

Gemeinschaftspraxis

Prof. Dr. med. Friedhelm Raue, PD Dr. med. Karin Frank-Raue
Innere Medizin – Endokrinologie

Dr. med. Sabine Hentze
Humangenetik

Leistungsverzeichnis - Molekulargenetisches Labor

Dr.med. habil Egbert Schulze
Dr. rer. nat. Susanne Rondot
Dr. rer. nat. Susanne Clausmeyer
Dr. rer. nat. Christine Haag

Februar 2005

Hinweise zur molekulargenetischen Diagnostik

Versandtaschen und Auftragsformulare

Um Ihnen den Probenversand zu vereinfachen, stellen wir Ihnen frankierte und adressierte **Versandtaschen und Auftragsformulare** zur Verfügung (Bestellung bitte mit beiliegendem Anforderungszettel per Fax oder E-mail bzw. über das Internet).

Untersuchungsaufträge

Molekulargenetische Untersuchungen belasten **nicht das Laborbudget** des überweisenden Arztes. Auch mit der Einführung des neuen EBM 2000plus zum 1.4.2005 werden sich für die molekulargenetische und cytogenetische Diagnostik keine wesentlichen Änderungen ergeben. Als Einsender müssen Sie lediglich darauf achten, unabhängig von der Art der Erkrankung bei der Überweisung und in Ihrer eigenen Abrechnung die Ausschluss-Ziffer 32010 – „Genetisch bedingte Erkrankungen ...“ anzugeben (siehe Kapitel 32.2 bzw. 32.3 – allgemeines bzw. spezielles Labor). Dann werden Ihnen die Leistungen der molekulargenetischen Diagnostik nicht im Laborbudget angerechnet.

Die Leistungen der molekulargenetischen Diagnostik werden bei begründeter Indikation von den Kostenträgern übernommen. Deshalb bitten wir um eindeutige Angabe der Diagnose und Mitteilung vorhandener Vorbefunde (Kopien der Laborbefunde mitschicken, ein ausführlicher Brief ist nicht erforderlich).

Der Patient/die Patientin sollte schriftlich ihr Einverständnis zur Untersuchung und zur weiteren Lagerung der DNA-Probe abgeben (siehe Formular „Einverständniserklärung“)

Humangenetische Beratung

Die molekulargenetische Diagnostik kann zu weitreichenden Konsequenzen für den Patienten und dessen Familie führen. Insbesondere bei der prädiktiven Diagnostik empfehlen wir daher eine entsprechende Beratung, bevor der Patient die Zustimmung für die Untersuchung gibt. Außerdem sollte auch die Mitteilung pathologischer Befunde in einer humangenetischen Beratung erfolgen. In unserer Gemeinschaftspraxis können Sie jederzeit Termine für eine humangenetische Beratung (Frau Dr. Hentze – Tel.: 06221-439090) vereinbaren.

Angaben zur Eigen- und Familienanamnese können die molekulargenetische Untersuchung und die Befunderstellung wesentlich vereinfachen. Außerdem können die Kosten durch Vermeidung unnötiger Doppeluntersuchungen reduziert werden. Bitte teilen Sie uns deshalb die relevanten Vorbefunde mit.

Probenentnahme – Postnatale Diagnostik

Bitte beschriften Sie alle Probengefäße eindeutig mit Namen und Geburtsdatum des Patienten. **Nicht eindeutig beschriftete** Proben können von uns **nicht bearbeitet** werden. Bitte verwenden Sie für die Beschriftung entsprechende Aufkleber (nicht mit Faserschreiber direkt auf das Röhrchen schreiben).

Molekulargenetische Untersuchungen werden vorwiegend aus **EDTA-Vollblut** durchgeführt. Ein kleines Blutbildröhrchen (1-3 ml, bei Säuglingen auch weniger) ist ausreichend. Die Proben können **normal mit der Post versandt** werden und sind über mehrere Tage stabil (Einfrieren ist nicht notwendig; Zwischenlagerung bitte im Kühlschrank).

Alternativ zu Blutproben können auch Tupfer mit Wangenschleimhautabstrichen, native Gewebeproben, Zellkulturen oder Präparate aus der Pathologie (z.B. Paraffin-Blöcke) verwendet werden. Abstrichtupfer können Sie bei uns anfordern (wegen verschiedener Zusätze in den Wattetupfern bitte kein eigenes Material verwenden).

Bei Einsendung von bereits präparierter DNA bitten wir um Angabe der Präparationsmethode und der Konzentration.

Pränatale Diagnostik

Untersuchungen sind möglich aus Chorionzottenbiopsien, Amnionzellen (direkt), fetalem Gewebe sowie entsprechenden Zellkulturen. Der Versand kann auf dem Postweg erfolgen (bitte bevorzugt per Express, Versand über das Wochenende oder Feiertage vermeiden, Zwischenlagerung im Kühlschrank möglich).

Wir möchten Sie bitten, Proben zur **Pränataldiagnostik** möglichst **telefonisch anzukündigen**. Unbedingt erforderlich sind Angaben über Vorbefunde der Eltern, des Indexpatienten der Familie und die Schwangerschaftswoche bei Probenentnahme. Außerdem sollte mitgeteilt werden, ob eine maternale Kontamination der Probe bereits ausgeschlossen wurde. Wenn dies nicht erfolgt ist, benötigen wir auf jeden Fall EDTA-Blutproben der Eltern.

Proben zur Pränataldiagnostik werden immer bevorzugt bearbeitet. Der Befund steht in der Regel innerhalb einer Woche zur Verfügung. Verzögerungen ergeben sich meist durch ungenügende Vorbereitung der Untersuchung (Indexpatient bzw. Eltern noch nicht untersucht, verzögerte Einsendung entsprechender Blutproben).

Familienuntersuchungen

Voraussetzung für eine sinnvolle Untersuchung von Familienmitgliedern ist die abgeschlossene molekulargenetische Untersuchung des Indexpatienten. Bei einigen Erkrankungen kann der Genträgerstatus auch durch indirekte genetische Untersuchung über gekoppelte polymorphe Marker ermittelt werden. Bitte sprechen Sie mit uns ab, welche Familienmitglieder in welcher Reihenfolge in die Untersuchung einbezogen werden sollen.

Bearbeitungszeiten

Die Bearbeitungszeiten richten sich vor allem nach dem Eingang eiliger Proben in unserem Labor (z.B. Pränataldiagnostik). Dadurch kann es zu Verzögerungen bei der Bearbeitung von einzelnen Proben kommen. Sie können uns jederzeit anrufen, um eine Information über den aktuellen Bearbeitungszeitraum Ihrer eingesandten Proben zu erhalten.

Eine besonders eilige Bearbeitung ist bei entsprechender Indikation (z.B. Schwangerschaft, bevorstehende Operation) jederzeit möglich. Wir bitten um entsprechende Kennzeichnung auf dem Untersuchungsauftrag.

Sollen im Rahmen differentialdiagnostischer Abklärungen mehrere Untersuchungsparameter bearbeitet werden (z.B. 21-Hydroxylase, 3 β -HSD), wäre es aus Kostengründen wünschenswert, dass eine Reihenfolge von Ihnen oder nach telefonischer Rücksprache mit uns festgelegt wird. Häufig hilft uns bei der Differentialdiagnose auch eine Beurteilung der Laborbefunde weiter. Bei Familienuntersuchungen benötigen wir auf jeden Fall einen Stammbaum, auf dessen Grundlage dann eine individuelle Bearbeitung (nur Nachweis der in der Familie vorhandenen Mutationen) erfolgen kann.

Probenaufbewahrung

Wenn nicht anders vereinbart, archivieren wir die DNA-Proben für mindestens 10 Jahre. Nachuntersuchungen sind also jederzeit möglich. Bitte informieren Sie uns, wenn der Patient nach der humangenetischen Beratung eine Vernichtung der Probe wünscht.

Erläuterungen zu einzelnen Untersuchungen

Weitere Hinweise zu den einzelnen Krankheitsbildern können Sie den Informationsblättern entnehmen, die wir erarbeitet haben und die fortlaufend aktualisiert werden. Sie können diese Informationsblätter auch einzeln für spezielle Krankheitsbilder anfordern.

Molekulargenetische Diagnostik bei Hyperandrogenämie, Hirsutismus, Fertilitätsstörungen oder Adrenogenitalem Syndrom (AGS)

Steroid-21-Hydroxylase (CYP21B, MIM 201910)
3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD, MIM 201810)
Steroid-11 β -Hydroxylase (CYP11B1, MIM 202010)
StAR-Gen (MIM 600617)

Indikationen für AGS-Diagnostik (21-Hydroxylase)

- Neugeborene mit Virilisierung (Klitorishypertrophie), intersexuellem Genitale oder Salzverlustsyndrom
- Differentialdiagnostik bei erhöhtem 17OH-Progesteron im AGS-Neugeborenencreening
- Pränataldiagnostik des AGS
- Geschwister und Partner von AGS-Indexpatienten (besonders bei Kinderwunsch)
- Patientinnen mit Hyperandrogenämie (Hirsutismus, Fertilitätsstörungen, Oligo- bzw. Amenorrhoe, PCO-Syndrom, prämaturer Pubarche) nach endokrinologischer Differentialdiagnostik

Klinische Formen des AGS (21-Hydroxylase Gendefekt):

- klassischer 21-Hydroxylasedefekt
mit Salzverlust
ohne Salzverlust (einfach virilisierend)
- nicht-klassischer 21-Hydroxylasedefekt
late-onset AGS
- (symptomatisches) heterozygoten AGS

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Enzymdefekte der Steroidbiosynthese der Nebennierenrinde sind eine häufige Ursache der Hyperandrogenämie und ihrer klinischen Folgeerscheinungen. Für einige dieser Störungen sind heute die genetischen Ursachen bekannt. Durch Funktionsuntersuchungen (z.B. ACTH-Test, Dexamethason-Suppressionstest, GnRHa-Test) kann eine Verdachtsdiagnose für den zugrunde liegenden Defekt gestellt werden. Die molekulargenetische Diagnostik ermöglicht dann den Nachweis von Mutationen in verschiedenen Genen der Steroidhormonsynthese.

Die wichtigste Ursache der adrenalen Hyperandrogenämie sind Gendefekte der **21-Hydroxylase** (CYP21B-Gen). Das **klassische adrenogenitale Syndrom (AGS)** kommt in Mitteleuropa mit einer Häufigkeit von 1:7000 – 1:15000 vor. Es wird autosomal rezessiv vererbt. Bei Verdacht auf eine Schwangerschaft mit homozygotem (klassischem) AGS besteht die Möglichkeit einer **Pränataltherapie** mit Dexamethason. Die Pränataltherapie des AGS ist immer noch eine experimentelle Therapie. Wichtig sind der rechtzeitige Behandlungsbeginn (bis zur 6. SSW, spätestens 10. SSW) und die Vorbereitung der genetischen **Pränataldiagnostik** durch Untersuchung von Indexfall und Eltern. Die **Chorionbiopsie** (10.-11. SSW) ermöglicht eine frühzeitige Diagnosestellung, um unnötige Behandlungen gesunder bzw. männlicher Feten zu vermeiden. Die Pränataldiagnostik kann auch nach Amniozentese erfolgen.

Das nicht-klassische (late-onset) AGS tritt in Mitteleuropa mit einer Häufigkeit von ca. 1:25 - 1:200 auf. Die klinische Symptomatik kann bereits vor der Pubertät nachweisbar sein (prämatüre Adrenarche bzw. Pubarche, Großwuchs, akzeleriertes Knochenalter, leichte Klitorishypertrophie) oder sich erst in der Pubertät bzw. bei erwachsenen Frauen entwickeln (Hirsutismus, Akne, Seborrhoe, temporärer Haar- ausfall, Stirnglatze, Klitorishypertrophie, Oligo- bzw. Amenorrhoe, Infertilität). Bei Patientinnen mit klinischen Symptomen einer **Hyperandrogenämie** und **Fertilitätsstörungen** werden **heterozygote Mutationen** des CYP21B-Gens mit einer Häufigkeit von bis zu 30% (im Vergleich zu 2% in einer gesunden Kontrollpopulation) beschrieben. Über ähnliche Häufigkeiten dieses Gendefektes wurde auch bei Kindern mit prämatürer Pubarche bzw. prämatürer Adrenarche berichtet. Inwieweit Mutationen der 21-Hydroxylase kausal an der Entstehung der sehr unterschiedlichen klinischen Symptomatik einer Hyperandrogenämie beteiligt sind, ist bisher nicht geklärt. Eine relativ milde adrenale Hyperandrogenämie ist aber zumindest als Verstärkungsfaktor bei anderen Erkrankungen (z.B. PCO-Syndrom) anzusehen.

Bei Mutationsnachweis im Erwachsenenalter und bestehendem Kinderwunsch ist auch die Untersuchung des Partners notwendig.

Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation der verschiedenen AGS-Formen zeigt eine große Variabilität, so daß jeder Fall individuell im Zusammenhang der klinischen Befunde, Hormonwerte und der genetischen Diagnostik bewertet werden muß. Bisher wurden **über 50 Mutationen im CYP21B-Gen** beschrieben. Die genetische Diagnostik muß deshalb durch **vollständige Gensequenzierung** erfolgen.

Bei **Kinderwunsch** ist auch eine genetische Untersuchung des Partners notwendig. Die Heterozygotenfrequenz für alle Formen des AGS liegt in Mitteleuropa bei mindestens 1:50, sie ist in Südeuropa wesentlich häufiger.

Mit der Einführung des **AGS-Neugeborenen Screenings** durch Bestimmung von 17-Hydroxyprogesteron (17OH-P) aus Trockenblut am 3.-5. Lebenstag sind häufiger erhöhte 17OH-P Spiegel abzuklären. In 80% der Fälle handelt es sich um Frühgeborene mit physiologisch erhöhtem 17OH-P in den ersten Lebenswochen. Eine schnelle Abklärung ist durch die zusätzliche Bestimmung von 21-Desoxycortisol möglich. Der Assay ist allerdings nur in wenigen Speziallaboratorien verfügbar. Bei klinischer Symptomatik (Klitorishypertrophie, intersexuelles Genitale, Gedeihstörung, Salzverlustsyndrom) ist neben einer hormonellen Differentialdiagnostik (17OH-P, Testosteron, ACTH, Renin usw.) innerhalb weniger Tage eine molekulargenetische Diagnostik möglich.

Nach ACTH-Stimulation finden sich häufig (bis zu 40% der Patientinnen mit Hyperandrogenämie) Hinweise auf einen **3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Defekt** (erhöhtes 17OH-Pregnenolon und/oder DHEA). Genetische Defekte des 3 β -HSD Typ-II Gens sind aber sehr selten (< 1% der Patientinnen mit Hyperandrogenämie). Der pathologische Anstieg von 17OH-Pregnenolon und DHEA beruht wahrscheinlich auf einer Hemmung des Enzyms in der Nebennierenrinde auf Proteinebene. Ob in diesen Prozeß andere Gene (z.B. Transkriptionsfaktoren) einbezogen sind, ist noch nicht geklärt.

Die anderen Enzymdefekte (**11 β -Hydroxylase, StAR-Gen**) sind extrem selten. Eine molekulargenetische Untersuchung führen wir nur nach Rücksprache durch. Differentialdiagnostisch kann durch eine Multiteroidanalyse aus Urin mittels GC-MS der Enzymdefekt in fast allen Fällen erfasst werden.

Methode:

DNA-Extraktion; PCR, vollständige DNA-Sequenzierung der entsprechenden Gene des Steroidmetabolismus

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

für Pränataldiagnostik - Chorionzottenbiopsie, Fruchtwasser oder kultivierte Amnionzellen

Dauer der Untersuchung:

ca. 4 Wochen

Pränataldiagnostik ca. 1 Woche

Mutationsnachweis auf der Basis einer Verdachtsdiagnose (Klinik, basale Hormonspiegel, Stimulationsteste)

Enzym bzw. Gen	Hormonbefunde
21-Hydroxylase (CYP21B)	<p><u>homozygot (klassisches AGS):</u> 17OH-P bereits basal massiv erhöht (> 2000 ng/dl) Altersabhängige Normwerte bei Neugeborenen beachten</p> <p><u>homozygot (late onset):</u> 17OH-Progesteron basal > 200 ng/dl, nach ACTH > 1000 ng/dl</p> <p><u>heterozygot:</u> 17OH-Progesteron nach ACTH > 300 ng/dl; 21-Desoxycortisol nach ACTH > 45 ng/dl (Nachweis von Gendefekten bei ca. 30% der Patientinnen)</p>
3β-Hydroxysteroiddehydrogenase (3β-HSD)	DHEA und 17OH-Pregnenolon nach ACTH-Stimulation massiv erhöht
11β-Hydroxylase (CYP11B1)	DOC und 11-Desoxycortisol nach ACTH-Stimulation erhöht evtl. Hypertonie und Virilisierung
17α-Hydroxylase (CYP17)	DOC und Corticosteron erhöht; Cortisol und Testosteron erniedrig Molekulargenetik nur nach individueller Rücksprache
StAR Protein (Steroidogenic acute regulatory protein) Lipoidhyperplasie der NNR	alle Steroidhormone und Metabolite erniedrig (z.T. in den ersten Lebensmonaten noch relativ normale Werte) Molekulargenetik nur nach individueller Rücksprache

ACTH-Test und Molekulargenetik des AGS:

- Die Bestimmung von 17OH-Progesteron (und 17OH-Pregnenolon, DHEA) nach ACTH-Stimulation ermöglicht **nicht** den sicheren Ausschluß bzw. Nachweis von Gendefekten der 21-Hydroxylase
der 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD3B2)
Im Vergleich mit molekulargenetischen Untersuchungen liefert der ACTH-Test bei Patientinnen mit Hyperandrogenämie bzw. PCO-Syndrom in ca. 20-30% der Fälle falsch positive und in ca. 10% falsch negative Ergebnisse.
- Bei Patientinnen mit Hyperandrogenämie, Hirsutismus, Fertilitätsstörungen, polycystischen Ovarien **und Kinderwunsch** sollte deshalb eine molekulargenetische Untersuchung des 21-Hydroxylasegens durchgeführt werden.
- Bei (heterozygotem) Mutationsnachweis muß auch der **Partner** der Patientin molekulargenetisch untersucht werden.
- Die Familie muß sowohl gynäkologisch-endokrinologisch als auch **humangenetisch** beraten werden.
- In dieser Beratung muß die Indikation zur **Pränataltherapie und Pränataldiagnostik** gestellt werden.

Voraussetzungen für die Pränataltherapie und Pränataldiagnostik des AGS

- Nachweis des Gendefektes (vollständige Genanalyse) beim Indexfall (AGS) und den Eltern oder heterozygoter (klassischer) Gendefekt bei beiden Partnern.
- Ausschluß von Kontaminationen der Chorion(Amion)-DNA
- Humangenetische Beratung
- Endokrinologische Beratung und Therapieführung
- Therapiebeginn vor der 6. - (9.) SSW

Literatur - Hyperandrogenämie, AGS

Joint LWPES/ESPE CAH Working Group. Consensus statement on 21-Hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Pediatric Endocrinology (2002) *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4048-4053

New MI et al. Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies (2001) *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5651-5657

White PC and Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-Hydroxylase deficiency (2000) *Endocrine Reviews* 21: 245-291

Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency (2001) *Endocrinol Metab Clinics North America* 30: 31-59

Lutfallah C et al. Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency (2002) *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2611-2622

Kalantaridou SN and Chrousos GP. Monogenic disorders of puberty (2002) *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2481-2494

Bachega TAS et al. Variable ACTH-stimulated 17-Hydroxyprogesterone values in 21-Hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations (2002) *J Clin Endocrinol Metab* 87: 786-790

Witchel SF et al. Candidate gene analysis in premature pubarche and adolescent hyperandrogenism (2001) *Fertil Steril* 75: 724-730

Dacou-Voutetakis C and Dracopoulou M. High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarche (1999) *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1570-1574

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern. **Stand 02/2005**

Prof. Dr. med. F. Raue, PD Dr. med. Karin Frank-Raue-Innere Medizin-Endokrinologie
Dr. med. Sabine Hentze - Humangenetik
Molekulargenetisches Labor
Im Weiher 12 – 69121 Heidelberg
Telefon 06221/658883 - Fax 06221/658884 - E-mail: Egbert.Schulze@raue-endokrinologie.de

Molekulargenetische Diagnostik

Glukocortikoid-supprimierbarer Hyperaldosteronismus (GSH, engl. GRH; MIM 103900)

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Der Glukocortikoid-supprimierbare Hyperaldosteronismus (GSH; auch als Dexamethason-supprimierbarer Hyperaldosteronismus bezeichnet; engl. GRH – glucocorticoid remediable aldosteronism) ist eine seltene, dominant vererbte Form der Hypertonie, die sich häufig bereits im Kindesalter manifestiert. Charakteristisch ist eine vermehrte Ausscheidung von 18-Hydroxycortisol und 18-Oxocortisol im Urin, die mit einem erhöhten Verhältnis der Tetrahydrometaboliten von 18-Oxocortisol zu denen des Aldosterons einhergeht (Werte >2,0 bei Normwerten von 0,2). Zudem sind erhöhte Plasma-Aldosteronwerte bei supprimierter Plasmareninaktivität zu beobachten, so daß ein erhöhter Quotient von Aldosteron zu Renin im Plasma resultiert. Die Tatsache, daß bei GSH-Patienten die Aldosteronsekretion durch ACTH stimuliert wird, weist darauf hin, daß bei diesen Patienten Aldosteron in der Zona fasciculata der Nebenniere produziert wird. Als Ursache des GSH konnte ein Hybridgen zwischen der 11 β -Hydroxylase und der Aldosteronsynthase identifiziert werden. Aufgrund der hohen Homologie beider Gene kann es in der Meiose zu einem ungleichen Crossing-over kommen, aus dem ein Hybridgen hervorgeht, das die regulatorischen Sequenzen der 11 β -Hydroxylase und die codierenden Regionen der Aldosteronsynthase enthält. Dieses Hybridgen wird dann unter der Kontrolle von ACTH in der Zona fasciculata der Nebenniere exprimiert und führt zu einer Aldosteronsynthaseaktivität, die der ACTH-Sekretion und nicht mehr der Regulation durch das Renin-Angiotensin-System folgt.

Methode:

DNA-Extraktion aus Leukocyten; PCR-Reaktion unter Verwendung von Primern, die 5' an Sequenzen der 11 β -Hydroxylase und 3' an Sequenzen der Aldosteronsynthase binden. Mit diesen Primern kann ein Hybridgen erfasst werden, das nach Crossing-Over zwischen 11 β -Hydroxylase und Aldosteronsynthase entsteht.

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 1 Woche

Literatur:

Peters J, Hampf M, Peters B, Bernhardt R (1998) Handbuch der molekularen Medizin (Hrsg. Ganten D, Ruckpaul K), Band 3: 432-437

Lifton RP et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension (1992) Nature 355 : 262-265

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern. **Stand 02/2005**

Molekulargenetische Diagnostik

Apparenter Mineralocorticoidexzeß (AME, MIM 218030)

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Der Apparente Mineralocorticoidexzeß (AME) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die sich frühzeitig im Kindesalter mit Bluthochdruck, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose bei supprimiertem Renin-Angiotensin-System manifestiert. Die Plasmaspiegel für Aldosteron und Renin sind niedrig bzw. nicht nachweisbar. Spätfolgen sind die typischen Komplikationen des Bluthochdrucks mit Endorganschäden im Zentralnervensystem, Niere, kardiovaskulären System und Auge. Bei Neugeborenen mit AME wird häufig ein niedriges Geburtsgewicht beobachtet.

Ursache des AME sind inaktivierende Mutationen des HSD11B2-Gens, das für die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 codiert, ein vor allem in der Niere exprimiertes Isoenzym. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Cortisol zu Cortison. Cortisol, das in wesentlich höherer Konzentration vorliegt als Aldosteron, weist eine etwa gleich hohe Affinität zum Mineralocorticoidrezeptor auf wie Aldosteron. Cortisol, aber nicht Cortison, konkurriert daher mit Aldosteron um die Bindung an den Mineralocorticoidrezeptor. Die Inaktivierung von Cortisol durch die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase sichert also die Ligandenspezifität des Mineralocorticoidrezeptors in der Niere. Bei fehlender Aktivität der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in der Niere zeigen sich dementsprechend die mineralocorticoiden Wirkungen von Cortisol, die zu Natriumretention, erhöhtem Blutdruck und Hypokaliämie führen.

Biochemisch ist für den AME eine veränderte Ausscheidung der Metaboliten von Cortisol und Cortison im Urin kennzeichnend: Bei fehlender Umsetzung von Cortisol zu Cortison wird eine verminderte Ausscheidung von Tetrahydrocortison beobachtet, außerdem ist der Quotient Tetrahydrocortison/Tetrahydrocortisol erniedrigt.

Molekulargenetik

Das Gen für die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 des Menschen ist auf Chromosom 16q22 lokalisiert. Die codierende Sequenz des HSD11B2-Gens umfaßt insgesamt fünf Exons, die Gesamtlänge des Gens beträgt ca. 6,2 kb. Bislang wurden 37 Mutationen beschrieben, die überwiegend in Exon 3-5 nachgewiesen wurden, nur eine Mutation wurde in Exon 2 gefunden. Neben Punktmutationen, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen, kommen auch kleinere Deletionen und Insertionen vor, die eine Verschiebung des Leserasters zur Folge haben. Seltener sind Mutationen, die zu einem veränderten Splicing der RNA führen. Für die bislang bekannten Mutationen wird eine gute Genotyp/Phänotyp-Korrelation beobachtet.

Methode:

DNA-Extraktion; PCR, DNA-Sequenzierung aller 5 Exons sowie der Exon-/Intronübergänge des HSD11B2-Gens.

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 4-6 Wochen

Literatur - AME

Mune T et al. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (1995) Nature Genetics 10: 394-399

White et al. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess (1997) Endocrine Reviews 18: 135-156

Wilson RC et al. Apparent mineralocorticoid excess (2001) Trends in Endocrinology & Metabolism 12: 104-111

Lavery GG et al. Late-onset apparent mineralocorticoid excess caused by novel compound heterozygous mutations in the HSD11B2 gene (2003) Hypertension 42: 123-129

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Stand 02/2005

Molekulargenetische Diagnostik der Thrombophilie

Faktor V(Leiden) (APC-Resistenz, G1691A, MIM 227400)

Prothrombin (Faktor II, G20210A, MIM 202010)

Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR, Ala677Val, MIM 236250)

Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1, MIM 173360)

Protein C-Mangel (Protein C-Gen, MIM 176860)

Protein S-Mangel (Protein S-Gen, MIM 176880)

Antithrombin III-Mangel (Antithrombin-Gen, MIM 107300)

Indikationen:

- Auffällige *Eigenanamnese*:
Spontane Thrombosen in jungem Lebensalter (< 45 Jahre), oder atypische Lokalisation oder kein erkennbarer Auslöser (z.B. Immobilisation)
- Auffällige *Familienanamnese* – nach o.g. Kriterien, einschließlich Hirnvenen
- rezidivierende Fehlgeburten
- biochemisch nachgewiesene Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC-Resistenz)
- nachgewiesener Mangel an Protein C bzw. Protein S
- Vor Einnahme von oralen Kontrazeptiva/Hormonersatztherapie bei Frauen mit auffälliger Eigen- und/oder Familienanamnese

Der Vorteil der molekulargenetischen Diagnostik liegt im sicheren Nachweis bzw. Ausschluß eines genetisch bedingten Thromboserisikos ohne die für die hämatologischen Funktionsassays geltenden Einschränkungen durch exogene Faktoren.

Bei positiver Eigen- und/oder Familienanamnese bieten wir den **kombinierten Nachweis** der aufgeführten Mutationen in den Genen für **Faktor V (Leiden)**, **Prothrombin-**, **MTHFR-** und **PAI-1** mittels DNA-Chip an (Thrombophilie-Profil).

Die **Faktor V(Leiden)-Mutation** (Synonyme: APC-Resistenz, FV R506Q, FV G1691A) ist der wichtigste bisher bekannte genetische Risikofaktor für thromboembolische Ereignisse. Es handelt sich dabei um eine Punktmutation des Nukleotids 1691 im Faktor V-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin durch Glutamin (Aminosäure 506) führt. Der mutierte Faktor V kann durch aktiviertes Protein C nur unzureichend inaktiviert werden (APC-Resistenz), wodurch eine erhöhte Thromboseneigung entsteht.

Die Prävalenz heterozygoter Mutationen bei europäischen Kontrollpersonen liegt bei 3-5%. Der heterozygote Defekt ist mit einem 5-8fachen Thromboserisiko verbunden, das sich bei gleichzeitiger Einnahme von oralen Kontrazeptiva auf das ca. 30fache erhöht. Der homozygote Defekt ist mit einem 50-100mal erhöhten Thromboserisiko verbunden. Die Häufigkeit homozygoter Mutationen liegt jedoch unter 1%.

Eine Punktmutation des **Prothrombingens** (G20210A) führt heterozygot zu erhöhten Prothrombinspiegeln und damit zu einem 2-3fach erhöhten Thromboserisiko, insbesondere für Hirnvenenthrombosen (10fach erhöht). Bei gleichzeitiger Einnahme oraler Kontrazeptiva ist dieses Risiko sogar 150fach erhöht. Die Häufigkeit der heterozygoten Prothrombingenmutation in einer asymptomatischen Kontrollgruppe liegt bei 2-3%. Homozygote Merkmalsträger sind sehr selten.

Bei 15–20% der Thrombosepatienten, die heterozygote Träger der Faktor V(Leiden)-Mutation sind, läßt sich auch eine heterozygote Prothrombingen-Mutation nachweisen. Patienten, die gleichzeitig Träger **heterozygoter Mutationen im Faktor V und im Prothrombin-Gen** sind, haben ein kumulatives Risiko für Thrombosen und Myokardinfarkte.

Das Thromboserisiko erhöht sich weiterhin durch eine *Hyperhomocysteinämie*, deren häufige Ursachen homozygote Mutationen in den Genen für die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), seltener für die Cystathion- β -Synthase, sind.

Bei der molekulargenetischen Diagnostik des **MTHFR-Gens** wird eine Genvariante (**C677T-Mutation**) nachgewiesen, die zum Austausch der Aminosäure Alanin in Position 222 durch Valin führt. Das so veränderte Enzym ist thermolabil und hat eine deutlich reduzierte Aktivität (Produktion des biologisch aktiven Folats). Häufig kommt es bei homozygoten Mutationsträgern zu einer Hyperhomocysteinämie, insbesondere bei Mangel an Folsäure und/oder Vit. B12 bzw. bei Nierenfunktionsstörungen. Die homozygote Variante des MTHFR-Gens (Ala222Val) wird bei 12-15 % der Bevölkerung in Mitteleuropa gefunden. Eine aktuelle Meta-Analyse der bisher durchgeführten Studien zeigt für homozygote Träger der Mutation ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, weniger jedoch für Venenthrombosen auf.

Die heterozygote Mutation Ala222Val (C677T) im MTHFR-Gen, die bei 25-40% der mitteleuropäischen Bevölkerung nachweisbar ist, hat nach heutigem Kenntnisstand keine pathophysiologische Bedeutung.

Der sogenannte 4G/5G Polymorphismus im Gen für den **Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1)** beschreibt die Deletion eines G-Nukleotids im Promotorbereich des Gens. Homozygot wird er bei 12% der Bevölkerung nachgewiesen. Häufig lassen sich erhöhte periphere PAI-Spiegel nachweisen. Das Protein inhibiert die vom Plasminogen ausgehende Thrombolyse. Auch homozygot gilt der Polymorphismus nicht als unabhängiger Risikofaktor für venöse Thrombosen, führt jedoch in Verbindung mit anderen Mutationen (Faktor V, Prothrombin) zu einer signifikanten Erhöhung des Thromboserisikos. Homozygote Mutationen sind nach aktueller Literatur mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden, das sich derzeit jedoch nicht sicher von begleitenden Risikofaktoren wie erhöhten Lipidwerten, Insulinresistenz, Gewicht etc. abgrenzen lässt.

Bei Patienten mit wiederholten thromboembolischen Ereignissen, früher Manifestation (< 45 Jahre) bzw. positiver Familienanamnese für schwere Thrombosen und **Ausschluß** der Mutationen im Faktor-V bzw. Prothrombin-Gen werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 5-10 % Mutationen in den Genen für die antikoagulatorischen Proteine **Protein C, Protein S bzw. Antithrombin III** nachgewiesen.

Bei Männern bzw. Frauen ohne Östrogen Therapie kann zunächst biochemisch die Aktivität der Gerinnungsproteine bestimmt werden. Zumindest bei Aktivitäten um bzw. unter 50%, in der Schwangerschaft, sowie unter Einnahme von Marcumar und/oder Kontrazeptiva wird die molekulargenetische Diagnostik empfohlen. Sie erlaubt die Abklärung einer erblichen Prädisposition und ist dabei unabhängig von äußeren Faktoren.

Bislang sind über 160 Mutationen im **Protein C-Gen** beschrieben. Die Häufigkeit in der westeuropäischen Population beträgt ca. 1:300. Das Risiko für venöse Thrombosen ist bei heterozygoten Genträgern um das 10fache erhöht, insbesondere unter Einnahme von Kontrazeptiva. Mutationen von Protein C sind kein Risikofaktor für arterielle Thrombosen. Homozygote Protein C-Defekte sind extrem selten (>1:200.000) und führen zu schweren, häufig letalen Thrombosen in der Neonatalperiode (Enzymaktivität meist <1%).

Nach aktueller Literatur muss eine Kombination von zwei Polymorphismen im regulierenden Promotorbereich als „genetischer modifier“ gewertet werden. Der „CG“-Haplotyp ist signifikant häufiger bei Thrombosepatienten nachweisbar. Bei diesem Haplotyp sind sowohl die Aktivität von Protein C als auch die Plasmakonzentration verringert. Die heterozygote Anlage für den „CG“-Haplotyp erhöht nach aktueller Literatur das Thromboserisiko auf das 1,5fache.

Mutationen im Protein S-Gen lassen sich heterozygot bei 2-5 % der Thrombose-Patienten nachweisen. Das Risiko für venöse Thrombosen ist um ca. das 10fache erhöht. Bisher wurden über 70

Mutationen im Protein S-Gen mit erheblicher, auch intrafamiliärer, klinischer Variabilität (Typ I bis III) beschrieben. Zum klinischen Bild muss ein deutlich erhöhtes Fehlgeburtsrisiko bei Anlageträgerinnen hinzugerechnet werden. Auch beim Protein S-Defekt führen die seltenen homozygoten Mutationen zu sehr schweren Ausprägungen der Erkrankung bereits in der Neonatalperiode (Purpura fulminans, massive Thrombosen).

Heterozygote Mutationen des Antithrombin III-Gens lassen sich bei nur 1-2% der Thrombose-Patienten nachweisen (Prävalenz in der Bevölkerung 1:2000 bis 1:5000). Damit handelt es sich hierbei um die seltenste der bislang bekannten erblichen Thrombophilien, die allerdings mit dem höchsten Thromboserisiko (10-20fach) für Heterozygote einhergeht. Genträger haben im Plasma etwa 50% der normalen AT-III-Aktivität, diese Aktivität kann auch durch exogene Faktoren beeinträchtigt werden. Patienten mit der schweren Verlaufsform eines homozygoten AT III-Mangels wurden nur vereinzelt beobachtet.

Für Patienten mit hereditärem AT III-Mangel und deren Familienangehörige ist die molekulare Abklärung der zugrunde liegenden Mutation von großer Bedeutung. Mutationen, die nur die heparinbindende Domäne betreffen, sind mit einem minimalen Risiko für thromboembolische Ereignisse verbunden.

Die molekulare Analyse von Protein C, Protein S und Antithrombin III ist aufwendig und sollte deshalb nur nach Indikationsstellung durch einen Facharzt bzw. nach Rücksprache mit uns erfolgen. Eine genetische Beratung bieten wir selbstverständlich an.

Thrombophilie und Fehlgeburten

Protein S-Mutationen haben nach aktuellen Übersichten von allen Thrombophilieformen den ausgeprägtesten Einfluss auf die Fehlgeburtsrate, sie erhöhen das Risiko der Anlageträgerinnen auf das etwa 14fache.

Durch eine **APC-Resistenz** nimmt das Fehlgeburtsrisiko (frühe bzw. späte rezidivierende Fehlgeburten) bei Anlageträgerinnen auf das 3-8fache zu, durch die **Prothrombinmutation** um das etwa 2-3fache.

Die **MTHFR-Mutation** hat nach dem gegenwärtigen Stand der Literatur keinen Einfluss auf die Fehlgeburtsrate. Sie kann jedoch homozygot den Homocysteinspiegel erhöhen und ggfs. indirekt den Folsäurespiegel senken. In diesem Zusammenhang ist die Bedeutung des Folsäurespiegels für die Entwicklung des kindlichen Rückens zu berücksichtigen. Die pränatale Folsäureprophylaxe (bereits prae-conceptionem!) hat die Inzidenz der „Spina bifida“ auch in Nicht-Risiko-Familien signifikant senken können.

Methode:

DNA-Extraktion; PCR, Hybridisierung mit Mutations-spezifischen Sonden für die Punktmutationen in den Genen für Faktor V, Prothrombin, MTHFR und PAI-1

PCR und vollständige DNA-Sequenzierung aller Exons und der Exon/Intron-Übergänge der Gene für Protein C, Protein S und Antithrombin III

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung:

3 - 5 Arbeitstage (für Faktor V, Prothrombin und MTHFR)

4 - 6 Wochen (für Protein C, Protein S und Antithrombin III)

Literatur - Thrombophilie

Willeke A et al. Rationelle Thrombophiliediagnostik (2002) Deut Ärzteblatt 99: A2111-A2118

Witt I. APC-Resistenz (Faktor-V-Mutation) - Klinische Bedeutung, Pathophysiologie und Diagnostik (1998) Deut Ärzteblatt 95: A2316-A2323

Dahlbäck B und Hillarp A. Molecular coagulation and thrombophilia, In: Seligsohn U and Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis (2001) N Engl J Med 344: 1222-1231

Witt I. Molekularbiologische Grundlagen und Diagnostik der hereditären Defekte von Antithrombin III, Protein C und Protein S (1994) Hämostaseologie 14: 199-208.

Millar DS et al. Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency (2000) Hum Genet 106: 646-653

Persson KEM, Dahlbäck B und Hillarp A Diagnosing Protein S Deficiency: Analytical Considerations (2003) Clin Lab 49: 103-110.

Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis (2003) Lancet 361: 901-908.

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern. **Stand 02/2005**

Molekulargenetische Diagnostik

Multiple endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN-2) Familiäres Schilddrüsenkarzinom

Mutationen des RET-Protoonkogens (MIM 164761)

Indikationen:

- ***Alle Mitglieder einer MEN-2 Familie***

Bei klinisch betroffenen Familienmitgliedern kann die Art der RET-Mutation ausgehend vom Indexpatienten bestimmt werden. In einem zweiten Schritt können alle Blutsverwandten untersucht werden, ob sie Genträger dieser Mutation sind. Nicht-Genträger können nach Bestätigungsanalyse von weiteren Überwachungsuntersuchungen ausgeschlossen werden. Genträger sollten sich jährlich biochemischen Screeninguntersuchungen unterziehen, um frühzeitig ein medulläres Schilddrüsenkarzinom, ein Phäochromozytom und einen Hyperparathyreoidismus zu sichern. Ziel ist die prophylaktische Thyreoidektomie im präsymptomatischen Stadium.

- ***Alle Patienten mit sporadischem medullärem Schilddrüsenkarzinom***

Es zeigt sich, daß 3-5% der "sporadischen" medullären Schilddrüsenkarzinome in Wahrheit familiäre Formen sind, entweder Neumutationen oder Indexfälle bei unsicheren Angaben zur Familienanamnese. Bei Nachweis einer Keimbahnmutation sollte wie bei MEN-2 Patienten vorgegangen werden.

- ***Alle Patienten mit bilateralem Phäochromozytom***

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Ein Viertel der medullären Schilddrüsenkarzinome kommt familiär gehäuft im Rahmen der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN-2) vor. Der Erbgang ist autosomal dominant. Damit beträgt das Risiko eines Nachkommen, betroffen zu sein, 50%. Genträger der MEN-2 Mutation haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, ein manifestes medulläres Schilddrüsenkarzinom zu entwickeln. Ursache sind verschiedene Punktmutationen des auf Chromosom 10 lokalisierten RET-Protoonkogens, das für einen Tyrosinkinase-Rezeptor codiert. Die Mutation auf einem Allel führt bereits zu einer Aktivierung des Rezeptors, der über viele Zwischenstufen Wachstumsvorgänge initiiert (aktiviertes Onkogen). Da es sich um eine Keimbahnmutation handelt, läßt sich die Mutation in allen Körperzellen, so auch Blutzellen nachweisen. Der Nachweis kann vor Ausbruch der Erkrankung in einem präsymptomatischen Stadium erfolgen und erlaubt dann eine kurative Therapie (meist bis zum 6. Lebensjahr).

Das MEN-2 Syndrom kommt in 3 Varianten vor: bei der MEN-2A entwickelt die Mehrheit der Genträger im Laufe ihres Lebens ein medulläres Schilddrüsenkarzinom und ein Teil ein Phäochromozytom sowie einen primären Hyperparathyreoidismus. Bei der seltenen MEN-2B fehlt die Nebenschilddrüsenbeteiligung, dafür tritt eine Schleimhautganglioneuromatose und ein marfanoider Habitus hinzu. Daneben existiert auch ein familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom (FMTC) ohne weitere Endokrinopathien. Zwischen den verschiedenen Mutationen des RET-Protoonkogens (Genotyp) und den Varianten des MEN-2 Syndroms (Phänotyp) besteht eine Korrelation (siehe Tabelle). Neben der Keimbahnmutation (erbt) treten RET-Mutationen auch als somatische Mutation (im Laufe des Lebens erworben) allein im Tumorgewebe des sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinoms auf.

Die wichtigsten Mutationen des RET -Protoonkogens bei der MEN-2

Genotyp (RET -Mutation)

Exon 10 Codon 609, 611, 618, 620
 Exon 11 Codon 634
 Exon 13 Codon 768, 790, 791
 Exon 14 Codon 804
 Exon 15 Codon 891
 Exon 15 Codon 883
 Exon 16 Codon 918

Phänotyp

Familiäres MTC, MEN2A
 MEN-2A, Familiäres MTC
 Familiäres MTC
 Familiäres MTC
 Familiäres MTC
 MEN-2B
 MEN-2B

Methode

DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung aller Abschnitte des RET-Protoonkogens mit bekannten Mutationen (Exons 8, 10, 11, 13 -16)

Untersuchungsmaterial

2 – 5 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 2 - 3 Wochen

Literatur

Brandi ML et al. Consensus - Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2 (2001) J Clin Endocrinol Metab 86: 5658-5671

Stand 02/05

**Prof. Dr. med. F. Raue, PD Dr. med. Karin Frank-Raue - Innere Medizin –
Endokrinologie**
Dr. med. Sabine Hentze - Humangenetische Beratung
Molekulargenetisches Labor
Friedrich-Ebert-Anlage 28 – 69117 Heidelberg
Telefon 06221/658883 - Fax 06221/658884 - E-mail: Egbert.Schulze@raue-endokrinologie.de

Molekulargenetische Diagnostik

bei

Phäochromozytomen und Paragangliomen

RET-Protoonkogen (MEN-2, MIM 164761)

Tumor-Suppressor Gen VHL (MIM 193300)

Succinatdehydrogenase Subunit B-Gen (MIM 185470)

Succinatdehydrogenase Subunit D-Gen (MIM 602690)

Indikationen:

- Phäochromozytome - sporadische und familiäre Formen
- isolierte und syndromische Formen
- Paragangliome
- Familienuntersuchung zur Früherkennung und Prävention

Pathophysiologie und klinische Bedeutung:

Isolierte Phäochromozytome sind zumeist benigne (90%) katecholaminproduzierende Tumore der Nebenniere. Sie treten zumeist sporadisch auf, in bis zu 25 % der Fälle sind sie hereditär. Die hereditären Phäochromozytome können Bestandteil einer multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN-2) sein, die durch Mutationen des RET-Protoonkogens verursacht wird. Weitere Ursachen sind die Von Hippel-Lindau'sche Erkrankung (Mutationen des VHL-Gens) und zu einem geringen Anteil die Neurofibromatose Typ 1. Inzwischen konnte auch gezeigt werden, dass Patienten mit Phäochromozytomen Mutationen der Succinatdehydrogenase Untereinheit B und D (SDHB-Gen und SDHD-Gen) aufweisen. Neumann et al. (2002) konnten bei 25% der Patienten mit klinisch und familienanamnestisch „sporadischen“ Phäochromozytomen Mutationen im VHL-Gen (45%), RET-Protoonkogen (MEN-2; 20%), SDHB-Gen (18%) und SDHD-Gen (17%) nachweisen.

Mutationen der SDH-Gene (B,C,D) führen auch zu Tumoren chromaffiner Zellen des Grenzstrangs (Paragangliome). Paragangliome des sympathischen Grenzstrangs können – als Phäochromozytom – in der Nebenniere oder extraadrenal – zumeist im Bauchraum – lokalisiert sein. Sie können Katecholamine produzieren und maligne entarten (10-15%). Die hereditären Formen sind häufig multilokulär und manifestieren sich meist zwischen der 2. und 3. Lebensdekade.

Paraganglien des parasymphatischen Grenzstrangs sind hormonell inaktiv, gehen zumeist vom Glomus caroticum aus bzw. sind im Kopf- und Halsbereich lokalisiert.

Das SDHD-Gen unterliegt einem „imprinting“, eine Vererbung wurde bislang nur über den Vater beobachtet. Eine maligne Entartung eines Paraganglioms, dem eine SDHD-Mutation zugrunde liegt, wurde bislang nicht beobachtet.

Mutationen des SDHC-Gens wurden bislang nur bei zwei Familien nachgewiesen.

Von Hippel-Lindau-Syndrom

Die Von Hippel-Lindau'sche Erkrankung ist eine seltene autosomal dominante Erkrankung, die durch Hämangioblastome des Zentralnervensystems und der Retina, Nierenkarzinome, Phäochromozytome, Paragangliome, Inselzelltumore der Bauchspeicheldrüse und Tumore des Endolymphsystems des Innenohrs charakterisiert ist, wobei auch mehrere Organe gleichzeitig betroffen sein können. Die Erkrankung wird durch eine Mutation des VHL-Gens ausgelöst, das auf Chromosom 3p25-26 lokalisiert ist. Die Erkrankung hat eine Prävalenz von etwa 1:39.000. Chen et al. (1995) konnten zeigen, dass die Mutationsart bei Patienten mit VHL Typ 1 (ohne Phäochromozytome) und Patienten mit VHL Typ 2 (mit Phäochromozytomen) unterschiedlich ist. Mikrodeletionen/Insertionen, Nonsense-Mutationen oder Deletionen findet man in 56% der Familien mit VHL Typ 1 während Missense-Mutationen 96% der Mutationen ausmachen, die zu VHL Typ 2 führen.

SDHB-und SDHD-Gen

Komplex II (Succinat-Ubiquinon Oxireduktase) ist ein wichtiger Enzymkomplex in der Atmungskette der Mitochondrien und besteht aus vier Untereinheiten: Flavoprotein (SDHA), Iron Sulfur Protein (SDHB), die große (cybL, SDHC) und die kleine (cybS, SDHD) Untereinheit von Cytochrom B. SDHA und SDHB sind die enzymatischen Untereinheiten, und SDHC und SDHD verankern den Komplex in der mitochondrialen Membran. Baysal et al. konnten im Jahr 2000 zeigen, dass Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Tumoren spielen. Das SDHD-Gen ist auf Chromosom 11q23 lokalisiert und besteht aus 4 Exons, das Gen für SDHB liegt auf Chromosom 1p36.1-p35 und hat 8 Exons. Für den SDHD-Defekt konnte gezeigt werden, dass er sich nur bei Vererbung über den Vater manifestiert.

RET-Protoonkogen (MEN-2)

Die molekulargenetische Diagnostik zum Ausschluß von Mutationen im RET-Protoonkogen (MEN-2) wird in einem speziellen Informationsblatt für diese Erkrankung beschrieben, das Sie ebenfalls in unserem Labor anfordern können.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung der 3 Exons des VHL-Gens, der 8 Exons des SDHB-Gens und der 4 Exons des SDHD-Gens sowie der jeweiligen Exon-Intron-Übergänge

Sequenzierung der Exons 10, 11, 13-16 des RET-Protoonkogens

Komplette Deletionen sowie partielle Deletionen des VHL-Gens werden mit dem MLPA-Kit (MRC-Holland) untersucht.

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 8 Wochen

Literatur

Baysal B E et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma (2000) Science 287: 848-851

Chen F et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype (1995) Hum Mut 5: 66-75

Maher E A & Eng C The pressure rises: update on the genetics of pheochromocytoma (2002) Hum Mol Genet 11(20): 2347-2354

Neumann H P H et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma (2002) New Eng J Med 346: 1459-1466

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern. **Stand 02/2005**

Diagnostik und Therapie hereditärer Formen des primären Hyperparathyreoidismus (pHPT)

Der primäre Hyperparathyreoidismus (pHpt) gehört zu den häufigen endokrinen Erkrankungen mit einer Prävalenz von 3 in 1000 der Allgemeinbevölkerung und 21 in 1000 unter 55- bis 75-jährigen Frauen. In 80 % der Fälle handelt es sich um ein solitäres Adenom der Nebenschilddrüse, das durch operative Entfernung kurativ behandelt werden kann; seltener liegen multiple Adenome oder eine Hyperplasie der Nebenschilddrüsen vor, die in 25% durch ein vererbbares Syndrom hervorgerufen werden. Obwohl selten, bedürfen die verschiedenen hereditären Formen des pHpt eines speziellen Managements. Bei vier Formen der hereditären Variante, der familiären hypocalciurischen Hypercalciämie (FHH), der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN1) und der MEN Typ 2 (MEN2) sowie dem Hyperparathyreoidismus-Kiefertumor-Syndrom (hyperparathyroidism-jaw tumor syndrom) (HPT-JT) sind Keimbahn-Mutationen bekannt und eine molekulargenetische Diagnostik möglich. Die sichere Klassifikation erlaubt eine adäquate Therapie der Nebenschilddrüsen. Während die FHH **nicht** operiert werden sollte, bedarf es bei den anderen Formen einer subtotalen bis totalen Parathyreoidektomie mit evtl. Kryopreservation von Nebenschilddrüsenngewebe.

FHH – familiäre hypocalciurische Hypercalciämie

Keimbahn-Mutationen im „Calcium sensing Rezeptor“ (CaSR) können sowohl zur Hypercalciämie als auch zu Hypocalciämie führen, je nach Inhibition oder Aktivierung des Rezeptors. Patienten mit FHH haben seit Geburt eine asymptotische Hypercalciämie, eine Operation der Nebenschilddrüsen führt **nicht** zu einer Normalisierung des Serum Calciumspiegels. Ursache ist eine „set point“ Verstellung der physiologischen inversen Regulation von Calcium und PTH durch den CaSR auf einem höheren Niveau, d.h. erst bei höheren Calciumspiegeln kommt es zu einer Suppression von PTH. So ist es nicht verwunderlich, dass Patienten mit FHH einen leicht erhöhten PTH-Spiegel bei Hypercalciämie aufweisen können. Schlüsselbefund ist eine relative Hypocalciurie gemessen an der Hypercalciämie, das Verhältnis von Calcium- zu Creatininclearance ist unter 0,01 erniedrigt. Eine Bestimmung des Serum Calciumspiegels bei Angehörigen und letztendlich eine molekulargenetische Untersuchung des CaSR-Rezeptors mit Nachweis von Mutationen sichern die Diagnose. Häufig wird die Diagnose erst postoperativ bei Persistenz der Hypercalciämie diskutiert, deshalb sollte bei allen Patienten mit Verdacht auf pHpt die Calciumausscheidung überprüft werden und bei einer Ca/Creatinin-Clearance <0,01 eine molekulargenetische Untersuchung des CaSR-Gens vorgenommen werden.

MEN-1 - Multiple endokrine Neoplasie Typ 1

Inaktivierende Keimbahn-Mutationen im MENIN-Gen, einem Tumor-Suppressor-Gen, sind nicht nur für die Entwicklung der Nebenschilddrüsen-Tumoren sondern auch für Tumore in der Hypophyse, neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP) Tumore und nichtendokrine Tumore im Rahmen der MEN-1 verantwortlich. Der pHpt ist die häufigste und meist die erste Tumormanifestation der MEN-1, 95 % der Patienten mit MEN-1 entwickeln vor dem 40. Lebensjahr einen pHpt. Im Gegensatz zu den häufiger malignen und lebenslimitierenden GEP Tumoren (Gastrinome, Insulinome, Karzinoide) findet man nur sehr selten ein Nebenschilddrüsen-Carcinom. Eine sorgfältige Anamnese bei jungen Patienten mit pHpt in Richtung Symptome einer Hypophysenerkrankung und GEP-Tumor, einschließlich Familienanamnese mit Hinweis auf mögliche Todesursachen durch GEP-Tumore, lässt klinisch an eine MEN-1 denken. Biochemische Untersuchungen (z.B. PRL, STH, Gastrin, pankreatisches Polypeptid) decken frühzeitig die Manifestationen der verschiedenen Tumore auf. Eine Sicherung der Diagnose erfolgt durch den Nachweis einer Mutation im MENIN-Gen. Da alle Epithelkörperchen proliferieren, ist eine totale Parathyreoidektomie mit Autotransplantation notwendig, bei Unkenntnis der Diagnose und

Entfernung nur eines hyperplastischen Epithelkörperchens oder bei insuffizienter totaler Parathyreoidektomie persistiert der Hyperparathyreoidismus. Ein in der Nebenschilddrüsen Operation erfahrener Chirurg ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Operation. Bei dieser Operation sollte auch immer der Thymus mit entfernt werden, um einen intrathymalen Nebenschilddrüsentumor nicht zu übersehen und einem Thymuskarzinoid vorzubeugen. Eine lebenslange Nachsorge bezüglich eines Rezidiv-pHpt neben der Überwachung der übrigen Tumore ist notwendig, eine Familienuntersuchung bezüglich weiterer MEN-1 Genträger ist sinnvoll.

MEN-2 - Multiple endokrine Neoplasie Typ 2

Mutationen im RET-Protoonkogen können je nach Genotyp (Lage der Mutation) zu verschiedenen Phänotypen führen, die MEN-2b und das familiäre medulläre Schilddrüsenkarzinom (FMTC) entwickeln keinen pHpt. Der pHpt kommt im Rahmen der MEN-2a in 20 % vor, insbesondere bei Mutationen im Codon 634. Klinisch ist der pHpt meist mild und manifestiert sich häufig erst nach dem medullären Schilddrüsenkarzinom, dass sich im Rahmen einer pHpt-Diagnostik ein MEN-2 Syndrom herausstellt, ist eher die Ausnahme. Eine Hyperplasie der Nebenschilddrüsen oder multiple Epithelkörperchen-Tumore (z.T. Adenome) sind häufig, eine Nebenschilddrüsen-Operation wie bei MEN-1 ist dann notwendig. Vor diesem Eingriff muss ein Phäochromocytom ausgeschlossen werden. Da bis auf die Indexpatienten die MEN-2 Genträger meist prophylaktisch vor Manifestation des medullären Schilddrüsenkarzinoms thyreoidektomiert werden, wird der pHpt häufig erst im Laufe des Lebens (meist in der vierten Lebensdekade) im Rahmen der regelmäßigen Nachsorge diagnostiziert.

HPT-JT – Hyperparathyreoidismus mit Kiefertumor Syndrom

Mutationen im Parafibromin (HRPT2) Gen finden sich bei der Hälfte der bekannten Familien mit dem HPT-JT Syndrom, einem Syndrom mit einem pHpt (80%), ossifizierenden Fibromen der Mandibula (30%), renalen Cysten, Hämangiomen oder Wilms-Tumoren. Der pHpt entwickelt sich in den ersten 20 Lebensjahren mit multiplen z.T. cystischen Epithelkörperchenadenomen und einer deutlichen Überrepräsentierung von Nebenschilddrüsenkarzinomen. Auch sporadische Parathyreoidea-Carcinome zeigen häufig somatische inaktivierende Mutationen im HRPT2-Gen. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem HRPT2-Gen ebenfalls um ein Tumorsuppressor-Gen.

Schlussfolgerung

Die Diagnose des pHpt ist heutzutage einfach zu stellen, ein erhöhter Serumcalciumspiegel in Verbindung mit einem erhöhtem PTH-Spiegel ist nahezu beweisend für einen pHpt. Da nur durch die Operation eine Heilung zu erreichen ist, wird sie heutzutage auch asymptomatischen Patienten angeboten, zumal die Operationstechnik durch präoperative Lokalisation, intraoperative PTH-Bestimmung und durch minimal invasive Techniken zur Entfernung eines Epithelkörperchenadenoms verfeinert wurde. Um so wichtiger ist die präoperative Diagnose einer FHH, da diese Patienten **nicht** von einer Operation profitieren. Genauso wichtig für die Operationsplanung ist die präoperative Diagnose einer Vierdrüsenhyperplasie oder von multiplen Adenomen wie sie beim MEN-1, MEN-2 und HPT-JT Syndrom zu erwarten sind. Nur so kann die bei Standardoperation zu erwartende Persistenz oder ein Rezidiv des pHpt vermieden werden. Neben anamnestischen (in Familienanamnese MEN-1-, MEN-2-typische Tumore, rezidivierende Ulcera, Prolaktinom, Phäochromocytom), klinischen (Alter unter 40 Jahre, Rezidiv oder Persistenz des pHpt) und biochemischen (erhöhtes Calcitonin, Gastrin, Prolaktin) Hinweisen helfen vor allen Dingen die molekulargenetischen Untersuchungen mit Nachweis einer spezifischen Mutation die Diagnose des hereditären primären Hyperparathyreoidismus zu sichern.

Molekulargenetische Diagnostik

Multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN-1)

Mutationen des MEN-1-Gens (MIM 131100)

Indikationen:

- Sicherung der Diagnose multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN-1) bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus sowie Hypophysentumoren oder Pankreastumoren
- Familienuntersuchungen bei nachgewiesenem Indexfall
- Patienten mit persistierender Hyperkalzämie nach Nebenschilddrüsenoperation oder bei multiplen Adenomen oder Hyperplasien

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Die multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN-1) ist eine pluriglanduläre Erkrankung, bei der in verschiedenen endokrinen Drüsen Tumore auftreten. Die Neoplasien treten in der Nebenschilddrüse, den neuroendokrinen Zellen des Pankreas und Duodenums sowie der Hypophyse auf. Die MEN-1 wird autosomal dominant vererbt, der genetische Marker (Mutationen im MEN-1-Gen) ist bekannt und erlaubt eine Frühdiagnose.

Die Klinik der MEN-1 wird durch das Tumorwachstum und die endokrine Aktivität des Tumors bestimmt. Leittumor ist die Nebenschilddrüsenneoplasie (Hyperplasie aller vier Nebenschilddrüsen oder multiple Adenome) mit Entwicklung eines primären Hyperparathyreoidismus. Rezidiv oder Persistenz eines primären Hyperparathyreoidismus nach erfolgreicher Nebenschilddrüsenoperation lassen an ein MEN-1 Syndrom denken (1-3% des primären Hyperparathyreoidismus). Tritt zusätzlich ein Prolaktinom oder eine Akromegalie und/oder ein Insulinom oder Gastrinom hinzu, ist die Diagnose fast klinisch zu sichern, insbesondere wenn ein familiäres Auftreten vorliegt. Darüber hinaus können Karzinoide, Nebennierenrindentumore (z.T. endokrin inaktiv) sowie Lipome der Haut hinzutreten. Die Tumore entwickeln sich im Laufe des Lebens beginnend im frühen Erwachsenenalter. Lebenslimitierend sind die häufig malignen Gastrinome. Die Inzidenz der MEN-1 wird auf 1:65.000 geschätzt.

Ursache der MEN-1 ist eine Mutation im MEN-1-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 11 (11q3). Dieses Gen enthält 10 Exons und codiert für ein Protein mit 610 Aminosäuren. Es handelt sich um ein Zellkernprotein mit Tumorsuppressor Funktion, das bei der Regulation des Zellzyklus als Interaktionspartner des AP1 Transkriptionsfaktors JunD eine wichtige Rolle spielt. Ausfall der Funktion führt zur unkontrollierten Proliferation der betroffenen Zelle. Diese Zellen weisen neben der vererbten Keimbahnmutation auf dem einen Allel ("first hit") auf dem anderen Allel eine somatische Deletion im Bereich des Menin-Gens auf ("second hit", loss of heterozygosity). Keimbahn- und somatische Mutation zusammen führen zum totalen Verlust der Funktion von Menin als Tumorsuppressor in dieser Zelle und damit zum klonalen Wachstum.

Es wurden bisher über 250 verschiedene heterozygote Mutationen in den Exons 2 bis 10 sowie den angrenzenden Introns beschrieben, die zur fehlerhaften Synthese der mRNA bzw.

des Menin-Proteins führen. Hot spots für Mutationen haben sich bisher nicht gezeigt, deshalb ist eine komplette Sequenzierung der kodierenden Region des MEN-1-Gens notwendig. In 80 bis 90% der MEN-1 Familien fanden sich Mutationen im MEN-1-Gen. Bei Nachweis einer Mutation bei einem Index-Patienten einer MEN-1 Familie lässt sich eine gezielte Untersuchung nach dieser bekannten Mutation bei den übrigen Familienmitgliedern durchführen.

Bei Verdacht auf MEN-1 auf Grund klinischer oder biochemischer Untersuchungen lässt sich die Diagnose durch Nachweis der Menin-Mutation beim Indexpatienten sichern. Durch eine Familienuntersuchung lässt sich frühzeitig, vor klinischer Manifestation, eine Genträgerschaft bzw. eine Nicht-Genträgerschaft nachweisen. Die umfangreiche biochemische Diagnostik kann sich auf die Genträger konzentrieren, Nicht-Genträger können aus der weiteren Überwachung entlassen werden.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR-Reaktion, vollständige Sequenzierung der Exons 2 - 10 des MEN- 1-Gens
Komplette Deletionen sowie partielle Deletionen des Menin-Gens werden mit dem MLPA-Kit (MRC-Holland) untersucht.

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 4 - 6 Wochen

Literatur

Pannett A A J and Thakker R V Multiple endocrine neoplasia type 1 (1999) Endocrine-Related Cancer 6:449-473

Brandi ML et al. Consensus - Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2 (2001) J Clin Endocrinol Metab 86:: 5658-5671

Stand 02/2005

Molekulargenetische Diagnostik
 bei
Familiärer hypocalciurischer Hypercalcämie (FHH)
oder autosomal dominanter Hypocalcämie (ADH)

Mutationen des Calcium-sensing Rezeptors (CaSR, MIM 601199)

Indikationen:

- Differentialdiagnostik des primären Hyperparathyreoidismus
- Differentialdiagnostik des idiopathischen Hypoparathyreoidismus

Pathophysiologie und klinische Bedeutung:

Calcium-Ionen spielen eine wichtige Rolle für eine Reihe von Körperfunktionen wie Blutgerinnung, normale Erregbarkeit von Nerven- und Muskelgewebe und Muskelkontraktion. Der Calcium-Sensing Rezeptor (CaSR) ist in der Lage, geringe Veränderungen der Konzentration von zirkulierendem Calcium zu erfassen und diese Information an intrazelluläre Signalwege weiterzuleiten. Der CaSR ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der vorwiegend in den Hauptzellen der Nebenschilddrüse und in den Tubuluszellen der Niere exprimiert wird. Die Zellen der Nebenschilddrüse reagieren mit Hilfe des CaSR auf eine Verminderung der extrazellulären Calciumkonzentration mit einer gesteigerten Freisetzung von Parathormon (PTH), das seinerseits die Calciumkonzentration im Blut anhebt. Eine erhöhte Calciumkonzentration senkt die PTH-Freisetzung.

1993 zeigten Pollak et al., dass Mutationen des humanen CaSR-Gens, das auf Chromosom 13q13.3 – q21 lokalisiert ist, sowohl zu einer familiären hypocalciurischen Hypercalcämie (FHH) als auch zu einer autosomal dominanten Hypocalcämie (ADH) führen können. Die FHH ist auf inaktivierende Mutationen des CaSR-Gens zurückzuführen, während die ADH durch aktivierende Mutationen ausgelöst wird.

Familiäre hypocalciurische Hypercalcämie (FHH)

Die familiäre hypocalciurische Hypercalcämie (FHH) wurde 1972 erstmals von Foley et al. beschrieben. Die Häufigkeit der Erkrankung beträgt etwa 1% bezogen auf alle Patienten mit einem primären Hyperparathyreoidismus. Die FHH ist charakterisiert durch eine mild bis moderat erhöhte Calciumkonzentration im Serum (<12 mg/dL; 3 mmol/L), eine milde Hypermagnesiämie und eine normale bis leicht erhöhte PTH-Konzentration. Schlüsselbefund ist eine relative Hypocalciurie gemessen an der Hypercalcämie, das Verhältnis von Calcium- zu Creatininclearance ist unter 0,01 erniedrigt. Bei der FHH handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit einer Penetranz von fast 100%. Die FHH ist eine genetisch heterogene Erkrankung, wobei etwa bei zwei Drittel aller Patienten Mutationen im CaSR-Gen nachgewiesen werden. Die Mutationen (meist "missense" Mutationen) verteilen sich auf die 6 kodierenden Exons des CaSR-Gens, ohne besondere "hot spots" erkennen zu lassen. Ein zweiter Locus für die FHH liegt auf Chromosom 19p13.3 und ein dritter auf Chromosom 19q13.

Da etwa 5 – 10% der Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus einen PTH-Spiegel im oberen Normbereich haben, ist es oftmals schwierig, eine familiäre hypocalciurische Hypercalcämie von einem milden primären Hyperparathyreoidismus zu unterscheiden (Gunn und Wallace, 1992). Bei Patienten mit FHH führt eine Entfernung der Nebenschilddrüsen jedoch **nicht** zu einer Normalisierung des Serum

Calciumspiegels (siehe auch Merkblatt Diagnostik und Therapie hereditärer Formen des primären Hyperparathyreoidismus).

Autosomal dominante Hypocalcämie (ADH)

Die autosomal dominante Hypocalcämie ist das Spiegelbild der FHH. Die Serum-Calciumkonzentrationen liegen im Bereich von 6 – 8 mg/dL (1.5 – 2 mmol/L), die Serum-PTH-Konzentrationen liegen im Normbereich und im Gegensatz zu anderen Ursachen einer Hypocalcämie ist die Ausscheidung von Calcium im Urin normal bis hoch. Diese Erkrankung ist mit aktivierenden Mutationen im CaSR-Gen assoziiert. Die autosomal dominante Hypocalcämie stellt eine wichtige Differentialdiagnose zum idiopathischen Hypoparathyreoidismus dar. Bei Patienten mit ADH kann die erhöhte Calcium-ausscheidung in der Niere zur Entstehung von Nierensteinen und einer Nephrocalcinose bis hin zur Niereninsuffizienz führen, daher muß die Anhebung des Calciumspiegels sehr vorsichtig erfolgen. Ziel der Therapie ist die Anhebung des Serum-Calciumspiegels bei symptomatischen Patienten in den unteren Normbereich.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung der codierenden Exons 2 – 7 und aller Exon/Intron-Übergänge

Untersuchungsmaterial

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 4 – 6 Wochen

Literatur

Pollak M R et al. Mutations in the human Ca⁽²⁺⁾-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism (1993) Cell 75:1297-1303

Foley T P et al. Familial benign hypercalcemia (1972) J Pediat. 81: 1060-1067

Gunn I R & Wallace J R Urine calcium and serum ionized calcium, total calcium and parathyroid hormone concentrations in the diagnosis of primary hyperparathyroidism and familial benign hypercalcaemia (1992) Ann Clin Biochem. Jan;29 (Pt 1):52-8

Brown E M, Pollak M R & Hebert S C The extracellular calcium-sensing-receptor: Its Role in Health and Disease (1992) Annu Rev Med 49: 15-29

Pearce S H S & Thakker R V The calcium-sensing receptor: insights into extracellular calcium homeostasis in health and disease (1997) J Endocrinol 154(3):371-8

Chattopadhyay N et al. The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism (1996) Endocr Rev. Aug;17(4):289-307

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern. **Stand 02/2005**

Molekulargenetische Diagnostik

Maturity onset diabetes of the young (MODY-Diabetes)

Glukokinase-Gen (GCK, MIM 138079)

Hepatic Nuclear Factor 1 alpha (HNF1alpha, MIM 142410)

Hepatic Nuclear Factor 4 alpha (HNF4 alpha, TCF14, MIM 600281)

Indikationen:

- vor dem 25. Lebensjahr auftretender, nicht Insulin-abhängiger Diabetes mellitus mit familiärer Häufung ohne Nachweis von Insulin-Antikörpern
- Differentialdiagnostik des Typ-II Diabetes
- Familienangehörige von Patienten mit nachgewiesener MODY-Mutation

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Eine besondere Form des nicht Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (Typ 2 Diabetes) ist der Maturity-Onset-Diabetes of the Young (MODY), der in sehr jungen Lebensjahren (in der Regel vor dem 25. Lebensjahr) auftritt. Er betrifft ca. 5% der Patienten mit Typ2-Diabetes. Mutationen in mindestens sechs verschiedenen Genen wurden bislang als Ursache der klinisch heterogenen Erkrankung identifiziert: Das Enzym Glukokinase (MODY2), sowie die Transkriptionsfaktoren Hepatic Nuclear Factor-4 α (HNF4 α , MODY1), Hepatic Nuclear Factor-1 α (HNF1 α , MODY3), Insulin Promoter Factor-1 (IPF-1, MODY4), HNF1 β (MODY5) und NeuroD/BETA2 (MODY6). Charakteristisch für MODY sind die frühe Manifestation, der autosomal dominante Erbgang mit hoher Penetranz, d. h. es sind in der Regel mehrere aufeinanderfolgende Generationen in einer Familie betroffen, sowie das Fehlen der typischen Zeichen des Metabolischen Syndroms.

Die klinische Manifestation ist abhängig von dem jeweils ursächlichen Gendefekt. Die häufigsten Formen sind MODY2 (ca. 15% der Fälle) und MODY3 (ca. 69% der Fälle). Für etwa 10% der klinisch betroffenen Familien muß zumindest ein noch unbekanntes weiteres Gen verantwortlich sein.

Kriterien zur Diagnose des MODY-Diabetes:

- Manifestation vor dem 25. Lebensjahr
- Body-Mass-Index unter 25
- Ausschluß eines Typ1-Diabetes
- Auftreten eines Diabetes mellitus in zwei oder drei Generationen einer Familie

MODY Typ 3 betrifft etwa 70% der Patienten mit einem MODY-Diabetes. Er beruht auf verschiedenen Punktmutationen in den Exons 1-10 und im Promotor des Transkriptionsfaktors HNF1 α (Hepatic Nuclear Factor 1 α). Dieses Protein wird u.a. in der Leber und den β -Zellen des Pankreas exprimiert und reguliert die Transkription des Insulin-Gens und verschiedener weiterer Gene. Mutationen des HNF1 α -Gens führen zu einer progredienten Beeinträchtigung der β -Zellfunktion und damit zu einer eingeschränkten Insulinsekretion. MODY3 manifestiert sich häufig während der Pubertät durch ausgeprägte Hyperglykämie mit einer auffallend erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Sulfonylharnstoffpräparaten, sowie gutes Ansprechen auch auf geringe Insulinmengen. Unbehandelt führt diese

Form des MODY-Diabetes bei mind. 30% der Patienten zu den bekannten Gefäßkomplikationen und wird insulinpflichtig.

MODY Typ 2 betrifft etwa 15% der Patienten. Er ist auf verschiedene Punktmutationen und Deletionen in den Exons 1-10 des Glukokinase-Gens zurückzuführen. Mehr als 150 verschiedene Mutationen des Gens sind bislang beschrieben. Die Glukokinase wird in der Leber und in den β -Zellen des Pankreas exprimiert. In den β -Zellen des Pankreas ist das Enzym Glukokinase Bestandteil des Glucose-Sensor-Systems und somit essentiell für die adäquate Insulinsekretion. Inaktivierende Mutationen des Gens führen dazu, daß der aktuelle Blutzuckerwert etwas zu niedrig gemessen wird, so daß im Mittel eine milde Hyperglykämie resultiert. Die Blutzuckerwerte bleiben in der Regel stabil, führen nicht zu für den Diabetes mellitus üblichen Gefäßschäden und sind dann nicht behandlungspflichtig. MODY2 manifestiert sich häufig während einer Schwangerschaft als Gestationsdiabetes.

MODY Typ 1 wird verursacht durch Mutationen im Gen für den Transkriptionsfaktor HNF4 α . Die Pathophysiologie des MODY Typ 1 ähnelt der des MODY Typ 3, da beide Transkriptionsfaktoren ein vergleichbares Expressionsmuster zeigen und HNF4 α die Expression von HNF1 α reguliert.

Da die MODY-Erkrankung zu 80% durch Mutationen im HNF1 α - oder Glukokinase-Gen verursacht wird, werden zunächst diese beiden Gene analysiert. Bei den von uns untersuchten Patienten wurden bislang bei 28% aller Patienten Mutationen in einem dieser beiden Gene nachgewiesen. Bei unauffälligem Befund kann bei entsprechender Indikation auch die Untersuchung des Transkriptionsfaktors HNF4 α erfolgen.

Die Analyse weiterer Gene, die zu MODY-Diabetes führen, kann z. Zt. nur im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen erfolgen.

Methode:

DNA-Extraktion; PCR, vollständige DNA-Sequenzierung des Glukokinase-Gens und des Gens für HNF1 α ; nach Rücksprache auch vollständige Sequenzierung des Gens für HNF4 α .

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 6 - 8 Wochen

Literatur

Fajans SS et al. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young (2001) N Engl J Med 345: 971-980

Winter WE and Silverstein JH. Molecular and genetic bases for maturity onset diabetes of the youth (2000) Curr Opin Pediatr 12: 388-393

Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the young: Clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity (1998) Diabet Med 15: 15-24

Stride A and Hattersley AT. Different genes, different diabetes: Lessons from maturity-onset diabetes of the young (2002) Ann Med 34: 207-216

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Stand 02/2005

Molekulargenetische Diagnostik

Hereditäre Lipidstoffwechselerkrankungen

Apolipoprotein-B (MIM 107730) und Apolipoprotein-E (MIM 107741) LDL-Rezeptor (MIM 143890)

Indikationen:

- positive Familienanamnese für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Hyperlipidämie
- Hypercholesterinämie (Gesamtcholesterin > 230 mg/dl oder LDL > 175 mg/dl)
- Hypertriglyceridämie (Triglyceride > 200 mg/dl)

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Herzinfarkt und Schlaganfall gehören in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen. Viele Patienten mit einer Herz-Kreislauf-Erkrankung leiden an einer Störung des Lipidstoffwechsels, für die neben Ernährungsfaktoren und Bewegungsmangel auch verschiedene erbliche Faktoren eine Rolle spielen. Häufig werden erbliche Lipidstoffwechsel-Erkrankungen dominant vererbt, so daß 50% der Kinder dieser Patienten ebenfalls von der Erkrankung betroffen sein werden. Außerdem treten bei Patienten mit dominant vererbten Lipidstoffwechsel-Erkrankungen die klinischen Symptome bereits in einem sehr jungen Lebensalter auf.

Häufige genetische Ursachen für Lipidstoffwechsel-Erkrankungen, die routinemäßig nachgewiesen werden können:

- **familiäre Hypercholesterinämie Typ II (reine Hypercholesterinämie durch LDL-Erhöhung)**
 Häufigste hereditäre Lipidstoffwechsel-Erkrankung (in Europa ca. 1:500)
 Genetische Ursache liegt in Mutationen des Apolipoproteins-B oder des LDL-Rezeptors
- **familiäre Hypercholesterinämie Typ III (Dyslipoproteinämie durch β -VLDL (Remnants), mäßige Erhöhung von Cholesterin und Triglyceriden)**
 Rezessiv/polygene Form tritt mit einer Häufigkeit von 1:500 auf
 Ursache ist häufig eine Homozygotie für das Allel E2 des Apolipoproteins-E
 Die dominante Form beruht auf weiteren Mutationen des Gens für das Apolipoprotein-E

Das zu untersuchende Gen sollte auf Grund der klinischen Symptomatik und der laborchemischen Diagnostik ausgewählt werden. **Dazu ist zunächst eine Differenzierung zwischen der Hyperlipidämie Typ II und Typ III erforderlich:**

- Bei Verdacht auf **Hyperlipidämie Typ II** erfolgt die molekulargenetische Analyse des **Apolipoprotein-B** Gens und evtl. des LDL-Rezeptors (siehe dort)
- Bei Verdacht auf **Hyperlipidämie Typ III** erfolgt die molekulargenetische Analyse des **Apolipoprotein E** Gens

Apolipoprotein B

Das Apolipoprotein-B (ApoB) ist als Bestandteil der low-density-Lipoprotein (LDL)-Partikel für deren Bindung an den LDL-Rezeptor verantwortlich. Mutationen des ApoB-Gens führen häufig zu einer schlechteren Bindung der LDL-Partikel an den LDL-Rezeptor. Die Häufigkeit dieser Mutationen liegt in Mitteleuropa bei ca. 1:500. Unter den Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie lassen sich in 2-5% Mutationen des ApoB-Gens nachweisen.

Die häufigste Ursache liegt in Mutationen des Codons 3500 im Exon 26 des ApoB-Gens. Es können zwei Punktmutationen nachgewiesen werden (C→T, Nukleotid 9774 und G→A, Nukleotid 9775). Der ApoB-Defekt wird autosomal-dominant vererbt.

Im Gegensatz zu anderen Formen der familiären Hypercholesterinämie ist für Patienten mit Mutationen im ApoB-Gen eine Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern (Statine) nur von geringem Nutzen. Deshalb besitzt der Mutationsnachweis im ApoB-Gen auch für die weitere Therapieplanung eine große Bedeutung.

Für Patienten mit einer heterozygoten Mutation des Codons 3500 des ApoB-Gens ist das Risiko für Arteriosklerose und Herzinfarkte stark erhöht.

Indikationen zur molekulargenetischen Untersuchung des Apolipoprotein-B Gens

- familiäre Hypercholesterinämie Typ II
- Differentialdiagnose bei erhöhtem LDL-Cholesterinspiegel
- positive Familienanamnese in Bezug auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Apolipoprotein E

Das Apolipoprotein E (ApoE) spielt eine wichtige Rolle im Cholesterintransport. ApoE bindet an eine Vielzahl von Lipoproteinen und an zwei hepatische Rezeptoren (LDL-Rezeptor und ApoE-Rezeptor). Die Ursache für erhöhte Cholesterin- und Triglycerid-Serumspiegel bei Patienten mit Dysbetalipoproteinämie oder Hyperlipidämie Typ III liegt häufig in einer verminderten Clearance von Chylomicronen und VLDL-Remnants, hervorgerufen durch eine verminderte Bindung von Apolipoprotein-E an die hepatischen Rezeptoren. Biochemisch lassen sich erhöhte VLDL-Spiegel, erhöhtes Cholesterin, erniedrigtes LDL und ein atypisches Lipoprotein (beta-VLDL) nachweisen.

In Mitteleuropa kommen hauptsächlich drei ApoE-Isoformen vor: ApoE2 (Frequenz 0,1), ApoE3 (Frequenz 0,75) und ApoE4 (Frequenz (0,15)). Die Bestimmung dieser Isoformen mittels proteinbiochemischer Methoden (isoelektrische Fokussierung) ist relativ aufwendig und kann bei bestimmten Erkrankungen verfälscht werden (z.B. durch Glykosylierung bei Diabetikern): Im Gegensatz dazu ermöglicht die molekulargenetische Bestimmung der ApoE2-Isoformen ein zuverlässiges Ergebnis. Die E2-, E3- und E4-Isoformen unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz im Codon 112 bzw. 158 des Apo-E Gens (ApoE2 = Cys/Cys; ApoE3 = Cys/Arg; ApoE4 = Arg/Arg). Durch den verschiedenen Anteil positiver Ladungen (Arg) lässt sich die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität der Isoformen erklären.

Die meisten Patienten mit Dysbetalipoproteinämie oder Hyperlipidämie Typ III sind homozygot für die E2-Isoform von ApoE. Allerdings entwickeln nur ca. 4% der Patienten mit Homozygotie für ApoE2 eine familiäre Dysbetalipoproteinämie. Deshalb ist der ApoE2-Phänotyp als genetischer Risikofaktor für diese Erkrankung anzusehen. Weitere bisher nicht identifizierte genetische Faktoren und insbesondere die Ernährung beeinflussen die Entwicklung der klinischen Symptomatik. Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer Dysbetalipoproteinämie bei homozygoter ApoE2-Isoform sind Östrogen-Therapie (z.B. Substitutionstherapie in der Menopause), Hypothyreose, Übergewicht und Diabetes.

Genetische Ursachen der Dysbetalipoproteinämie bzw. der Hyperlipidämie Typ III:

- Homozygote ApoE2-Isoform
- Mutationen des Apolipoprotein E-Gens, die zu einer dominanten Ausprägung der Hyperlipidämie Typ III führen

Indikationen zur molekulargenetischen Untersuchung des ApoE-Gens

- Hyperlipidämie Typ III
- Differentialdiagnose bei erhöhten Cholesterin- bzw. Triglyceridwerten
- positive Familienanamnese für Hyperlipidämie Typ III bzw. Dysbetalipoproteinämie

LDL-Rezeptor

Die familiäre Hypercholesterinämie (Synonym Hyperlipoproteinämie Typ IIA MIM 143890) gehört mit einer Häufigkeit von 1:500 zu den häufigsten monogenen Erbkrankheiten und ist auf Mutationen des LDL-Rezeptors (LDLR, MIM 606945) zurückzuführen. Die Funktion des LDL-Rezeptors besteht darin, überschüssiges LDL-Cholesterin in die Leberzellen aufzunehmen und zu Gallensäure zu metabolisieren. Durch die Aufnahme der Lipoproteine kommt es gleichzeitig über Rückkopplungsmechanismen zu einer Hemmung der endogenen Cholesterinsynthese. Ein genetischer Defekt des LDL-Rezeptors führt über eine verringerte Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Leber zu einer erhöhten endogenen Cholesterinsynthese. Durch die Erhöhung des LDL-Cholesterins kommt es zu einer Koronarsklerose und zu Lipidablagerungen im Bereich der Augenlider (Xanthelasma), in der Hornhaut des Auges (Arcus lipoides corneae), in Haut und Sehnen der Hände und Füße (Xanthome). Die familiäre Hypercholesterinämie wird autosomal dominant vererbt. Patienten mit einer defekten Kopie des LDL-Rezeptors (Heterozygote) haben Gesamtcholesterinspiegel von >300 mg/dl, während Patienten mit zwei defekten Kopien (Homozygote) in der Regel Gesamtcholesterinspiegel zwischen 600 und 1200 mg/dl aufweisen. Das LDLR-Gen ist auf Chromosom 19 (19p13) lokalisiert und besteht aus 18 Exons. Bisher sind über 800 Mutationen in den Datenbanken beschrieben, die über das gesamte Gen verteilt sind. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Punktmutationen, kleinere Insertionen und Deletionen. Der Anteil von großen Deletionen und Rearrangements beträgt etwa 10 – 15%.

Methoden:

DNA-Extraktion, PCR, Hybridisierung mit Mutations-spezifischen Sonden auf dem Light Cycler (für Apo-B und Apo-E)

PCR und Sequenzierung der 18 Exons des LDL-Rezeptor-Gens inklusive Promotorbereich und aller Exon/Intron-Übergänge. Komplette Deletionen sowie partielle Deletionen des LDLR-Gens werden mit dem MLPA-Kit (MRC-Holland) untersucht.

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 5 Arbeitstage (Apo-B/E)
8 Wochen (LDL-Rezeptor)

Literatur

Hanlon CS and Rubinsztein DC. Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans (1995) *Atherosclerosis* 6: 85-90

Ceska R et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a lesson from homozygous and heterozygous patients (2000) *Physiol Res* 49 (Suppl): S125-S130

Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: pathogenesis of a receptor disease. *Johns Hopkins Med J.* 1978 Jul;143(1):8-16.

Villegier L, Abifadel M, Allard D, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Beroud C, Junien C, Boileau C, Varret M. The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database. *Hum Mutat.* 2002 Aug;20(2):81-7.

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Molekulargenetische Diagnostik bei Adipositas

Mutationen im Gen für den Melanocortin-4 Rezeptor (MC4R, MIM 155541)

Indikationen:

- Adipositas mit kontinuierlicher starker Gewichtszunahme (durch Diät kaum zu beeinflussen)
frühkindliche Hyperphagie
- BMI > alters- und geschlechtsspezifischer BMI + 3SD

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Adipositas entwickelt sich häufig im Zusammenspiel aus genetischer Disposition und Einflüssen der Umwelt. Familienanalysen deuten auf einen genetisch bedingten Anteil von bis zu 70% hin.

Schwere Adipositas kann durch genetische Defekte in verschiedenen Genen hervorgerufen werden, die am Melanocortin-Stoffwechsel beteiligt sind.

In einzelnen Familien wurden Mutationen im Leptingen, im Leptin-Rezeptor-Gen, dem Prohormon Convertase-1 Gen und dem Proopiomelanocortin (POMC) beschrieben. Diese Adipositasformen sind aber sehr selten, assoziiert mit multiplen endokrinen Erkrankungen und werden autosomal rezessiv vererbt.

Die häufigste bisher bekannte monogenetische Ursache für schwere Adipositas sind Mutationen im Melanocortin-4 Rezeptor-Gen (MC4R). Das Gen für den MC4R ist auf dem Chromosom 18 (18q21.3) lokalisiert. Der Melanocortin-4 Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter 7-Transmembranrezeptor, der im Gehirn exprimiert wird. Ihm wird eine zentrale Rolle in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Nahrungsverwertung zugeschrieben. Mutationen im MC-4-Rezeptorgen können zu schwerer Adipositas führen, deren Ausprägung in den meisten Fällen einem autosomal dominanten Vererbungsmuster folgt. Die Häufigkeit von MC4R-Mutationen wird nach der bisher vorliegenden Literatur auf ca. 2-5% der Patienten mit schwerer Adipositas geschätzt.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR; vollständige Sequenzierung des Gens für den MC4-Rezeptor

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: ca. 4 Wochen

Literatur

Farooqi IS Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency (2000) J Clin Invest 106: 271-279

Dubern B et al. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte stimulating hormone genes in severely obese children (2001) J Pediatr 139: 204-209

Vaisse C et al. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity (2000) J Clin Invest 106: 253-262

Farooqi IS et al. (2003) Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. N Engl J Med 348: 1085-1095

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Molekulargenetische Diagnostik

Eisenstoffwechsel und Hämochromatose (MIM 235200)

Indikationen:

- Diagnosesicherung bzw. Differentialdiagnose bei Patienten mit laborchemischen Hinweisen für eine Eisenüberladung, erhöhter Transferrinsättigung (cut-off 45-50%) und erhöhtem Serumferritin (200-300 µg/dl)
- Diagnosesicherung bei symptomatischen Patienten mit Leberzirrhose, Diabetes mellitus, Hypogonadismus, Kardiomyopathie, Pigmentierung (Bronzehaut), Arthritis
- Identifizierung homozygoter Genträger bei positiver Familienanamnese

Das Ziel der molekularen Diagnostik ist die frühzeitige Erkennung von Patienten mit einem erhöhten Risiko einer Eisenüberladung. Dadurch kann eine gezielte jährliche Überwachung mittels Ferritin- und Transferrinsättigungswerten bzw. die rechtzeitige präventive Therapie mittels Phlebotomien gewährleistet werden.

Häufigkeit und Klinik

Die hereditäre Hämochromatose ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Eisenstoffwechsels mit einer Prävalenz von 1:300 bis 1:400 in der zentraleuropäischen Bevölkerung. Die Heterozygotenfrequenz liegt bei etwa 1:10. Damit zählt die Hämochromatose zu den häufigsten vererbten Stoffwechselerkrankungen. Die Erkrankung manifestiert sich (laborchemisch) bei Männern im 4.-5. Lebensjahrzehnt, betroffene Frauen erkranken meist etwas später in der Postmenopause.

Ursächlich ist eine pathologisch gesteigerte Eisenresorption im Dünndarm. Eisen wird in der Leber durch Ferritin in einer nicht-toxischen Form gespeichert. Bei chronisch progredienter Überladung wirkt das Metallion zytotoxisch und führt zur Leberzellnekrose, Fibrose und Zirrhose. Die Leberzirrhose ist irreversibel und birgt ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Leberzellkarzinoms. Im Pankreas löst die Toxizität des Eisens einen Diabetes mellitus aus, in der Hypophyse einen hypogonadotropen Hypogonadismus, im Herzmuskel eine Kardiomyopathie. Die Pathogenese der Arthropathie ist noch ungeklärt.

Molekulargenetik und Pathogenese

HFE-I: 1995 wurden Mutationen des sogen. HFE-Gens auf Chromosom 6 als molekulare Ursache der Erkrankung definiert. Bei mehr als 80% der betroffenen Patienten in Zentraleuropa, Nordamerika und Australien handelt es sich um eine homozygote Punktmutation, C282Y. Etwa 5% der Patienten sind compound heterozygot für zwei verschiedene Mutationen (z.B. Kombination von C282Y mit den Mutationen H63D oder S65C). Homozygot werden die H63D bzw. S65C Mutation bei etwa 1-3% der Patienten nachgewiesen. In der Regel liegt bei diesen Patienten eine milde Form der Eisenstoffwechselstörung vor.

Die **Penetranz** der ursächlichen HFE-Mutation wird derzeit auf etwa 60% geschätzt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die klinische Symptomatik bis zum 5. Lebensjahrzehnt (Männer) bzw. nach der Menopause unspezifisch ist: Müdigkeit, Leistungsminderung, Gelenksbeschwerden, Impotenz. Veränderungen der Eisenparameter (Transferrinsättigung und Ferritin) beginnen im 3. Lebensjahrzehnt. 95% der Männer mit einer homozygoten HFE-Mutation zeigen jenseits des 40. Lebensjahres eine erhöhte Transferrinsättigung und erhöhte Ferritinwerte, aber nur 50% sind klinisch symptomatisch.

Eine HFE-Mutation findet sich als **heterozygote** Anlage signifikant gehäuft bei der hepatischen Porphyrie (ca. 40% der Patienten) und Non-alkoholischen Steatohepatitis (ebenfalls ca. 40% der Patienten) vs. 12% der durchschnittlichen Bevölkerung: Es handelt sich bei der HFE-Mutation um einen klassischen „genetic modifying factor“ für diese Erkrankungen.

Für heterozygote Anlagetträger einer HFE-Mutation besteht kein erhöhtes Risiko, an einer Hämochromatose zu erkranken. Die Eisenparameter (Ferritin, Transferrinsättigung) können bei diesen Probanden leicht erhöht sein, erreichen jedoch nicht die für eine Hämochromatose relevante diagnostische Grenze.

Bei etwa 5-15% der Patienten mit klinisch-histologisch gesicherter Hämochromatose findet sich keine der genannten Mutationen im HFE-Gen:

HFE2 a: Die molekulare Grundlage der früh manifestierenden **juvenilen Hämochromatose** mit ausgeprägter Beteiligung von Myokard und Hypophyse konnte 2004 charakterisiert werden. Mutationen in einem als Hämajuvelin bezeichneten Gen wurden bei bislang allen untersuchten Patienten nachgewiesen. Auch diese Hämochromatoseform ist rezessiv erblich.

HFE 2b: Das sogen. HAMP-Gen kodiert für ein sehr kleines Peptid, Hepzidin, das in der Leber synthetisiert wird und die duodenale Eisenresorption reguliert (inhibiert). Homozygote Mutationen des HAMP-Gens führen über eine verminderte Sekretion des Peptids in der Leber zu einer übermäßigen duodenalen Eisenresorption. Auch die Kombination einer heterozygoten Hepzidin- mit einer heterozygoten HFE-Mutation wurde bei klinisch gesicherter Hämochromatose nachgewiesen. Hepzidinmutationen in heterozygoter Form gelten als signifikanter genetischer „modifier“ bei der klinischen Ausprägung der HFE-Hämochromatose!

Die zentrale Bedeutung des Hepzidins bei der infektionsbedingten Anämie ist im Tiermodell wie auch in klinischen Studien nachgewiesen.

HFE 3: Im Mittelmeerraum sind die genannten HFE-Mutationen nur bei etwa 60% der Hämochromatosepatienten nachweisbar. Mutationen in einem zweiten Transferrinrezeptor (TfR 2) auf Chromosom 7 wurden bei einzelnen betroffenen italienischen Familien nachgewiesen.

HFE 4: Eine seltene **dominant** erbliche Hämochromatoseform konnte auf Mutationen des Gens für eines der beiden enteralen Eisentransportproteine – IREG bzw. Ferroportin 1 – zurückgeführt werden. Diese Hämochromatoseform unterscheidet sich histologisch von der HFE-induzierten Hämochromatose: Hier sind primär die v. Kupfferschen Sternzellen eisenüberladen. Der Pathomechanismus ist bislang nicht geklärt. Die betroffenen Patienten zeigen erhöhte Ferritinwerte bei *normaler* Transferrinsättigung – im strengen Sinne handelt es sich hier um eine **Hyperferritinämie**. Phlebotomien sind kontraindiziert.

Differentialdiagnostisch kommt bei deutlich erhöhten Ferritinwerten und sonst normalen Eisenparametern auch das dominant erbliche **Hyperferritinämie-Katarakt-Syndrom** in Frage. Dieses klinisch benigne Krankheitsbild wird durch eine Mutation im L-Ferritingen verursacht. Die hier eisenunabhängige Synthese von Ferritin nimmt keinen Einfluss auf die Eisenparameter. Einzige behandlungsbedürftige Konsequenz ist evtl. ein milder Katarakt. **Phlebotomien** sind bei diesen Patienten **kontraindiziert**, sie führen rasch zu einer Anämie, die sich nur langsam wieder normalisiert.

Die **Therapie** der HFE-Hämochromatose (1-3) ist einfach und nebenwirkungsarm: Wöchentliche Phlebotomien von 300-500 ml bis zum Erreichen eines therapeutischen Ferritinzielwertes zwischen 20 und 50 µg/l. Nach Entleerung der Lebereisenspeicher sind Phlebotomien nur noch in großen Intervallen erforderlich, in seltenen Fällen auch gar nicht mehr. Eisenarme Diäten haben sich nicht als hilfreich in der Behandlung bzw. Prävention der Hämochromatose erwiesen.

Bei frühzeitiger, konsequenter Therapie ist die Lebenserwartung homozygoter Mutationsträger normal. Der Insulinbedarf beim hämochromatosebedingten Diabetes mellitus lässt sich bei entleerten Eisenspeichern deutlich reduzieren. Die sehr schmerzhafteste Arthropathie, insbesondere des Zeige- und Mittelfingers in Grund- und Mittelgelenk, ist leider bislang therapierefraktär und erfahrungsgemäß auch mit Analgetika nur schwer einzustellen.

Methode:

DNA-Extraktion; PCR, Hybridisierung mit Mutations-spezifischen Sonden für die Mutationen HFE C282Y, H63D und S65C, Schmelzkurvenanalyse auf dem Light Cycler PCR und vollständige DNA-Sequenzierung der Gene für HFE Typ 2-4

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung:

3 - 5 Arbeitstage (HFE-1)

8 – 10 Wochen HFE 2-4 (nach Rücksprache)

Literatur

Hentze MW et al. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism (2004) Cell 117: 285-97

Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis - a new look at an old disease (2004) N Eng J Med 350: 2383-97

Niederau C, Strohmeyer G. Strategies for early diagnosis of hemochromatosis (2002) Eur J Gastroenterol Hepatol 14: 217-221

Trinder D et al. Molecular pathogenesis of iron overload (2001) Gut 51: 290-295

Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation (2003) Blood 102: 783-788

Roetto A et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis (2003) Nature Genetics 33: 21-22

Hediger MA et al. Iron transport and hemochromatosis (2002) J Investig Med 50: 239S-246S

Merryweather-Clarke AT et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations (2000) Genetic Testing 4: 183-198

Meyer R. Hämochromatose - Ist ein Screening mittels Gentest sinnvoll? (2001) Deut. Ärzteblatt 98: C536-C537

Pietrangelo A et al. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene (1999) N Engl J Med 341: 725-732

Martin ME et al. A point mutation in the bulge of the iron-responsive element of the L-ferritin gene in two families with the hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome (1998) Blood 91: 319-323

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Stand 07/2004

Molekulargenetische Diagnostik bei Kleinwuchs bzw. Leri-Weill-Syndrom

Mutationen im SHOX-Gen (SHOX, MIM 312865)

Indikationen:

- Leri-Weill-Syndrom
- idiopathischer Minderwuchs (idiopathic short stature - ISS), insbesondere bei Kombination mit milden Dysproportionen der Extremitäten
- Turner-Syndrom

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Bisher bekannte monogenetische Defekte sind nur für eine geringe Zahl der Patienten mit Kleinwuchs verantwortlich. Mutationen wurden u.a. nachgewiesen in den Genen für Wachstumshormon (GH), Wachstumshormonrezeptor (GRH) und den Homeobox-Genen HESX-1, PROP-1 und Pit-1.

Das SHOX-Gen (short stature homeobox-containing gene) gehört ebenfalls zu den Homeobox-Genen, die an der Regulation der Zelldifferenzierung beteiligt sind. Das SHOX-Gen ist in der pseudoautosomalen Region (PAR) der Geschlechtschromosomen lokalisiert (Xp22 bzw. Yp11.3). Eine diploide Dosis der homologen Gene in der pseudoautosomalen Region ist für eine normale Entwicklung des Menschen notwendig. Deletionen oder Punktmutationen im SHOX-Gen führen zu einer Haploinsuffizienz, die mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert sein kann:

- Leri-Weill-Syndrom (Dyschondrosteosis)
 - fast in 100% der Fälle sind SHOX-Mutationen nachweisbar (ca. 80% Deletionen, 20% Punktmutationen)
 - Kleinwuchs und Madelung-Deformität
 - symmetrische Verkürzung der Unterarme und Unterschenkel
 - bilaterale Verkürzung und Verbiegung des Radius
 - dorsale Subluxation der distalen Ulna
- Turner-Syndrom
 - 1:2500 Mädchen sind betroffen
 - Karyotyp 45, X oder strukturelle Veränderungen auf dem zweiten X-Chromosom (fast immer Deletion der SHOX-Region)
- idiopathischer Kleinwuchs (ISS)
 - Körpergröße unter der 3. Perzentile
 - keine nachweisbaren Skelettveränderungen
 - keine endokrinen oder psychisch/neurologischen Erkrankungen
 - normaler Karyotyp
 - Häufigkeit von Shox-Mutationen ca. 1 - 2.5 %

Methode:

DNA-Extraktion, PCR, vollständige Sequenzierung der Exons 2 bis 6 des SHOX-Gens
Komplette sowie partielle Deletionen des Shox-Gens werden mit dem MLPA-Kit (MRC-Holland) untersucht.

Bei Verdacht auf eine Deletion des Shox-Gens kann außerdem in Zusammenarbeit mit einem cytogenetischen Labor eine FISH-Analyse mit einer Shox-Gensonde durchgeführt werden.

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: ca. 6 - 8 Wochen

Literatur

Rao E et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome (1997) Nature Genetics 16: 54-62

Binder G et al. Identification of short stature caused by SHOX defects and therapeutic effect of recombinant human growth hormone (2000) J Clin Endocrinol Metab 85: 245-249

Belin et al. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome) (1998) Nature Genetics 19: 67-69

Rappold GA et al. Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature (2002) J Clin Endocrinol Metab 87: 1402-1406

Ross JL et al. Phenotypes associated with SHOX deficiency (2001) J Clin Endocrinol Metab 86: 5674-5680

Clement-Jones M et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome (2000) Hum Molec Genetics 9: 695-702

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Stand 02/2005

Molekulargenetische Diagnostik
 bei
Pseudohypoparathyreoidismus Typ IA (PHP IA) oder
Albright hereditärer Osteodystrophie (AHO)
Mutationen des GNAS1-Gens (MIM 139320)

Indikationen:

- Sicherung der Diagnose bei klinischer oder biochemischer Symptomatik von PHP Ia, AHO oder POH

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Der Pseudohypoparathyreoidismus (PHP IA) und die Albright hereditäre Osteodystrophie (AHO) beruhen auf heterozygoten inaktivierenden Mutationen im GNAS1 Gen, das für die Alpha-Untereinheit (Gs alpha) des heterotrimeren G-Proteins Gs codiert. Gs alpha ist an der Vermittlung extrazellulärer Signale über Hormonrezeptoren beteiligt, die über eine Aktivierung der Adenylatzyklase und damit über einen Anstieg des intrazellulären Gehaltes an cAMP weitergeleitet werden. Dieser Mechanismus der Signaltransduktion findet sich bei einer Reihe von Hormonrezeptoren, so z. B. bei den Rezeptoren für Parathormon (PTH), TSH, Glucagon, ACTH, Vasopressin und Gonadotropine.

Die Symptome der AHO sind vielfältig, es werden Kleinwuchs, Brachydaktylie, Adipositas, rundes Gesicht, subkutane Verkalkungen und geistige Retardierung beobachtet. Beim Krankheitsbild des PHP IA kommt eine Resistenz gegenüber PTH, TSH und Gonadotropinen hinzu, wobei die PTH-Resistenz im proximalen Tubulus der Niere mit Hypokalziämie und Hyperphosphatämie klinisch am auffälligsten ist.

AHO (das alleinige Auftreten des AHO-Phänotyps ohne Hormonresistenz wird auch als Pseudopseudohypoparathyreoidismus oder PPHP bezeichnet) und PHP IA treten familiär gehäuft auf und es finden sich beide Krankheitsbilder in derselben Familie. AHO und PHP IA folgen einem autosomal dominanten Erbgang, die Ausprägung als PPHP oder PHP IA hängt jedoch davon ab, ob das mutierte Allel vom Vater oder von der Mutter geerbt wurde. Wird das mutierte Allel von der Mutter geerbt, so prägt sich das Krankheitsbild des PHP IA aus, der PPHP-Phänotyp findet sich bei Patienten, die das mutierte Allel vom Vater geerbt haben. Dieser unterschiedlichen phänotypischen Ausprägung derselben inaktivierenden Gs alpha Mutation in einer Familie liegt nach heutigem Kenntnisstand das Phänomen des "genomic imprinting" zugrunde. "Genomic imprinting" bedeutet, daß gewebespezifisch nur jeweils eines der beiden Allele eines Gens exprimiert wird, das zweite wird zu einem frühen Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung stillgelegt. Gs alpha wird in vielen Geweben von beiden Allelen exprimiert, im proximalen Tubulus der Niere jedoch nur vom mütterlichen Allel. In den meisten Geweben wird daher bei Vorliegen einer inaktivierenden Mutation die Restaktivität auf 50 % reduziert, unabhängig davon, welches Allel die Mutation trägt. Im proximalen Tubulus der Niere, einem der wesentlichen Zielgewebe von PTH, wird die Aktivität von Gs alpha dagegen unbeeinträchtigt sein, wenn das väterliche Allel die Mutation aufweist, da dieses hier nicht exprimiert wird. Ist jedoch das mütterliche Allel von der Mutation betroffen, so geht die Gs alpha-Aktivität in diesem Gewebe vollständig verloren, wodurch sich auch die PTH-Resistenz der Patienten mit PHP IA erklärt.

Ein anderes Krankheitsbild, das durch verminderte Gs alpha-Aktivität und isolierte PTH-Resistenz der Niere ohne andere Hormonresistenzen oder Symptome von AHO beschrieben wird, ist der Pseudohy-

poparathyreoidismus Typ IB (PHP IB). Da in anderen Geweben normale Gs alpha-Aktivitäten gemessen werden können, liegt diesem Phänotyp wohl keine Mutation im GNAS1 Gen zugrunde, sondern er beruht vermutlich auf einem Defekt des "genomic imprinting", der ein oberhalb der codierenden Region von Gs alpha gelegenes, nicht translatiertes Exon betrifft und zur Inaktivierung auch des mütterlichen Allels des GNAS1 Gens in der Niere führt. In einem Einzelfall wurde aber auch bei PHP IB eine Mutation in der carboxy-terminalen Region von Gs alpha nachgewiesen, die spezifisch die Interaktion mit dem PTH-Rezeptor, nicht aber mit anderen Hormonrezeptoren hemmt.

Inaktivierende Mutationen im GNAS1 Gen können auch zur phänotypischen Ausprägung der "progressive osseous heteroplasia" (POH) führen. Dieses Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch fortschreitende Neubildung von Knochengewebe in der Haut und im Fettgewebe und in der Folge durch Wachstumsstörungen, es fehlen jedoch die charakteristischen Symptome der AHO sowie die Hormonresistenz. POH tritt nur bei Vererbung des mutierten Allels durch den Vater auf. In den betroffenen Familien führt eine mütterliche Vererbung zu AHO, nicht aber zu PHP IA. Bislang ist nicht geklärt, weshalb eine inaktivierende Mutation in Gs alpha in manchen Familien zu PPHP bzw. PHP IA und in anderen zu POH bzw. AHO führt.

Aktivierende Mutationen im GNAS1-Gen führen zum Krankheitsbild des McCune-Albright-Syndrom (MAS, MIM 174800), das durch fibröse Knochendysplasien, hyperpigmentierte Hautläsionen und vorzeitige Pubertät charakterisiert ist. Hinzukommen können außerdem Überfunktionen von Schilddrüse, Nebenniere oder Hypophyse. In allen bisher beschriebenen Fällen tritt das MAS sporadisch auf und wird nicht an die nachfolgende Generation vererbt. Ursache sind postzygotische Mutationen der Codons 201 oder 227, die zu einem somatischen Mosaik führen. Die Mutationen sind in der Regel nur im pathologisch veränderten Gewebe nachweisbar, seltener auch in nicht betroffenen Geweben. Der Zeitpunkt der Mutation während der Embryonalentwicklung scheint die phänotypische Ausprägung der Symptomatik zu beeinflussen. Aktivierende Mutationen im GNAS1-Gen als Keimbahnmutationen wurden bisher nicht beobachtet, es wird daher vermutet, daß solche Mutationen sich letal auswirken.

Das GNAS1 Gen des Menschen besteht aus 13 Exons, es ist auf Chromosom 20q13 lokalisiert. Mutationen werden in nahezu allen Exons gefunden, mit Ausnahme von Exon 3. Alle Typen von Mutationen konnten nachgewiesen werden, also kleine Insertionen oder Deletionen, außerdem Punktmutationen, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen. Seltener sind Mutationen, die ein verändertes Splicing der RNA zur Folge haben.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR; Sequenzierung aller 13 Exons des GNAS1 Gens (die ersten sechs und die letzten drei Codons des Exons 1 des GNAS1 Gens können aus technischen Gründen nicht sequenziert werden).

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 6 – 8 Wochen

Literatur

Weinstein L S et al. Endocrine manifestations of stimulatory G protein α -subunit mutations and the role of genomic imprinting (2001) *Endocrine Reviews* 22: 675-705

Lania A et al. G protein mutations in endocrine diseases (2001) *European Journal of Endocrinology* 145: 543-559

Hayward B E et al. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15475-15480

Aldred M A and Trembath R C Activating and inactivating mutations in the human GNAS1 gene (2000) *Human Mutation* 16: 183-189

Liu J et al. A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type 1B (2000) *J Clin Invest* 106: 1167-1174

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Stand 02/2005

Molekulargenetische Diagnostik

X-chromosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (familiäre hypophosphatämische Rachitis, Phosphatdiabetes, Vitamin D resistente Rachitis)

Mutationen des PHEX-Gens (OMIM 307800)

Indikationen:

- Kinder mit Zeichen der Rachitis, die auf Vitamin-D Therapie nicht ansprechen und eine Hypophosphatämie aufweisen
- Erwachsene mit Zeichen einer durchgemachten Rachitis und Hypophosphatämie, DD oncogene Rachitis
- Familienangehörige 1. Grades von Patienten mit nachgewiesener PHEX-Mutation

Definition: Die X-chromosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (XLH) ist gekennzeichnet durch eine Hypophosphatämie, bedingt durch einen renalen Phosphatverlust. Die Prävalenz beträgt 1:20.000. Die übrigen Parameter des Knochenstoffwechsels liegen im Normbereich (Serum-Calcium, Urin-Calcium, PTH, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃). Im Kindesalter ist eine Wachstumsstörung mit Entwicklung von verkürzten und verbogenen Extremitäten (genu vara, rachitische Verbiegung) zu verzeichnen, ohne Therapie resultiert ein dysproportionierter Kleinwuchs. Eine seltene Variante ist die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR).

Pathogenese: Ursache der XLH sind inaktivierende Mutationen im PHEX-Gen (**Phosphatregulierendes Gen mit Homologien zu Endopeptidasen auf dem X-Chromosom**) auf Chromosom Xp22.1. Das vom PHEX-Gen codierte Protein umfaßt 749 Aminosäuren, es ist ein integrales Membranprotein, dessen überwiegender Teil, einschließlich des katalytischen Zentrums, auf der Zelloberfläche liegt. Das Protein gehört zu einer Gruppe von Metallopeptidasen, die in ihrem aktiven Zentrum ein Zink-Atom enthalten. Die Funktion des PHEX-Proteins ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, daß es bei fehlender Aktivität von PHEX zur Akkumulation phosphaturischer Faktoren (Phosphatonine) kommt, die normalerweise durch PHEX inaktiviert werden. Das Phosphatonin inhibiert auf noch unbekannte Weise den Natrium-Phosphat-Cotransporter im proximalen Tubulus der Niere mit der Folge einer vermehrten Phosphatausscheidung (Tubulopathie). Als ein potentielles Phosphatonin wird FGF23 (Fibroblast Growth Factor 23) diskutiert, das im Tierversuch eine phosphaturische Wirkung zeigt. Mutationen, die die proteolytische Inaktivierung von FGF23 verhindern, wurden als Ursache der ADHR identifiziert. FGF23 wird jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand nicht direkt durch PHEX gespalten. Das direkte Substrat von PHEX sind vermutlich noch nicht identifizierte Oligopeptide, die nach proteolytischer Spaltung durch PHEX ihrerseits auf noch nicht bekannte Weise die Inaktivierung und/oder Expression von FGF23 regulieren. Erhöhte Spiegel von FGF23 werden bei manchen, aber nicht bei allen XLH-Patienten nachgewiesen.

Die Hypophosphatämie allein erklärt allerdings nicht das beobachtete Krankheitsbild, es muß außerdem eine direkte Störung der Osteoblastenfunktion vorliegen, die eine defekte Mineralisation im Knochen zur Folge hat.

Molekulargenetik: Das PHEX-Gen ist auf Chromosom Xp22.1 lokalisiert. Die codierende Sequenz besteht aus 22 Exons, die Gesamtlänge des Gens beträgt ca. 220 kB. Mutationen werden in allen Exons

gefunden. Alle Typen von Mutationen konnten nachgewiesen werden, also kleine Insertionen oder Deletionen, außerdem Punktmutationen, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen oder mit dem Splicing der RNA interferieren. In etwa 10% der Fälle werden größere Deletionen zwischen 100 bp und 50 kb gefunden (siehe <http://data.mch.mcgill.ca/phexdb>).

Das PHEX-Gen ist vorwiegend in Osteoblasten, Osteocyten und Odontoblasten exprimiert, in geringem Maße findet man eine Expression auch in Ovarien, Lunge, Epithelkörperchen und Gehirn, aber nicht in der Niere.

Klinik und Diagnostik: Die Hypophosphatämie ist schon bald nach der Geburt nachweisbar. Die Wachstumsverzögerung und Beinverbiegung beginnt mit dem Laufen (2. Lebensjahr), darüber hinaus können Defekte im Dentin auftreten. Die Schwäche in der Muskulatur, die typisch für die klassische Vitamin D-Mangelrachitis ist, findet sich nicht. Knaben scheinen stärker betroffen zu sein als Mädchen (nicht in allen Studien). Die Penetranz ist komplett, der Schweregrad variiert innerhalb der Familie, es gibt keine ausgeprägte Genotyp-Phänotyp Korrelation.

Richtungsweisend ist die Hypophosphatämie und Hyperphosphaturie bei normalem Serum-Calcium, Urin-Calcium, PTH, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und nur gering erhöhter AP. Der 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Spiegel ist normal; bei erniedrigtem Phosphat wäre jedoch ein erhöhter Spiegel zu erwarten, dies deutet auf eine gestörte Synthese von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ bei XLH hin. Die molekulargenetische Untersuchung bestätigt die klinische Diagnose, erlaubt eine Frühdiagnose bei Neugeborenen und eine frühzeitige Therapie in den ersten Lebensmonaten. Differentialdiagnostisch kann die calcipenische Form der Rachitis durch den fehlenden Nachweis einer Hypophosphatämie abgegrenzt werden, schwieriger ist die DD der Tubulopathie, bei der auch andere Metabolite ausgeschieden werden (Fanconi-Syndrom). Im Erwachsenenalter ist die erworbene Tubulopathie nach Chemotherapie oder die onkogene Rachitis durch Hämangiopericytom abzugrenzen.

Therapie: Bei Kindern mit XLH ist das Ziel eine ausreichende Körpergröße zu erreichen, bei Erwachsenen die Auswirkungen der Hypophosphatämie zu beseitigen. Dazu ist es notwendig, den Phosphat Spiegel (Erwachsene 1-4g/d, Reducto spezial[®]) anzuheben (bei Überdosierung Diarrhoe). Durch alleinige orale Phosphatgabe wird der Phosphat Spiegel angehoben, der Serum-Calcium Spiegel gesenkt, dadurch das PTH stimuliert (sekundärer Hyperparathyreoidismus), deshalb ist es notwendig, den Calcium Spiegel durch gleichzeitige 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Gabe (10-20 ng/kg) anzuheben. Unter dieser Therapie entwickeln 80% der Patienten eine medulläre Nephrocalcinose, meist bei normalem Creatinin.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR; Sequenzierung aller 22 Exons sowie der Exon-/Intronübergänge des PHEX-Gens

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 8 – 10 Wochen

Literatur:

The HYP-Consortium A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets (1995) Nature Genetics 11: 130-136

Sabbagh Y et al. PHEXdb, a locus-specific database for mutations causing x-linked hypophosphatemia (2000) Hum Mut 16: 1-6

Rowe P The role of the PHEX gene (PEX) in families with x-linked hypophosphatemic rickets (1998) Curr Opin Nephrol Hypertens 7: 367-376

Quarles LD Evidence for a bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis (2003) J Clin Invest 112: 642-646

Quarles LD FGF23, PHEX and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization (2003) Am J Physiol Endocrinol Metab 285: E1-E9

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern. **Stand 02/2005**

Prof. Dr. med. F. Raue, PD Dr. med. Karin Frank-Raue-Innere Medizin-Endokrinologie
Dr. med. Sabine Hentze - Humangenetik
Molekulargenetisches Labor
 Im Weiher 12 – 69121 Heidelberg
 Telefon 06221/658883 - Fax 06221/658884 - E-mail: Egbert.Schulze@raue-endokrinologie.de

Molekulargenetische Diagnostik bei Schilddrüsenhormonresistenz

Schilddrüsenhormonrezeptor-beta (THRB, MIM 190160)

Indikationen:

- erhöhte Schilddrüsenhormonwerte (fT3, fT4) im Serum bei nicht supprimierbarem TSH

Pathophysiologie und klinische Bedeutung:

Das Syndrom der Schilddrüsenhormonresistenz ist charakterisiert durch eine reduzierte Hormonwirkung in Relation zu den zirkulierenden Hormonspiegeln. Die Patienten mit Schilddrüsenhormonresistenz haben sowohl erhöhte T3- und T4-Spiegel im Serum als auch ein erhöhtes oder nicht supprimiertes basales TSH. Die Gabe von supraphysiologischen Schilddrüsenhormonmengen führt bei diesen Patienten nicht zu der erwarteten Supprimierung der TSH-Sekretion. Das klinische Bild der Erkrankung ist sehr variabel. Die Patienten zeigen meist eine Struma, begleitet von Hyperaktivität, Hör- und Lernstörungen, klassischen Symptomen einer Hyperthyreose (z.B. Tachyarrhythmie), Thyreotoxikose oder auch Entwicklungsstörungen des Zentralnervensystems und des Skeletts. Die klinischen Manifestationen sind sowohl zwischen den jeweiligen Familien als auch unter den einzelnen Familienmitgliedern mit Schilddrüsenhormonresistenz sehr verschieden. Klinisch läßt sich eine generelle Resistenz von einer hypophysären Resistenz unterscheiden. Bei der generellen Resistenz sind Hypophyse und periphere Gewebe betroffen, bei der hypophysären die TSH-Produktion in der Hypophyse. Bei der Schilddrüsenhormonresistenz handelt es sich meistens um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die auf Mutationen im THRB-Gen (thyroid hormone receptor beta) zurückzuführen ist. Einige Fälle sind jedoch sporadisch, wenige auch rezessiv. Die Inzidenz ist unbekannt.

Seit der Erstbeschreibung dieses Syndroms durch Refetoff et al. im Jahr 1967 wurden über 350 Fälle von Schilddrüsenhormonresistenz der Literatur beschrieben.

Schilddrüsenhormonrezeptor-beta:

Schilddrüsenhormonrezeptoren werden durch zwei verschiedene Gene kodiert, das THRA-Gen auf Chromosom 17 (17q11.2) und das THRB-Gen auf Chromosom 3 (3p24.3). Von beiden Genen werden durch alternatives Splicing verschiedene Isoformen gewebsspezifisch exprimiert.

Die Schilddrüsenhormonrezeptoren sind Teil einer großen Familie von nuklearen Rezeptoren, die die Expression von Genen regulieren. Die Rezeptoren haben eine DNA-Bindungs-Domäne am Aminoterminus und eine Liganden-Bindungsdomäne (Hormon-Bindungsdomäne) am Carboxyl-Terminus. Fast alle Mutationen des THRB-Gens, die bisher weltweit im Zusammenhang mit einer Schilddrüsenhormonresistenz beschrieben wurden, betreffen die Liganden-Bindungsdomäne. Das THRB-Gen besteht aus 10 Exons, wobei etwa 99% aller Mutationen in den Exons 7, 8, 9 und 10 nachgewiesen wurden.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung der Exons 7, 8, 9 und 10 sowie der Exon/Intron-Übergänge des THRB-Gens

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: ca. 6 Wochen

Literatur

Refetoff et al. Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphysis, goiter and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone (1967) J Clin Endocrinol Metab 27:279-294

Refetoff et al. The Syndromes of Resistance to Thyroid Hormone (1993) Endocrine Reviews 14(3): 348-399

Yen et al. Physiological and Molecular Basis of Thyroid hormone Action (2001) Physiological Reviews 81(3) : 1097-1142

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Stand 02/2005

Genetische Prädisposition für Osteoporose

Nachweis genetischer Polymorphismen in den Genen für Vitamin-D-Rezeptor (VDR, MIM 601769), Collagen Typ-I (COLIA1, MIM 129150) und den Estrogenrezeptor-alpha (ER-alpha, MIM 133430) Osteoprotegerin (OPG, MIM 602643) Laktase (MIM 603202)

Indikationen für den Nachweis der genetischen Prädisposition für Osteoporose:

- zur Abklärung des Risikos für eine Osteoporose (insbesondere bei jüngeren Patienten)
- männliche Patienten ohne klare Genese für eine Osteoporose
- familiäre Osteoporose

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Osteoporose ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei deren Entstehung genetische Faktoren eine große Rolle spielen. Zwillings- und Familienuntersuchungen belegen die Bedeutung genetischer Faktoren für die Knochendichte. Die Fraktur ist der klinisch manifeste Endpunkt der Erkrankung, die durch verminderte Knochendichte, Veränderungen von Knochenumsatz und Mikroarchitektur des Knochens sowie Fallneigung charakterisiert werden kann. Nur in sehr seltenen Fällen wird eine Osteoporose durch Mutationen in einem einzelnen Gen hervorgerufen (z.B. Lipoprotein receptor related protein-5 Gen beim Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom). Viel häufiger sind polygenetische Ursachen in Kombination mit anderen endokrinen und nicht-endokrinen Erkrankungen oder mit verschiedenen Umweltfaktoren. Genomweite Linkage-Untersuchungen haben Kandidatenregionen auf verschiedenen Chromosomen identifiziert, die einen Zusammenhang zu einer verminderten Knochendichte (BMD) und/oder einem erhöhten Frakturrisiko aufweisen. Die genauen Genlokalisationen konnten aber meist noch nicht identifiziert werden.

In einigen Kandidatengenomen (Komponenten der Knochenmatrix, Rezeptoren für calciotrope Hormone, Cytokine, Wachstumsfaktoren) wurden genetische Polymorphismen beschrieben, die einen Zusammenhang zu einer verminderten Knochendichte oder einem erhöhten Frakturrisiko erkennen lassen. Bisher am besten untersucht sind der Vitamin-D Rezeptor (VDR) und das Collagen Typ-1-alpha-1 Gen (ColIA1).

In der 3'-Region (Intron 8) des **Genes für den Vitamin-D-Rezeptor (VDR)** wurden verschiedene Polymorphismen beschrieben. Der bekannteste betrifft eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BsmI*. Der sogenannte **BB-Genotyp** dieses Polymorphismus (fehlende *BsmI*-Schnittstelle auf beiden Allelen) ist mit einer niedrigeren Knochendichte und einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert. Die Häufigkeit des BB-Genotyps in der kaukasischen Bevölkerung beträgt 18%, in Asien aber nur ca. 2%. Allerdings war der Einfluss dieses Polymorphismus auf die genannten Parameter in einigen Studien nur relativ gering. In einer Metaanalyse wurde für den BB-Genotyp eine um ca. 2 – 2,5% verringerte Knochendichte erhalten. Das relative Risiko für Wirbelfrakturen war in verschiedenen Studien für den

BB-Genotyp um maximal das 2,5fache erhöht. Deshalb kann der VDR-Genotyp allein nicht zur Beurteilung des Osteoporoserisikos verwendet werden. Diskutiert wird auch ein Zusammenhang zwischen den VDR-Allelen bzw. der Knochendichte und der Calcium- bzw. Vitamin D-Aufnahme aus dem Darm. Für den Bb- bzw. bb-Genotyp (d.h. Schnittstelle für *BsmI* auf einem oder beiden Allelen vorhanden) besteht keine Assoziation zu einer veränderten Knochendichte oder einem erhöhten Frakturrisiko.

Ein genetischer Polymorphismus im Intron 1 des **Collagen Typ-I-alpha-1-Gens (COLIA1)** beeinflusst die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SP-1. Das sogenannte "s-Allel" hat eine erhöhte Affinität für das SP-1 Bindungsprotein und führt zu einer erhöhten Transkriptionsrate. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen den Collagen alpha-1 und alpha-2 Ketten und in der Folge zu einer Abnahme der Knochenfestigkeit und der Mineralisierung. Jede Kopie des "s-Allels" ist nach verschiedenen Meta-Analysen gegenüber dem "S-Allel" mit einer Verringerung der Knochendichte um 0.15 Standardabweichungen und unabhängig davon mit einer Zunahme des Frakturrisikos um das 1.62 fache assoziiert. In der kaukasischen Bevölkerung beträgt die Häufigkeit des ss-Genotyps nur 3%, der Ss-Genotyp wird bei ca. 30% der Patienten nachgewiesen. Für den ColIA1(SP-1)-Polymorphismus wurden auch Assoziationen mit einer beschleunigten Abnahme der postmenopausalen Knochendichte sowie zum Ansprechen auf eine Etidronat-Therapie beschrieben.

Für den **Estrogenrezeptor-alpha (ER-alpha)** wurden verschiedene genetische Polymorphismen im Promotor (TA-Repeats) und im Intron 1 (Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *PvuII* und *XbaI*) beschrieben. Einer neueren Meta-Analyse zufolge (JPA Ioannidis et al. 2002) weisen homozygote Träger des XX-Genotyps (Schnittstelle für *XbaI* auf beiden Allelen fehlend) eine höhere Knochendichte und ein geringeres Frakturrisiko auf als heterozygote oder homozygote Träger des x-Allels (Schnittstelle für *XbaI* auf einem oder beiden Allelen vorhanden). Eine signifikante Assoziation des *PvuII*-Polymorphismus mit der Knochendichte war nicht nachweisbar.

Von Bedeutung für die Knochendichte ist auch das **Osteoprotegerin (OPG)**, das zusammen mit RANKL und RANK Teil eines essentiellen Cytokin-Systems für die Regulation der Osteoklastenfunktion ist.

RANKL (Rezeptoraktivator des Transkriptionsfaktors NFκB-Ligand) aktiviert die Differenzierung von Osteoklasten, steigert die Aktivität ausgereifter Osteoklasten und hemmt ihre Apoptose durch Bindung an seinen Rezeptor RANK (Rezeptoraktivator des Transkriptionsfaktors NFκB). Diese Interaktion kann durch OPG gehemmt werden, das als löslicher Rezeptor für RANKL fungiert und dieses abfangen kann. Seine Wirkungen sind also antagonistisch zu RANKL und umfassen die Hemmung der Osteoklasten-Genese, die Suppression der Osteoklasten-Aktivierung und die Induktion der Apoptose. Entscheidend für die Regulation der Osteoklasten-Differenzierung und -Funktion ist das Verhältnis RANKL/OPG. Mehrere Polymorphismen im Promotor des OPG-Gens, A163G, G209A und T245G, konnten mit einem gesteigerten Frakturrisiko assoziiert werden.

Ein Einfluß auf die Knochendichte wurde auch für die adulte Form der Laktoseintoleranz, basierend auf einer verminderten Expression des **Laktase-Gens**, beobachtet. Neuere Studien haben eine strenge Korrelation zwischen der adulten Form der Laktoseintoleranz und der genetischen Variante -13910 C/T in einer regulatorischen Sequenz vor dem Laktase-Gen gezeigt. Bei Patienten mit der adulten Form der Laktoseintoleranz wird in 96-98% die homozygote Variante -13910 C/C gefunden. Die C/C-Variante wurde in einer Untersuchung an postmenopausalen Frauen auch mit einer verringerten Knochendichte und einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert.

Einschränkend muß für diese genetischen Untersuchungen erwähnt werden, daß die bisher bekannten genetischen Polymorphismen nur einen Teil der Variabilität von Knochendichte und Frakturrisiko erklären können. Insbesondere gibt es noch keine schlüssigen Daten über den kombinierten Einfluss verschiedener genetischer Faktoren (also z.B. die Kombination der verschiedenen VDR-Genotypen mit den Polymorphismen im ColIA1- und ER-alpha Gen). Außerdem müssen weitere genetische Faktoren, die heute noch nicht bekannt sind, sowie Ernährung und Umwelteinflüsse berücksichtigt werden.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR

Nachweis der DNA-Polymorphismen mittels Light-Cycler oder durch DNA-Sequenzierung

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 2 – 3 Wochen

Literatur

Ralston SH Genetic control of susceptibility to osteoporosis (2002) J Clin Endocrinol Metab 87: 2460-2466

Ioannidis JPA et al. Association of polymorphisms of the estrogen receptor α gene with bone mineral density and fracture risk in women: A meta-analysis (2002) J Bone Miner Res 17: 2048-2060

McGuigan FEA et al. Genetic and environmental determinants of peak bone mass in young men and women (2002) J Bone Miner Res 17: 1273-1279

Rizzoli R et al. Osteoporosis, genetics and hormones (2001) J Mol Endocrinol 26: 79-94

Ferrari S et al. Genetic aspects of osteoporosis (1999) Curr Opinion Rheumatol 11: 294-300

Eisman JA Genetics of osteoporosis (1999) Endocrine Rev 20: 788-804

Mann V et al. A COLIA1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality (2001) J Clin Invest 107: 899-907

Hofbauer L and Schoppet M Clinical implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases (2004) JAMA 292: 490-495

Arko B et al. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis (2002) J Clin Endocrinol Metab 87: 4080-4084

Langdahl BL et al. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures (2002) J Bone Miner Res 17: 1245-1255

Obermayer-Pietsch BM et al. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures (2004) J Bone Miner Res 19: 42-47

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Stand 02/2005

Prof. Dr. med. F. Raue, PD Dr. med. Karin Frank-Raue-Innere Medizin-Endokrinologie
Dr. med. Sabine Hentze - Humangenetik
Molekulargenetisches Labor
 Im Weiher 12 – 69121 Heidelberg
 Telefon 06221/658883 - Fax 06221/658884 - E-mail: Egbert.Schulze@raue-endokrinologie.de

Molekulargenetische Diagnostik

bei Laktoseintoleranz (adulte Form) Laktase-Mangel (MIM 603202)

Indikationen:

- adulte Form der Laktoseintoleranz (Blähungen, Durchfall, Darmkrämpfe nach dem Verzehr von laktosehaltigen Nahrungsmitteln)
- Osteoporoserisiko

Die Laktoseintoleranz ist auf die fehlende oder verminderte Aktivität des Enzyms Laktase zurückzuführen. Dieses Enzym, das in der Dünndarmschleimhaut exprimiert wird, spaltet das Disaccharid Laktose in Galaktose und Glukose. Die beiden Monosaccharide werden im Dünndarm resorbiert, während das ungespaltene Disaccharid Laktose nicht resorbiert werden kann. Die unverdaute Laktose wird durch Darmbakterien aufgenommen und vergoren. Die bei der Gärung entstehenden Produkte Wasserstoff, Kohlendioxid und kurzkettige Fettsäuren führen unter anderem zu Blähungen und Diarrhoe. Die adulte Form des Laktase-Mangels ist der weltweit häufigste „Enzymdefekt“. Die Laktaseaktivität ist normalerweise bei der Geburt maximal und wird im Laufe der Kindheit vermindert, sie kann genetisch bedingt aber auch bis ins Erwachsenenalter konstant hoch bleiben (Laktase-Persistenz). Die geographische Verteilung des Laktase-Mangels zeigt ein Nord-Süd-Gefälle. In nordischen Ländern haben nur etwa 5-10% der Bevölkerung einen Laktase-Mangel, in Deutschland sind es ca. 15-20%, im Mittelmeerraum ca. 70% und in der Äquatorzone liegt der Anteil der Bevölkerung mit Laktase-Mangel bei 98%. Diese Form des Laktase-Mangels (primäre Form) ist von der sekundären Form zu unterscheiden, die auf eine Schädigung der Oberfläche des Dünndarmepithels zurückzuführen ist (z.B. Morbus Crohn, Zöliakie). Die primäre Laktoseintoleranz wird autosomal rezessiv vererbt. Untersuchungen zeigten eine strenge Korrelation zwischen der Laktoseintoleranz und der genetischen Variante –13910 C/T, die sich in regulatorischen Sequenzen vor dem Laktase-Gen befindet. Bei Patienten mit der adulten Form der Laktoseintoleranz wird in 96-98% die homozygote Variante –13910 C/C gefunden. Bei gesunden Kontrollen konnte die C/C-Variante in fast allen bisher durchgeführten Populationsstudien ausgeschlossen werden.

Verschiedene Studien zeigen, dass Patienten mit Laktoseintoleranz eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, an Osteoporose zu erkranken (siehe Merkblatt Osteoporose). Die C/C-Variante an Position –13910 des Laktase-Gens wurde in einer Untersuchung an postmenopausalen Frauen mit einer verringerten Knochendichte und einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert.

Methode:

DNA-Extraktion, PCR

Nachweis des DNA-Polymorphismus durch DNA-Sequenzierung

Untersuchungsmaterial:

2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 1 Woche

Literatur - Laktasemangel

Rasinpera H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Totterman N, Lindahl H, Jarvela I, Kolho KL. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. (2004) *Gut* 53(11):1571-6.

Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. (2002) *Nat Genet.* 30(2):233-7.

Obermayer-Pietsch BM, Bonelli CM, Walter DE, Kuhn RJ, Fahrleitner-Pammer A, Berghold A, Goessler W, Stepan V, Dobnig H, Leb G, Renner W. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. (2004) *J Bone Miner Res.* 19(1):42-7.

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern. **Stand 02/2005**

Prof. Dr. med. F. Raue, PD Dr. med. Karin Frank-Raue-Innere Medizin-Endokrinologie
 Dr. med. Sabine Hentze - Humangenetik
Molekulargenetisches Labor
 Im Weiher 12 – 69121 Heidelberg
 Telefon 06221/658883 - Fax 06221/658884 - E-mail: Egbert.Schulze@raue-endokrinologie.de

Genetische Polymorphismen des Enzyms P450 2C19 (CYP2C19 - MIM 124020)

Bedeutung für den Metabolismus von Omeprazol und anderen Protonen- pumpenhemmern - Wirksamkeit dieser Arzneimittel in der Eradikationstherapie von *H. pylori*

Omeprazol ist der am häufigsten in der Eradikationstherapie von *Helicobacter pylori* verwendete Protonenpumpenhemmer (PPI). Die meisten PPI (Omeprazol, Pantoprazol, Lansoprazol) mit Ausnahme von Esomeprazol werden in der Leber durch das Cytochrom P450 2C19 metabolisiert. Für dieses Enzym sind drei genetische Polymorphismen bekannt (Mutationen in Exon 4, Exon 5 und im Startkodon des CYP2C19-Gens), die zu einem stark verringerten Metabolismus der PPI und anderer Arzneimittel (z.B. Mephenytoin, Proguanil, Diazepam) führen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Mutationsträger (langsame Metabolisierer) signifikant höhere Eradikationsraten von *H. pylori* bei Verwendung eines identischen Standardschemas (Tripeltherapie) aufweisen, als Patienten mit der „Wildtyp-Sequenz“ von CYP2C19 (schnelle Metabolisierer). Die Häufigkeit der homozygot „schnellen Metabolisierer“ mit somit niedrigeren Plasmaspiegeln der PPI liegt in der kaukasischen Bevölkerung bei ca. 60-70%. Homozygot „langsame Metabolisierer“ und heterozygote Patienten werden mit Häufigkeiten von 2-5% bzw. 20-35% beschrieben. Die Plasmaspiegel von Omeprazol sind bei den „langsamen Metabolisierern“ signifikant erhöht (6 bis 10fach). Bei diesen Patienten war in verschiedenen Studien ein duales Schema zur Eradikation von *H. pylori* (PPI und Amoxicillin, also Verzicht auf ein zweites Antibiotikum wie z.B. Clarithromycin) wirksam.

Der CYP2C19-Genotyp korreliert ebenfalls mit dem intragastrischen pH-Wert und den Plasma-Gastrin-Spiegeln (jeweils höher bei Patienten mit homozygoter bzw. heterozygoter Mutation von CYP2C19).

Als therapeutische Konsequenzen aus dem Nachweis der genetischen Polymorphismen ergeben sich für Patienten mit hoher Metabolisierungsrate (Wildtyp P450 2C19-Sequenzen):

- Dosiserhöhung der PPI im Eradikationsschema
- Verlängerung der Therapiedauer

Ob Esomeprazol, das zu einem deutlich höheren Anteil durch CYP-3A4 und nicht durch CYP2C19 metabolisiert wird, unabhängig von den genetischen Polymorphismen im CYP2C19-Gen wirksam ist, muß noch in einer kontrollierten Studie belegt werden.

Indikationen zur CYP2C19-Genotypisierung:

relativ: vor Beginn einer Eradikationstherapie zur Auswahl eines optimalen Therapieschemas

absolut: Patienten mit Rezidiven nach *Helicobacter pylori*-Eradikation

Methode:

DNA-Extraktion; PCR

Hybridisierung mit Mutations-spezifischen Sonden und Schmelzkurvenanalyse auf dem Light Cycler
 Der Befund enthält eine Bewertung mit Empfehlungen für die weitere Therapie.

Untersuchungsmaterial: 2 ml EDTA Blut; normaler Postversand

Dauer der Untersuchung: 5 Arbeitstage

Literatur – CYP2C19:

Furuta T, Shirai N et al. (2001) Effect of genotypic differences in CYP2C19 on cure rates for *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with a proton pump inhibitor, amoxicillin, and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther* 69:158-68.

Sagar M, Tybring G, Dahl M-L, Bertilsson L, Seensalu R (2000) Effects of omeprazole on intragastric pH and plasma gastrin are dependent on the CYP2C19 polymorphism. *Gastroenterology* 119:670-76.

Tanigawara Y, Aoyama N et al. (1999) CYP2C19 genotype-related efficacy of omeprazole for the treatment of infection caused by *Helicobacter pylori*. *Clin Pharmacol Ther* 66:528-34.

Aoyama N, Tanigawara Y et al. (1999) Sufficient effect of 1-week omeprazole and amoxicillin dual treatment for *Helicobacter pylori* eradication in cytochrome P450 2C19 poor metabolizers. *J Gastroenterol* 34 (Suppl XI):80-83.

Stand 10/2004

Genetische Prädisposition für Parodontose

Polymorphismen in den Genen für Interleukin-1A (IL-1A -889, MIM 147760) und Interleukin-1B (IL-1B +3954, MIM 147720)

Indikationen:

- juvenile Parodontitis
- schwere Verlaufsformen der chronischen Parodontitis
- familiäre Häufung von Parodontalerkrankungen

Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Interleukin-1 (IL-1) spielt unter den genetisch bedingten Risikofaktoren für Parodontalerkrankungen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle. Interleukin-1 wird vom Immunsystem als Antwort auf äußere Reize, z.B. parodontopathogene Keime, ausgeschüttet und soll letztlich deren Elimination bewirken. Genetische Polymorphismen können eine Überproduktion von IL-1 bewirken, die mit massiven Entzündungsvorgängen assoziiert ist.

Es existieren zwei Formen von IL-1:

- IL-1alpha (saure Form, kodiert durch das IL-1A-Gen)
- IL-1beta (neutrale Form, kodiert durch das IL-1B-Gen)

Der Nachweis der genetischen Polymorphismen in den beiden Interleukin-Genen besitzt einen hohen prognostischen Stellenwert für

- den Schweregrad einer Parodontalerkrankung,
- für eine verzögerte Wundheilung nach operativer Therapie und
- für die Notwendigkeit einer intensiven Prophylaxe bei juveniler Parodontitis

Bei den Polymorphismen von IL-1A und IL-1B trägt Allel 1 jeweils ein Cytidin (C-Nukleotid), während bei Allel 2 an der entsprechenden Position ein Thymin (T-Nukleotid) nachgewiesen wird. Der Allel 2-Polymorphismus des IL-1B-Gens führt über eine Beeinflussung der Feed-back-Regulation bei der Proteinsynthese zu einer Überproduktion des Entzündungsmediators Interleukin-1 und nachfolgend zu einer gesteigerten Abwehrreaktion des Patienten auf parodontopathogene Keime. In der Folge kommt es zu einer verstärkten Taschenbildung sowie zum Abbau des Parodontalgewebes. Die Prävalenz des Allels 2 von IL-1B+3954 beträgt in der kaukasischen Bevölkerung ca. 30%.

Bei Patienten, die gleichzeitig Träger der beiden Polymorphismen (Allel 2 von IL-1A und IL-1B) sind, ist das Risiko für eine schwere Parodontitis sowie für eine verzögerte Heilung bei aggressiver operativer Therapie deutlich erhöht. Die Kombination mit zusätzlichen Risikofaktoren (z.B. Rauchen) führt zu einer weiteren Zunahme des Risikos für Parodontalerkrankungen.

Der genetische Risikotest muß durch ernährungsphysiologische und mikrobiologische Untersuchungen (z.B. Wirtsbedingungen für parodontopathogene Keime, Keimspektrum) ergänzt werden, um eine effiziente Behandlungsplanung zu ermöglichen.

Methode:

DNA-Präparation aus dem Wangenschleimhautabstrich

Amplifikation der interessierenden Regionen der Gene für Interleukin-1A und Interleukin-1B durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Nachweis der Polymorphismen IL-1A-889 und IL-1B+3954 mit einem Light Cycler Assay bzw. durch DNA-Sequenzierung

Als positiv werden alle Proben bezeichnet, die an beiden untersuchten Genloci (IL-1A-889 und IL-1B+3954) mindestens eine Kopie von Allel 2 (siehe oben) tragen.

Untersuchungsmaterial:

Wangenabstrich; normaler Postversand

Bitte verwenden Sie nur die Abstrichtupfer, die wir Ihnen zur Verfügung stellen.

Wichtige Hinweise für die Probenentnahme (Wangenschleimhaut-Abstrich)

- 30 min vor der Probenentnahme keine Nahrungsaufnahme
Mund mit reinem Wasser spülen (keine Zusätze)
- mit sterilem Abstrichtupfer an der Wangenschleimhaut 5-6 x mit drehender Bewegung unter leichtem Druck Material gewinnen
- Tupfer mindestens 60 min offen trocknen (Vorsicht vor Kontaminationen!)
- Abstrichtupfer im Röhrchen (beschriftet) versenden

Dauer der Untersuchung: 5 – 10 Arbeitstage

Literatur

Kornman KS et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease (1997) J Clin Periodontol 24: 72-77

Kornman KS and Di Giovine FS Genetic variations in cytokine expression: A risk factor of adult periodontitis (1998) Ann Periodontol 3: 327-338

Westerman CMP et al. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population (2001) J Clin Periodontol 28: 1137-1144

Greenstein G and Hart TC A critical assessment of interleukin-1 genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis (2002) J Periodontol 73: 231-247

Meisel P et al. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster in patients with periodontal disease (2002) J Periodontol 73: 27-32

Die angegebene Literatur können Sie per Fax oder E-mail in unserem Labor anfordern.

Stand 10/2004