Abteilung Innere Medizin I
(Direktor: Professor Dr. med. G. Adler)

Quantitative Analyse der MEN 1 Genexpression in peripherem Blut: Implikationen für die klinische Gendiagnostik

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Philipp Reiser
Friedrichshafen

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Wolfram Karges

2. Berichterstatter: PD Dr. Felix Manuel Mottaghy

Tag der Promotion: 09.02.2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 4

1. Einleitung 6

2. Fragestellung 11

3. Material und Methoden 12

3.1 Strategie und Experimentaldesign 12

3.2 Probanden und Materialgewinnung 13

3.3 Verdünnungsserie für die Erstellung einer Standardkurve 15

3.4 Prinzip und Durchführung der real-time PCR 21

3.5 Absolute Quantifizierung der mRNA 26

3.6 Statistik 30

4. Ergebnisse 31

4.1 Probanden und Material Charakteristika 31

4.2 Ergebnisse der Verdünnungsserie 32

4.2 Erstellung der Standardkurve 36

4.4 Leukozytenzahlen 39

4.5 Quantifizierung der MEN1 mRNA 40

5. Diskussion 44

6. Zusammenfassung 49

7. Literaturverzeichnis 50

8. Danksagung 57

Abkürzungsverzeichnis

13 S und 18 S	Sedimentationskonstanten der eukaryoten Ribosomen
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Arg	Arginin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Ca^{2+}	Kalzium
CCD	Charge Coupled Device
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C_T	Threshold Cycle
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA
dT	Desoxy Thymin
dTTP	Desoxythymintriphosphat
dU	Desoxy Uracil
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraethylsäure
I.E.	Internationale Einheiten
IGF	Insulin-like growth factor
k-Da	kilo Dalton
LJ	Lebensjahre
LOH	Loss of heterozygosity
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MuLV	Murines Leukämie Virus
MUX	Multiplexer
OD	Optische Dichte

PCR	Polymerasekettenreaktion
PTH	Parathormon
R^2	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SSCP	Single strand conformation polymorphism
T	Thymin
TAE	Trisbase Acid Na_4EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
Trp	Tryptophan
UNG	Uracil-N-Glycosylase
WBC	White blood cells

1. Einleitung

Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1

Die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die sich durch das kombinierte Auftreten von neuroendokrinen Tumoren (DeLellis 1995) definiert und auf den funktionellen Verlust eines Tumorsuppressorgens (Larsson et al. 1988; Thakker et al. 1989) zurückzuführen ist.
Als diagnostisch wegweisende und häufigste Erkrankung zeigt sich bei 90 bis 97% der MEN1 Patienten ein primärer Hyperparathyreoidismus, gefolgt von endokrinen Tumoren des Pankreas in 40 bis 75% der Fälle (Wermer 1954; Thakker 2000; Trump et al. 1996). Adenome der vorderen Hypophyse sind mit 30% die dritthäufigste Manifestation (Burgess 1996; Padberg et al. 1995). Weitere assoziierte Läsionen sind adrenokortikale Adenome (Burgess 1996b), Angiofibrome und Kollagenome (Darling 1997) und andere seltene Tumore wie ein MEN1 assoziiertes Astrozytom Grad II (Karges et al. 2003).
Um die klinische Diagnose des MEN1 stellen zu können, müssen wenigstens zwei der oben genannten Organe betroffen sein (Skogseid et al. 1994).
Aufgrund der autosomal-dominanten Vererbung dieser Erkrankung beträgt das Erkrankungsrisiko der Kinder von MEN1 Patienten 50%; vor allem aufgrund der altersabhängigen Penetranz, die im Alter von 20 Jahren. 52%, aber im Alter von 40 LJ. bereits 98% beträgt (Bassett 1998; Trump et al. 1996).

Die heutige klinische Diagnosestellung umfasst ein biochemisches Screening-Programm für putative Genträger, welches Kalzium, PTH, Prolaktin, IGF, ACTH, Glukose, Insulin, Gastrin, Glukagon, u.a. umfasst (Skogseid 2003). Dieses Screening-Programm, welches früher für alle erstgradig Verwandten eines MEN-1 Patienten empfohlen wurde, kann heute durch die DNA Analyse des betreffenden Genabschnittes auf die Genträger beschränkt werden (Karges et al. 2000). Ein hoch konserviertes Tumorsuppressorgen (Karges et al. 1999), welches sich auf dem Chromosom 11q13 (Larsson et al. 1998) befindet, wurde als molekularer Ursprung der Erkrankung erkannt (Chandrasekharappa et al. 1997; The Europeen Consortium on MEN1 1997).

Die MEN1 Mutationen bedingen einen Funktionsverlust (loss of function) (Pannett, Thakker 1999) von Menin, einem 610 Aminosäuren großen Protein, welches auf zehn Exons kodiert ist und mit dem AP1 Transkriptionsfaktor JunD interagiert (Agarwal et al. 1999).

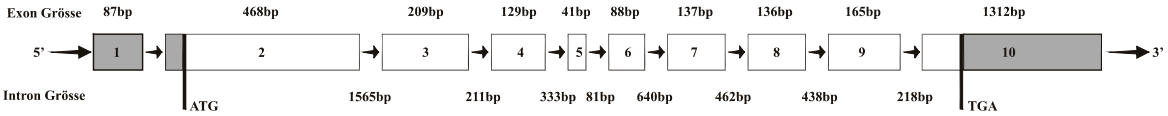

Abb. 1 Schematische Darstellung der 10 Exone des MEN1 Gens; bp = Basenpaar; Intronsequenzen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet

In betroffenen Geweben kann ein Verlust der Heterozygotie (Solomon et al. 1991) (Loss of heterozygosity) nach der two-hit-Hypothese nach Knudson (Knudson 1971) angenommen werden; d.h. beide Allele sind durch genetische Veränderungen inaktiviert. Dies ist im allgemeinen ein mehrstufiger Prozess, beginnend mit einer klinisch stummen hereditären Prädisposition zu einer Neoplasie, indem ein Allel verändert ist. Später folgt dann eine weitere Mutation in einer somatischen Zelle (LOH). Alternativ besteht die Möglichkeit zweier somatischer Mutationen, was jedoch statistisch durch viel kleinere Wahrscheinlichkeiten und einen späteren Krankheitsbeginn charakterisiert wird (Haber und Fearon 1998).

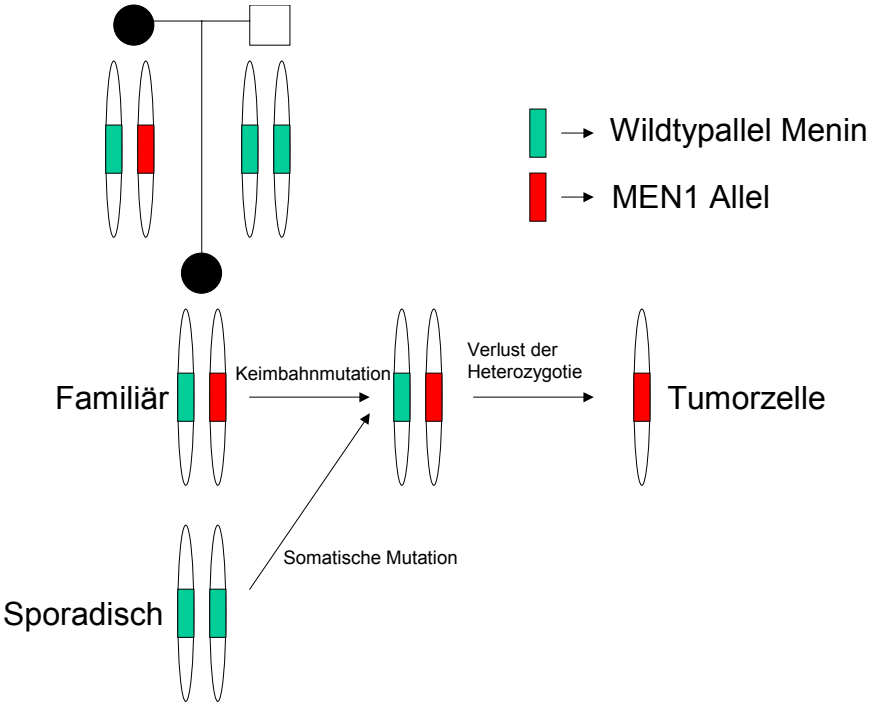

Abb. 2 Knudson two-hit-hypothesis; diese Abbildung veranschaulicht den theoretischen molekulargenetischen Mechanismus, der der Inaktivierung des MEN1 Tumorsuppressor Gens zugrunde liegt. Links oben ist eine Familie mit einem betroffenen Kind dargestellt. Das Kind ist heterozygot für die MEN1-Störung. Zugunsten der Übersichtlichkeit der Darstellung ist nur ein potentieller Mechanismus für den zweiten Hit aufgezeigt. Die sporadischen Tumoren entstehen durch einen ähnlichen Mechanismus mit dem Unterschied, dass beide Hits durch somatische Mutationen entstehen.

Für ein molekulares Screening ist die Untersuchung von Tumorgewebe aus betroffenen Organen entbehrlich. Da Menin ubiquitär exprimiert wird (Ikeo et al. 1999; Karges et al. 1999) ist es einer Untersuchung in Leukozyten im peripheren Blut zugänglich. Die molekulare Krankheitsfindung wird stark durch die Tatsache erschwert, dass bis zum heutigen Tag mehr als 300 unterschiedliche Mutationen des MEN1 Gens beschrieben wurden (siehe „The Human Gene Mutation Database Cardiff“), die keinerlei Genotyp-Phänotyp Korrelationen aufweisen (Kouvaraki et al. 2002; Wautot et al. 2002). Des weiteren kann kein wirklicher „hot spot“ ausgemacht werden, wobei jedoch in einigen Codons (Codon 83, 84, 209-211, 514-516) gehäuft Mutationen zu finden sind (Thakker 1998).

Im Vergleich mit anderen erblichen Störungen zeigt sich der hohe analytische Aufwand bei der Mutationsfindung beim MEN1 Syndrom.

Tab. 1 Merkmale des genetischen Mutationsscreenings bei MEN1 Syndrom im Vergleich zu anderen erblichen Störungen

Erkrankung	***Gen (Chromosom)***	***Größe der kodierenden Sequenz***	***Identifizierte Mutationen[1]***	***hot-spot vorhanden***	***Häufigste Mutation***	***Analytischer Aufwand***
MEN1	**MEN1 (11q13)**	**1,6 kb (9 Exone)**	**>300**	**nein**	**keine**	**hoch**
Cystische Fibrose	CFTR (7q31)	4,4 kb (24 Exone)	>400	ja	Δ508F (70%)	hoch
MEN2	RET (10q11)	2,5 kb (19 Exone)	9	ja	Codon 634 (65%)	mittel
Hämochromatose	HFE (6p21)	1,0 kb (6 Exone)	2	ja	C281Y (83%)	gering

[1]ohne sehr seltene Mutationen, d.h. Häufigkeit <0,1%; kb entschpricht 1000 Basen; Δ508F = Verlust von Phenylalanin; C281Y = Cystein durch Tyrosin ersetzt

So ist das hereditäre MEN1 Syndrom nur einer molekularen Analyse zugänglich, sofern die komplette codierende Sequenz sequenziert bzw. analysiert wird, was auf der Ebene der genomischen DNA mit einem hohem Aufwand an Zeit und Kosten verbunden ist. Jedoch ist auch eine Analyse der mRNA möglich. Diese muss vor der Direktsequenzierung in einer RT-PCR zu cDNA umgewandelt werden. Der bisherige große Nachteil dieser Methode ist die scheinbare Instabilität der mRNA, was dazu führt, dass Blutproben auf Eis gelagert und möglichst schnell verarbeitet werden müssen, um eine Degradation zu verhindern (gemäss aktuellem Verfahrensprotokoll der Universität Ulm), um eine einwandfreie Sequenzierung zu gewährleisten.

Quantitative real-time PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Technik, die im Jahr 1983 von Kary Mullis erdacht und entwickelt wurde (Bartlett et al. 2003), aber ihre Bedeutsamkeit hat sich von den Anfängen (Saiki et al. 1985) bis heute immer weiter ausgeweitet und ohne sie wäre die moderne Molekularbiologie nicht vorstellbar. Die Weiterentwicklung der ursprünglichen Polymerasekettenreaktion ist die quantitative PCR in Echtzeit (quantitative real-time PCR), welche es ermöglicht, neben der Analyse von entstehendem PCR Produkt, dieses auch in Echtzeit zu detektieren. Hier stehen unterschiedliche Produkte wie der Roche Lightcycler, der Biorad iCycler und der AbiPrism 7700 SDS von Applied Biosystems zur Verfügung, sowie diverse unterschiedliche Chemikalien zur Detektion, z.B. TaqMan Sonden oder SYBR Green bei Applied Biosystems. Alle aktuellen Chemikalien beruhen auf der Erzeugung eines Fluoreszenzsignals durch intermolekulare Interaktionen zwischen Primer, Template und Chemikalie; die Sensitivität und Reproduzierbarkeit sind nicht nur hier sehr ähnlich (Hein et al. 2001), auch die Geräte unterscheiden sich wenig (Nitsche et al. 1999).

2. Fragestellung

Um sichere Aussagen bei der Entdeckung putativer MEN1 Genträger machen zu können, ist die klinische Gendiagnostik unerlässlich. Durch die große Anzahl von Mutationen und fehlenden hot spots, so wie durch zahlreiche Intronmutationen ist die auf genomischer DNA basierte Diagnostik arbeits- und kostenintensiv.
Hier bietet sich die einfachere Möglichkeit der Analyse der MEN1 mRNA an, welche in Leukozyten exprimiert wird, sich mittels PCR leicht amplifizieren lässt und so schließlich einfacher einer Sequenzierung zugänglich ist.
Die Analyse auf genomischer Ebene zeichnet sich durch große Stabilität der DNA, im Extremfall über Jahrzehnte, aus, wobei sich bei der Verwendung von mRNA die Frage stellt, ob diese hinreichend stabil für spätere Analysen ist.

Das Ziel der Experimente:

Die klinische Fragestellung war, ob die Multiple Endokrine Neoplasie Typ1 mRNA Genexpression in Leukozyten aus peripherem Blut eine hinreichende Halbwertszeit bzw. Stabilität aufweist, um eine darauffolgende molekulare Analyse zu ermöglichen und die aktuellen klinischen molekularbiologischen Screening-Untersuchungen für putative MEN1 Genmutationsträger auf mRNA Basis zu vereinfachen und effizienter zu gestalten.

Hierzu wurde die experimentelle Strategie verfolgt, eine systematische Stabilitätsanalyse der MEN1 Tumorsuppressorgen mRNA mittels quantitativer real-time PCR im Zeitraum von 0 bis 7 Tagen anzufertigen und mit den Ausgangsmengen an vorhandener mRNA zu vergleichen.

3. Material und Methoden

3.1 Strategie und Experimentaldesign

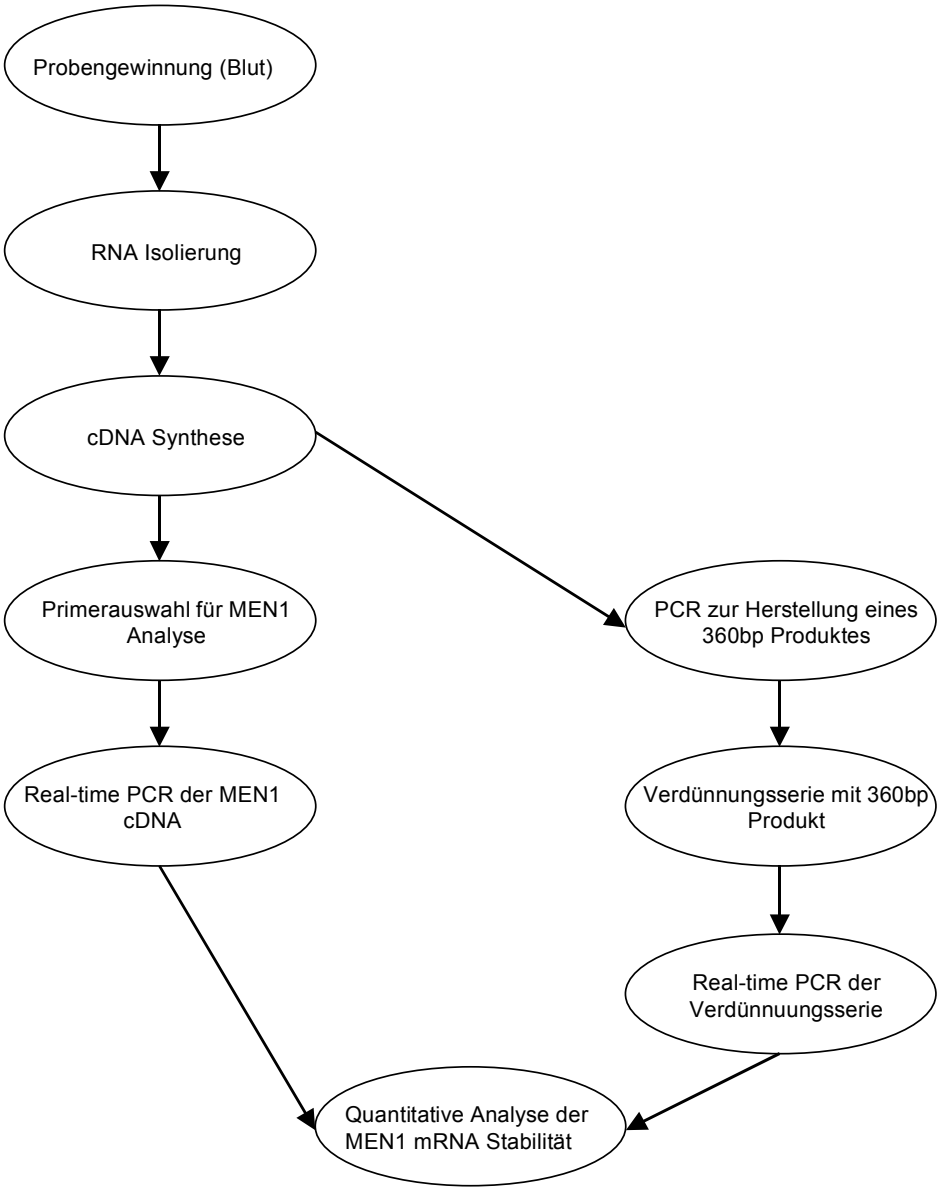

Abb. 3 Schematische Darstellung des Experimentaldesigns und der Strategie der quantitativen mRNA Analyse. bp = Basenpaare.

3.2 Probanden und Materialgewinnung

Die für die Untersuchungen verwendeten Blutproben stammen von zwei Patienten mit nachgewiesenen MEN1 Mutationen und von zwei gesunden Kontrollpersonen. Diesen Personen wurden jeweils mehrere unterschiedliche Blutproben entnommen.
Es wurden Blutproben verglichen, die entweder Lithium-Heparin oder Kalium-EDTA als Antikoagulans enthielten.

Tab. 2 Übersicht der Spezifikationen der verwendeten Monovetten von Sarstedt

Art und Volumen	*Antikoagulans*	*Konzentration*
4,5 ml S-Monovette	Lithium-Heparin	15 I.E. Heparin/ml Blut
2,7 ml S-Monovette	Kalium-EDTA	1,6 mg EDTA/ml Blut

EDTA (Ethylendiamintetraethylsäure), I.E. (Internationale Einheiten), S (Serum)

Den Patienten wurden am Tag 0 die Blutproben entnommen und anschließend ließ man sie im Entnahmegefäß für 1, 3, 5 und 7 Tage bei Raumtemperatur ruhen, bevor die RNA Isolation bzw. die cDNA Herstellung erfolgte.

An den entsprechenden Tagen wurden des weiteren die Leukozytenzahlen in den Blutproben durch das universitätseigene Labor ermittelt.

RNA Isolierung aus den Blutproben

Die totale RNA der einzelnen Proben wurde nach der Standard RNAzol Methode von Roth gewonnen und anschließend jeweils in 10 µL DEPC behandeltem Wasser gelöst. Diese Isolierung lief für alle Proben von allen Versuchsprobanden identisch ab. Entsprechend den Vorgaben wurde RNA an den Tagen null, wobei hier ein Triplett angefertigt wurde, eins, drei, fünf und sieben aus den EDTA- bzw. Li-Heparin Blutproben isoliert.

Zur exakten RNA Konzentrationsbestimmung wurden des weiteren von jeder RNA Probe Optische Dichte Messungen bei 260 und 280 nm durchgeführt.

cDNA-Synthese aus RNA

Die cDNA Synthese wurde mit Hilfe von Random Hexamer Primern, die eine bedeutend höhere Ausbeute als spezifische Primer (Zhang und Byrne 1999) erbringen, durchgeführt. Als Reverse-Transkriptase Enzym wurde die Reverse-Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus (MuLV) (DeStefano et al. 1991) verwendet. Es wurden jeweils 20 µL Ansätze hergestellt, für welche 1000 ng RNA eingesetzt wurden.
Diese Menge wurde photometrisch bestimmt, was bei RNA Konzentrationen von über 100 ng/µL eine sehr zuverlässige Methode ist (Bustin 2002), zusätzlich wurden sie visuell mit Agarosegelen abgeglichen.

Tab. 3 Reaktionsbedingungen für die cDNA Synthese

Reagenz	***Volumen in µL***
$MgCl_2$	4
10X Puffer II (25mM)	2
dNTP (10mM)	2
RNAse Inhibitor	1
MuLV	1
Random Hexamers	1
Aqua dest.	2,86
RNA Mix	6,14
Summe	20

$MgCl_2$ (Magnesiumchlorid), dNTP (Desoxynukleotidtriphosphat), MuLV (Murines Leukämie Virus), RNA (Ribonukleinsäure), dest. (destilliert)

3.3 Verdünnungsserie für die Erstellung einer Standardkurve

Herstellung des 360 bp PCR Produktes für die Verdünnungsserie

Für die Erstellung einer Standardkurve, welche später genutzt werden kann, um die aus den einzelnen Proben gewonnenen C_t-Werte (Erläuterung s.u.) einer absoluten Kopienzahl zuzuordnen, ist es notwendig, hierfür eine Verdünnungsserie auf dem AbiPrism 7700 zu analysieren.

- ***Primerdesign***

Hierzu wurde zuerst das Segment II des Menin Gens mittels Polymerasekettenreaktion und den Primern M331 / M690A vervielfältigt. Dieses Segment wurde gewählt, da es die Primer M533 und M659A (Kriterien für deren Auswahl s.u.) für die später zu erstellende quantitative real time PCR enthält.

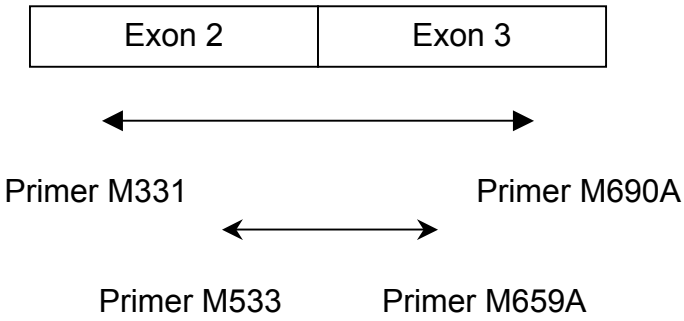

Abb. 4 Schematische Darstellung der Lage der beiden in den Analysen verwendeten Primerpaare im MEN1 Gen. Beide Primerpaare überspannen in der DNA das Intron zwischen Exon 2 und 3. Es entsteht ein langes PCR Produkt mit 360 bp (M331/M690A) sowie ein kurzes mit 127 bp (M533/M659A). Der Intronabschnitt ist nicht dargestellt.

Durch die so gewählte Position der Primer entstehen ein langes 360 bp Produkt und ein innerhalb liegendes kurzes 127 bp Produkt. Das lange Produkt besitzt die gleichen Reaktionseigenschaften wie das kurze und stellt später die Basis der Verdünnungsserie zur Quantifizierung der eigentlichen MEN1 mRNA dar.

Die Auswahl der Primer für Segment II entspricht der Sense-/Antisenseprimerkombination nach Ludwig et al. (Ludwig et al. 1999):

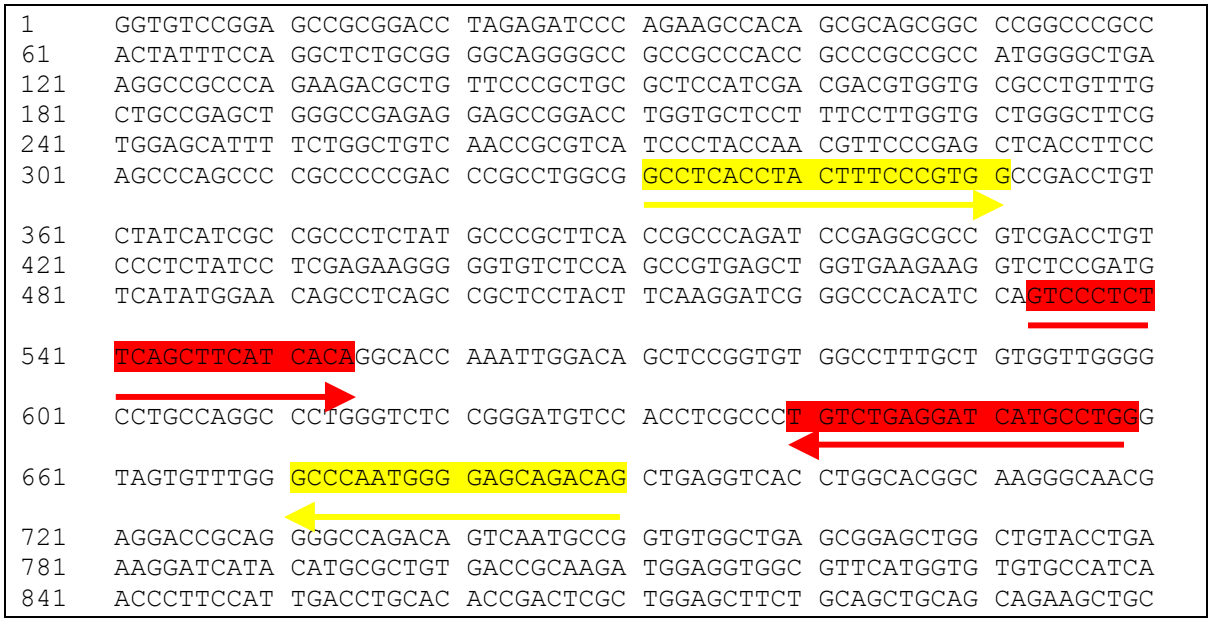

Abb. 5 Ausschnitt der MEN1 mRNA aus der Genbank U93236 mit den beiden Primer Paaren M331/M690A (gelb) und M533/M659A (rot).

Tab. 4 Tabelle mit Primersequenzen, gelb die Sequenzen für den Perkin Elmer, rot die Sequenzen für die quantitative real-time PCR. A= Anitsense, bp= Basenpaare.

Primer	***Sequenz***	***Produktlänge***
M331	5'- GCC TCA CCT ACT TTC CCG TGG	360 bp
M690A	5'- CTG TCT GCT CCC CAT TGG GC	
M533	5'- GTC CCT CTT CAG CTT CAT CAC A	127 bp
M659A	5'- CCA GGC ATG ATC CTC AGA CA	

- ***Polymerasekettenreaktion***

Für die Polymerasekettenreaktion wurde das Perkin Elmer 9600 PCR System im Stepcyclemodus genutzt. Die Reagenzien wurden in ihrer quantitativen Zusammensetzung nach den optimierten Standardbedingungen ausgewählt (Roux 1993, Cha und Thilly 1993).

Tab. 5 25 µL Ansatz für eine PCR auf Perkin Elmer 9600

Reagenz	***Volumen in µL***
Aqua dest.	18,9
10x Puffer ($MgCl_2$, 1,5mM)	2,5
dNTP (2,0mM)	2,5
M331	0,25
M690A	0,25
Taq Polymerase	0,1
cDNA	0,5
Summe	25

$MgCl_2$ (Magnesiumchlorid), dNTP (Desoxynukleotidtriphosphat), RNA (Ribonukleinsäure), dest. (destilliert), cDNA (Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)

Die Zyklusanzahl von 34 wurde als optimal für die Amplifizierung der cDNA ermittelt (Douglas und Atchinson 1993); die weiteren Reaktionsbedingungen für die PCR auf dem Perkin Elmer 9600 PCR System entsprechen den von Karges (Karges et al. 1999) empfohlenen für das Segment II des MEN1 Gens.

Tab. 6 Gerätetechnische Reaktionsbedingungen des Perkin Elmer 9600 PCR Systems

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
1. Denaturierung	96°C	3 min.
Zyklus 1-34:		
Denaturierung	96°C	30 sec.
Annealing	66°C	30 sec.
Extension	72°C	30 sec.
Endextension	72°C	5 min.

- ***Aufreinigung des 360 bp PCR Produktes***

Um das PCR Produkt von unnötigen und für die OD-Messung störenden Überresten der abgelaufenen PCR zu befreien, wird das QIAquick PCR Purification Kit benutzt.
35 μL des erzeugten 360 bp PCR Produktes werden mit 175 μL PB Buffer versetzt und in die Reinigungssäule eingefüllt. Anschließend wird diese mehrmals gewaschen. Das aufgereinigte PCR Produkt wird mittels 30 μL Buffer BE aus der Säule gelöst. Hierfür muss nach dem Einfüllen des Puffers für 15 Minuten gewartet werden, um das Produkt zu lösen, bevor die Säule ein letztes mal für zwei Minuten zentrifugiert wird.

- ***Agarosegelelektrophorese***

Für die qualitative Kontrolle und für die spätere quantitative optische Abschätzung der Menge an entstandenem PCR Produkt wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für die Basenlänge von 360 bp des PCR Produktes eignet sich ein 1,5 % Agarosegel (Zimm und Levene 1992). Hierfür wurden 1,88 g Agarose in 125 mL TAE-Puffer gelöst und mit 4,25 μL Ethidiumbromid versetzt. Die Geltaschen wurden anschließend mit 2 μL bzw. 5 μL PCR Produkt, welches zuvor mit einem optisch etwa identischem Volumen des Ladepuffers Xylenxyanol gemischt wurde, befüllt. Die Basenlänge wurde mittels einer 100 bp Leiter kontrolliert. Das Gel wurde dann in der Elektrophoresekammer für 25 Minuten einer Spannung von 125 Volt ausgesetzt.

Die erzeugte Menge an PCR Produkt pro μL wird nun sowohl mittels optischer Schätzung, als auch mittels OD-Messung ermittelt.

- ***Herstellung der Verdünnungsserie***

Für die Generierung einer Standardkurve wurde aus dem 360 bp PCR Produkt eine serielle 10-fach Verdünnungsserie angelegt. Das aufgereinigte PCR Produkt enthält eine Konzentration von 10,1 ng/μL.
In der geringsten Verdünnung wird 1ng Template (PCR-Produkt) eingesetzt (bei einem Volumen von 4 μL*)*. Die anschließenden Verdünnungen wurden nach folgendem Prinzip angelegt: für die nächst höhere Verdünnung wurde jeweils die zuvor hergestellte Verdünnung erneut als Ausgangsprodukt verwendet.

Tab. 7 Übersicht der einzelnen Verdünnungsstufen

PCR Produkt in μL	*Aqua dest. in μL*	*Konzentration in ng/μL*	*Verdünnungs-stufe*	**Anzahl der Moleküle**
1	39,4	0,25	1	$2{,}7063 \times 10^9$
4	36	0,025	1:10	270.680.000
4	36	0,0025	1:100	27.068.000
4	36	0,00025	1:1.000	2.706.800
4	36	0,000025	1:10.000	270.680
4	36	0,0000025	1:100.000	27.068
4	36	0,00000025	1:1.000.000	2707
4	36	0,000000025	1:10.000.000.	270
4	36	0,0000000025	1:100.000.000	27
4	36	0,00000000025	1:1.000.000.000	3

PCR (Polymerasekettenreaktion), Aqua dest. (destilliertes Wasser)

Quantitative real-time PCR der Verdünnungsserie

Um die Standardkurven für die absolute Quantifizierung der später zu untersuchenden MEN1 mRNA zu erstellen, wurde von der seriellen 10-fach Verdünnungsserie eine quantitative real-time PCR angefertigt. Hierzu wurde der AbiPrism 7700 von Perkin Elmer verwendet. Das grundlegende Prinzip entspricht dem des Perkin Elmer 9600 PCR Systems. Jedoch kann bei diesem Gerät das entstehende PCR Produkt in Echtzeit detektiert werden. Die technische Funktionsweise wird später näher erläutert.

Tab. 8 40 µL Ansatz für ein real-time PCR auf AbiPrism 7700

Reagenzien	*Volumen in µL*
Aqua dest.	22,4
$MgCl_2$	4,8
dNTP	3,2
Sybr Green	4
UNG	0,2
Primer M533	0,6
Primer M659A	0,6
AmpliTaq DNA Polymerase	0,2
360 bp PCR Verdünnung als Template	4
Summe	40

$MgCl_2$ (Magnesiumchlorid), dNTP (Desoxynukleotidtriphosphat), dest. (destilliert), UNG (uracil-N-glycosylase), DNA (Desoxyribonukleinsäure), bp (Basenpaare), PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Reaktionsbedingungen für den AbiPrism 7700 von Applied Biosystems entsprechen den Vorgaben von Applied Biosystems für Standard real-time PCR Läufe und lauten wie folgt:

Tab. 9 Gerätetechnische Reaktionsbedingungen des AbiPrism 7700 SDS

Schritt	*Temperatur*	*Zeit*
Aktivierung der UNG	50°C	2 min.
1. Denaturierung	95°C	10 min.
Zyklus 1-40:		
Denaturierung	95°C	15 sec.
Annealing und Extension	60°C	60 sec.

UNG (uracil-N-glycosylase)

3.4 Prinzip und Durchführung der real-time PCR

Funktionsprinzip des AbiPrism 7700 SDS von Applied Biosystems

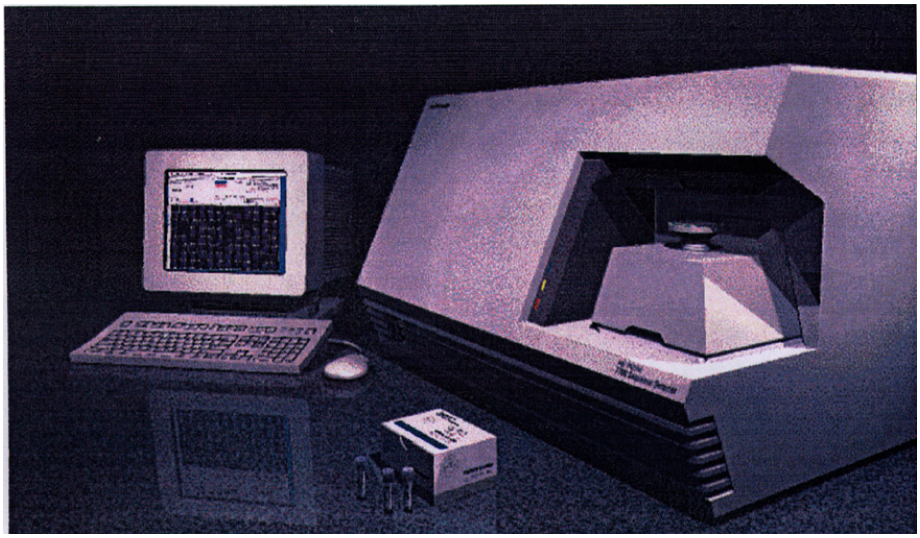

Abb. 6 AbiPrism 7700 SDS von Applied Biosystems mit Computerterminal

Der AbiPrism 7700 SDS muss in zwei Hauptkomponenten unterteilt werden. Einerseits besteht er aus einer Heizplatte, die weitgehend dem Gerät GeneAmp PCR Systems 9600 entspricht, also einer reinen PCR Maschine. Die zweite Komponente umfasst die Laser- und Detektionstechnik. Der Argonlaser (488 nm), dessen Strahl über einen dichroiden Spiegel zunächst auf einen Multiplexer (MUX) gelenkt wird, führt zu einer Fluoreszenzanregung in den PCR Tubes. Der MUX ist über 96 Lichtleiter mit dem optischen Heizdeckel des Thermocyclers verbunden, die jeweils über einer der 96 Linsen enden. Mit Hilfe des MUX wird der Laserstrahl auf die einzelnen Tubepositionen verteilt. Der Strahl dringt dann in das geschlossene Reaktionsgefäß ein und regt dort eine Fluoreszenzemission an, welche den Cycler wieder über denselben optischen Leiter verlässt. Da die Fluoreszenz eine andere Wellenlänge als der Laserstrahl besitzt, wird diese durch den dichroiden Spiegel reflektiert und auf einen Spektographen geleitet und mittels einer (Charge Coupled Device) Kamera in ein digitales Signal umgewandelt. Für jede Probe kann die CCD Kamera Emissionsdaten im Bereich von 500 bis 660 nm sammeln.

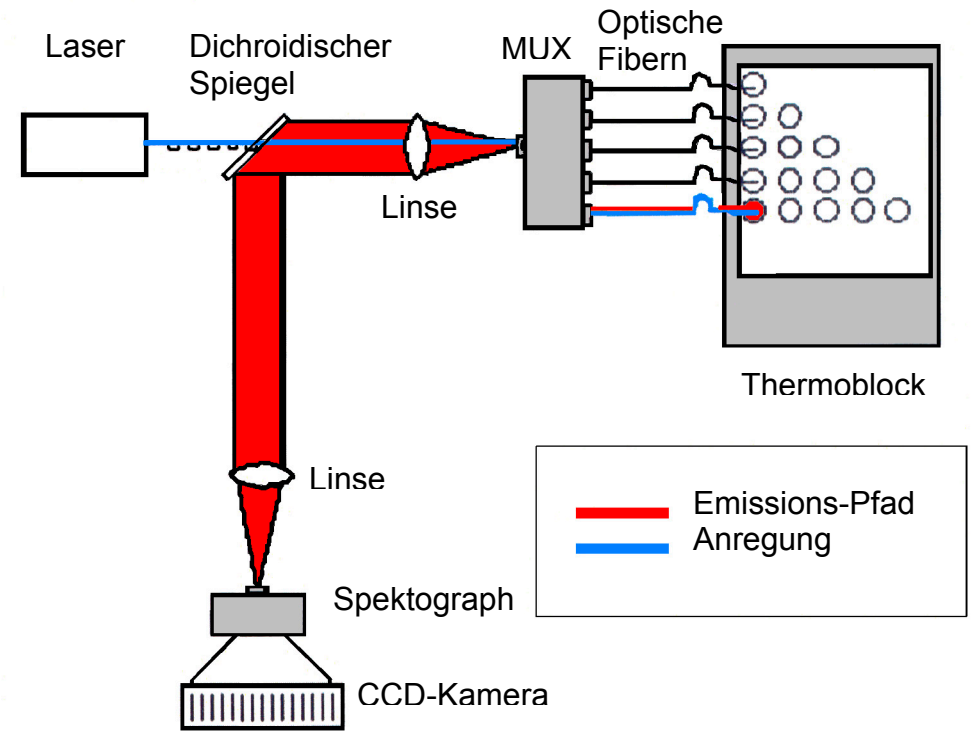

Abb. 7 Schematisches Funktionsprinzip des AbiPrism 7700 SDS; Charge Coupled Device (CCD). Ein Laser wird mittels Multiplexer (MUX) auf verschiedene Reaktionsgefässe gelenkt und induziert dort Fluoreszenz. Diese wird durch einen Spiegel auf eine Kamera gelenkt und quantifiziert.

Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green

Der Farbstoff SYBR Green von Applied Biosystems lagert sich nur in doppelsträngige DNA ein und kann dort laserinduziert zu Fluoreszenz angeregt werden. An die dsDNA lagert sich SYBR Green über eine minor groove (englisch: kleine Grube) Bindung an und ist sehr sensibel in der Detektion von entstandenem Doppelstrang PCR Produkt (Schmittgen et al. 2000).

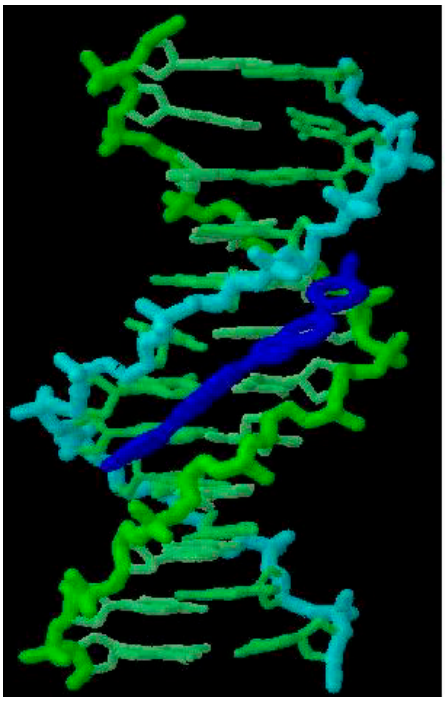

Abb. 8 DNA Ausschnitt mit SYBR Green Molekül (dunkelblau) in minor groove Bindung

Mittels SYBR Green und dem AbiPrism 7700 SDS kann direkt die Entstehung von neuem Produkt in Echtzeit detektiert und darauffolgend analysiert werden.

Begriffe und Definitionen bei der real-time PCR mittels AbiPrism 7700

R_n -Wert:

Ein R_n -Wert (normalisiertes Reportersignal) entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffes dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffes. Unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsänderungen aufgrund von Voluminaschwankungen (z.B. durch Pipettierfehler) können somit ausgeglichen werden. Während der PCR steigt R_n im gleichen Maße wie die Menge an PCR Produkt zunimmt, bis die Reaktion eine Plateauphase erreicht.

ΔR_n -Wert:

Weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nukleaseverdau basieren, werden ausgeglichen, indem das während der ersten PCR Zyklen erstellte Hintergrundsignal vom jeweiligen R_n-Wert abgezogen wird.

C_T-Wert:

Der sogenannte Threshold Cycle drückt diejenige Zykluszahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über eine Grundlinie bzw. Schwelle erfasst wird. Für die spätere Quantifizierung der MEN1 mRNA ist dieser Wert von zentraler Bedeutung.

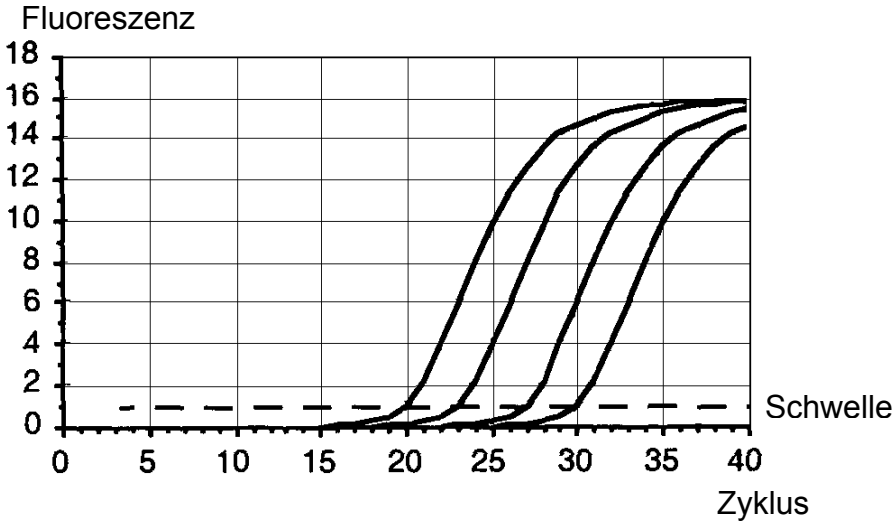

Abb. 9 Kurvenverlauf bei einer quantitativen real-time PCR; beide Achsen sind linear

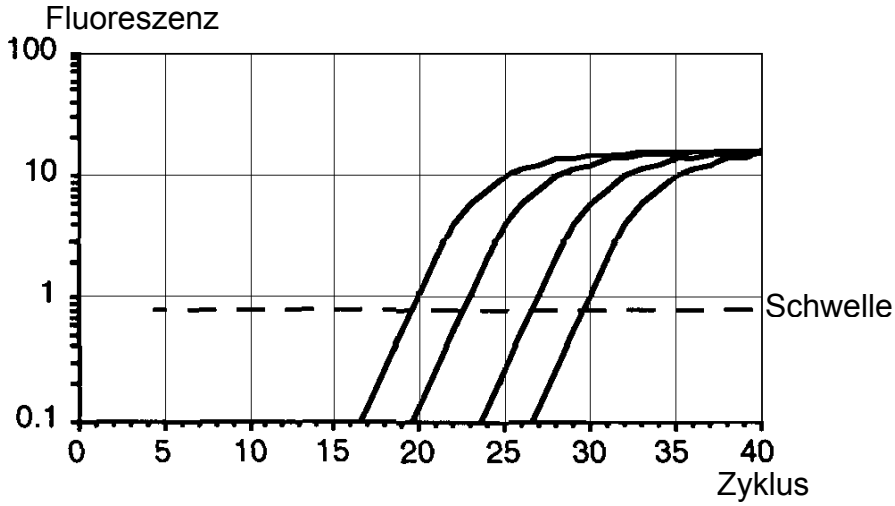

Abb. 10 Kurvenverlauf bei einer quantitativen real-time PCR; Fluoreszenz Achse wurde logarithmisch aufgetragen

In einem PCR System mit einer theoretisch optimalen Effizienz von 100% nimmt der C_T-Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus ab. Die wirkliche Effizienz liegt jedoch ein Vielfaches niedriger und wird nicht zuletzt durch die Amplifikatlänge bedingt (Rolfs et al. 1992 und Ferre F 1992).

Kontaminationsvermeidung durch UNG

Es wurde bei den real-time PCR Läufen das Enzym uracil-N-glycosylase (UNG) verwendet, um mögliche Kontaminationen durch vorhergegangene PCR Läufe zu vermeiden und die Spezifität der Messungen zu erhöhen. UNG ist ein nukleasefreies 26-k-Da rekombinates Enzym, welches durch das Escherichia coli uracil-N-glycosylase Gen kodiert wird (Kwok and Higuchi 1989). UNG setzt seine Wirkung an einzel- und doppelsträngiger DNA, welche dUracil enthält, frei. Es bewirkt eine Hydrolyse der Uracil-glykosidischen Bindungen an dUracil enthaltenden DNA Bereichen, was zu einer Freisetzung von Uracil führt. Dagegen weist das Enzym UNG keinerlei Aktivität bezüglich RNA oder dThymin enthaltender DNA auf (Longo et al. 1990).
Durch die Verwendung von UNG kann eine Reamplifikation von carry-over PCR Produkten vermieden werden, sofern dTTP durch dUTP in den PCR Reaktionen ersetzt wird. Um das Enzym zu aktivieren und ihm seine Arbeit zu ermöglichen wird dem eigentlichen PCR Zyklus ein zwei Minuten dauernder Schritt bei 50°C vorangestellt. Durch den darauf folgenden 95°C Schritt wird das Enzym vollständig inaktiviert und stellt kein Hindernis mehr für die folgende PCR Reaktionen dar.

3.5 Absolute Quantifizierung der mRNA

- ***Auswahl der Primer für den AbiPrism 7700 SDS***

Die Primer wurden mittels der von Applied Biosystems angeboten Primer Express Software Version 1.5 in einem zuvor ausgewählten Bereich der MEN1 mRNA generiert; das Primerpaar wurde manuell so ausgewählt, dass es eine Intron-/Exongrenze beinhaltet, um Verunreinigungen der mRNA mit genomischer DNA leicht detektieren zu können. Die Sequenzabfolge der Oligonukleotide entstammt der Genbank U93236 für die mRNA des MEN1 Gens.
Des weiteren wurden folgende Spezifikationen für die Auswahl der Primer verwendet, um möglichst spezifisch bindende Primer zu erhalten und um die störende Bildung von Primerdimeren zu verhindern:

- die Produktlänge wurde möglichst kurz gewählt, in diesem Fall 127 bp
- der Guanin/Cytosin-Anteil sollte zwischen 20 und 80% liegen
- es dürfen möglichst wenige identische NTPs und maximal vier Guanin Basen hintereinander liegen
- die Schmelztemperatur T_m der Primer muss zwischen 58 und 60°C liegen
- die fünf NTPs am 3'Ende dürfen maximal zwei Guanin Basen und/oder Cytosin Basen enthalten.

Es wurden folgende Primer ausgewählt:

Tab. 10 Sense/Antisenseprimer der quantitativen real-time PCR

Primer	*Sequenz*	*Produktlänge*	*T_m*
M533	5'- GTC CCT CTT CAG CTT CAT CAC A-3'	127 bp	58°C
M659A[1]	5'- CCA GGC ATG ATC CTC AGA CA-3'		58°C

[1]Antisense-Primer; bp (Basepaare), T_m (Schmelztemperatur)

Nach der Auswahl wurden die Primer Oligonukleotide durch die Firma Interactiva Biotechnologie GmbH (Ulm) hergestellt und so in Aqua dest. gelöst, dass die Primer-Stock Konzentration 20 pmol/μL beträgt.

Es wurde des weiteren auf die Faltung der Primer geachtet, wenn innerhalb des Primers Hairpinstrukturen am 3'-Ende auftreten, kann die Taq Polymerase zusätzliche Basen anhängen, was dazu führt, dass der Primer nicht mehr spezifisch binden kann.
Genauso problematisch sind Hairpins am 5'-Ende, wobei die Taq Polymerase dann Basen vom 5'-Ende entfernt. Der so verkürzte Primer bindet später nur noch mit geringer Wahrscheinlichkeit an die Template-DNA.

- ***Primer Konzentrationstest***

Um eine optimale PCR Reaktion gewährleisten zu können, bei der zum einem möglichst viel spezifisches Produkt und möglichst wenige Primer Dimere entstehen, zum anderen der Einsatz von Verbrauchsmaterialien möglichst gering gehalten wird, wurde vor den eigentlichen Messungen der mRNA Menge und der Verdünnungsserie ein Primerkonzentrationstest für die Primer M533 und M659A durchgeführt.
Hierfür wurden drei verschiedene Primerkonzentrationen 500 nM, 300 nM und 100nM hergestellt. Sense- und Antisenseprimerkonzentrationen waren hierbei immer identisch. Für die Erfassung der optimalen Konzentration wurde der AbiPrism 7700 SDS benutzt.
Die Reaktionsbedingungen für die quantitative real-time PCR mit 40 μL Ansätzen zeigt Tab. 11.

Tab. 11 Reaktionsbedingungen Primer Konzentrationstest

Reagenzien	***Volumen in µL***
Aqua dest.	23,1
$MgCl_2$	4,8
dNTP	3,2
UNG	0,2
Sybr Green	4
AmpliTaq DNA Polymerase	0,2
cDNA	0,5
Primer Mix	4
Summe	40

$MgCl_2$ (Magnesiumchlorid), dNTP (Desoxynukleotidtriphosphat), dest. (destilliert), UNG (uracil-N-glycosylase), cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure), bp (Basenpaare), PCR (Polymerasekettenreaktion)

Für die Zeit und Temperaturwerte für den Heizblock des AbiPrism 7700 SDS wurden folgende Standardbedingungen gewählt:

Tab. 12 PCR Spezifikationen für die Primer Amplifikation; UNG = Uracil-n-glykosylase

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
Aktivierung der UNG	50°C	2 min.
1. Denaturierung	95°C	10 min.
Zyklus 1-40:		
Denaturierung	95°C	15 sec.
Annealing und Extension	60°C	60 sec.

UNG (uracil-N-glycosylase)

Die Auswahl des Primers erfolgte schließlich anhand der ermittelten C_T-Werte und einer Agarosegelelektrophorese.

- ***MEN1 Stabilitätsexperiment***

Es wurde von allen hergestellten MEN1 cDNA Proben eine quantitative real-time PCR auf dem AbiPrism 7700 SDS angefertigt, d.h. es wurden jeweils die Proben von Tag 0, 1, 3, 5 und 7 in Duplikaten quantifiziert. Mittels einer Standardkurve konnten den einzelnen Proben absolute Kopienzahlen zugeordnet werden. Für den Tag null standen jeweils drei unterschiedliche Proben je Proband zur Verfügung.

Die Reaktionsbedingungen für den AbiPrism 7700 SDS entsprechen denen für den Primerkonzentrationstest und sind folgende:

Tab. 13 Reaktionsbedingungen beim MEN1 Stabilitätsexperiment; UNG = Uracil-n-glykosylase

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
Aktivierung der UNG	50°C	2 min.
1. Denaturierung	95°C	10 min.
Zyklus 1-40:		
Denaturierung	95°C	15 sec.
Annealing und Extension	60°C	60 sec.

UNG (uracil-N-glycosylase)

Die PCR Ansätze haben ein Volumen von 40 μL und wurden wie bereits oben erwähnt in Duplikaten angesetzt. Die Reagenzien wurden in folgender Zusammensetzung verwendet:

Tab. 14 Volumenbestandteile eines 40 µL Ansatzes

Reagenzien	***Volumen in µL***
Aqua dest.	25,9
$MgCl_2$	4,8
dNTP	3,2
UNG	0,2
Sybr Green	4
AmpliTaq DNA Polymerase	0,2
Primer M533	0,6
Primer M659A	0,6
cDNA	0,5
Summe	40

$MgCl_2$ (Magnesiumchlorid), dNTP (Desoxynukleotidtriphosphat), dest. (destilliert), UNG (uracil-N-glycosylase), cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure), bp (Basenpaare), PCR (Polymerasekettenreaktion)

Anschließend wurden die Ergebnisse auf dem Computer ausgewertet; zur weiteren Kontrolle wurden die PCR Produkte auf 2,5% Agarosegelen aufgetragen.

3.6 Statistik

Es wurden Methoden der deskriptiven Statistik verwendet, hierunter fielen der Einsatz von Mittelwerten und Standardabweichungen. Des weiteren wurde bei der Verdünnungsserie die Intraassayvariabilität bestimmt.

Die Intraassayvariabilität wurde nach folgender Formel ermittelt:
Mittelwert ($\sum$ Standardabweichungen der Verdünnungsserie in %)

Hierbei hatten nur die ersten sieben SD der Verdünnungsserie Einfluss auf die Intraassayvariabilität, da ebenfalls nur in den ersten sieben seriellen Verdünnungsschritten C_T-Werte detektiert wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Probanden und Material Charakteristika

Die verwendeten Patientenproben wiesen unterschiedliche Mutationen auf, die bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurden und mittels Sequenzierung der kompletten kodierenden Sequenz des MEN1 Gens ermittelt wurden.

Charakterisierung der Mutationen der MEN1 Patienten:

Tab. 15 Mutationsübersicht der MEN1 Patienten, deren Blutproben verwendet wurden

Patient	*mRNA Mutation*	*Proteineffekt*	*Referenz*
1	1021T→ C	Trp → Arg	Giraud (1998)
2	678del6	ΔS226, ΔY227	Ludwig (1999)

Nomenklatur der mRNA Mutationen gemäß J.T. den Dunnen (2001). T = Thymin, C = Cytosin, Trp = Tryptophan, Arg = Arginin, ΔS = Verlust von Serin, ΔY = Verlust von Tyrosin.

Des weiteren stehen neben den MEN1 Patienten auch Proben von zwei gesunden Kontrollpersonen zur Verfügung. Es wurde keine Sequenzierung des MEN1 Gens durchgeführt, jedoch sind keinerlei familiäre Belastungen noch sonstige Anhaltspunkte für ein MEN1 Syndrom vorhanden.

RNA Isolation

Die totale RNA, sowohl der Patienten-, als auch der Kontrollproben wurde nach der Standard RNAzol Methode von Roth gewonnen.
Zur Qualitätskontrolle der Isolierung und zur Mengenabschätzung der RNA wurde von allen Proben eine Agarosegelelektrophorese angefertigt. Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Gelelektrophorese einer RNA Isolation. Es zeigt sich, dass auch nach 7 Tagen intakte RNA (28s,18s) isoliert werden kann.

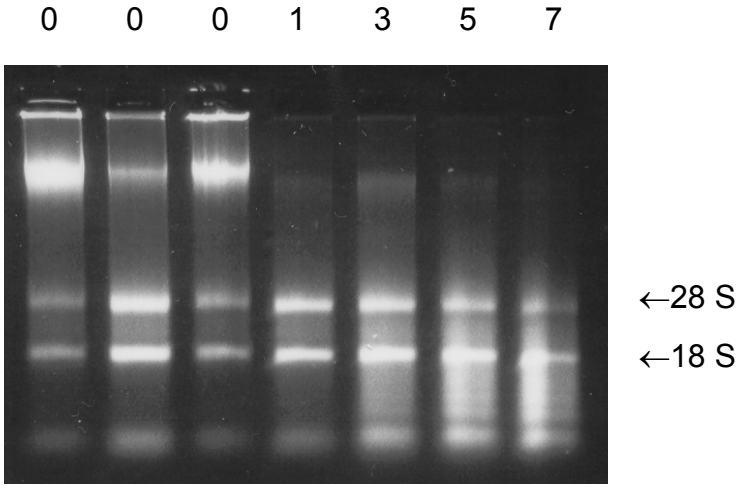

Abb. 11 Agarosegelelektrophorese einer RNA Isolation. Die über der Abbildung befindlichen Zahlen entsprechen dem Alter der Proben in Tage. Rechts stehen die typischen Sedimentationskonstanten für RNA.

4.2 Ergebnisse der Verdünnungsserie

Es wurde für die Standardkurve, die eine absolute Quantifizierung der Kopienzahlen der Proben ermöglicht, eine Verdünnungsserie angelegt. Diese Verdünnungsserie basiert auf einem zuvor generierten 360 bp PCR Produkt des Menin Gens.

Dieses Produkt wird mittels einer Agarosegelelektrophorese qualitativ kontrolliert; ebenso wird die Elektrophorese zur späteren quantitativen Abschätzung der Menge an entstandenem PCR Produkt verwendet.

- ***Qualitative Agarosegelelektrophorese***

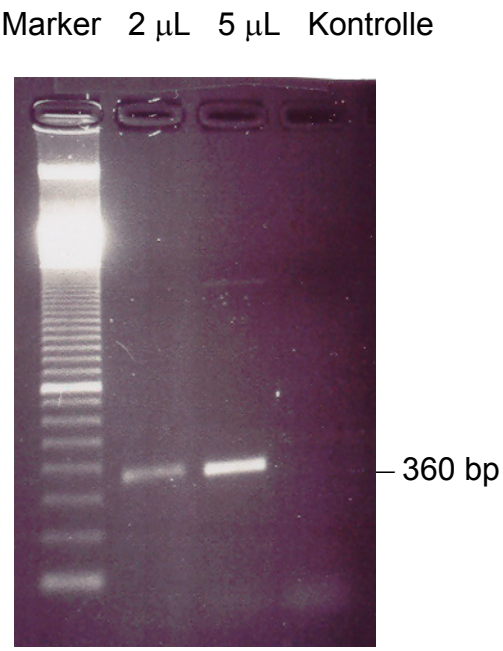

Abb. 12 Agarosegel des 360 bp PCR Produktes; die Geltaschen wurden mit einem Marker, 2 μL und 5 μL PCR Produkt, sowie einer Wasserkontrolle befüllt. Es zeigen sich keine unspezifischen Produkte. bp (Basenpaare).

Die erzeugte Menge an PCR Produkt pro μL wird nun sowohl mittels optischer Schätzung, als auch mittels OD-Messung ermittelt.

- ***OD- Messung und visuelle Abschätzung***

Das durch die PCR gewonnene und anschließend aufgereinigte 360 bp lange Produkt wird nun mittels einer OD-Messung und durch visuellen Vergleich der Bilder der Agarosegelelektrophorese mit Referenzbildern quantitativ untersucht.

- *Visuelle Bestimmung*

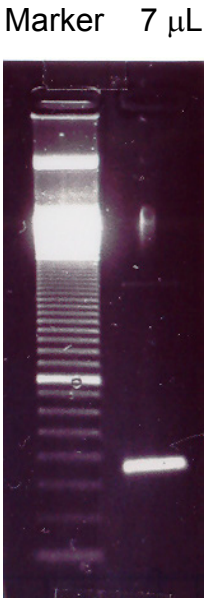

Abb. 13 Agarosegelelektrophorese; 1,5% Agarosegel; 7 µL Produkt eingesetzt.

Die subjektive visuelle Abschätzung der entstandenen Bande ergeben etwa 70 bis 80 ng insgesamtes Produkt. Dies entspricht einer Konzentration des PCR-Produkts von 10 - 11,4 ng/µL PCR Produkt.

- *OD-Messung*

Das erstellte PCR Produkt wurde mittels OD-Messung quantifiziert.

Tab. 16 Ermittelte OD_{260nm} Werte mit dem DU 640 Spectrograph von Beckman

Menge PCR Produkt	***Aqua dest.***	***Verdünnung***	***Absorption bei 260 nm***	***Mittelwert Absorption***	***Konzentration c[ng/µL]***
2	78	1:40	0,0052		
dito	dito	dito	0,0050	0,0051	10,2
4	76	1:20	0,0095		
dito	dito	dito	0,0105	0,0100	10,0

PCR Produkt und Aqua dest. in µL, PCR (Polymerasekettenreaktion), Aqua dest. (destilliertes Wasser)

Die Grundlage für die Konzentrationsbestimmung auf Basis der OD-Messung bei einer Wellenlänge von λ=260 nm ist die folgende physikalische Formel:

Konzentration [ng/μL] = $OD_{260\ nm}$ x Verdünnung x Faktor F
(F=50 bei der Messung von DNA)

So ergibt sich aus den oben aufgeführten Absorptionswerten für das aufgereinigte 360 bp PCR Produkt eine Konzentration von **10,1 ng/μL**.

- ***Berechnung des Molekulargewichtes des 360 bp PCR Produktes***

Um die Teilchenzahl pro ng Produkt ermitteln zu können, ist es notwenig das Molekulargewicht des 360 bp Produktes zu kennen.
Das Molekulargewicht wurde mit dem Oligo Composition Calculator (http://medlib.med.utha.edu/masspec/mongo.htm) berechnet, dem folgende Basiswerte zugrunde liegen:

Tab. 17 Molekulargewicht der einzelnen Basen und Phosphat

Base	***Molekulargewicht in g/mol***
Cytosin	289,180
Thymin	304,200
Adenin	313,210
Guanin	329,210
Phosphat	79,980

Berechnet werden musste das molekulare Gewicht von 360 bp PCR Produkt:

```
GCC TCA CCT ACT TTC CCG TGG CCG ACC TGT CTA TCA TCG CCG CCC TCT ATG
CCC GCT TCA CCG CCC AGA TCC GAG GCG CCG TCG ACC TGT CCC TCT ATC CTC
GAG AAG GGG GTG TCT CCA GCC GTG AGC TGG TGA AGA AGG TCT CCG ATG TCA
TAT GGA ACA GCC TCA GCC GCT CCT ACT TCA AGG ATC GGG CCC ACA TCC AGT
CCC TCT TCA GCT TCA TCA CAG GCA CCA AAT TGG ACA GCT CCG GTG TGG CCT
TTG CTG TGG TTG GGG CCT GCC AGG CCC TGG GTC TCC GGG ATG TCC ACC TCG
CCC TGT CTG AGG ATC ATG CCT GGG TAG TGT TTG GGC CCA ATG GGG AGC AGA
CAG
```

MOLECULAR MASS 5'p - DNA[360mer] - 3'OH
M =110736,537 g/mol C:121 T:81 A:58 G:100

Reverse Molecular Mass
M=111784,361 g/mol C:100 T:58 A:81 G:121

Gesamtmasse
222520,89 g/mol

Abb. 14 Berechnungsgrundlage des Oligo Composition Calculator für das 360 bp PCR Produkt; C = Cytosin, T = Thymin, A = Adenin, G = Guanin; Die Zahlen hinter der jeweiligen Base entsprechen deren Häufigkeit im Produkt.

- ***Berechnung der Teilchenzahl pro ng Produkt***

Nach obiger Berechnung beträgt die molekulare Masse des 360 bp Produktes 222.520,89 g/mol. Unter Verwendung der Avogadro Konstanten N_A, welche eine Teilchenzahl von 6,022 x 10^{23} mol^{-1} vorgibt, errechnet sich eine Teilchenzahl von 2,7063 x 10^9 pro ng Produkt.

4.2 Erstellung der Standardkurve

Um die zu untersuchende MEN1 mRNA in absoluten Kopienzahlen quantifizieren zu können, wurde zuvor eine serielle 10fach Verdünnungsserie angelegt. Anschließend wurde eine quantitative real-time PCR auf dem AbiPrism7700 SDS durchgeführt.

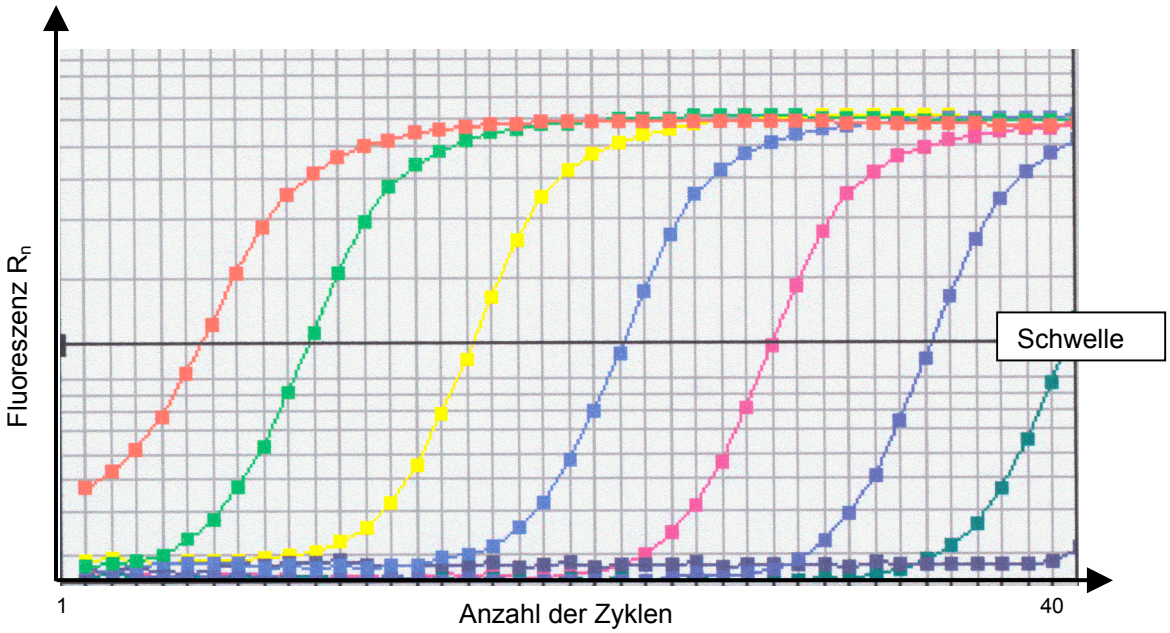

Abb. 15 Verlauf der Fluoreszenzwerte der quantitative real-time PCR der seriellen 10-fach Verdünnungsserie; unterschiedliche Farben entsprechen den einzelnen Verdünnungsstufen. Die erste Kurve von links entspricht der geringsten Verdünnungsstufe, nach rechts zunehmend. Die x-Achse zeigt die Anzahl der durchlaufenen PCR Zyklen und endet in diesem Fall bei 40.

Hierbei ergab sich obige Originalabbildung des AppliedBiosystems Systems, wobei die einzelnen Farben den unterschiedlichen Verdünnungsstufen entsprechen.

Die auf der y-Achse aufgetragenen Fluoreszenzwerte erreichen im Bereich der Schwelle (Threshold Cycle) exponentielle Wachstumswerte, was zu einer relativen Stabilität der C_T-Werte in diesem Bereich zueinander führt. Anschliessend gehen sie in die Plateau-Phase über, in der limitierende Faktoren in der PCR, wie zunehmende Inaktivierung der Taq Polymerase oder der Verbrauch der Primer, zu einem Sistieren einer weiteren Amplifikation führen.

Das exakte Ergebnis der Quantifizierung stellt sich folgendermaßen dar:

Tab. 18 Übersicht der Ergebnisse der Verdünnungsreihen

Anzahl der Moleküle	***C_T-Werte***	***Rechnerische C_T-Werte***
2.706.800.000	6,26	6,26
270.680.000	9,92	9,58
27.068.000	16,35	12,90
2.706.800	21,98	16,22
270.680	28,17	19,54
27.068	34,33	22,86
2.707	39,97	26,18
271	40	29,50
27	40	32,82
3	40	36,14

Der C_T -Wert drückt diejenige Zykluszahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenz über eine Grundlinie bzw. Schwelle erfasst wird. C_T (Threshold Cycle)

Die rechnerischen Werte veranschaulichen den Unterschied zwischen einem realen PCR System und einem theoretisch idealen System mit einer optimalen Effizienz von 100%. Hierbei wurde der erste Messwert von 6,26 Zyklen als Ausgangswert belassen; ein solches optimales System mit maximaler Effizienz bedeutet, dass der C_T-Wert bei einer Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus abnimmt. Im Gegenschritt bedeutet dies, dass die C_T-Werte bei einer seriellen 10-fach Verdünnungsserie, pro Verdünnungsschritt im theoretischen System um 3,32 Zyklen zunehmen.

Somit lassen sich folgende beiden Standardkurven darstellen bzw. berechnen, wobei die „Soll“-Standardkurve nur zur Veranschaulichung mitaufgenommen wurde. Das dieses System optimal ist, zeigt sich hier auch in dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 1$, das die ideale Intensität des linearen Zusammenhangs der errechneten C_T-Werte wiederspiegelt:

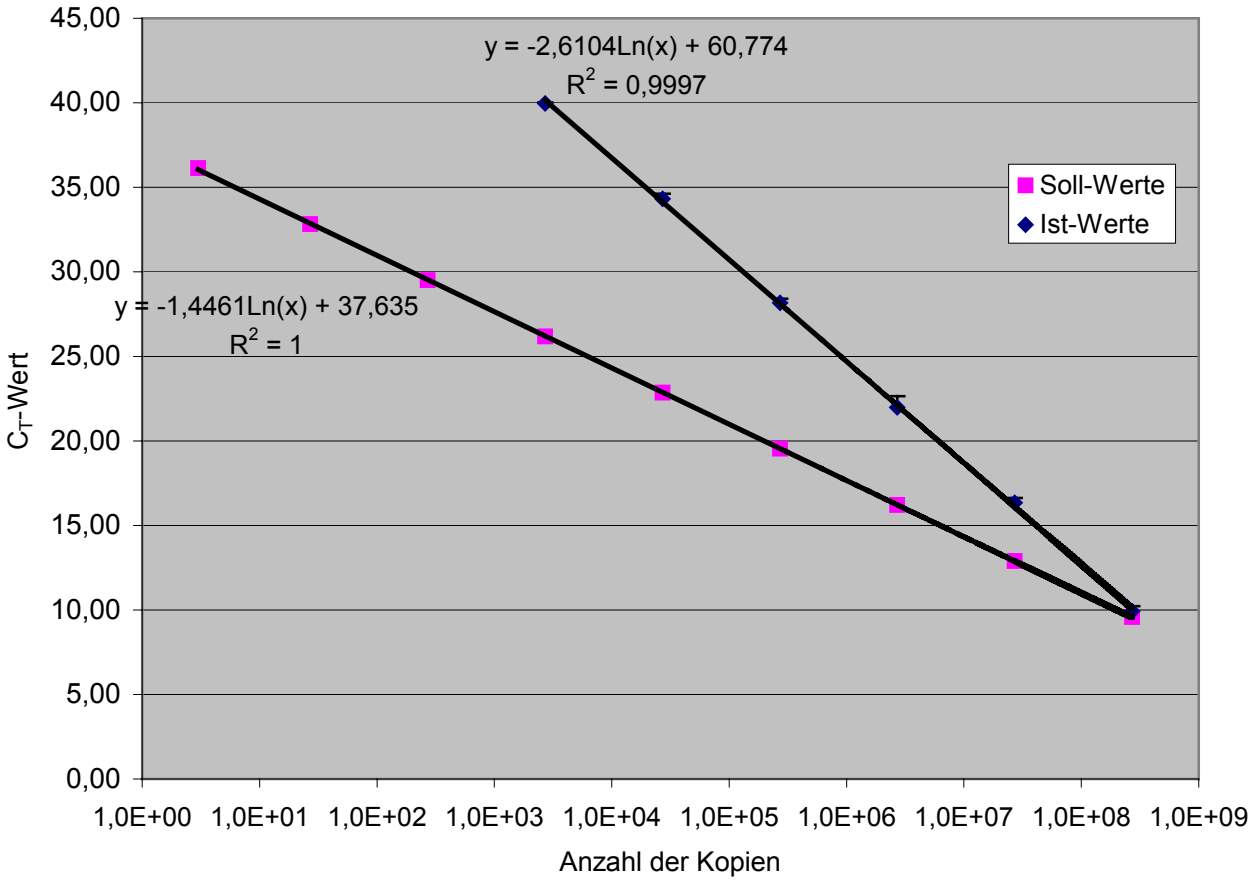

Abb. 16 Darstellung der Standardkurven für Soll- und Ist-Werte; x-Achse wurde logarithmisch aufgetragen. R^2 ist das Bestimmtheitsmaß der jeweiligen Standardkurve, deren Geradengleichung auch eingetragen ist. Der CT-Wert drückt diejenige Zykluszahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenz über eine Grundlinie bzw. Schwelle erfasst wird

Die Intraassayvariabilität der Verdünnungsserie beträgt mit der errechneten und in der Kurve eingetragenen Standardabweichung **1,7%**.

4.4 Leukozytenzahlen

Bei den entnommenen Blutproben wurden an jedem Tag Leukozytenzählungen durchgeführt. Die Unterteilung erfolgte nur nach dem Antikoagulans der Proben, also Lithium-Heparin oder Kalium-EDTA, nach Kontrollperson und MEN1 Mutationsträger wurde nicht unterschieden.

Abbildung 17 zeigt einen leichten „Überlebensvorteil“ der Leukozyten im Verlauf von sieben Tagen im mit Lithium-Heparin versetzten Blut.

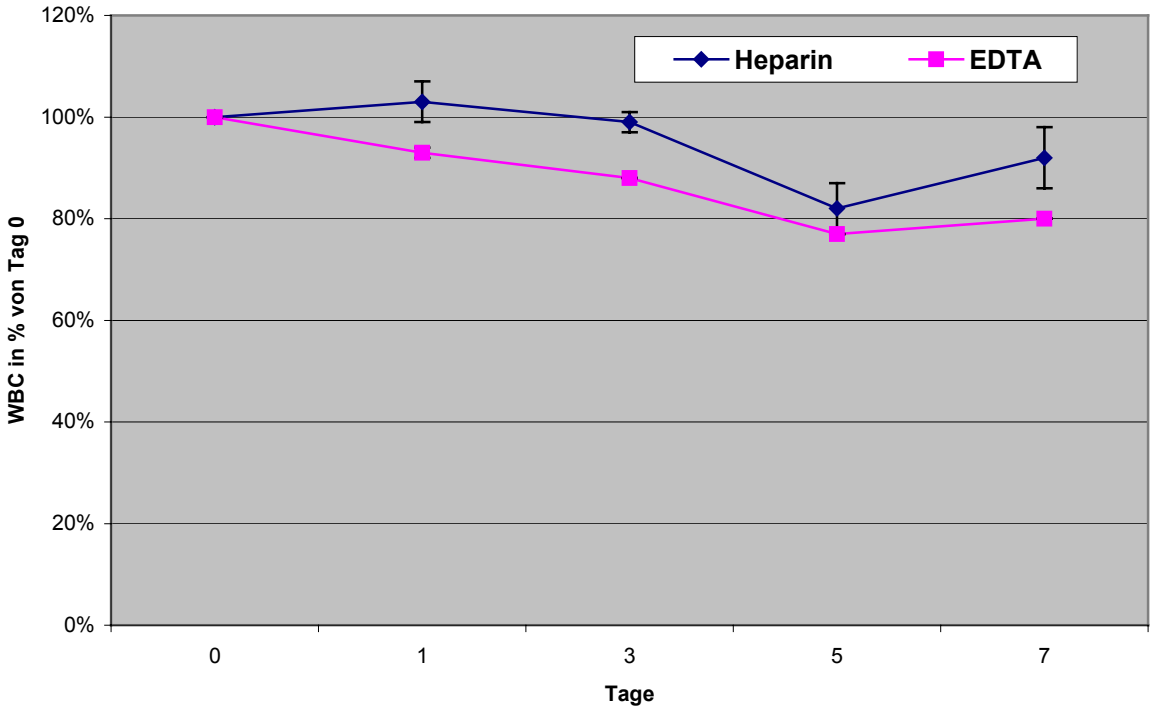

Abb. 17 Die relative Menge an Leukozyten in EDTA (Ethylendiamintetraethylsäure) Blut und in Lithium-Heparin Blut; Standardabweichungen wurden eingetragen; WBC steht für „white blood cells“ (Leukozyten). Der Wert am Tag 0 entspricht der initialen Ausgangsmenge der Leukozyten.

4.5 Quantifizierung der MEN1 mRNA

Sowohl die Blutproben der MEN1 Patienten als auch die der Kontrollpersonen, wurden für die RNA Isolation verwendet, bevor hieraus cDNA hergestellt wurde. Die cDNA wurde verwendet, um mittels einer quantitativen real-time PCR die Menge an MEN1 mRNA Kopien im zeitlichen Verlauf über sieben Tage zu ermitteln. Blutproben von Patienten und Kontrollpersonen wurden in den

Abbildungen zusammengefasst, da eine unterschiedliche Kinetik des mRNA Zerfalls nicht zu erwarten ist; die Unterteilung fand nur nach der Art des verwendeten Antikoagulantienzusatzes statt.

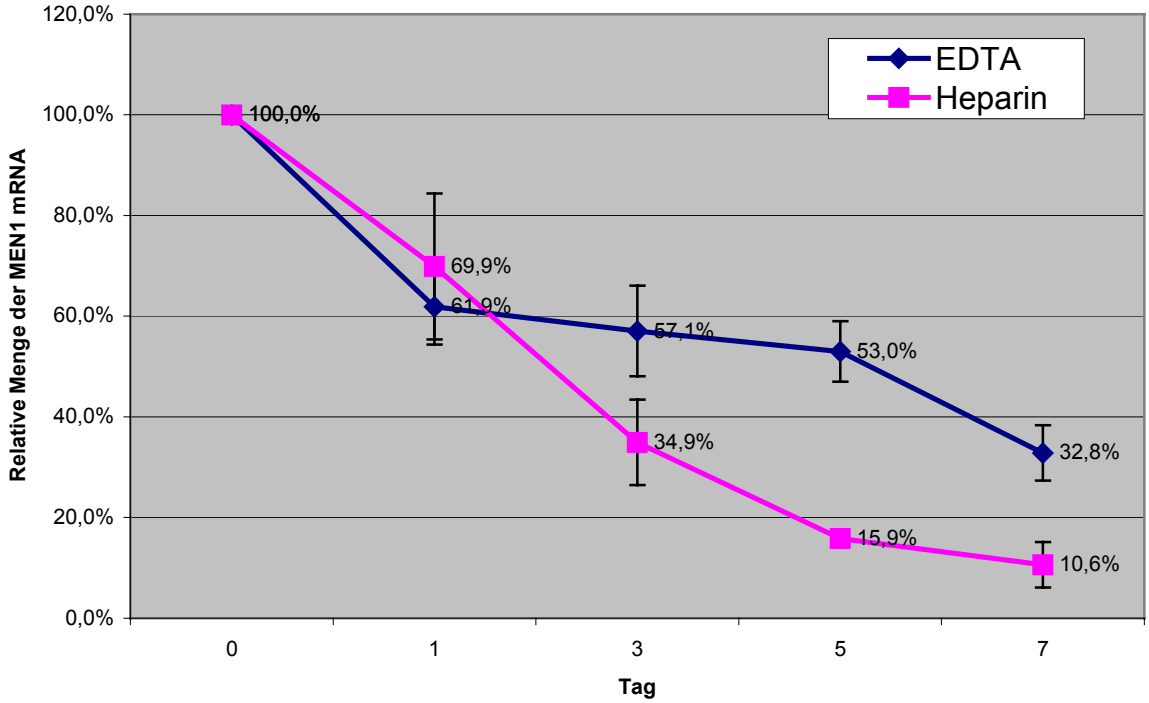

Abb. 18 Quantitative Analyse in 0 bis 7 Tagen alten Proben und Verlauf der Abnahme der MEN1 mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) Menge in EDTA (Ethylendiamintetraethylsäure) und Heparin Blut; die Standardabweichungen wurden eingetragen.

MEN1 mRNA Kopien zeigen im zeitlichen Verlauf über sieben Tage eine grössere Stabilität im mit EDTA versetzten Blut von Patienten und Kontrollpersonen im Gegensatz zu den Heparin Proben. Dies zeigte sich darin, dass nach einer Woche noch über 30% der Ausgangs-mRNA zu detektieren war.

Das Bild ist ähnlich für die Stabilität der MEN1 mRNA in Lithium-Heparin Blutproben, denn auch hier zeigt sich eine gewisse Stabilität der mRNA im zeitlichen Verlauf. Es wird aber im Vergleich zu den Kalium-EDTA Blutproben eine bedeutend schnellere mRNA Degradation erkennbar. An Tag 7 ermittelt man noch 10,6% der Ausgangsmenge von Tag 0 im mit Heparin versetzten Blut, im Gegensatz zu 32,8% bei EDTA versetzten Blut.

Um sich noch eine bessere Vorstellung von der MEN1 mRNA Menge im zeitlichen Verlauf machen zu können, wurden in Abbildung 19 die detektierten absoluten Kopienzahlen der mRNA pro ng totaler RNA aufgeführt.
Hierbei zeigt sich, dass sich sowohl in den Lithium-Heparin, als auch in den Kalium-EDTA Blutproben selbst nach einer Woche Alterung, immer noch etwa 2000 bis 5000 mRNA Kopien pro ng totaler RNA in den Proben befinden.

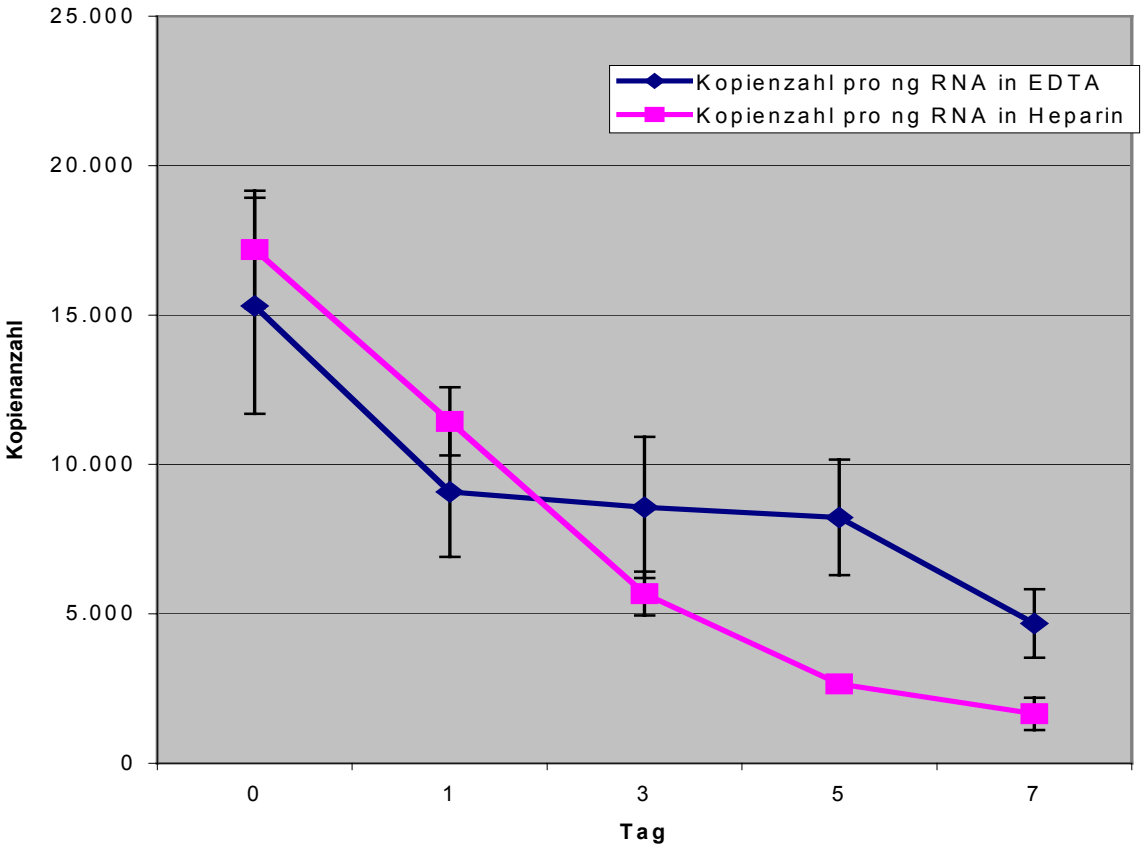

Abb. 19 Zeitlicher Verlauf von MEN1 mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) Kopien pro ng RNA in 0 bis 7 Tage alten EDTA (Ethylendiamintetraethylsäure) und Heparin Proben. Standardabweichungen wurden eingetragen.

Abbildung 20 zeigt nun die prozentualen Mengen von MEN1 mRNA detailliert im zeitlichen Verlauf sowie in der Aufteilung nach Patient und Kontrollperson.

Die Unterteilung nach Kalium-EDTA und Lithium-Heparin Blutproben wurde weiterhin beibehalten.

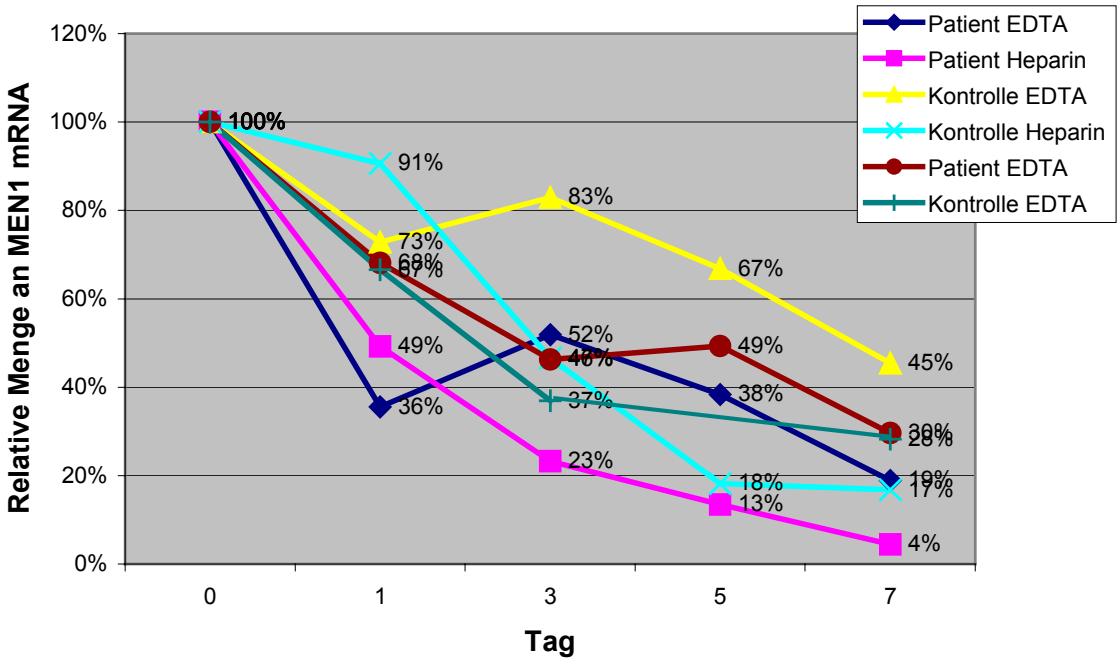

Abb. 20 Detailübersicht aller Proben, wobei eine Unterteilung nach Patient/Kontrollperson und EDTA/Heparin Blutprobe stattfand. EDTA (Ethylendiamintetraethylsäure), mRNA (Boten-Ribonukleinsäure)

Auch hier verdeutlicht sich der bedeutend geringere Outcome der mRNA bei den Heparin Proben, wobei sich die EDTA Proben mit Ausnahme einer Patientenprobe nach einer Woche Alterung deutlich stabiler zeigen.

5. Diskussion

Die Anzahl der klinisch relevanten Tumorsuppressorgene, wie zum Beispiel p53 (Williams et al. 1998), BRCA1 oder MEN1 nimmt stetig zu (Campos et al. 2003). So wird auch verstärkt nach Möglichkeiten gesucht, diese Gene, vor allem auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen, um zuverlässige Aussagen über Gefährdungen von Familiennachkommen, wie zum Beispiel beim MEN1 Syndrom machen zu können.

Das klinische Mutationsscreening, auf Basis von genomischer DNA, ist aktuell mit relativ großem zeitlichen und finanziellem Aufwand behaftet (Jakubowska et al. 2001), vor allem bei Genen mit komplizierten Strukturen (Sevilla et al. 2002) oder einer großen Anzahl von Mutationen, die wie bei MEN1 zusätzlich das Vorhandensein eines hot spots vermissen lassen. Erschwerend ist bei MEN1 auch das Fehlen einer Phänotyp-Genotyp Korrelation (Kouvaraki et al. 2002; Wautot et al. 2002) zu werten. Beim MEN1 Gen besteht die Möglichkeit, putative Mutationsträger mittels SSCP Analyse zu ermitteln und konsekutiv das Gen zu sequenzieren (Karges et al. 2000); dies erfolgt insgesamt alles auf der Basis von DNA Proben.

Der Ansatz, der nun verfolgt werden soll, ist die direkte Verwendung von MEN1 mRNA, um Mutationen zu detektieren. Da das MEN1-Gen im Körper ubiquitär exprimiert wird, ist es einer Analyse durch aus Blut zu gewinnenden Leukozyten zugänglich (Ikeo et al. 1999). So wird bei MEN1 die Amplifizierung der 10 Exone stark vereinfacht, da die mRNA in sechs Segmente zerlegt werden kann, die folglich mit nur sechs Primerpaaren in einer PCR vervielfältigt werden kann und so schnell der Sequenzierung zugänglich wird (Roijers et al 2000; Jakubowska et al. 2001). Des weiteren können so auch einfach Intronmutationen, die sich auf das Splicing des Proteins Menin auswirken, erkannt werden, stumme Intronmutationen dagegen wirken nicht störend auf die Analyse. Dies ist ein klinisch nicht zu vernachlässigender Vorteil bei der Verwendung von mRNA, da die Anzahl der entdeckten und verzeichneten Intronmutationen bei „The Human Gene Mutation Database“ in Cardiff täglich zunimmt und dies als wichtige Implikation für die steigende Relevanz zu werten ist (Mutch et al. 1999).

Ex vivo Stabilität von MEN1 mRNA

Im Falle der Verwendung von MEN1 mRNA galt bislang als größter Unsicherheitsfaktor die fragliche Stabilität der Nucleinsäure im Blut und folglich die Frage, ob es klinisch denn überhaupt sinnvoll sei mRNA anstatt von DNA zu analysieren. So wurde in der klinischen Diagnostik von MEN1 Patienten und deren Angehörigen stets genomische DNA, die meist aus peripheren Leukozyten gewonnen wurde, zur molekularbiologischen Analyse verwendet (Catani et al. 2002; Bartsch et al. 1998).

Wir haben systematisch die MEN1 mRNA Stabilität der aus peripherem Blut gewonnenen Leukozyten untersucht und konnten zeigen, dass die Stabilität von mRNA durchaus die Option bietet, mehrere Tage altes Blut einer molekularen Mutationsanalyse zuzuführen. Die Ausrichtung der Experimente auf die klinische Praktikabilität führte dazu, dass die mRNA Stabilität aus zwei Gruppen von Blutproben mit unterschiedlichen Gerinnungsinhibitorenzusätzen untersucht wurde. Es wurden RNA Isolationen aus Lithium-Heparin Blut mit Isolationen aus Kalium-EDTA Blut verglichen.

Die Ergebnisse zeigen im allgemeinen, dass Proben, egal welches Antikoagulans verwendet wurde, nach einem Tag Alterung noch mindestens 60% der ursprünglichen mRNA enthalten und somit geeignet für weiterführende Analysen sind. Die Menge an noch vorhandener MEN1 mRNA unterscheidet sich im weiteren Verlauf in den EDTA und Li-Heparin Blutproben. So findet die mRNA Degradation in Blutproben, welche EDTA als Antikoagulans verwendet haben, im weiteren zeitlichen Verlauf deutlich langsamer statt als in jenen mit Li-Heparin. Es zeigt sich in EDTA Proben von Tag 3, 5 und 7 noch 57,1%, 53% und 32,8% vom Ausgangswert am Abnahmetag, wohingegen sich im Li-Heparin Blut nur noch 34,9%, 15,9% und 10,6% der ursprünglichen MEN1 mRNA finden ließ.

So fällt auf, dass aber trotz der Unterschiede der beiden Antikoagulantien, die mRNA im zeitlichen Verlauf von bis zu sieben Tagen eine ausreichende Stabilität aufweist. In absoluten Werten wurde an Tag sieben immer noch ein Kopienzahl von ca. 5000 pro ng isolierter RNA aus EDTA Blut und ca. 2000 pro ng isolierter RNA aus Li-Heparin Blut ermittelt.

Einfluss der Antikoagulantien auf die Leukozytenüberlebensdauer

Die Annahme, dass die Leukozytenzahlen in EDTA Blutproben im Verlauf mehrerer Tage weniger schnell absinken würden als in Lithium-Heparin Proben, konnte nicht bestätigt werden, obwohl davon ausgegangen wurde, dass in den Blutproben, in denen der Ca^{2+} Spiegel durch das EDTA stark erniedrigt wurde, die Apoptose der Leukozyten verlangsamt ablaufen sollte, da eben Ca^{2+} als Apoptosekofaktor fehlte.
Das Bild der Ergebnisse tendiert zu einer längeren Überlebenszeit der Leukozyten in Lithium-Heparin Blut, ist bei weitem aber nicht so eindeutig wie die quantitative Analyse der MEN1 mRNA.
So zeigen sich in den mit EDTA ungerinnbar gemachten Blutproben nach sieben Tagen Alterung noch 80% der ursprünglich gemessen Leukozyten am Abnahmetag; dagegen waren in den Lithium-Heparin Proben noch 92% vorhanden.

Technische Aspekte

Die Standardkurve ist wichtig, um den einzelnen Werten, die mittels quantitativer real-time PCR für die MEN1 mRNA ermittelt wurden, absolute Kopienzahlen zuordnen zu können. Die Zuverlässigkeit der seriellen 10-fach Verdünnungsserie und der daraus resultierenden Standardkurve zeigt sich in einem fast optimalen Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,997, d.h. der Zusammenhang der analysierten Proben ist nahezu linear.
Des weiteren spricht die errechnete Intraassayvariabilität für eine sehr exakte Anlage der Verdünnungsserie. Sie beträgt lediglich 1,7%.

Dagegen zeigt sich bei der Standardkurve, dass das PCR-System bei der Amplifizierung des Produktes nicht mit 100% Effizienz gearbeitet hat. Dies ist ersichtlich in Abb.18, aus der erkennbar wird, dass die Ist-Standardkurve von der Soll-Standardkurve abweicht. Dies kann daran liegen, dass das für die Anlage der

Verdünnungsserie verwendete 360 bp Produkt schwer auflösbare Sekundärstrukturen bildet, was zu einer Senkung der erreichbaren Effizienz des Systems führt. Darüber hinaus können die verwendeten Primer M331 und M690A innerhalb ihrer eigenen Nukleotidstruktur Hairpinstrukturen am 3' oder 5' Ende entwickeln, da sie im Gegensatz zu den Primern M533 und M659A, die für die quantitative real-time PCR auf dem AbiPrism 7700 SDS entworfen wurden, nicht auf die mögliche Entwicklung von Sekundärstrukturen vor ihrem Einsatz in dem PCR System untersucht wurden. Diese Hairpinstrukturen innerhalb der Primer führen zu Fehlaktivitäten der Taq Polymerase, was letztendlich Probleme bei der Bindung der Primer an die cDNA verursacht und so ebenfalls die Effizienz des gesamten Systems negativ beeinflussen kann.

Klinische Bedeutung und Perspektiven

Die Möglichkeit der frühen Diagnosestellung eines hereditären MEN1 Syndroms sind dank der weitreichenden molekulargenetischen Analysen heute sehr fortgeschritten und von großer Bedeutung vor allem durch die weitreichenden Konsequenzen der Detektion einer Mutation im MEN1 Tumorsuppressorgen. So wird für MEN1 Genmutationsträger ein Screeningprogramm empfohlen (Karges et al. 2000), welches eine jährliche biochemische Diagnostik und 3-5jährlichen MRT Untersuchungen der Hypophyse verlangt. Dies schafft die Voraussetzungen für ein frühzeitiges Auffinden von Neoplasien im Rahmen des MEN1 Syndroms und ermöglicht durch eine ebenfalls frühzeitig einsetzende Therapie eine Senkung der Mortalität und Morbidität (Karges et al. 2002b).

Das frühzeitige und zuverlässige Auffinden von Mutationsträger hat hierdurch grundlegenden Einfluss auf die Lebenserwartung und Lebensqualität der Patienten (Kopp et al. 2001). So ist auch die Forderung nach zuverlässigen molekularbiologischen Analysen verständlich, wobei es hier ein ganze Reihe unterschiedlicher Methoden gibt, u.a. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), Heteroduplexanalyse (HD), denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), Protein Truncation Test (PTT) und Direktsequenzierung (DS) auf der

Basis von DNA oder mRNA. Alle eignen sich für die Erkennung von Mutationen von Tumorsuppressorgenen (Jakubowska et al. 2001b). Es zeigte sich bereits bei Jakubowska, dass die auf RNA basierte Sequenzierung zuverlässig und effizient arbeitet und den oben genannten Methoden überlegen ist. Sie besitzt die gleiche Sensitivität wie ein Ansatz, der auf genomischer DNA basiert.

Daher ist die mRNA Methode sehr interessant für die Detektion von MEN1 Genmutationen, da die benötigte mRNA im Körper ubiquitär exprimiert wird (Ikeo et al. 1999; Karges et al. 1999) und durch Leukozyten, die eine gute Quelle für qualitativ hochwertige RNA darstellen (Holmila et al. 2002), im peripheren Blut gut zugänglich ist. Wie Williams erkennen auch wir in der RNA Methode den großen Vorteil, das diese bedeutend effizienter ist, sofern das gesamte Gen untersucht werden muss, wie dies bei der Suche nach familiären MEN1 Mutationen der Fall ist (Williams et al. 1998).

Unsere Daten über die zeitliche Stabilität des MEN1 Gens ermöglichen einen effizienteren und praktikableren Umgang mit Blutproben von putativen MEN1 Mutationsträgern, in dem Sinne, dass auch außerklinisch Proben akquiriert werden können, um diese später molekulargenetisch auf der Basis von mRNA zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN1) ist ein autosomal-dominantes neuroendokrines Tumorsyndrom, das durch inaktivierende Mutationen des MEN1 Tumor Suppressor Gens ausgelöst wird. Die klinische Penetranz der Erkrankung ist mit über 90% im Alter von bereits 40 Jahren sehr hoch. Die Identifizierung von putativen MEN1 Mutationsträgern besitzt unmittelbare klinische Relevanz für Diagnostik und Therapie betroffener Individuen und deren Familien. Ein weit verbreitetes Verfahren zur MEN1 Mutationsdetektion ist die genomische PCR (Polymerasekettenreaktion) und DNA Direktsequenzierung. Aufgrund der genomischen Organisation des MEN1 Gens (10 Exone und fehlender Mutations hot spot) ist der erforderliche labortechnische Aufwand bei Verwendung von mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) potentiell geringer.

Zur Klärung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit die Eignung von RNA (Ribonukleinsäure) des peripheren Blutes zur klinischen MEN1 Gendiagnostik systematisch untersucht, insbesondere hinsichtlich der präanalytischen ex vivo mRNA Stabilität.

In Blutproben von MEN1 Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden im Verlauf von 7 Tagen RNA extrahiert und die mRNA mittels quantitativer real-time PCR und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green absolut quantifiziert.

Unter ex vivo Bedingungen zeigte sich bei Lagerung bei Raumtemperatur nach 24 Stunden eine Abnahme des MEN1 mRNA Spiegels in EDTA (Ethylendiamintetraethylsäure) Blut auf 61.9±12% gegenüber dem Ausgangswert. Nach 3 und 7 Tagen wurde ein Rückgang auf 57.1±17.8% bzw. 32.8±7.1% beobachtet. In mit Lithium-Heparin antikoaguliertem Blut fiel der mRNA Spiegel schneller ab (10.6±8.7% an Tag 7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass MEN1 mRNA im Blut über 7 Tage hinreichend stabil ist und als Ausgangspunkt für eine effiziente klinische Mutationsanalysen dienen kann. Durch die Möglichkeit eines außerklinischen Blutprobentransport können die Screeninguntersuchungen eines familiären hereditären Syndroms wie der MEN1 stark erleichtert werden.

7. Literaturverzeichnis

Agarwal KS, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM, Park SY, Chandrasekharappa SC, Collins FC, Spiegel AM; Menin interacts with the AP1 transcriptions factor JunD and represses JunD activated transcription; *Cell 1999; 96:143-152*

Bartlett JM, Stirling D; A short history of the polymerase chain reaction, *Methods in Molecular Biology 2003; 226:3-6*

Bartsch D, Kopp I, Bergenfelz A, Rieder H, Deiss Y, Munch K, Rothmund M, Simon B; Germline mutations in the MEN1 gene: basis for predictive genetic screening and clinical management of multiple endocrine neoplasia type 1 families; *Deutsche Medizinische Wochenschrift 1998; 123:1535-1540*

Bassett JHD, Forbes SA, Pannett AAJ, Lloyd SE, Christie PT, Wooding C, Harding B, Besser GM, Edwards CR , Monson JP, Sampson J, Wass JAH, Wheeler MH, Thakker RV1; Characterization of Mutations in Patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1; *American Journal Of Human Genetics 1998; 62:232-244*

Burgess JR, Harle RA, Tucker P, Parameswaran V, Davies P; Adrenal lesions in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type I; *Archives of Surgery 1996; 131:699–702 (1996b)*

Burgess JR, Shepherd JJ, Parameswaran V, Hoffman L, Greenaway TM; Spectrum of pituitary disease in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1): clinical, biochemical, and radiological features of pituitary disease in a large MEN1 kindred. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1996; 81:2642–2646*

Bustin SA; Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR: trends and problems; *Journal of Molecular Endocrinology 2002; 29:23-29*

Campos B, Diez O, Domenech M, Baena M, Balmana J, Sanz J, Ramirez A, Alonso C, Baiget M; RNA analysis of eight BRAC1 and BRAC2 unclassified variants identified in breast/ovarian cancer families from spain; *Human Mutation 2003; 22:337-341*

Cetani F, Pardi E, Giovannetti A, Vignali E, Borsari S, Golia F, Cianferotti L, Viacava P, Miccoli P, Gasperi M, Pinchera A, Marcocci C; Genetic analysis of the MEN1 gene and HPRT2 locus in two Italian kindreds with familial isolated hyperparathyreoidism; *Clinical Endocrinology 2002; 56:457-464*

Cha RS, Thilly WG; Specifity, Efficiency and Fidelity of PCR; *PCR Methods and Applications 1993; 3:18-29*

Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert Buck MR, Debelenko LV; Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1; *Science 1997; 276:404–407*

Darling TN, Skarulis MC, Steinberg SM, Marx SJ, Spiegel AM, Turner M; Multiple facial angiofibromas and collagenomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Archives of Dermatology 1997; 133:853–857*

DeLellis RA; Biology of Disease: Multiple Endocrine Neoplasia Syndromes Revisited; *Labaratory Investigation 1995; 72:494-505*

DeStefano JJ, Buiser RG, Mallaber LM, Myers TW, Bambara RA, Fay PJ; Polymerization and RNase H activities of the reverse transcriptases from avian myeloblastosis, human immunodeficiency and Moloney murine leukemia viruses are functionally uncoupled. *Journal of Biological Chemistry 1991; 266:7423-7431*

Dunnen JT, Antonarakis SE; Nomenclature for the description of sequence variations; *Human Genetics 2001; 109:121-124*

European Consortium on MEN1; Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene; *Human Molecular Genetics 1997b; 6:1177–1183*

Ferre F; Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods and Applications 1992; 2:1-9*

Giraud S, Zhang CX, Serova-Sinilnikova O, Wautot V, Salandre J, Buisson N, Waterlot C, Bauters C, Porchet N, Aubert JP, Emy P, Cadiot G, Delemer B, Chabre O, Niccoli P, Leprat F, Duron F, Emperauger B, Cougard P, Goudet P, Sarfati E, Riou JP, Guichard S, Rodier M, Calender A; Germ-line mutation analysis in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and related disorders; *American Journal of Human Genetics 1998; 63:455-467*

Haber DA, Fearon ER; The promise of cancer genetics; *The Lancet 1998; 351:1-8*

Hein I, Lehner A, Rieck P, Klein K, Brandl E, Wagner M; Comparison for different approaches to quantify Staphylococcus aureus cells by real-time quantitative PCR; *Applied Enviromental Microbiology 2001; 67:3122-3126*

Holmila R, Fouquet C, Cadranel J, Zalcman G, Soussi T; Splice mutations in p53 gene: case report and a review of the literature; *Human Mutation. 2003; 21:101-102*

Ikeo Y, Sakurai A, Hashizume K ; Characterization of the MEN1 gene product, menin, by site-specific polyclonal antibodies ; *Japanese Journal of Cancer Research 1999 ; 90:1088-1095*

Jakubowska A, Gorski B, Byrski T, Hurzarski T, Gronwald J, Menkiszak J, Cybulski C, Debniak T, Hadacek P, Scott RJ, Lubinski J; Detection of germline mutations in the BRCA1 gene by RNA-based sequencing; *Human Mutation 2001b; 18:149-156*

Jakubowska A, Gorski B, Kurzwaski G, Debniak T, Hadaczek P, Cybulski C, Kladny J, Oszurek O, Scott RJ, Lubinski J; Optimization of experimental conditions for RNA-based sequencing of MLH1 and MSH2 genes; *Human Mutation 2001; 17:52-60*

Karges W, Jostarndt K, Maier S, Flemming A, Weitz M, Wissmann A, Feldmann B, Dralle H, Wagner P, Böhm BO; MEN1 gene mutations in a subset of patients with sporadic and familial primary hyperparathyroidism target the coding sequence but spare the promoter region; *Journal of Endocrinology 2000; 166:1-9*

Karges W, Karges B, Ludwig L, Heidemann PH; Bi-allelic inactivation of the MEN1 tumor suppressor gene in human grade II astrocytoma; *Cancer Letters 2003; 196:23-27*

Karges W, Maier S, Wissmann A, Dralle H, Dosch HM, Boehm BO; Primary structure, gene expression and chromosomal mapping of rodent homologs of the MEN1 tumor suppressor gene; *Biochimica et Biophysica Acta / General Subjects 1999; 1446:286-294*

Karges W, Schaaf L, Dralle H, Boehm BO; Concepts for screening and diagnostic follow-up in multiple endocrine neoplasia type 1; *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes 2000b; 108:334-340*

Knudson AG Jr; Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1997; 68:820-823*

Kopp I, Bartsch D, Wild A, Schilling T, Nies C, Bergenfelz A, Rieder H, Simon B, Rothmund D; Predictive genetic screening and clinical findings in multiple endocrine neoplasia type 1 families; *World Journal of Surgery 2001; 25:610-616*

Kouvaraki MA, Lee JE, Shapiro SE, Gagel RF, Sherman SI, Sellin RV, Cote GJ, Evans DB; Genotyp-phenotyp analysis in multiple endocrine neoplasia type 1; *Archives of Surgery 2002; 137:641-647*

Kwok S, Higuchi R, Avoiding false positives with PCR; *Nature 1989; 339:237-238*

Larsson C, Skogseid B, Oberg K, Nakamura Y, Nordenskjold M; Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma; *Nature 1998; 332:85-87*

Longo N, Berninger NS, Hartley JL, Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions; *Gene 1990; 93:125-128*

Ludwig L, Schleithoff L, Kessler H, Wagner PK, Boehm BO, Karges W; Loss of wild-type MEN 1 gene expression in multiple endocrine neoplasia type 1 associated parathyroid adenoma. *Endocrine Journal 1999; 46:539-544*

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT; Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques 1998; 24:954-959*

Mutch MG, Dilley WG, Sanjurjo F, DeBenedetti MK, Doherty GM, Wells SA Jr, Goodfellow PJ, Lairmore TC; Germline mutations in the multiple endocrine neoplasia type 1 gene: evidence for frequent splicing defects; *Human Mutation 1999; 13:175-185*

Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Siegert W; Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA; *Clinical Chemistry 1999; 45:1932-1937*

Padberg B, Schröder S, Capella C, Frilling A, Klöppel G, Heitz PU; Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) revisited; *Virchows Archive 1995; 426:548-551*

Pannett AAJ, Thakker RV; Multiple endocrine neoplasia type 1, *Endocrine-related Cancer 1999; 6:449-473*

Roijers JFM, Wit MJ, Luijt RB, Amstel P, Höppener JWM, Lips CJM; Criteria for mutation analysis in MEN1-suspected patients: MEN1 case-finding; *European Journal of Clinical Investigation 2000; 30:487-492*

Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I.; PCR : Clinical diagnostic and research. *Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1992, 81-84,*

Roux KH; Optimization and Troubleshooting in PCR; *PCR Methods and Applications 1993; 4:185-194*

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N; Enzymatic amplifiifation of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia; *Science 1985; 230:1350-1354*

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW; Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods; *Analytical Biochemistry 2000; 285:194-204*

Sevilla C, Moatti JP, Julian-Reynier C, Eisinger F, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Paillertes B, Sobol H; Testing for BRCA1 mutations: a cost-effectiveness analysis; *European Journal of Human Genetics 2002; 10:599-606*

Skogseid B, Rastad J, Öberg K; Multiple endocrine neoplasia type 1: Clinical features and screening; *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 1994; 23:1-18*

Skogseid B; Multiple Endocrine neoplasia Type 1, *British Journal of Surgery 2003; 90:383-385*

Solomon E, Borrow J, Goddard AD; Chromosome Aberrations and Cancer; *Science 1991; 254:1153-1160*

Thakker RV, Bouloux P, Wooding C, Chotai K, Broad PM, Spurr NK, Besser GM; Association of parathyroid tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 with loss of alleles on chromosome 11; *New England Journal of Medicine 1989; 321:218–224*

Thakker RV; Multiple endocrine neoplasia syndromes of the twentieth century; *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998; 83:2617-20*

Thakker RV; Multiple endocrine neoplasia type 1; *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 2000; 29:541-567.*

Trump D, Farren B, Wooding C, Pang JT, Besser GM, Buchanan KD, Edwards CR; Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Quarterly Journal of Medicine 1996; 89: 653–669*

Wautot V, Vercherat C, Lespinasse J, Chambe B, Lenoir GM, Zhang CX, Porchet N, Cordier M, Beroud C, Calender A; Germline mutation profile of MEN1 in multiple endocrine neoplasia type 1: search for correlation between phenotype and the functional domains or the MEN1 protein; *Human Mutation 2002; 20:35-47*

Wermer P; Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands; *American Journal of Medicine 1954; 16:363–367*

Williams C, Norberg T, Ahmadian A, Pontén F, Bergh J, Inganäs, Lundeberg J, Uhlén M; Assessment of sequence-based p53 gene analysis in human breast cancer: messenger RNA in comparison with genomic DNA targets; *Clinical Chemestry 1998; 44:455-462*

Zhang J und Byrne CD; Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competive reverse-transcriptase PCR; *Biochemical Journal 1999; 337:231-241*

Zimm BH und Levene SD; Problems and prospects int the theory of gel electrophoresis of DNA; *Quarterly Review of Biophysics 1992; 25:171-204*

8. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. W. Karges für die Überlassung des sehr interessanten Forschungsthemas, die herzliche und freundliche Aufnahme in sein Forschungsteam und die uneingeschränkte Unterstützung bei allen Fragen.

Bei Herrn PD Dr. Mottaghy möchte ich mich bedanken für die freundliche Bereitschaft zur Zweitkorrektur.

Herrn Professor Dr. G. Adler und der Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Ulm danke ich für die Aufnahme als Doktorand.

Andrea Wissmann danke ich sehr herzlich für all die theoretische und praktische Hilfe, die sie mir entgegen brachte, die immer freundliche und offene Art und die vielen fröhlichen Stunden im Labor.

Bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich sehr bedanken für ihr kollegiales Verhalten und die mir entgegengebrachte Unterstützung bei dieser Arbeit.

Schließlich gilt mein besonderer Dank Christiane Zimmer, die durch häufiges Korrekturlesen und ermunternde Worte wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.