dem Einwiegen in einem Erlenmeyerkolben mit 0,5 x TBE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle zu einem homogenen Gel erhitzt. Anschließend wurde das Ethidiumbromid zugegeben und das heiße Gel luftblasenfrei in eine Horizontalgelapparatur mit einem Geltaschenkamm gegossen. Nach Polymerisation des Gels (ca. 0,5 h) wurde die Kammer mit TBE-Puffer gefüllt. Es wurden jeweils 5  $\mu\text{L}$  des PCR-Amplifikats mit 2  $\mu\text{L}$  6 x Ladepuffer gemischt und rasch, um Diffusion zu vermeiden, in die Geltaschen pipettiert. Je nach Gelgröße erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der zu untersuchenden DNA-Proben bei 80 bis 200 V. Die Laufzeit der Elektrophorese erstreckte sich über 0,5 bis 1,5 h. Unter UV-Licht erfolgten danach die visuelle Auswertung der Auftrennung und eine photographische Dokumentation.



**Abbildung 3: Darstellung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese**

#### 2.4.4 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Für die Aufreinigung der DNA-Amplifikate wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Die Aufreinigung dient dazu, die nicht umgesetzten Primer und Pufferkomponenten der PCR zu entfernen. Die restlichen 45 µL der PCR-Amplifikate wurden je mit dem fünffachen Volumen Bindungspuffer (PBI-Puffer) gemischt und unter Vermeidung von Schaumkronen auf die Säulen appliziert. Die Säulen wurden für 1 min bei 14000 U/min zentrifugiert und das Filtrat anschließend verworfen. Danach wurden die Säulen mit 750 PE-Puffer (Waschpuffer) gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Eine weitere Zentrifugation, 1 min bei 14000 U/min, diente dem Trocknen der Säulen.

Anschließend wurden die Säulen in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Tube überführt und die DNA mit 40 µL ddH<sub>2</sub>O eluiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde erneut 1 min bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.4.5 Sequenz-PCR mit BigDye-Fluoreszenz

Für die Sequenz-PCR wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von GE Healthcare verwendet. Als Matritze (Template) für die Sequenzierung dienten die gereinigten DNA-Amplifikate. Es wurde jeweils nur ein Primer pro Sequenz-Reaktion eingesetzt, da es sich bei dem Verfahren um eine Einzelstrang-synthese (cycle-sequencing) handelt. Um eine vollständige Auswertung der Nukleotidsequenz zu garantieren, wurden die PCR-Fragmente für jeweils beide DNA-Stränge (F = forward und R = reverse) sequenziert.

In 96-Mikrotiter-PCR-Platten wurden die Reaktionen mit jeweils 10  $\mu\text{L}$  PCR-Volumen angesetzt. In Tabelle 11 sind die Reagenzien dargestellt. Es wurde zunächst ein Mastermix (MM) hergestellt, der alle Reagenzien außer DNA und Primer enthält. Davon wurden je 7  $\mu\text{L}$  in die Kavitäten der PCR-Platte pipettiert und je 1  $\mu\text{L}$  Primer und 2  $\mu\text{L}$  Template dazugegeben und der Reaktionsansatz unter Vermeidung von Blasenbildung kurz durchmischt. Nach kurzem Zentrifugieren der Mikrotiterplatten (1 min bei 13000 U/min) wurden sie in der Thermocycler überführt und das PCR-Programm gestartet. Tabelle 12 enthält die Parameter für das PCR-Programm.

**Tabelle 11 Pipetierschema für einen 10  $\mu\text{L}$ -Sequenz-PCR-Ansatz**

Reagenzien	$\mu\text{L}$	Konzentration
5 x Sequenzpuffer	1	0,5 x
H <sub>2</sub> O	3,5	
DMSO Merck	0,50	5%
Primer 10 pmol/ $\mu\text{L}$ F/R	1,00	1 mM
Template	2,00	
BigDye Mix	2,0	

**Tabelle 12 Sequenz PCR-Programm**

PCR Programm Sequenz		
96°C	2 min	
96°C	10 s	35 Zyklen
53°C	10 s	
60°C	4 min	
15°C	-	

Durch die Zugabe sowohl von dNTPs als auch von ddNTPs kam es an den Templates an verschiedenen Stellen zu Strangabbrüchen, so dass im günstigsten Fall Kopien entstanden, die sich genau um eine Basenlänge unterscheiden. Durch die erhöhte Laufgeschwindigkeit der kleineren DNA-Abschnitte kann in der Sequenz-Kapillar-Elektrophorese anhand der fluoreszenzmakierten letzten Base die Basenabfolge ermittelt werden.

#### 2.4.6 Aufreinigung des Sequenz-PCR-Produktes

Die überzähligen Primer, freie Nukleotide und andere Pufferkomponenten wurden mit Hilfe einer Sephadex-G50-Gelfiltration aus dem Sequenz-Reaktionsprodukt entfernt. Das Sephadex-Pulver wurde in einer speziellen 96-well-Tüpfelplatte (Schablone) portioniert und in eine 96-Mikrotiterplatte überführt. Pro Well wurden 300 µl destilliertes Wasser dazugegeben. Binnen einer Stunde erfolgte das Aufquellen des Pulvers zu einer Gelsäule. Das überschüssige Wasser wurde mittels fünfminütiger Zentrifugation bei 2330 U/min entfernt und die Probe (10 µL Reaktionsprodukt) sowie 10 µL H<sub>2</sub>O zur Verdünnung mittig auf die Säule aufgetragen. Durch erneute Zentrifugation wurde das gereinigte Reaktionsprodukt als Filtrat aufgefangen.

#### 2.4.7 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung erfolgte mit dem MegaBACE 1000, einem auf Fluoreszenz-Messung beruhendem 96-Kapillar-Elektrophorese-Gerät der Firma GE-Healthcare.



Der LPA-Puffer und die Gelmatrix wurden zunächst auf Raumtemperatur temperiert und der 10 x LPA-Puffer mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Es wurden 6 Pufferröhrchen à 2 mL 1 x LPA-Puffer und eine 96-Mikrotiterplatte mit je 100 µL 1 x LPA-Puffer pro Well hergestellt. Nach zweiminütiger Zentrifugation der Puffer- und Matrixröhrchen bei 3000 U/min zur Entfernung der Luftbläschen erfolgte die Beladung des MegaBACE nach dem Protokoll des Gerätes. Die DNA-Proben wurden vor der Applikation 2 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die Probeninjektion erfolgte bei 2 kV für 75 s, die Elektrophoresebedingungen lagen bei 8 kV bei einer Laufzeit von 110 min und einer Temperatur von 44°C.

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Sequenz Analyser- und der Sequencer 4.5-Software.

## 2.5 Systematische Literaturanalyse

Es wurde eine systematische Literaturrecherche in den medizinischen Datenbanken *Pubmed* und *MBase* durchgeführt. Suchbegriffe waren „Hirschsprung Disease“ als Schlagwort, gekreuzt mit „*RET*-Protooncogene“ und mit „Exon 10 oder C609Y oder C620R oder C620W oder C620Y oder C618S oder C618Y oder C611S oder C618R“.

Des Weiteren wurde eine Literaturrecherche in *Web of Science* durchgeführt, zum einen mit der vorgenannten Suchstrategie, zum anderen über die Zitierung der Erstbeschreibung von Verdy (Verdy et al., 1982).

Die ermittelten Arbeiten wurden dahingehend überprüft, ob sie a) eine Studie beschreiben, in der Mutationen im *RET*-Protooncogen bei M. Hirschsprung oder MEN2a bzw. FMTC untersucht wurden oder b) ein Patient oder eine Familie mit HD und MEN2a/FMTC beschrieben wurde.

Autoren, die über Patienten oder Familien berichtet hatten, in der beide Erkrankungen koinzident waren, wurden angeschrieben und nach weiteren inzwischen bekannt gewordenen Patienten gefragt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientendaten

#### 3.1.1 Epidemiologische Daten

##### 3.1.1.1 Umfang der Stichprobe

Die Suchstrategien zum Auffinden von Patienten mit M. Hirschprung identifizierten 161 Erkrankte. Bei 14 Patienten lag die Erkrankung im Rahmen eines Syndroms vor; 2 Patienten waren unbekannt verzogen. Von den 145 z.T. mehrfach angeschriebenen Patienten antworteten 83 (57,2%). Alle, bis auf eine Patientin, erklärten sich mit der Teilnahme einverstanden. Somit wurde bei 82 Patienten (56,5%) das Exon 10 des *RET*-Gens untersucht. Fünf Patienten erfüllten entgegen erster Annahmen die Ein- und Ausschlusskriterien nicht vollständig, so dass ihre Daten nicht in die Auswertung eingeflossen sind.

Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich, sofern nicht anders erläutert, auf 77 Patienten. Die angestrebte Stichprobengröße von  $n > 73$  wurde erreicht. Einzelheiten sind in Tabelle 13 dargestellt.

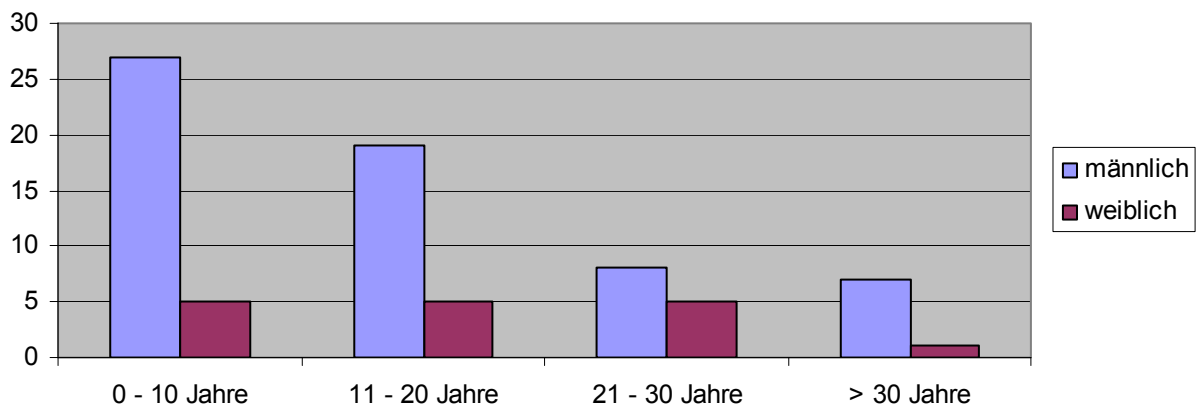
**Tabelle 13 Anzahl der Patienten in den einzelnen Kliniken**

	Lübeck	Kiel	Wilhelmstift	Altona
<b>Akten</b>	187	42	73	92
<b>Diagnose histologisch gesichert</b>	81	20	15	45
<b>Angeschrieben</b>	79	18	13	35
<b>Geantwortet</b>	45	9	8	21
<b>Beraten</b>	45	9	8	20

##### 3.1.1.2 Alter und Geschlecht

Von den 77 untersuchten Patienten waren 16 (20,7%) weiblichen und 61 (79,3%) männlichen Geschlechts, das Geschlechterverhältnis betrug demnach 1:4. Insgesamt wurden 55 Kinder, davon 46 Jungen und 9 Mädchen, und 22 Erwachsene, davon 15 Männer und 7 Frauen, untersucht.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 15,3 Jahre. Die Spanne reichte dabei von 2 bis 44 Jahren (Median 12 Jahre). Die Altersgruppe bis 10 Jahre umfasste 32 Patienten, die Altersgruppe 11-20 Jahre 24 Studienteilnehmer, die Altersgruppe 21-30 Jahre 13 Patienten; in der Altersgruppe 31-40 Jahre waren 7 Patienten und ein Patient war über 40 Jahre alt. Einzeldaten zur Alterstruktur sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Alterstruktur des Patientenkollektivs**

### 3.1.1.3 Familienanamnese

Unter den untersuchten Patienten waren 3 Geschwisterpaare:

- zwei Brüder, der ältere mit kurzstreckiger, der jüngere Bruder mit langstreckiger Aganglionose
- zwei Brüder, beide mit kurzstreckiger Aganglionose
- ein Junge und seine jüngere Schwester, beide mit langstreckiger Aganglionose, die bei dem Jungen bis zum Colon ascendens reichte und bei seiner Schwester bis zum Colon transversum; in dieser Familie war ebenfalls die Schwester der Mutter betroffen, die Aganglionoselänge ist nicht bekannt.

Bei einem Patienten mit kurzstreckiger Aganglionose waren Onkel und Großonkel väterlicherseits betroffen. Bei einer Patientin mit Zuelser-Wilson-Syndrom bestand bei der Mutter der Verdacht auf eine leichte Form eines M. Hirschsprung, die Diagnose wurde jedoch nicht bioptisch gesichert.

Keiner der Patienten hatte von MEN2a-typischen Tumoren betroffene Angehörige. Ein Patient berichtete von Verwandten mütterlicherseits mit Megaureteren. Ein Patient war adoptiert, hier konnte keine Familienanamnese erhoben werden.

### 3.1.2 Klinische Daten

Die Daten zur Aganglionoselänge konnten nur von 74 Patienten erhoben werden. Insgesamt betraf die Aganglionose bei 59 Patienten (79,7%) maximal das Sigma, bei 12 Patienten (16,2%) lag ein long-segment-Befall bis ins Colon ascendes und bei drei Patienten (4,1%) war der Dünndarm mitbetroffen. Das Verhältnis von kurz- zu langstreckiger Aganglionose (inkl. Dünndarmbeteiligung) beträgt 3,9:1. Tabelle 14 enthält Angaben zur Ausdehnung der Aganglionose in Abhängigkeit vom Geschlecht.

**Tabelle 14 Häufigkeit der verschiedenen Aganglionoselängen nach Geschlecht bezogen auf die Studienpopulation**

	<b>Kurzes Segment (maximal Sigma)</b>	<b>Langes Segment</b>	<b>Dünndarmbeteiligung</b>
<b>Insgesamt</b>	59 (79,7%)	12 (16,2%)	3 (4,1%)
<b>Weiblich</b>	9 (64,3%)	3 (21,4%)	2 (14,3%)
<b>Männlich</b>	50 (83,3%)	9 (15,0%)	1 (1,7%)
<b>Verhältnis w:m</b>	1:5,5	1:3	1:0,5

Bei 40 der 62 Patienten, die nicht auf das Anschreiben geantwortet hatten, konnten Daten zur Länge der Aganglionose erhoben werden. Insgesamt lag bei 32 Patienten eine auf das Rektosigmoid begrenzte Aganglionose vor (80%), bei 6 Patienten reichte die Aganglionose bis ins Kolon (15%) und bei 2 Patienten bis ins Ileum (5%).

Assoziierte Fehlbildungen konnten bei 3 Patienten festgestellt werden. Bei einer Patientin bestand ein vesikouretraler Reflux mit Megaureteren, bei einem anderen Patienten war die linke Niere doppelt angelegt. Eine Patientin wies zusätzlich ein Klippel-Feil-Syndrom sowie eine Sprengeldefornität auf. Ein medulläres Schilddrüsenkarzinom wurde in keinem Fall angegeben.

### 3.1.3 Genetische Daten

Für MEN2a disponierende Mutationen in den Codons 609, 611, 618 und 620 wurden in keiner der untersuchten DNA-Proben gefunden, ebenso keine Mutationen oder Polymorphismen in anderen Bereichen des Exon 10.

## 3.2 Literaturrecherche

Für die verschiedenen Schreibweisen des Begriffs „Morbus Hirschsprung“ wurden am 16.11.2009 in *Pubmed* 2.666 Treffer erzielt. Die Kopplung mit dem Begriff „*RET* protooncogene“ wies 123 Veröffentlichungen nach. Die weitere Verknüpfung mit „Exon 10 oder C609Y oder C620R oder C620W oder C620Y oder C618S oder C618Y oder C611S oder C618R“ erbrachte 131 Treffer. Die Suche in *MBase* am 08.12.2009 erzielte 3.431 Treffer für das Schlagwort „M. Hirschsprung“. Aus der Kopplung mit „*RET* protooncogene“ und mit „Exon 10 oder C609Y oder C620R oder C620W oder C620Y oder C618S oder C618Y oder C611S oder C618R“ resultierten 141 Publikationen. Der Abgleich mit *Pubmed* bezüglich doppelter Veröffentlichungen ergab 35 neue Artikel.

Die 166 gefundenen Artikel wurden nun anhand ihrer Relevanz bezüglich Beschreibung von Mutationen im *RET*-Protoonkogen bei Patienten mit MEN2a bzw. FMTC und M. Hirschsprung bewertet.

In 36 Artikeln wurden Mutationen in den Codons 609, 611, 618 und 620 im Exon 10 bei Patienten bzw. in Familien mit M. Hirschsprung und MEN2a/FMTC beschrieben. Es handelt sich dabei um 3 Berichte mit M. Hirschsprung in MEN2-Familien, 17 Fallberichte und 16 Studien mit Hirschsprung-Patienten, in denen in einem größeren Patientenkollektiv das *RET*-Gen systematisch untersucht wurde. Durch die Literaturangaben in den 36 Artikeln wurden weitere 5 Veröffentlichungen identifiziert, die zuvor in der systematischen Literaturrecherche nicht gefunden wurden. Die Suche in *Web of Science* erbrachte 45 Treffer, wobei kein neuer Artikel gefunden wurde. Insgesamt wurden 41 Veröffentlichungen beurteilt.

### 3.2.1 Studien

Es wurden 18 Publikationen, die das Screening des *RET*-Protoonkogens bei M. Hirschsprung beschreiben, identifiziert. Dabei beschreiben 3 Publikationen die gleiche Patientengruppe (Fitze et al., 2002; Fitze et al., 2003a; Serra et al., 2009), so dass nur der zuerst erschienene Artikel ausgewählt wurde (Fitze et al., 2002). In 2 anderen Studien wurden Abschnitte des *RET*-Gens ohne Einschluss des Exon 10 untersucht (Kusafuka et al., 1997; Guan et al., 2005). Auch diese Studien blieben unberücksichtigt. Einen Überblick über die 14 Publikationen gibt Tabelle 15.

Die Inzidenz von *RET*-Mutationen wird von 7,0% (Sancandi et al., 2000) bis 41,2% (Attie et al., 1995a) angegeben, die Inzidenz von MEN2-typischen Exon 10-Mutationen von 0% (Sancandi et al., 2000) bis 5% (Sijmons et al., 1998).

In den 14 Studien wurden 835 Patienten mit M. Hirschsprung untersucht. Da Skaba et al. und Sijmons et al. keine Angaben zur Häufigkeit von *RET*-Mutationen insgesamt in ihrer Studie gemacht haben, lässt sich nur sagen, dass bei mindestens 125 Patienten (15%) eine Mutation im *RET*-Protoonkogen vorliegt (Sijmons et al., 1998, Skaba et al., 2006).

Insgesamt wurden bei 12 Patienten MEN2a- bzw. FMTC-typische Mutationen im Exon 10 nachgewiesen, das entspricht 1,3% aller untersuchten Patienten und maximal 9,6% aller Patienten mit *RET*-Mutationen. Die Mutationen wurden dabei sowohl beim männlichen (1 Patient) als auch beim weiblichen Geschlecht (4 Patientinnen) beschrieben; bei 7 Patienten fehlen Angaben zum Geschlecht. Differenziert nach der Aganglionoselänge hatten 4 Exon 10-Mutationsträger eine Aganglionose, die bis maximal ins Sigma (short segment) reicht, in 6 Fällen lag ein langstreckiger Befall vor, der bei 3 Erkrankten das gesamte Kolon betraf. Bei zwei Patienten fehlen diesbezügliche Angaben. Die Familienanamnese war bei 4 Patientinnen positiv für ein Schilddrüsenkarzinom; in diesen Fällen hatte jeweils die Mutter ein medulläres Schilddrüsenkarzinom entwickelt. Bei einer Patientin konnte bereits ein MTC nachgewiesen werden und bei 7 Patienten ergaben sich keine Hinweise auf eine positive Familienanamnese.

Drei Veröffentlichungen beschreiben die Häufigkeit von M. Hirschsprung in Familien mit MEN2a. Decker und Kollegen berichteten dabei über den Nachweis

von verschiedenen Exon 10-Mutationen in 7 von 44 bzw. 6 von 36 MEN2a-Familien, in denen bei einigen Familienmitgliedern gleichzeitig M. Hirschsprung auftrat (Decker et al., 1998a; Decker et al., 1998b; siehe Tabelle 15). Zwei Familien wurden dabei schon von Borst beschrieben (Borst et al., 1995). Bei zwei Familien mit einer C620R-Mutation kamen sowohl kurzstreckige als auch langstreckige Aganglionosen vor. Bei vier Familien mit C618S-Mutation wurden zweimal lediglich kurze, in einer Familie eine lange und in einer sowohl lange als auch kurze Ausprägungen der Aganglionose beschrieben. In vier Familien mit C609Y-Mutation sowie in einer Familie mit C620W-Mutation kamen lediglich kurzsegmentale Aganglionosen vor. Über die Geschlechterverteilung wurden keine Angaben gemacht.

Bütter beschreibt bei 4 von 20 Patienten mit MEN2a oder FMTC das gleichzeitige Auftreten von M. Hirschsprung bei zugrunde liegender C620S-Mutation, es wurden keine Angaben bezüglich Geschlecht oder Aganglionoselänge gemacht (Bütter et al., 2007).

**Tabelle 15 Häufigkeit von *RET*-Mutationen in verschiedenen Populationen von Patienten mit M. Hirschsprung**

Autor, Jahr	Population	Anzahl Patienten	sporadisch/ familiär	long/ short segment	Patienten mit Mutationen im <i>RET</i> -Gen	Mutationen im Exon 10, Charakteristika
Yin et al., 1994	Italiener	82	keine Angaben	keine Angaben	16 (19,5%)	keine
Ederly et al., 1994a	Franzosen	34	0/34	keine Angaben	6 (17,6%)	keine
Romeo et al., 1994	Italiener	27	23/4	7/20	4 (14,8%), davon 3/23 spor. (13%) 1/4 fam. (25%)	keine
Attié et al., 1995a	Mehrere Zentren in Europa und Kanada, Kaukasier	80	45/35	44/25 (bei 11 Pat. keine Angaben)	33 (41,2%), davon 16/45 spor. (35,5%) 17/35 fam. (48,6%)	1 (1,25%) C609W, Is, fam., Geschlecht unbek., kein Hinweis auf MEN
Angrist et al., 1995	Pat. aus den USA, keine Angabe über ethnische Herkunft	80	44/36	29/16 (bei 35 Pat. keine Angaben)	8 (10%), davon 4/44 spor. (9,1%) 4/36 fam. (11,1%)	2 (2,5%) - C609Y, kein MTC, fam. - C620R, kein MTC, sporadisch
Seri et al., 1997	Italiener	39	keine Angaben	10/29	7 (17,9%), davon 5/10 Is (50%) 2/29 ss (6,9%)	1 (2,6%) C620R, Pat. mit TCA
Swenson et al., 1998	Schweden, Kaukasier	69	62/7	6/58 (bei 5 Pat. keine Angaben)	5 (7,2%), davon 2/62 spor. (3,2%) 3/7 fam. (42,9%)	1 (1,5%) C620R, fam., ss, Mutter MEN2a



Autor, Jahr	Population	Anzahl Patienten	sporadisch/ familiär	long/ short segment	Patienten mit Mutationen im <i>RET</i> -Gen	Mutationen im Exon 10, Charakteristika
Sijmons et al., 1998	Niederländer, Kaukasier	60	60/0	keine Angaben	keine Angaben	3 (5%) - C620R: weibl., ls, Mutter MTC - C609Y: weibl., ss, selbst MTC mit 37J. - C620R: männl., ss, de novo Mut., kein MTC
Sakai et al., 2000	Japaner, Asiaten	28	28/0, davon 16 männl., 12 weibl.	8/20	4 (14,3%), davon 2/8 ls (25%), 2/20 ss (10%)	keine
Sancandi et al., 2000	Briten, Kaukasier	57	48/9	15/40 (bei 2 Pat. keine Angaben)	4 (7,0%), 4/48 spor. (8,3%)	keine
Fitze et al., 2002	Deutsche, Kaukasier	76	71/5	22/54	18 (23,7%), davon 11/22 ls (50%) 7/54 ss (13%)	2 (2,6%) - C609S, ss - C620R, ls
Skaba et al., 2006	Tschechen, Kaukasier	56, davon 41 männl., 15 weibl.	keine Angaben	19/37	keine Angaben	2 (3,6%) - C609Y - C620R beide weibl., TCA, Mutter MTC,
Sangkhathat et al., 2006	Thailänder, Asiaten	41, davon 25 Chin.-Thai 16 Malay-Thai	41/0	11/30	3 (7,3%), davon 1/30 ss (3,3%) 2/11 ls (18,2%)	keine
Ruiz-Ferrer et al., 2006	Spanier	106	83/23 (aus 13 Familien)	44/47 (bei 15 Pat. keine Angaben)	11 (10,4%), davon 3/13 fam. (23%) 8/83 spor. (9,6%) 4/47 ss (8,5%) 7/44 ls (15,9%)	keine

## 3.2.2 Fallberichte

Es wurden 20 Artikel gefunden, in denen über bis zu 6 Familien mit MEN2 und M. Hirschsprung berichtet wurde (Tabelle 16). Zwei Artikel (de Groot et al., 2005, Dvorakova et al., 2005) beschreiben jeweils einen Fall, der bereits im Zusammenhang mit Studien beschrieben wurde (Sijmons et al., 1998; Skaba et al., 2006).

**Tabelle 16 Übersicht Fallbeschreibungen**

Autor, Jahr	Herkunft	Beschreibung	Mutation	Aganglionose-länge
Mulligan et al., 1994	keine Angabe	5 Familien, 4 mit MEN2a und HD, eine nur mit HD	- C609Y: nur HD - C618R (1x) und C620R (2x): beide Erkrankungen - C620R: FMTC aber nicht bei HD	Unbekannt
Borst et al., 1995	Michigan, USA	2 Fam. mit MEN2a, davon 3 bzw. 4 Pat. zusätzl. HD	C618S	3 x kurz, 4 x lang, davon 3 x TCA
Caron et al., 1996	Frankreich	1 Fam., 7 Pat. mit MEN2a, davon 3 zusätzl. HD	C618R	unbekannt
Azzis et al., 1996	Frankreich	1 Pat. mit MTC und HD	unbekannt	kurz
Blank et al., 1996	USA	1 Fam. mit MEN2a, 2 Jungen nur HD	C620R	unbekannt
Peretz et al., 1997	Marokko	1 Fam. mit MTC, 1 Pat. zusätzl. HD	C618R	kurz
Romeo et al., 1998	Italien	2 Fam. mit FMTC, je 1 Pat. zusätzl. HD	C620R C620S	unbekannt
Borrego et al., 1998	Spanien	1 Fam. mit MEN2a, davon 1 Pat. zusätzl. HD	C620S plus A45A-Polymorphismus	unbekannt
Inoue et al., 1999	Japan	1 Fam. 28 Pat., 8 MEN2a, davon 1 zusätzl. HD	C620S	unbekannt
Munnes et al., 2000	Deutschland	1 Fam. mit HD oder FMTC, 1 Mädchen hat beide Erkrankungen	C609R	TCA
Sasaki et al., 2001	Japan	1 Fam. mit MEN2a, 1 Mädchen mit HD und MTC	C620S	kurz

Autor, Jahr	Land	Beschreibung	Mutation	Aganglionose-länge
Pasini et al., 2002	Italien	1 Fam. mit MTC, 1 Junge nur HD	C618R	unbekannt
Nishikawa et al., 2003	Japan	1 Fam., 2 Pat. mit MTC, 1 Pat. mit HD	C611S	kurz (männl. Patient)
Gilchrist et al., 2004	Kanada	1 Fam. mit MEN2a, 1 Junge zusätzl. HD	C620R	unbekannt
Fitze, 2004	Deutschland	1 Fam. mit MEN2a, 1 Pat. nur HD	C609S plus A45A-Polymorphismus	kurz
		1 Fam. mit MEN2a, 1 Pat. zusätzl. HD	C620S plus A45A-Polymorphismus	unbekannt
Moore et al., 2007	Südafrika	1 Fam. mit MTC, 1 Pat. nur HD	C620W	lang
Fialkowski et al., 2008	USA	2 Familien, Pat. mit MTC oder HD	- C609Y - C620R	unbekannt
Moore und Zaahl, 2009	Südafrika	1 Fam. mit MEN2, davon 2 Pat. nur HD	C620R	beide TCA

**Tabelle 17 Mutationen bei Assoziationen von M. Hirschsprung und MEN2a**

Mutation	Anzahl insges.	Beschreiber (mit Anzahl der jeweils beschriebenen Mutationen)
C618R	5	Mulligan et al., 1994; Peretz et al., 1997 (2); Caron et al., 1996; Pasini et al., 2002
C618S	6	Borst et al., 1995 (2); Decker et al., 1998a; Decker et al., 1998b (3)
C620R	14	Mulligan et al., 1994 (3); Blank et al., 1996; Decker et al., 1998a; Decker et al., 1998b; Romeo et al., 1998; Sijmons et al., 1998; Swenson et al., 1998; Gilchrist et al., 2004; Skaba et al., 2006; Fialkowski et al., 2008; Moore und Zaahl, 2009 (2)
C620S	9	Romeo et al., 1998; Borrego et al., 1998; Inoue et al., 1999; Sasaki et al., 2001; Fitze, 2004; Bütter et al., 2007 (4)
C620W	2	Decker et al., 1998b; Moore et al., 2007
C609Y	7	Sijmons et al., 1998; Decker et al., 1998a (2); Decker et al., 1998b (2); Skaba et al., 2006; Fialkowski et al., 2008
C609S	1	Fitze, 2004
C609R	1	Munnes et al., 2000
C611S	1	Nishikawa et al., 2003
unbekannt	4	Verdy et al., 1982; Azzis et al., 1996

Insgesamt sind 50 Familien beschrieben, in denen bei zugrunde liegender MEN2a-typischer Mutation im Exon 10 MEN2a und M. Hirschsprung koinzident auftreten. Doppelbeschreibungen wurden anhand aller verfügbaren Information identifiziert und als solche berücksichtigt.

Die Mutation C620R wurde in 14 Fällen und somit am häufigsten beschrieben, die Mutationen C609R und C611S bislang nur einmal.

Angaben zur Aganglionoselänge finden sich bei 16 Individuen. In 8 Fällen lag ein kurzstreckiger Befall vor; in 8 Fällen war die Aganglionose ausgedehnt, wobei sechsmal das gesamte Kolon betroffen war. Mit Ausnahme einer Veröffentlichung (Azzis et al., 1996) beschreiben alle Fallberichte familiäre Fälle.

### 3.2.3 Persönliche Korrespondenz

Die Autoren der Studien wurden angeschrieben und bezüglich inzwischen neu entdeckter Patienten mit M. Hirschsprung und MEN2a bzw. FMTC befragt. Es antworteten R. Hofstra aus der Groninger Arbeitsgruppe und G. Fitze von der TU Dresden.

R. Hofstra teilte am 23.12.2009 mit, dass in seiner Arbeitsgruppe bislang bei 300 Patienten mit M. Hirschsprung das *RET*-Gen untersucht wurde. Dabei seien insgesamt nur bei den drei bereits beschriebenen Patienten (Sijmons et al., 1998) MEN2a-typische Mutationen nachgewiesen worden. Damit liegt die Häufigkeit dieser Mutationen in der Groninger Studienpopulation bei 1,0%.

G. Fitze teilte am 28.12.2009 ebenfalls mit, dass bei insgesamt 300 untersuchten Patienten nur in den drei bereits veröffentlichten (Fitze et al., 2002, Fitze, 2004) Fällen eine Mutation im Exon 10 gefunden wurde. Auch in der Population der Dresdener Arbeitsgruppe liegt damit die Prävalenz bei 1,0%.

## 4 Diskussion

### 4.1 Epidemiologische Daten

#### 4.1.1 Umfang der Stichprobe

Insgesamt konnten 77 Patienten mit histologisch gesichertem M. Hirschsprung in die Studie eingeschlossen werden. Bei einem angenommenen Anteil von 4% Mutationsträgern - diese Schätzung basierte auf den zum Zeitpunkt der Konzeption der Studie vorliegenden Publikationen - konnten wir mit mindestens 95%iger Wahrscheinlichkeit mindestens einen Mutationsträger erwarten.

#### 4.1.2 Alter und Geschlecht

In unserer Stichprobe beträgt das Geschlechterverhältnis (männlich:weiblich) insgesamt 4:1 und entspricht somit den in der Literatur angegebenen Werten. Auch die Angleichung des Verhältnisses mit zunehmender Länge der Aganglionose spiegelt sich in unseren Ergebnissen wider: Während bei der kurzstreckigen Aganglionose das Verhältnis 5,5:1 beträgt, ist es bei der langstreckigen Form 3:1 und beim M. Hirschsprung mit Dünndarmbeteiligung sogar 1:2. Es lässt sich somit bestätigen, dass Mädchen deutlich seltener erkranken als Jungen, aber wenn, dann schwerwiegender (Badner et al., 1990).

#### 4.1.3 Familienanamnese

In 5-10% der Fälle tritt der M. Hirschsprung familiär gehäuft auf (Badner et al., 1990). Von unseren 77 untersuchten Patienten hatten 7 Patienten ebenfalls von der Erkrankung betroffene Familienangehörige. Es handelte sich um drei Geschwisterpaare und eine Einzelperson aus insgesamt vier Familien. Auch der Anteil der familiären Erkrankungen entspricht mit 9,1% den in der Literatur angegebenen Werten.

## 4.2 Klinische Daten

In unserem Kollektiv ging die Aganglionose zu 79,7% nicht über das Sigma hinaus, in 20,3% lagen langstreckige Formen mit Aganglionose des Kolons bis zur Dünndarmbeteiligung vor. Das Verhältnis kurz- zu langstreckig entspricht mit 3,9:1 somit den in der Literatur angegebenen Daten. In der Gruppe der Patienten, die nicht geantwortet hatten, konnte bei 40 der 62 Betroffenen die Aganglionoselänge bestimmt werden. Hier ergab sich ein entsprechendes Verhältnis von 4:1. Ein relevanter Rücklaufbias kann damit weitgehend ausgeschlossen werden.

Patienten, die Träger einer MEN2-typischen Mutation sind, entwickeln zu 90% ein medulläres Schilddrüsenkarzinom, meistens als Erstmanifestation des MEN2a-Syndroms (Brandi et al., 2001). Typischerweise liegt das Manifestationsalter bei der familiären Form zwischen 30 und 40 Jahren, während das sporadische Karzinom den Häufigkeitsgipfel zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr hat. In unserer Studie sind 29 Patienten über 20 Jahre alt und davon acht über 30 Jahre. Bei keinem der Patienten wurde bislang ein MTC nachgewiesen. Die Klinik korreliert somit mit den molekularen Untersuchungen, in denen bei keinem Patienten eine MEN2a-typische Mutation gefunden wurde.

Assoziierte Fehlbildungen treten in 30% der Hirschsprung-Erkrankungen auf, wobei es sich in 12% um Fehlbildungen im Rahmen syndromaler Formen handelt, bei denen die zugrunde liegende Mutation nicht im *RET*-Gen liegt (Moore, 2006). Um die Wahrscheinlichkeit, dass bei unserer Stichprobe andere Gene als *RET* in die Pathogenese involviert sind, zu reduzieren, schlossen wir die syndromalen Formen der Erkrankung aus.

Bei den nicht-syndromalen individuellen Fehlbildungen, die in ca. 18% vorkommen (Amiel et al., 2008), sind vor allem der Gastrointestinaltrakt, das zentrale Nervensystem, das Herz und der Urogenitaltrakt betroffen (Moore, 2006; Parisi und Kapur, 2000). In unserer Studie bestanden bei drei Patienten nicht-syndromale Fehlbildungen, davon war bei zwei Patientinnen das Urogenitalsystem betroffen. Bei einem weiteren Patienten war die Familienanamnese diesbezüglich positiv. Urogenitalanomalien sind in 5,6% bis 7,3% mit dem M. Hirschsprung assoziiert (Parisi und Kapur, 2000) und umfassen Nierenanomalien, Ureterduplikaturen, Hydronephrose/Hydroureter und Blasenfunktionsstörungen (Moore, 2006). Wir fanden einen Anteil von 2,6%, wobei dieses Ergebnis nicht auf klinischer und

bildgebender Diagnostik, sondern auf Eigenangaben der Patienten beruht. Asymptomatische Fälle wurden somit nicht erfasst.

Eine hohe *RET*-Expression findet sich während der Embryogenese sowohl in der Niere als auch im enterischen Nervensystem. Im Mausmodell haben homozygot-*RET*-defiziente Mäuse nicht nur eine langstreckige Kolonaganglionose, sondern auch eine Nierenagenesie und sind nicht lebensfähig (Schuchardt et al., 1994), das gleiche gilt für *GDNF*-knockout-Mäuse (Moore et al., 1996). Prato et al. suchten gezielt nach urogenitalen Anomalien bei Hirschsprung-Patienten und fanden bei 21 von 84 untersuchten Hirschsprung-Patienten kongenitale Fehlbildungen, um den Faktor 4 mehr als erwartet. Am häufigsten kamen Hydronephrosen und Hypospadien vor, 12 Fehlbildungen waren asymptomatisch (Prato et al., 2009). Beim Hirschsprung sind Nierenaplasien bzw. -agenesien in bis zu 4,4% beschrieben (Amiel et al., 2008), das ist deutlich häufiger als bei Nicht-Hirschsprung-Patienten, bei denen eine unilaterale Nierenagenesie in 0,2% und eine Nierenaplasie in 0,1% vorkommt (Bühling, 2004). Diese Daten zeigen zum einen die Bedeutung des *RET*-Gens auf die Nierenentwicklung auch beim Menschen, zum anderen sollten sie Anlass dafür sein, bei Neugeborenen mit M. Hirschsprung auch an Nierenfehlbildungen zu denken.

Eine unserer Patientinnen leidet zusätzlich unter einem Klippel-Feil-Syndrom (Blockwirbelbildung im Halsbereich) mit einer Sprengeldeformität (fixierter Schulterblatthochstand). Skelettfehlbildungen sind in 5,1% mit der kongenitalen Aganglionose assoziiert, es handelt sich jedoch hauptsächlich um Muskelerkrankungen oder Polydaktylie. Ein Zusammenhang des Klippel-Feil-Syndroms mit dem M. Hirschsprung wurde bislang nicht beschrieben.

### 4.3 Genetische Daten

In unserer Studie fanden wir bei keinem der 77 Patienten eine MEN2a-typische Mutation im Exon 10 des *RET*-Protoonkogens, ebenso wurden keine anderen Mutationen oder Polymorphismen in dem untersuchten Exon festgestellt.

Bei einer Prävalenz der MEN2a-verursachenden Mutationen von 4% und einer repräsentativen Studienpopulation von 77 Patienten beträgt der Erwartungswert

der Mutationsträgeranzahl 3,08. Wegen  $P_M = 1 - P_W = 1 - p_w^n$  (siehe 2.1.1) ist unter gleichen Bedingungen die Wahrscheinlichkeit, mindestens einen Mutationsträger zu finden, 95,7%. Damit unterscheidet sich die von uns gefundene Mutationsrate von 0% signifikant von 4%. Das Konfidenzintervall beträgt [0;3,8].

Aus der Zusammensetzung unserer Studienpopulation erklärt sich die Abweichung unseres Ergebnisses von den in der Literatur angegebenen höheren Prävalenzen nicht. Sowohl hinsichtlich des Geschlechterverhältnisses als auch der Anganglioselängen und des familiären Auftretens entspricht unser Patientengut den Literaturangaben.

#### 4.4 Literaturrecherche

Unser Ergebnis soll im Folgenden vor dem Hintergrund der Literaturrecherche bewertet werden.

##### 4.4.1 Umfang

In der Datenbank *Medline* findet sich vor allem die angloamerikanische Literatur, während *MBase* die europäische Literatur umfasst.

Die Recherche in *Web of Science*, die zum einen über die gleiche Suchstrategie wie in den anderen beiden Datenbanken, zum anderen über die Zitierung des ältesten Artikels (Verdy et al., 1982) erfolgte, diente der Kontrolle und zeigte die gleichen Ergebnisse an. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die durchgeführte Recherche die relevante Literatur nahezu vollständig erfasst.

##### 4.4.2 Studien mit Hirschsprung-Patienten

In 14 Studien wurde das Auftreten von *RET*-Mutationen beschrieben. Die Häufigkeit von Mutationen im *RET*-Gen insgesamt wird mit bis 41% (Attie et al., 1995a), von zu MEN2-prädisponierenden Exon 10-Mutationen bis 5% angegeben (Sijmons et al., 1998).



Die meisten Studien wurden in Europa durchgeführt, mit Schwerpunkt in den Niederlanden, Schweden, Tschechien, Spanien und Italien. Somit wurden hauptsächlich Kaukasier getestet. Die gefundenen Mutationsraten weichen erheblich voneinander ab.

Während erste Studien die Prävalenz von *RET*-Mutationen beim sporadischen M. Hirschsprung auf bis zu 35% bezifferten (Attie et al., 1995a), wurden in neueren Studien deutlich geringere Häufigkeiten angegeben. Swenson fand bei schwedischen Hirschsprung-Patienten lediglich in 7,0% *RET*-Mutationen, ebenso Sancandi bei englischen Patienten (Swenson et al., 1998; Sancandi et al., 2000). Eine wahrscheinliche Erklärung für die Diskrepanz ist, dass in den früheren Studien mehr Patienten mit ausgedehnteren Aganglionoseformen eingeschlossen wurden, was nicht der normalen Verteilung entspricht. In den letzten Jahren wurden breiter angelegte Studien mit einem höheren Anteil kurzsegmentaler Erkrankungen durchgeführt, bei denen Mutationen in den kodierenden Regionen des *RET*-Gens seltener zu finden sind. In unserer Studie wurde lediglich das Exon 10 untersucht, nicht das gesamte *RET*-Gen, so dass wir keine Aussage über die allgemeine Häufigkeit von *RET*-Mutationen machen können.

In den Studien, die MEN2-Mutationen bei M. Hirschsprung nachgewiesen haben, zeigt sich in der Studie von Skaba eine deutliche Selektion des Patientenguts (Skaba et al., 2006). Das Patientenkollektiv bestand aus einer prospektiven (34 Patienten) und einer retrospektiven (22 Patienten) Gruppe mit sporadischem M. Hirschsprung. In die retrospektive Gruppe wurden hauptsächlich Patienten mit totaler Aganglionose des Kolons (TCA) eingeschlossen, einer mit 3–8% seltenen Manifestationsform des M. Hirschsprung mit hoher Mutationswahrscheinlichkeit. Patienten mit sogenanntem ultrakurzen Segment wurden ausgeschlossen. Erwartungsgemäß wurden auch beide Exon 10-Mutationen bei Patientinnen mit TCA gefunden. Diese Selektion bezüglich sehr schwerer Krankheitsfälle, die in unserer Studie nicht stattgefunden hat, ist eine Erklärung für die hohe Rate MEN2a-typischer Mutationen in der Studie von Skaba. Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass eine langstreckige Aganglionose nicht nur die Wahrscheinlichkeit für *RET*-Mutationen allgemein, sondern auch das Risiko für eine MEN2a-typische Exon 10-Mutation erhöht.

In der Studie von Sijmons et al. wurden 60 Patienten mit M. Hirschsprung untersucht (Sijmons et al., 1998). Mutationen im Exon 10 wurden bei einem Mädchen mit langstreckiger Aganglionose und positiver Familienanamnese bezüglich MEN2a und bei einer Frau mit kurzstreckigem Hirschsprung und negativer Familienanamnese gefunden. Bei einem vierjährigen Jungen wurde eine Mutation im Exon 10 entdeckt, die bei den Eltern nicht vorhanden war und daher wahrscheinlich de novo entstanden ist.

Leider ist nicht beschrieben, wie das Patientenkollektiv zusammengesetzt ist, ob es sich also um familiäre oder sporadische Fälle handelt und wie viele Patienten eine kurz- oder eine langstreckige Aganglionose haben. Bemerkenswert ist aber, dass zwei Patienten mit kurzem Segment, bei denen die Familienanamnese negativ ist, betroffen sind.

Die Datenlage zeigt aber insgesamt, dass in einem unselektionierten Patientengut sowohl die *RET*-Mutationen im Allgemeinen als auch speziell die Mutationen im Exon 10 beim M. Hirschsprung nicht so häufig sind wie zunächst angenommen. Im Gegenteil, in manchen Studien wurde wie bei uns keine Mutationen im Exon 10 gefunden.

Die Korrespondenz mit R. Hofstra und G. Fitze ergab, dass auch in den beiden großen Arbeitsgruppen lediglich insgesamt bei jeweils 3 von 300 Patienten diese MEN2a-typischen Mutationen gefunden worden, und das Risiko einer MEN2a-typischen Mutation bei ca. 1,0% liegt. Die Veröffentlichung von Sijmons beschreibt dabei genau die drei Patienten, die in der niederländischen Arbeitsgruppe bislang gefunden worden, damals bezogen auf 60 Hirschsprung-Patienten, heute bezogen auf 300 Patienten.

Zusammenfassend wurde unter Berücksichtigung der Studien und der persönlich kommunizierten Daten bei 13 von 1299 Patienten mit M. Hirschsprung eine MEN2a-typische Mutation im Exon 10 beschrieben. Die weltweite Inzidenz dieser Mutationen bei der kongenitalen Aganglionose beträgt somit 1,0%.

#### 4.4.3 Fallberichte

Aus den Fallberichten kann keine Aussage über die Prävalenz von MEN2a-typischen Exon 10-Mutationen getroffen werden. Sie geben jedoch zusätzliche Hinweise auf Phänotypen, die ein erhöhtes Risiko für eine MEN2a-typische Exon 10-Mutation aufweisen.

Bezüglich der Ausdehnung der Aganglionose bei den Hirschsprung/MEN2-Patienten wurden insgesamt leider nur vereinzelte Angaben gemacht. Die Gesamtheit der verfügbaren Daten (Studien und Fallberichte) ergibt jedoch einen deutlichen Hinweis auf die Aganglionoselänge als Risikofaktor für das Vorliegen der Mutation. Das Verhältnis von kurz- zu langstreckiger Aganglionose, das bei der Hirschsprungerkrankung allgemein bei 80:20 liegt, beträgt bei den Trägern der untersuchten Mutation 46:54. Der Anteil der Patienten mit totaler Kolonaganglionose ist mit 35% deutlich erhöht gegenüber 3-8% in der gesamten Hirschsprung-Population. Auch Fälle mit positiver Familienanamnese sind bei den Patienten mit Exon 10-Mutation gegenüber der sonstigen Hirschsprungpopulation überrepräsentiert. In den ausgewerteten Studien beträgt das Verhältnis familiärer zu sporadischer Fälle bei den Mutationsträgern 7:2. Für alle Hirschsprung-Patienten wird der Anteil familiärer Fälle mit 5-10% angegeben. Unter den Patienten der ausgewerteten Studien beträgt er 18%. Die Fallberichte beschreiben mit einer Ausnahme (Azzis et al., 1996) ausschließlich Familien (14:1 Fälle). Auch wenn hier mit einer Verzerrung durch selektive Publikation gerechnet werden muss, wird eine positive Familienanamnese als Risikofaktor deutlich. Weibliches Geschlecht stellt insofern eine Prädisposition dar, als dass Mädchen mit M. Hirschsprung tendenziell häufiger eine langstreckige Aganglionose aufweisen als Jungen. Ob das Geschlecht unabhängig davon ein selbstständiger Risikofaktor ist, lässt sich nicht beurteilen; es liegen nur in Einzelfällen Angaben zum Geschlecht vor.

#### 4.5 Folgerungen für die Screening-Praxis

Da das Auftreten von medullären Schilddrüsenkarzinomen bei Patienten und Familien mit M. Hirschsprung und Mutationen in den Codons 609, 618 und 620 des *RET*-Protoonkogens beschrieben wurde, sprach sich eine internationale

Gruppe von Endokrinologen auf dem 7. internationalen Workshop für multiple endokrine Neoplasien 1999 für ein generelles Screening des Exon 10 des *RET*-Protoonkogens bei allen Patienten mit M. Hirschsprung aus (Brandi et al., 2001).

Unsere Studie zeigt, dass MEN2a-verursachende Mutationen bei in Norddeutschland wohnenden Patienten mit M. Hirschsprung seltener sind als nach Veröffentlichungen aus den Niederlanden oder Tschechien zunächst erwartet werden konnte. Mögliche Gründe für diese Diskrepanz sind auf zwei Ebenen zu vermuten. Zum einen deutet die Studienlage auf eine von der jeweils untersuchten Bevölkerungsgruppe abhängige genetische Disposition hin. Daher ist die Annahme plausibel, dass unser Ergebnis die regionale Variabilität der Mutationshäufigkeit widerspiegelt. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass frühere Untersuchungen an einem nicht-repräsentativen Patientengut durchgeführt wurden. Eine genaue Analyse der Literatur weist auf einen starken Einfluss der Aganglionoselänge hin. In unserer unselektierten Studienpopulation findet sich ein erwartungsgemäß hoher Anteil von Patienten mit kurzen Aganglionosen. Gestützt wird diese Bewertung durch ähnliche Ergebnisse anderer Untersuchungen sowie durch die referierten persönlichen Mitteilungen, wonach in großen unselektionierten Hirschsprung-Populationen Mutationshäufigkeiten um 1% gefunden wurden. Eine Abschätzung dieser möglichen Einflüsse ist angesichts der anerkannt geringen Mutationshäufigkeit nicht möglich. Das Ergebnis gibt jedoch Anlass, die Empfehlung eines generellen Screenings aller Hirschsprung-Patienten in Norddeutschland kritisch zu hinterfragen. Eine sinnvolle Praxis, die unnötige Belastungen von Patienten vermeidet und Ressourcen schont, sollte nicht nur alle verfügbaren klinischen Informationen nutzen, sondern auch bei der Entscheidung über den zu screenenden Abschnitt differenzieren. Neben einer Untersuchung des gesamten *RET*-Gens ist auch die selektive Sequenzierung wahrscheinlich betroffener Exons in Betracht zu ziehen.

Die aktuelle Datenlage zeigt, dass Exon 10-Mutationen sowohl bei Patienten mit langstreckiger als auch mit kurzer Aganglionose zu beobachten sind und sowohl beim männlichen als auch beim weiblichen Geschlecht auftreten (siehe Tabellen 15 und 16). Diese Mutationen finden sich jedoch fast ausschließlich bei Patienten mit M. Hirschsprung, die eine positive Familienanamnese für MEN2, entweder MEN2a oder FMTC, haben. Lediglich 9 Patienten ohne bisherigen Hinweis auf

eine positive Familienanamnese wurden bislang beschrieben (Attie et al., 1995a; Angrist et al., 1995; Seri et al., 1997; Sijmons et al., 1998; Azzis et al., 1996). Es ist also zu empfehlen, bei jedem Hirschsprung-Patienten eine umfassende Familienanamnese zu erheben. Bei Auffälligkeiten bezüglich Schilddrüsenerkrankungen und -operationen bei Familienmitgliedern, aber auch fraglichen Phäochromozytomen (Sasaki et al., 2001) sollte auf jeden Fall eine genetische Untersuchung des Exon 10 erfolgen, ebenso bei Patienten mit ausgedehnter Aganglionose.

Wir haben in dieser Studie in Übereinstimmung mit der Konsensusgruppe lediglich das Exon 10 untersucht, da in nahezu allen Fällen koinzidenter Erkrankungen dieser Genabschnitt betroffen ist. Es sind mittlerweile jedoch 5 Fälle von Patienten mit M. Hirschsprung und einer Mutation in Exon 13 beschrieben (Skaba et al., 2006; Ruiz-Ferrer et al., 2006; Vaclavikova et al., 2009).

Es handelt sich jeweils um die Mutation Tyr791Phe, die selten beim alleinigen familiären Schilddrüsenkarzinom vorkommt und als Risikogruppe 3 klassifiziert wird. In allen Beschreibungen gab es bislang keinen Anhalt für ein medulläres Schilddrüsenkarzinom bei dem Patienten bzw. in seinem familiären Umfeld. Da medulläre Schilddrüsenkarzinome bei dieser Mutationen im Allgemeinen jedoch erst später auftreten (Erkrankungsgipfel 40. bis 50. Lebensjahr), sollten diese Patienten sorgsam beobachtet werden. Eine komplette Durchsequenzierung des *RET*-Gens ist nicht erforderlich, da die MEN2a- und FMTC-verursachenden Mutationen auf die Exons 10, 11 sowie 13 bis 16 begrenzt sind. In den Fällen, in denen eine Untersuchung des *RET*-Gens auf jeden Fall durchgeführt werden sollte (positive Familienanamnese für MTC, ausgedehnte Aganglionose), ist jedoch ein Screening dieser 6 Exons zu diskutieren, auch wenn bislang nur bei M. Hirschsprung-Patienten mit Mutationen im Exon 10 tatsächlich medulläre Schilddrüsenkarzinome beschrieben worden sind.

Die vorliegende Arbeit liefert aktuelle Daten für eine risikostratifizierte genetische Beratung von Patienten mit M. Hirschsprung und deren Familien und für die Entwicklung neuer Empfehlungen für ein genetisches Screening. Die Penetranz der bekannten *RET*-Gen-Mutationen für das medulläre Schilddrüsenkarzinom ist sehr hoch und die Erkrankung durch eine frühzeitige Thyreoidektomie zu verhindern, während das bereits metastasierte MTC eine schlechte Prognose

aufweist. Dadurch haben sowohl der Nachweis als auch der Ausschluss MTC-prädisponierender Mutationen eine hohe klinische Relevanz für die weitere Therapie. Eine frühe Operation verhindert den Ausbruch der Erkrankung, der Ausschluss einer prädisponierenden Mutation macht Vorsorgeuntersuchungen überflüssig und reduziert die psychische Belastung der Patienten, die durch die Sorge vor einer malignen Erkrankung entstehen kann. Dem Nutzen müssen die Kosten der genetischen Beratung und Untersuchung gegenüber gestellt werden. Unbestritten ist der Nutzen der Sequenzierung des Exon 10 bei Patienten mit hohem Risiko (langstreckige Aganglionose, positive Familienanamnese). Ob - wie in der Konsensusempfehlung vorgesehen- auch Patienten ohne entsprechende Risikofaktoren in das Screening einzubeziehen und auch die Exons 11 und 13 - 16 zu untersuchen sind, sollte anhand der aktuellen Datenlage erneut in einer Konsensuskonferenz diskutiert werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die aktuellen Konsensusempfehlungen in endokrinologischen Fachkreisen gut bekannt sind, aber die Umsetzung durch Fachdisziplinen, die Kinder mit Aganglionosen betreuen, d.h. Kinderchirurgie und Kinder- und Jugendmedizin, kaum erfolgt. Diese Fachdisziplinen sollten daher intensiver in die Erarbeitung von Screeningempfehlungen eingebunden werden und für die Verbreitung der Empfehlungen in ihren Fachkreisen sorgen.

## 5 Zusammenfassung

Mutationen im *RET*-Protoonkogen verursachen sowohl das multiple endokrine Neoplasie-Syndrom Typ 2a als auch das kongenitale Megakolon (M. Hirschsprung). Während es sich bei der multiplen endokrinen Neoplasie um aktivierende Mutationen handelt, führen die Mutationen beim M. Hirschsprung zum Funktionsverlust des Proteins. In der Literatur finden sich Berichte, die das gleichzeitige Vorkommen beider Erkrankungen bei einem Patienten bzw. in einer Familie beschreiben; die Ursache ist dabei jeweils eine typische MEN2a-verursachende Mutation im Exon 10 des *RET*-Protoonkogens. Die Diagnose M. Hirschsprung birgt somit ein gewisses Risiko, zusätzlich an einem medullären Schilddrüsenkarzinom zu erkranken. Studien schätzten die Mutationshäufigkeit auf 3 bis 5 %. Auf dieser Grundlage wurde von einem internationalen Konsortium („Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2“) die Empfehlung ausgesprochen, jeden Hirschsprung-Patienten auf diese Mutationen hin zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Relevanz dieser Empfehlung für die Betreuung von Patienten in Norddeutschland kritisch zu prüfen. Zu diesem Zweck wurde bei 77 Patienten mit histologisch nachgewiesenem M. Hirschsprung das Exon 10 des *RET*-Protoonkogens mittels eines DNA-Extraktes aus Mundschleimhautzellen auf MEN2a-typische Mutationen untersucht. Bei keinem der Patienten wurde eine Mutation in diesem Genabschnitt entdeckt. Das Konfidenzintervall der Prävalenz beträgt [0;3,8].

Desweiteren führten wir eine umfassende Auswertung der Literatur zur weltweiten Prävalenz dieser Mutation bei Patienten mit M. Hirschsprung durch und ergänzten diese durch persönliche Korrespondenz mit den Autoren. Insgesamt wurden bei 1299 untersuchten Patienten mit M. Hirschsprung 13 Fälle mit MEN2a-typischen Exon 10-Mutationen erfasst. Die Prävalenz beträgt 1,0%. Die nähere Analyse der klinischen Daten ergab, dass ausgedehnte Aganglionose und positive Familienanamnese die wesentlichen Risikofaktoren für das Vorliegen der Mutation darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, die Entscheidung über ein Screening nicht allein auf die Diagnose M. Hirschsprung zu stützen, sondern von Klinik und Familienanamnese abhängig zu machen. Bei Vorliegen entsprechender Risikofaktoren empfiehlt sich ein Screening des Exon 10. Zu diskutieren ist auch die Untersuchung der Exons 11, 13, 14, 15 und 16 des *RET*-Gens, da Mutationen in diesen Abschnitten ebenfalls ein Risiko für die Entwicklung von Schilddrüsentumoren darstellen. Mutationsträger sind entsprechend der Leitlinie für multiple endokrine Neoplasien zu versorgen.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Airaksinen MS, Saarma M: The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature* 3: 383-394 (2002)
2. Amiel J, Attie T, Jan D, Pelet A, Edery P, Bidaud C, Lacombe D, Tam P, Simeoni J, Flori E, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Lyonnet S: Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5(3): 355-357 (1996)
3. Amiel J, Lyonnet S: Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet* 38, 729-739 (2001)
4. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S: Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 33: 1-3 (2003)
5. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Zizza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KKY, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PKH, Ceccherini I, Hofstra RMW, Fernandez R: Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 45: 1-14 (2008)
6. Angrist M, Kauffman E, Slaugenhaupt SA, Matise TC, Puffenberger EG, Washington SS, Lipson A, Cass DT, Reyna T, Weeks DE, Sieber W, Chakravarti A: A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nat Genet* 4: 351-356 (1993)
7. Angrist M, Bolk S, Thiel B, Puffenberger EG, Hofstra RM, Buys CH, Cass DT, Chakravarti A: Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4: 821-830 (1995)
8. Angrist M, Bolk S, Halushka M, Lapchak PA, Chakravarti A: Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. *Nat Genet* 14: 341-344 (1996)

9. Arighi E, Popsueva A, Degl'Innoncenti D, Borrello MG, Carniti C, Perala NM, Pierotti MA, Sariola H: Biological Effects of the Dual Phenotypic Janus Mutation of *ret* Cosegregating with both Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 and Hirschsprung's Disease. *Mol Endocrin* 18 (4): 1004-1017 (2004)
10. Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Takahashi M: Mechanism of Activation of the *ret* Proto-Oncogene by Multiple Endocrine Neoplasia 2A Mutations. *Mol. Cell. Biol.* 15 (3): 1613-1619 (1995)
11. Attie T, Pelet A, Edery P, Eng C, Mulligan LM, Amiel J, Boutrand L, Beldjord C, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Ponder PAJ, Lyonnet S: Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4:1381-1386 (1995), zitiert: Attie et al., 1995a
12. Attie T, Till M, Pelet A, Amiel J, Edery P, Boutrand L, Munnich A, Lyonnet S: Mutation of the Endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4 (12): 2407-2409 (1995), zitiert: Attie et al., 1995b
13. Attié-Bitach T, Abitbol M, Gérard M, Delezoide AL, Augé J, Pelet A, Amiel J, Pachnis V, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M: Expression of the RET Proto-Oncogene in Human Embryos. *Am J Med Genet* 80: 481-486 (1998)
14. Auricchio A, Casari G, Staiano A, Ballabio A: Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum Mol Genet* 5(3): 351-354 (1996)
15. Azzis O, Fremond B, Dabadie A, Jouan J, Bracq H, Babut JM: Total colonic form of Hirschsprung disease. Treatment and long term follow-up in 16 cases. *Chirurgie* 121 (3): 225-229 (1996)
16. Badner J A, Sieber WK, Garver K L, Chakravarti A: A Genetic Study of Hirschsprung Disease. *Am J Hum Genet* 46: 568-580 (1990)
17. Blank RD, Sklar CA, Dimich AB, LaQuaglia MP, Brennan MF: Clinical Presentations and RET Protooncogene Mutations in Seven Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 Kindreds. *Cancer* 78 (9): 1996-2003 (1996)
18. Block MA, Jackson CE, Greenawald KA, Yott JB, Tashjian AH: Clinical Characteristics Distinguishing Hereditary from Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Arch Surg* 115(2): 142-148 (1980)
19. Bodian M, Stephens FD, Ward BCH: Hirschsprung's Disease and Idiopathic Megacolon. *The Lancet* 6-11 (1949)

20. Bodian M, Carter CO: A family study of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet* 26, 261-277 (1963)
21. Bolande RP: The Neurochristopathies. *Hum Pathol* 5 (4): 409-29 (1974)
22. Bolk S, Pelet A, Hofstra RM, Angrist M, Salomon R, Croaker D, Buys CH, Lyonnet S, Chakravarti A: A human model for multigenetic inheritance: Phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(1): 268-273 (2000)
23. Bolk Gabriel S, Salomon R, Pelet A, Angrist M, Amiel J, Fornage M, Attié-Bitach T, Olson JM, Hofstra R, Buys C, Steffann J, Munnich A, Lyonnet S, Chakravarti A: Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet* 31: 89-93 (2002)
24. Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M, Bredesen DE, Edery P, Mehlen P: The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO Journal* 19 (15): 4056-4063 (2000)
25. Borrego S, Eng C, Sanchez B, Saez ME, Navarro E, Antinolo G: Molecular Analysis of the *ret* and GDNF Genes in a Family with Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A and Hirschsprung Disease. *J Clin Endocrin Metab* 83(9): 3361-3364 (1998)
26. Borrego S, Saez ME, Ruiz A, Gimm O, Lopez-Alonso M, Antinolo G, Eng C: Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet* 36: 771-774 (1999)
27. Borrego S, Ruiz A, Saez ME, Gimm O, Gao X, Lopez-Alonso M, Hernandez A, Wright FA, Antinolo G, Eng C: RET genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. *J Med Genet* 37: 572-578 (2000)
28. Borrego S, Wright FA, Fernandez RM, Williams N, Lopez-Alonso M, Davuluri R, Antinolo G, Eng C: A Founding Locus within the RET Proto-Oncogene may account for a large Proportion of apparently sporadic Hirschsprung Disease and a Subset of Cases of Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Am. J. Hum. Genet* 72: 88-100 (2003)

29. Borst MJ, VanCamp JM, Peacock ML, Decker RA: Mutational analysis of multiple endocrine neoplasia type 2A associated with Hirschsprung's disease. *Surgery* 117: 386-391 (1995)
30. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJM, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BAJ, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA, Marx SJ: Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. *J of Clin Endocrin* 86: 5658-5671 (2001)
31. Brooks AS, Bertoli-Avella AM, Burzynski GM, Breedveld GJ, Osinga J, Boven LG, Hurst JA, Mancini GMS, Lequin MH, de Coo RF, Matera I, de Graaff E, Meijers C, Willems P, Tibboel D, Oostra BA, Hofstra RMW : Homozygous Nonsense Mutations in KIAA1279 are associated with Malformations of the Central and Enteric Nervous System. *Am J Hum Genet* 77: 120-126 (2005)
32. Brooks AS, Leegwater PA, Burzynski GM, Willems PJ, de Graaf B, van Langen I, Heutink P, Oostra BA, Hofstra RMW, Bertoli-Avella: A novel susceptibility locus for Hirschsprung's disease maps to 4q31.3-q32.3. *J Med Genet* 43: e35 (2006)
33. Bühling JK: Niere und ableitende Harnwege. In: Bühling KJ, Lepenies J, Witt K: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 3. Aufl., Kap. 21: 306-307, Urban&Fischer, München, 2004
34. Buetter A, Gagné J, Al-Jazaeri A, Emran MA, Deal C, St-Vil D: Prophylactic thyroidectomy in pediatric carriers of multiple endocrine neoplasia type 2A or familial medullary thyroid carcinoma: mutation in C620 is associated with Hirschsprung's disease. *J Ped Surg* 42 (1): 203-206 (2007)
35. Cacheux V, Dastot-Le Moal F, Kaariainen H, Bondurand N, Rintala R, Boissier B, Wilson M, Mowat D, Goossens M: Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 10 (14): 1503-1510 (2001)
36. Callaghan RP, Nixon HH: Megarectum: Physiological Observations. *Arch Dis Child* 39: 153-157 (1964)
37. Cantrell VA, Owens SE, Chandler RL, Airey DC, Bradley KM, Smith JR, Southard-Smith EM: Interactions between *Sox10* and *EdnrB* modulate

- penetrance and severity of aganglionosis in the Sox10Dom mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 13(19): 2289-2301 (2004)
38. Carlomagno F, De Vita G, Berlingieri MT, de Franciscis V, Melillo RM, Colantuoni V, Kraus MH, Di Fiore PP, Fusco A, Santoro M: Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. *Embo J* 15(11): 2717 -2725 (1996)
  39. Carlomagno F, Salvatore G, Cirafici AM, De Vita G, Melillo RM, de Franciscis V, Billaud M, Fusco A, Santoro M: The Different RET-activating Capability of Mutations of Cysteine 620 or Cysteine 634 Correlates with the Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 Disease Phenotype. *Cancer Res.* 57: 391-395 (1997)
  40. Caron P, Attie T, David D, Amiel J, Brousset F, Roger P, Munnich A, Lyonnet S: C618R Mutation in Exon 10 of the RET Proto-Oncogene in a Kindred with Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A and Hirschsprung's Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (7): 2731-2733 (1996)
  41. Carrasquillo MM, McCallion AS, Puffenberger EG, Kashuk CS, Nouri N, Chakravarti A: Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nature* 32: 237-244 (2002)
  42. Charlier C, Segers K, Karim L, Shay T, Gyapay G, Cockett N, Georges M: Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet* 27: 368-370 (2001)
  43. Dastot-Le Moal F, Wilson M, Mowat D, Collot N, Niel F, Goossens M: ZFX1B mutations in patients mit Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mutat* 28 (4): 313-321 (2006)
  44. Decker RA, Peacock ML: Occurrence of MEN 2a an Familial Hirschsprung's Disease: A New Indication for Genetic Testing of the RET Proto-Oncogene. *J Ped Surg* 33 (2): 207-214 (1998), zitiert: Decker et al., 1998a
  45. Decker RA, Peacock ML, Watson, P: Hirschsprung disease in MEN 2A: increased spectrum of RET exon 10 genotypes and strong genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 7 (1): 129-134 (1998), zitiert: Decker et al., 1998b

46. de Groot JWB, Sijmons RH, Links TP, Plukker JTM, Hofstra RMA: Medullary Thyroid Cancer in a Patient with Hirschsprung Disease with a C609Y Germline RET-mutation. *J Ped Gastroenterol* 40: 226-229 (2005)
47. de la Torre-Mondragón L, Ortega-Salgado JA: Transanal Endorectal Pull-Through for Hirschsprung's Disease. *J Ped Surg* 33 (8): 1283-1286 (1998)
48. de Lorijn F, Boeckxstaens GE, Benninga MA: Symptomatology, Pathophysiology, Diagnostic Work-up, and Treatment of Hirschsprung Disease in Infancy and Childhood. *Ped Gastr* 9: 245-253 (2007)
49. Doray B, Salomon R, Amiel, Pelet A, Touraine R, Billaud M, Attie T, Bachy B, Munnich A, Lyonnet S: Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 7: 1449-1452 (1998)
50. Duhamel B: A New Operation for the Treatment of Hirschsprung's Disease. *Arch Dis Child* 35: 38-39 (1960)
51. Dvorakova S, Dvorakova K, Malikova M, Skaba R, Vlcek P: A novel Czech kindred with familial medullary carcinoma and Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 40 (6): e1-6 (2005)
52. Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, Holder S, Nihoul-Fekete C, Ponder BA; Munnich A: Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 378-380 (1994), zitiert: Edery et al., 1994a
53. Edery P, Pelet A, Mulligan LM, Abel L, Attie T, Dow E, Bonneau D, David A, Flintoff W, Jan D: Long segment and short segment familial Hirschsprung's disease: variable clinical expression at the RET locus. *J. Med. Genet.* 31: 602-606 (1994), zitiert: Edery et al., 1994b
54. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, Ploos van Amstel HC, Lips CJM, Nishisho I, Takai AI, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjöld M, Komminoth P, Hendy GN, Gharib H, Thibodeau SN, Lacroix A, Frilling A, Ponder BAJ, Mulligan LM: The Relationship Between Specific RET Proto-oncogene Mutations and Disease Phenotype in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *JAMA* 276 (19): 1575-1579 (1996)
55. Fialkowski EA, DeBenedetti MK, Moley JF, Bachrach B: RET proto-oncogene testing in infants presenting with Hirschsprung disease identifies 2 new

- multiple endocrine neoplasia 2A kindreds. *J Pediatr Surg* 43 (1): 188-190 (2008)
56. Fitze G, Cramer J, Ziegler A, Schierz M, Schreiber M, Kuhlisch E, Roesner D, Schackert HK: Association between c135G/A genotype and RET proto-oncogene germline mutations and phenotype of Hirschsprung's disease. *Lancet* 359: 1200-1205 (2002)
57. Fitze G, Cramer J, Serra A, Schreiber M, Roesner D, Schackert HK: Within-Gene Interaction Between c.135 G/A Genotypes and RET Proto-Oncogene Germline Mutations in HSCR Families. *Eur J Pediatr Surg* 13: 152-157 (2003), zitiert: Fitze et al., 2003a
58. Fitze G, Appelt H, König IR, Görgens H, Stein U, Walther W, Gossen M, Schreiber M, Ziegler A, Roesner D, Schackert H: Functional haplotypes of the RET proto-oncogene promotor are associated with Hirschsprung Disease (HSCR). *Hum Mol Genet* 12 (24): 3207-3214 (2003), zitiert: Fitze et al., 2003b
59. Fitze G: Management of patients with Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma. *Eur J Pediatr Surg* 14:375-383 (2004)
60. Fitze G, Schackert HK: Hereditäres medulläres Schilddrüsenkarzinom. *Der Onkologe* 10: 29-37 (2004)
61. Garcia-Barceló M, Sham MH, Lui VCH, Chen BLS, Ott J, Tam PKH: Association study of PHOX2B as a candidate gene for Hirschsprung's Disease. *Gut* 52: 563-567 (2003)
62. Gardner E, Papi L, Easton DF, Cummings T, Jackson CE, Kaplan M, Love DR, Mole SE, Moore JK, Mulligan LM, Norum RA, Ponder MA, Reichlin S, Stall G, Telenius H, Telenius-Berg M, Tunnacliffe A, Ponder BAJ: Genetic linkage studies map the multiple endocrine neoplasia type 2 loci to a small interval on chromosome 10q11.2. *Hum Mol Genet* 3: 241-246 (1993)
63. Garipey CE: Developmental Disorders of the Enteric Nervous System: Genetic and Molecular Bases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39: 5-11 (2004)
64. Garver KL, Law JC, Garver B: Hirschsprung disease: a genetic study. *Clin Genet* 28(6): 503-508 (1985)
65. Georgeson KE, Robertson DJ: Laparoscopic-assisted approaches for the definitive surgery for Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 13(4): 256-262 (2004)

66. Gilchrist DM, Morrish DW, Bridge PJ, Brown JL: Cost analysis of DNA-based testing in a large Canadian family with multiple endocrine neoplasia type 2. *Clin Genet* 66: 349-352 (2004)
67. Graivier L, Sieber WK: Hirschsprung's Disease and Mongolism. *Surgery* 60: 458-461 (1966)
68. Griseri P, Bachetti T, Puppo F, Lantieri F, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I: A common haplotype at the 5' end of the RET proto-oncogene, overrepresented in Hirschsprung patients, is associated with reduced gene expression. *Hum Mutat* 25 (2): 189-195 (2004)
69. Guan T, Li JC, Li MJ, T JF: Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism analysis of rearranged during transfection proto-oncogene in Chinese familial hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol* 11 (2): 275-279 (2005)
70. Hirschsprung, H: Stuhlträgheit neugeborener infolge von dilatation und hypertrophie des colons. *JB Kinderheilkunde* 27:1 (1888)
71. Höppner W: Molecular Routine Diagnostics in Endocrinology. *J Lab Med* 25 (9/10): 380-86 (2001)
72. Hofstra RM, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, van Ravenswaaij-Arts C, Majoor-Krakauer D, Angrist M, Chakravarti A, Meijers C, Buys CH: A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12: 445-446 (1996)
73. Hofstra RM, Valdenaire O, Arch E, Osinga J, Kroes H, Loffler BM, Hamosh H, Meijers C, Buys CH: A Loss-of-Function Mutation in the Endothelin-Converting Enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung Disease, Cardiac Defects, and Autonomic Dysfunction. *Am J Hum Genet* 64: 304-308 (1999)
74. Ikeda K, Goto S: Diagnosis and Treatment of Hirschsprung's Disease in Japan. *Ann Surg* 199(4): 400-405 (1983)
75. Inoue K, Shimotake T, Inoue K, Tokiwa K, Iwai N: Mutational Analysis of the *RET* Proto-Oncogene in a Kindred with Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A and Hirschsprung's Disease. *J Ped Surg* 34 (10): 1552-1554 (1999)



76. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, Fertitta A, Carrano AV, Nagao M: Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 4 (12): 1519-1521 (1989)
77. Ivanchuk SM, Myers SM, Eng C, Mulligan LM: De novo mutation of GDNF, ligand for the RET/GDNF- $\alpha$  receptor complex, in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5 (12): 2023-2026 (1996)
78. Iwashita T, Murakami H, Asai N, Takahashi M: Mechanism of Ret dysfunction by Hirschsprung mutations affecting its extracellular domain. *Hum Mol Genet* 5 (10): 1577-1580 (1996)
79. Kleinhaus S, Moley J, Sheran M, Sieber WK: Hirschsprung's Disease: A Survey of the Members of the Surgical Section of the American Academy of Pediatrics. *J Ped Surg* 14(5): 588-597 (1979)
80. Kusafuka T, Wang Y, Puri P: Novel mutations of the endothelin-B receptor gene in isolated patients with Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 5(3): 347-349 (1996)
81. Kusafuka T, Wang Y, Puri P: Mutation Analysis of the RET, the Endothelin-B Receptor, and the Endothelin-3 Genes in Sporadic Cases of Hirschsprung's Disease. *J Ped Surg* 32 (3): 501-504 (1997)
82. Kwok JB, Gardner E, Warner JP, Ponder BA, Mulligan LM: Structural analysis of the human ret proto-oncogene using exon trapping. *Oncogene* 8(9): 2575-2582 (1993)
83. Lorenzo MJ, Gish DG, Houghton C, Stonehouse TJ, Pawson T, Ponder BAJ, Smith DP: RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2. *Oncogene* 14: 763-771 (1997)
84. Lyonnet S, Bolino A, Pelet A, Abel L, Nihoul-Fekete C, Briard ML, Mok-Siu V, Kaariainen H, Martucciello G, Lerone M, Puliti A, Luo Y, Weissenbach J, Devoto M, Munnich A, Romeo G: A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet* 4: 346-350 (1993)
85. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, van Vroonhoven TJ, Roehrer HD, Wahl RA, Lamesch P, Raue F, Conte-Devolx B, Dralle H: Early Malignant Progression of Hereditary Medullary Thyroid Cancer. *N Engl J Med* 349: 1517-1525 (2003)

86. Manie S, Santoro M, Fusco A, Billaud M: The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends in Genetics* 17 (10): 580-589 (2001)
87. Martucciello G, Prato AP, Puri P, Holschneider AM, Meier-Ruge W, Jasonni V, Tovar JA, Grosfeld JL: Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system: A report from the 4<sup>th</sup> International Symposium on Hirschsprung's Disease and related neurocristopathies. *J Ped Surg* 40 (10): 1527-1531 (2005)
88. McCallion AS, Chakravarti A: ENDRB/EDN3 and Hirschsprung Disease Type II. *Pigment Cell Res* 14(3): 161-169 (2001)
89. Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B, Morger R, Moser R, Schärli A: Acetylcholinesterase Activity in Suction Biopsies of the Rectum in the Diagnosis of Hirschsprung's Disease. *J Ped Surg* 7 (1): 11-17 (1972)
90. Miše N, Drosten M, Racek T, Tannapfel A, Pützer BM: Evaluation of potential mechanisms underlying genotype-phenotype correlations in multiple endocrine neoplasia type 2. *Oncogene* 25: 6637-6647 (2006)
91. Mole SE, Mulligan LM, Healey CS, Ponder BAJ, Tunnacliffe A: Localisation of the gene for multiple endocrine neoplasia type 2A to a 480 kb region in chromosome band 10q11.2. *Hum Mol Genet* 2 (3): 247-252 (1993)
92. Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A: Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 76-79 (1996)
93. Moore SW, Johnson G: Acetylcholinesterase in Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 21: 255-263 (2005)
94. Moore SW: The contribution of associated congenital anomalies in understanding Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 22: 305-315 (2006)
95. Moore SW, Appfelstaedt J, Zaahl MG: Familial medullary carcinoma prevention, risk evaluation, and RET in children of families with MEN2. *J Ped Surg* 42 (2): 326-332 (2007)
96. Moore SW, Zaahl MG: Multiple endocrine neoplasia syndroms, children, Hirschsprung's disease and RET. *Pediatr Surg Int* 24: 521-530 (2008)
97. Moore SW, Zaahl MG: Clinical and genetic differences in total colonic aganglionosis in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 44 (10): 1899-1903 (2009)

98. Mowat DR, Croaker GD, Cass DT, Kerr BA, Chaitow J, Ades LC, Chia NL, Wilson MJ: Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J Med Genet* 35: 617-623 (1998)
99. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A, Ponder BAJ: Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363: 458-460 (1993)
100. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Ponder MA, Feldman GL, Peizhi L, Jackson CE, Ponder BAJ: A de novo mutation of the RET proto-oncogene in a patient with MEN2A. *Hum Mol Genet* 3 (6): 1007-1008 (1994)
101. Munnes M, Fanaei S, Schmitz B, Muiznieks I, Holschneider AM, Doerfler W: Familial Form of Hirschsprung Disease: Nucleotide Sequence Studies Reveal Point Mutations in the RET Proto-Oncogene in Two of Six Families But Not in Other Candidate Genes. *Am J Med Genet* 94: 19-27 (2000)
102. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, Maes B, Savagner F, Giraud S, Bezieau S, Kottler ML, Morange S, Conte-Devolx B: Familial Medullary Thyroid Carcinoma with Noncysteine RET Mutations: Phenotype-Genotype Relationship in a large Series of Patients. *J of Clin Endocrin* 86: 3746-3753 (2001)
103. Nishikawa M, Murakumo Y, Imai T, Kawai K, Nagaya M, Funahashi H, Nakao A, Takahashi M: Cys611Ser mutation in RET proto-oncogene in a kindred with medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease. *Eur J Hum Genet* 11: 364-368 (2003)
104. Okamoto E, Ueda T: Embryogenesis of Intramural Ganglia of the Gut and Its Relation to Hirschsprung's Disease. *J Ped Surg* 2 (5): 437-443 (1967)
105. Pakarinen MO, Rintala RJ, Koivusalo A, Heikkinen M, Lindahl H, Pukkala E: Increased Incidence of medullary thyroid carcinoma in patients treated for Hirschsprung's disease. *J. Ped. Surg.* 40 (10): 1532-1534 (2005)
106. Paratore C, Eichenberger C, Suter U, Sommer L: Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 11(24): 3075-3085 (2002)
107. Parisi MA, Kapur RP: Genetics of Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr* 12: 610-617 (2000)

108. Pasini B, Borrello MG, Greco A, Bongarzone I, Luo Y, Mondellini P, Alberti L, Miranda C, Arighi E, Bocciardi R, Seri M, Barone V, Radice MT, Romeo G: Loss of function effect of the RET mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet* 10: 35-40 (1995)
109. Pasini A, Geneste O, Legrand P, Schlumberger M, Rossel M, Fournier L, Rudkin BB, Schuffenecker I, Lenoir GM, Billaud M: Oncogenic activation of RET by two distinct FMTC mutations affecting the tyrosine kinase domain. *Oncogene* 15: 393-402 (1997)
110. Pasini B, Rossi R, Ambrosio MR, Zatelli MC, Gullo M, Gobbo M, Collini P, Aiello A, Pansini G, Trasforini G, Uberti E: RET mutation profile and variable clinical manifestations in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease. *Surgery* 131: 373-381 (2002)
111. Passarge E: The Genetics of Hirschsprung's Disease. *N Eng J Med* 276: 138-143 (1967)
112. Passarge E: : Gastrointestinaltract and hepatobiliary duct system. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR: Emery and Remoin's: Principles and Practice of Medical Genetics. 4. Aufl., Vol. 2, Kap. 64: 1751-1759, Churchill Livingstone, London, 2002
113. Peczkowska M, Januszewicz A: Multiple endocrine neoplasia type 2. *Familial Cancer* 4: 25-36 (2005)
114. Pelet A, Attie T, Goulet O, Eng C, Ponder BA, Munnich A, Lyonnet S: De-novo mutations of the *RET* proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *The Lancet* 344: 1769-1770 (1994)
115. Pelet A, de Pontual L, Clément-Ziza M, Salomon R, Mugnier C, Matsuda F, Lathrop M, Munnich A, Feingold J, Lyonnet S, Abel L, Amiel J: Homozygosity for a frequent and weakly penetrant predisposing allele at the *RET* locus in sporadic Hirschsprung disease. *J Med Genet* 42: e18 (2005)
116. Peña A, Hong A: The posterior sagittal trans-sphincteric approach. *Acta Chir Iugosl* 51 (2): 11-21 (2004)
117. Peretz H, Luboshitsky R, Baron E, Biton A, Gershoni R, Usher S, Grynberg E, Yakobson E, Graff E, Lapidot M: Cys 618 Arg mutation in the *RET* proto-oncogene associated with familial medullary thyroid carcinoma and maternally transmitted Hirschsprung' s disease suggesting a role for imprinting. *Hum Mutat* 10 (2): 155-159 (1997)

118. Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith JC, Read AP, Wegner M, Goossens M: SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18: 171-173 (1998)
119. Prato P, Musso M, Ceccherini I, Mattiolo G, Giunta C, Ghiggeri GM, Jasonni V: Hirschsprung disease and congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): a novel syndromic association. *Medicine* 88 (2): 83-90 (2009)
120. Puffenberger EG, Kauffman ER, Bolk S, Matise TC, Washington SS, Angrist M, Weissenbach J, Garver KL, Mascari M, Ladda R, Slaugenhaupt SA, Chakravarti A: Identity-by-descent and association mapping of a recessive gene for Hirschsprung disease on human chromosome 13q22. *Hum Mol Genet* 3(8): 1217-1225 (1994)
121. Puri P: Hirschsprung's Disease: Clinical and Experimental Observations. *World J Surg* 17: 374-384 (1993)
122. Raue F, Frank-Raue K: Multiple Endocrine Neoplasie Type 2: 2007 Update. *Horm Res* 68 (suppl 5): 101-104 (2007)
123. Rehbein F, Von Zimmermann H: Results with Abdominal Resection in Hirschsprung's Disease. *Arch Dis Child* 35: 29-37 (1960)
124. Robledo M, Gil L, Pollán M, Cebrián A, Ruíz S, Azanedo M, Benitez J, Menárguez J, Rojas JM: Polymorphisms G691S/S904S of *RET* as Genetic Modifiers of MEN2A. *Cancer Research* 63: 1814-1817 (2003)
125. Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, Pasini B, Bocciardi R, Lerone M, Kaariainen H, Martucciello G: Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the *RET* proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 377-378 (1994)
126. Romeo G, Ceccherini I, Celli J, Priolo M, Betsos N, Bonardi G, Seri M, Yin L, Lerone M, Jasonni V, Martucciello G: Association of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung disease. *J Intern Med* 243: 515-520 (1998)
127. Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antinolo G, López-Alonso M, Eng C, Borrego S: A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both *RET* mutations and predisposing *RET* haplotypes. *Genet Med* 8 (11): 704-710 (2006)

128. Sakai T, Nirasawa Y, Itoh Y, Wakizaka: Japanese patients with sporadic Hirschsprung: mutation analysis of the receptor tyrosine kinase proto-oncogene, endothelin-B receptor, endothelin-3, glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin genes: a comparison with similar studies. *Eur J Pediatr* 159: 160-167 (2000)
129. Salomon R, Attie T, Pelet A, Bidaud C, Eng C, Amiel J, Sarnacki S, Goulet O, Ricour C, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Lyonnet S: Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung Disease. *Nat Genet* 14: 345-47 (1996)
130. Sancandi M, Ceccherini I, Costa M, Fava, M, Chen B, Wu Y, Hofstra R, Laurie T, Griffiths M, Burge D, Tam PKH: Incidence of *RET* Mutations in Patients with Hirschsprung's Disease. *J. Ped. Surg.* 35 (1): 139-143 (2000)
131. Sancandi M, Griseri P, Pesce B, Patrone G, Puppo F, Lerone M, Martucciello G, Romeo G, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I: Single nucleotide polymorphic alleles in the 5' Region of the *RET* proto-oncogene define a risk haplotype in Hirschsprung's Disease. *J Med Genet* 40: 714-718 (2003)
132. Sangkhathat S, Kusafuka T, Chengkriwate P, Patrapinyokul S, Sangthong B, Fukuzawa: Mutations and polymorphisms of Hirschsprung disease candidate genes in Thai patients. *J Hum Genet*: 51: 1126-1132 (2006)
133. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco M, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH: Activation of *RET* as a Dominant Transforming Gene bei Germline Mutations of *MEN2A* und *MEN2B*. *Science* 267: 381-83: 380-383 (1995)
134. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Visconti R, De Vita G, Salvatore G, Lupoli G, Fusco A, Vecchio G: Molecular biology of the *MEN2* gene. *J Int Med* 243: 505-508 (1998)
135. Sasaki Y, Shimotake T, Go S, Iwai N: Total Thyroidectomy for Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma 12 Years after Correction of Hirschsprung's Disease. *Eur J Surg* 167: 467-466 (2001)
136. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Constantini F, Pachnis V: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor *RET*. *Nature* 367: 380-383 (1994)
137. Seri M, Yin L, Barone V, Bolino A, Celli I, Bocciardi R, Pasini B, Ceccherini L, Lerone M, Kristofferson U, Larsson LT, Casasa JM, Cass DT, Abramowicz

- MJ, Vanderwinden JM, Kravcenkiene I, Baric I, Silengo M, Martucciello G, Romeo G: Frequency of *RET* mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 9: 243-249 (1997)
138. Serra A, Görgens H, Alhadad K, Ziegler A, Fitze G, Schackert HK: Analysis of *RET*, *ZEB2*, *EDN3* and *GDNF* Genomic Rearrangements in 80 Patients with Hirschsprung Disease. *Ann Hum Genet* 73: 147-151 (2009)
139. Sijmons RH, Hofstra RMW, Wijburg FA, Links TP, Zwierstra RP, Vermey A, Aronson DC, Tan-Sindhunata G, Brouwers-Smalbraak GJ, Maas SM, Buys CHCM: Oncological implications of *RET* gene mutations in Hirschsprung's disease. *Gut* 43: 542-547 (1998)
140. Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDermid H, Myers S, Kidd JR, Jackson CE, Duncan AMV, Farrer LA, Brasch K, Castiglione C, Genel M, Gertner J, Greenberg CR, Gusella JF, Holden JJA, White BN: Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* 328: 528-530 (1987)
141. Sipple JH: The Association of Pheochromocytoma with Carcinoma of the Thyroid Gland. *Am J Med* 31: 163-166 (1961)
142. Skaba R, Dvorakova S, Vaclavikova E, Vlcek P, Frantlova M, Bendlova B: The risk of medullary thyroid carcinoma in patients with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 22(12): 991-995 (2006)
143. Soave F: Hirschsprung's Disease: A New Surgical Technique. *Arch. Dis. Child.* 39: 116-124 (1964)
144. Spouge D, Baird P A: Hirschsprung Disease in a Large Birth Cohort. *Teratology* 32: 171-177 (1985)
145. Sproat-Emison E, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S, Portnoy ME, Cutler DJ, Green ED, Chakravarti A: A common sex-dependent mutation in a *RET* enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* 434: 857-863 (2005)
146. Steiner AL: Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma, hyperparathyroidism and Cushing's disease: multiple endocrine neoplasia, type 2. *Medicine* 47: 371-409 (1968)
147. Swenson O, Bill AH: Resection of the rectum and rectosigmoid with preservation of the sphincter for benign spastic lesions producing megacolon. *Surgery* 24: 212-220 (1948)

148. Swenson O, Sherman JO, Fisher JH: Diagnosis of Congenital Megacolon: An Analysis of 501 Patients. *J Ped Surg* 8 (5): 587-594 (1973)
149. Swenson PJ, Molander ML, Eng C, Anvret M, Nordenskjöld A: Low frequency of *RET* mutations in Hirschsprung disease in Sweden. *Clin Genet* 54: 39-44 (1998)
150. Tafazzoli K, Soost K, Wessel L, Wedel T: Topographic peculiarities of the submucous plexus in the human anorectum - consequences for histopathologic evaluation of rectal biopsies. *Eur J Pediatr Surg* 15 (3): 159-163 (2005)
151. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM: Activation of a Novel Human Transforming Gene, *ret*, by DNA Rearrangement. *Cell* 42: 581-588 (1985)
152. Takahashi M: The Role of the *ret* Proto-Oncogene in Human Disease. *Nagoya J Med Sci* 60: 23-30 (1997)
153. Taraviras S, Marcos-Gutierrez, CV, Durbec P, Jani H, Grigoriou M, Sukumaran M, Wang LC, Hynes M, Raisman G, Pachnis V: Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development* 126: 2785-2797 (1999)
154. Vaclavikova E, Dvorakova S, Sykorova V, Bilek R, Dvorakova K, Vlcek P, Skaba R, Zelinka T, Bendlova B: *RET* mutation Tyr791Phe: the genetic cause of different diseases derived from neural crest. *Endocrine* 36 (3): 419-424 (2009)
155. van Heyningen, V: One gene - four syndromes. *Nature* 367: 319-320 (1994)
156. Verdy M, Weber AM, Roy CC, Morin CL, Cadotte M, Brochu P: Hirschsprung's disease in a family with multiple endocrine neoplasia type 2. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1: 603-607 (1982)
157. Waldschmidt, J: Erkrankungen des Dickdarms. In: Waldschmidt J: Das akute Abdomen im Kindesalter: Diagnose und Differentialdiagnose. Kap. 5: 265-278, VCH edition medizin, Weinheim, 1990
158. Yin L, Barone V, Seri M, Bolino A, Bocciardi R, Ceccherini I, Pasini B, Tocco T, Lerone M, Cywes S: Heterogeneity and low detection rate of *RET* mutations in Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 2 (4): 272-280 (1994)
159. Zhou Y, Zhao Y, Cui B, Gu L, Zhu S, Li J, Liu J, Yin M, Zhao T, Yin Z, Yu C, Chen C, Wang L, Xiao B, Hong J, Zhang Y, Tang Z, Wanf S, Li X, Ning G: *RET* proto-oncogene mutations are restricted to codons 634 and 918 in



mainland Chinese families with MEN2a and MEN2b. Clin Endocrin 67 (4):  
570-576 (2008)

## Danksagung

Ich möchte zuerst Herrn Prof. Dr. L. Wessel für die Möglichkeit zur Promotion und Überlassung des Themas danken. Frau Dr. Martina Kohl gebührt mein Dank für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Höppner und den Mitarbeitern der Bioglobe GmbH, Hamburg, danke ich für die genetische Analyse der Proben und für die geduldige Einarbeitung in die Laborverfahren.

Danken möchte ich ebenso den humangenetischen Instituten der Universitäten Lübeck, Kiel und Eppendorf, insbesondere Herrn Priv.-Doz. Dr. Y. Hellenbroich, Frau Dr. A. Caliebe und Frau K. Sommerfeld für die Durchführung der humangenetischen Beratungen, sowie Dr. U. Hübner, Wilhemstift Hamburg, und Dr. K. Wenke, Kinderklinik Altona, für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Sehr herzlich danke ich allen Patienten, die durch ihre Teilnahme die Durchführung der Studie ermöglicht haben.

# Lebenslauf



Name: Franziska Schulze  
Geburtstag: 13.05.1983  
Geburtsort: Delmenhorst  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schul Ausbildung

1989 – 1995 Grundschule und Orientierungsstufe  
Ganderkesee  
1995 – 2002 Gymnasium Ganderkesee  
2002 Hochschulreife

## Hochschulausbildung

2002-2008 Studium der Humanmedizin an der Universität zu  
Lübeck  
08/2004 Ärztliche Vorprüfung  
07/2007 – 07/2008 Praktisches Jahr  
11/2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## berufliche Ausbildung

seit 01/2009 Assistenzärztin in der Klinik für  
Dermatologie, Venerologie und Allergologie,  
Direktor Prof. Dr. med. D. Zillikens,  
UKSH, Campus Lübeck