Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Henning Dralle, FRCS)

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Molekulargenetische Untersuchungen zur Pathogenese sporadischer medullärer Schilddrüsenkarzinome

Habilitation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med. habil.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Oliver Gimm
geboren am 2. September 1967 in Flensburg

Gutachter:
1. Prof. Dr. med. H. Dralle, Halle
2. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. I. Hansmann, Halle
3. Prof. Dr. med. H.K. Schackert, Dresden

Datum der Verteidigung: 27. April 2004
Datum der Beschlussfassung: 8. Juni 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006947
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006947]

Referat

Einleitung: Im Gegensatz zu den hereditären medullären Schilddrüsenkarzinomen, bei denen Keimbahnmutationen des Protoonkogens *RET* eine bedeutende pathogenetische Rolle spielen, ist wenig über die Pathogenese der häufigeren sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome bekannt.

Zielsetzung: Untersuchung, inwieweit somatische Mutationen bzw. sogenannte polymorphe „Low-Penetrance"-Sequenzvarianten in
- *RET* bzw. in *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3*, welche für die Co-Faktoren von RET kodieren
- *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3*, welche wie RET für Tyrosinkinasen kodieren

eine Bedeutung bezüglich der Pathogenese sporadischer medullärer Schilddrüsenkarzinome spielen.

Material und Methoden:
- Bestimmung der genomischen Struktur von *NTRK2*.
- Mutationsanalysen an Tumor- und Blut-DNA der oben genannten Gene bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom. Beim Nachweis polymorpher Sequenzvarianten Bestimmung deren Häufigkeit bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom und bei Patienten einer Kontrollgruppe.
- Untersuchung der Auswirkung einer dabei identifizierten polymorphen Sequenzvariante in *GFRA1* auf die Expression auf mRNA-Ebene und Proteinebene.

Wesentliche Ergebnisse:
Genomische Struktur von NTRK2: NTRK2 besteht aus mindestens 17 Exons, welche zwischen 36 und 306 Basenpaare groß sind.
Mutationsanalysen von NTRK1, NTRK2 und NTRK3: Somatische Mutationen in diesen Genen konnten nicht nachgewiesen werden. *NTRK1* hat mindestens 6, *NTRK3* mindestens 3 exonische Polymorphismen. Deren Häufigkeit unterscheidet sich nicht signifikant zwischen Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom und einer Kontrollgruppe.
Mutationsanalysen von RET: Bei 50% der sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome wurde die somatische Mutation M918T nachgewiesen. Zudem wurde nachgewiesen, dass die polymorphe Sequenzvariante in Exon 14, S836S, bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom ca. 2,5-mal so häufig vorliegt wie bei Patienten einer Kontrollgruppe ($p<0,05$).
Analysen von GFRA1, GFRA2* und *GFRA3 und GFRα-1: Somatische Mutationen in diesen Genen konnten nicht nachgewiesen werden. *GFRA1* hat mindestens 2 und *GFRA2* mindestens 1 exonischen Polymorphismus. Ein seltener Polymorphismus an Position –193 von *GFRA1* liegt überproportional häufig bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom vor ($p<0,05$). Bei Vorliegen dieses Polymorphismus war die Expression sowohl von *GFRA1* (mRNA-Ebene) als auch von GFRα-1 (Proteinebene) erhöht.

Schlussfolgerungen:
Somatische Mutationen in *NTRK1, NTRK2 und NTRK3* scheinen keine große Rolle bezüglich der Pathogenese sporadischer medullärer Schilddrüsenkarzinome zu spielen.
Die polymorphe Sequenzvariante S836S in *RET* liegt überproportional häufig bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom vor und könnte eine „Low-Penetrance"-Mutation darstellen.
Die polymorphe Sequenzvariante an Position –193 von *GFRA1* liegt überproportional häufig bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom vor und scheint zu einer gesteigerten Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene zu führen.

Gimm, Oliver: Molekulargenetische Untersuchungen zur Pathogenese sporadischer medullärer Schilddrüsenkarzinome.
Halle, Univ., Med. Fak., Habil., 94 Seiten, 2003

Inhaltsverzeichnis

A. Habilitationsschrift

Verzeichnis der Abkürzungen

1. Einleitung 1

1.1 Epidemiologie medullärer Schilddrüsenkarzinome 1

1.2 Klinik medullärer Schilddrüsenkarzinome 1

1.3 Prognose medullärer Schilddrüsenkarzinome 3

1.4 Therapie medullärer Schilddrüsenkarzinome 4

1.5 Pathogenese medullärer Schilddrüsenkarzinome 4

1.6 Fragestellungen 8

2. Material und Methoden 9

2.1 Materialgewinnung 9

2.2 Allgemeine Methoden 9
2.2.1 DNA-Extraktion 9
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 9
2.2.3 RNA-Extraktion und RT-PCR 10
2.2.4 Longe-Range-PCR 10
2.2.5 Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP) 10

2.3 Spezielle Methoden 11
2.3.1 Mutationsanalysen von *NTRK1* 11
2.3.2 Bestimmung der genomischen Struktur von *NTRK2* 11
2.3.3 Mutationsanalysen von *NTRK2* und *NTRK3* 13
2.3.4 Mutationsanalysen von *RET* 17
2.3.5 Genomische Struktur von *GFRA2* 17
2.3.6 Mutationsanalysen von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* 17
2.3.7 Expressionsanalysen von *GFRA1* 20
2.3.8 GFRα-1-Immunhistochemie 21

2.4 Statistische Analysen 21

3. Ergebnisse 22

3.1 Mutationsanalysen von *NTRK1* 22

3.2 Analysen von *NTRK2* und *NTRK3* 24
3.2.1 Genomische Struktur von *NTRK2* 24

3.2.2 Mutationsanalysen von *NTRK2* 24
3.2.3 Mutationsanalysen von *NTRK3* 24

3.3 Mutationsanalysen von *RET* **26**

3.4 Analysen von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* **30**
3.4.1 Mutationsanalysen von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* 30
3.4.2 Anaylsen bezüglich der Expression von *GFRA1* bzw. GFRα-1 31

4. Diskussion **35**

4.1 Analysen von *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3* **35**

4.2 Analysen von *RET* **36**

4.3 Analysen von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* bzw. GFRα-1 **39**

5. Zusammenfassung **42**

6. Literaturverzeichnis **43**

7. Originalarbeiten **49**

7.1 Originalarbeit 01: J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 2784-2787 **49**
7.2 Originalarbeit 02: Int J Cancer 2001; 92: 70-74 **54**
7.3 Originalarbeit 03: Oncogene 1999; 18: 1369-1373 **60**
7.4 Originalarbeit 04: Oncogene 2001; 20: 2161-2170 **66**

8. Thesen der Habilitationsschrift **77**

B. Anhang **I**

1. Lebenslauf **II**

2. Wissenschaftlicher Werdegang **IV**

3. Lehre **VII**

4. Eidesstattliche Erklärung **VIII**

5. Danksagung **IX**

A. Habilitationsschrift

Verzeichnis der Abkürzungen

Acryl	Acrylamid
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
Bis	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FMTC	Familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom
GDNF	Glial Cell Line-derived neurotropic Factor
GFRA	Glial Cell Line-derived neurotropic Factor Receptor Alpha (Gen)
GFRα	Glial Cell Line-derived neurotropic Factor Receptor Alpha (Protein)
GPI	Glucosyl-Phosphatidylinositol
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MTC	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
N/A	nicht anwendbar
n.d.	nicht durchgeführt
n.s.	nicht signifikant
NTRK	Neurotropische Tyrosinkinase
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RET	Rearranged during Transfection
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
sMTC	Sporadisches medulläres Schilddrüsenkarzinom
SSCP	Single-Strand Conformational Polymorphism
TRK	Tyrosinkinase
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett-Licht
WT	Wildtyp-Sequenz

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie medullärer Schilddrüsenkarzinome

Medulläre Schilddrüsenkarzinome gehören zu den seltenen humanen Malignomen. Im Jahr 1959 wurden sie erstmals als eigene Tumorentität beschrieben [42], jedoch gab es bereits vorher Beschreibungen dieser amyloidhaltigen Tumoren [49, 52]. Ihre Inzidenz soll bei 0,5–3/1.000.000 Einwohner liegen. Verlässliche epidemiologische Daten liegen jedoch nur aus skandinavischen Ländern vor [14, 46]. In diesen wird der Anteil medullärer Schilddrüsenkarzinome an allen Schilddrüsenmalignomen mit 3,6% bis 3,8% angegeben. Da in diesen Arbeiten auf Daten aus den 60er und 70er Jahren zurückgegriffen wurde, d.h. also relativ kurz nach dem medulläre Schilddrüsenkarzinome als eigene Tumorentität beschrieben wurden, wurde ihr Anteil vermutlich zu niedrig eingeschätzt. In neueren Studien, in denen bei Patienten mit Knotenstruma routinemäßig eine präoperative Bestimmung des für medulläre Schilddrüsenkarzinome sehr sensitiven und spezifischen Tumormarkers Calcitonin im Serum veranlasst wurde, lag der Anteil bei 16-40% [84, 89, 115]. Dieser Anteil erscheint recht hoch zu sein, wahrscheinlich gibt es zudem regionale Unterschiede. Der Anteil medullärer Schilddrüsenkarzinome an allen Schilddrüsenmalignomen wird in der Regel mit 5-10% angegeben.

1.2 Klinik medullärer Schilddrüsenkarzinome

Der größte Teil, d.h. ca. 75% aller medullären Schilddrüsenkarzinome, ist sporadisch [88]. Diese Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnose in der Regel einen klinisch manifesten, solitären Schilddrüsenknoten. Da medulläre Schilddrüsenkarzinome bereits früh lymphogen metastasieren, liegt bei über 50% dieser Patienten dann zudem eine lymphogene Metastasierung vor. Daher kann auch ein vergrößerter, indolenter Lymphknoten das Erstsymptom eines medullären Schilddrüsenkarzinoms sein. Hämatogene Metastasen medullärer Schilddrüsenkarzinome sind fast ausschließlich kleinknotig und befallen in erster Linie die Leber, die Lunge und die Knochen. Aufgrund des geringen Metastasendurchmessers entziehen sich diese oftmals bildgebenden Verfahren. Bei vorhandener Metastasierung liegt fast immer ein erhöhter Serumcalcitoninwert vor, nur in Ausnahmefällen ist dies nicht der Fall [110].
Bei ca. 25% aller medullären Schilddrüsenkarzinome handelt es sich um hereditäre Karzinome. Diese gehören zu dem Syndromkomplex der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2. Bereits 1961 wurde berichtet, dass Schilddrüsenkarzinome gehäuft mit Phäochromozytomen auftreten können [101, 118], wobei zunächst jedoch noch nicht auf die Korrelation speziell medullärer Karzinome und Phäochromozytome hingewiesen wurde. Im Jahr 1968 wurde der Begriff

„multiple endokrine Neoplasie vom Typ 2 (MEN 2)“ für das gehäufte gemeinsame Auftreten eines medullären Schilddrüsenkarzinoms, Phäochromozytomen und eines (primären) Hyperparathyreoidismus vorgeschlagen [105]. Diese Befundkonstellation wird heute als multiple endokrine Neoplasie Typ 2A (MEN 2A) bezeichnet (Tab. 1). Dabei tritt das medulläre Schilddrüsenkarzinom in 90-100% der Betroffenen auf. Phäochromozytome, welche nur sehr selten maligne sind (<5%) [12, 74], werden bei ca. 40-60% diagnostiziert. Ein primärer Hyperparathyreoidismus kann bei 10-30% der Betroffenen nachgewiesen werden.

Tab. 1: Phänotypen von Patienten mit sporadischem (sMTC) und hereditärem (FMTC, MEN 2A, MEN 2B) medullären Schilddrüsenkarzinom

	sMTC	FMTC	MEN 2A	MEN 2B
Alter bei Diagnose§ (Jahre)	40-50	45-55	25-35	10-20
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	100%	90-100%*	90-100%*	100%
Phäochromozytom	-	-	40-60%	40-60%
Primärer Hyperparathyreoidismus	-	-	10-30%	-
Ganglioneuromatose	-	-	-	+
Multiple Schleimhautneurome	-	-	-	+
Marfanoider Habitus	-	-	-	+
Verdickte Corneafasern	-	-	-	+

sMTC - sporadisches medulläres Schilddrüsenkarzinom
FMTC - familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom
MEN 2A - Multiple endokrine Neoplasie Typ 2A
MEN 2B - Multiple endokrine Neoplasie Typ 2B

§ Seit dem die routinemäßige präoperative Bestimmung von Calcitonin bei Patienten mit Schilddrüsenknoten empfohlen wird und seit dem *RET* als das pathogenetisch bedeutsamste Gen bezüglich der Pathogenese hereditärer medullärer Schilddrüsenkarzinome identifiziert wurde, ist das Diagnosedurchschnittsalter der Patienten mit sporadischem und hereditärem medullären Schilddrüsenkarzinom immer jünger geworden.

* Seit dem *RET* als das pathogenetisch bedeutsamste Gen bezüglich der Pathogenese hereditärer medullärer Schilddrüsenkarzinome identifiziert wurde, werden viele Patienten bereits vor Entstehung eines medullären Schilddrüsenkarzinoms operiert.

– Erkrankung wird nicht beobachtet bzw. deren Häufigkeit entspricht der der allgemeinen Bevölkerung.

\+ Erkrankung wird bei vielen Betroffenen beobachtet, die Erkrankung muss jedoch nicht unbedingt auftreten, noch ist deren Auftreten pathognomonisch [35, 36, 87].

Patienten, welche an einem MEN 2B-Syndrom leiden, entwickeln außer einem medullären Schilddrüsenkarzinom (100%) und einem Phäochromozytom (40-60%) einen marfanoiden Habitus, Schleimhautneurome, eine intestinale Ganglioneuromatose sowie verdickte Corneafasern (Tab. 1). Keines dieser Symptome muss im Rahmen eines MEN 2B-Syndroms auftreten, noch ist es pathognomonisch [35, 36, 87]. Im Gegensatz zum MEN 2A-Syndrom ist ein primärer Hyperparathyreoidismus nicht Bestandteil eines MEN 2B-Syndroms. Klinisch kann gelegentlich noch ein dritter Subtyp beobachtet werden, bei den Betroffenen findet man lediglich medulläre Schilddrüsenkarzinome. Aufgrund der familiären Häufung bezeichnet man diese auch als familiäre medulläre Schildrüsenkarzinome (FMTC) (Tab. 1). Hierbei handelt es sich um eine rein klinische Beschreibung, molekulargenetisch kann derzeit nicht sicher unterschieden werden, ob ein Patient zu einer FMTC- bzw. MEN 2A-Familie gehört. Das bedeutet, dass auch Patienten aus einer vermeintlichen FMTC-Familie bezüglich anderer MEN 2-assoziierter Erkrankungen (Phäochromozytom, Hyperparathyreoidismus) untersucht werden müssen.

1.3 Prognose medullärer Schilddrüsenkarzinome

Die Prognose von Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom ist schlechter als die von Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom, jedoch deutlich besser als die von Patienten mit undifferenziertem Schilddrüsenkarzinom. Es werden 10-Jahresüberlebensraten von 60-70% angegeben [7, 44]. Man vermutet, das bis zu 50% aller Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom am Tumor versterben. Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose unterscheidet sich sowohl zwischen den sporadischen und hereditären Karzinomen als auch innerhalb der hereditären Karzinome untereinander (Tab. 1). Seit dem Patienten mit hereditärem medullären Schilddrüsenkarzinom anhand eines Gentests eindeutig identifiziert und somit verwandte „Genträger“ bereits zu einem Zeitpunkt identifiziert werden können, zu dem klinisch noch keine Symptome vorliegen, wird das Durchschnittsalter der Patienten mit hereditärem Schilddrüsenkarzinom immer jünger. Aber auch Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom werden heute aufgrund der vor Operation einer Knotenstruma routinemäßig empfohlenen Bestimmung von Calcitonin in jüngerem Alter diagnostiziert als früher [43]. Insgesamt führen die heute zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden dazu, dass Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom zu einem immer früheren Zeitpunkt der Karzinogenese erkannt werden. Dem entsprechend verschiebt sich das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Operation zu den niedrigeren Tumorstadien [43]. Daher können immer mehr Betroffene kurativ behandelt werden.

1.4 Therapie medullärer Schilddrüsenkarzinome

Therapie der Wahl ist die Operation. Da bei der hereditären Form das medulläre Schilddrüsenkarzinom aus jeder C-Zelle in der Schilddrüse entstehen kann, ist die totale Thyreoidektomie Standard [19, 116]. Aber auch beim oftmals uninodulären sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinom wird, unter anderem auf Grund der nicht vorhandenen Radiojodaufnahme dieser Karzinome, eine totale Thyreoidektomie von vielen Autoren empfohlen. Es gibt jedoch auch Autoren, die eine subtotale Thyreoidektomie in bestimmten Fällen für ausreichend halten [73]. Darüber hinaus wird bei beiden Formen mindestens die Dissektion des zervikozentralen Lymphknotenkompartments empfohlen [18, 44, 75]. Oftmals reicht die lymphogene Metastasierung jedoch bereits bis in die zervikolateralen Kompartimente, so dass dann eine über das zentrale Kompartment hinausgehende Dissektion empfohlen wird [44, 66, 75].

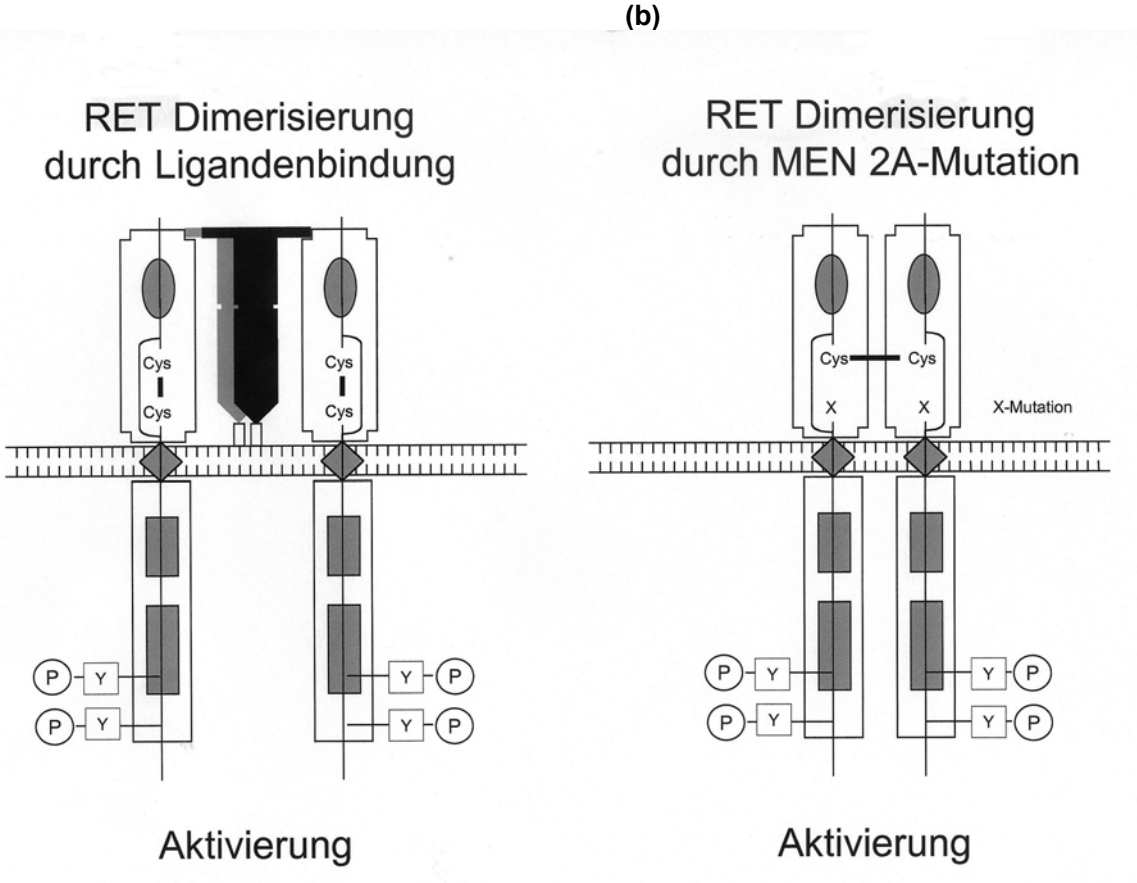
1.5 Pathogenese medullärer Schilddrüsenkarzinome

Zwei Gruppen konnten 1987 mit Hilfe von Linkage-Analysen den MEN 2A-Lokus auf Chromosom 10 lokalisieren [68, 100]. Auf diesem Chromosom war bereits 1985 ein Gen identifiziert worden, welches bei der Transfektion von NIH 3T3-Zellen ein Rearrangement aufwies und dadurch aktiviert wurde [107]. Aus diesem Grund wurde das Gen *RET* (Rearranged during transfection) genannt. *RET* kodiert für einen transmembranösen Tyrosinkinase-Rezeptor und wird sowohl in neuralen als auch neuroendokrinen Geweben exprimiert [106]. Im Jahr 1990 wurde erstmals gezeigt, dass somatische *RET*-Rearrangements in bis zu 25% bei papillären Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen werden können [40]. Bis zum Jahr 2003 konnten mindestens 10 verschiedene *RET*-Rearrangements (Translokationen und Inversionen) nachgewiesen werden [108]. Lange Zeit schien die dadurch verursachte Aktivierung von RET spezifisch für papilläre Schilddrüsenkarzinome zu sein [96], wenngleich es einen Bericht über das Vorhandensein von *RET*-Rearrangements in follikulären Schilddrüsenadenomen gab [51]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass *RET*-Rearrangements auch in trabekulären Schilddrüsenadenomen nachzuweisen sind, so dass diese von einigen Autoren als Variante papillärer Schilddrüsenkarzinome aufgefasst werden [81].

Im Jahr 1993 wurden erstmals *RET*-Keimbahnmutationen bei Patienten mit hereditärem medullären Schilddrüsenkarzinom im Rahmen eines FMTC bzw. MEN 2A-Syndroms identifiziert [17, 77]. Im Jahr 1994 wurden *RET*-Keimbahnmutationen erstmals auch bei Patienten mit MEN 2B-Mutationen nachgewiesen [11, 23, 45]. Im Gegensatz zu papillären Schilddrüsenkarzinomen wurden bei Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom fast

ausschließlich Punktmutationen gefunden, nur vereinzelt finden sich komplexere Mutationen (z.B. 9- bzw. 12-Basenpaare-Duplikationen) [47, 48]. Durch die Mutation kommt es zu einer Aktivierung von RET. Dieser Mechanismus ist für Mutationen, welche die extrazelluläre Domäne betreffen, gut geklärt. In diesen Fällen führt die Mutation zum Wegfall eines von 6 Cysteinen. Dadurch wird eine intramolekulare Disulfidbindung aufgelöst und es entsteht eine neue, intermolekulare Bindung zu einem anderen RET-Rezeptor (Abb. 1b). Auf diese Weise kommt es zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung von RET [4, 97]. Transgene Mäuse mit MEN 2A- bzw. MEN 2B-Mutationen entwickeln medulläre Schilddrüsenkarzinome, wodurch die Bedeutung dieser Mutationen hinsichtlich der Pathogenese hereditärer medullärer Schilddrüsenkarzinome weiter bekräftigt wird [1, 71]. Da bereits die Aktivierung eines Allels zur Tumorentstehung ausreicht, spricht vieles dafür, dass *RET* ein Protoonkogen ist.

Abb. 1: Aktivierung und Dimerisierung von RET durch Liganden/Co-Faktorenbindung (a) bzw. durch *RET*-Mutation und Wegfall eines extrazellulären Cysteins (b) (modifiziert nach [30])



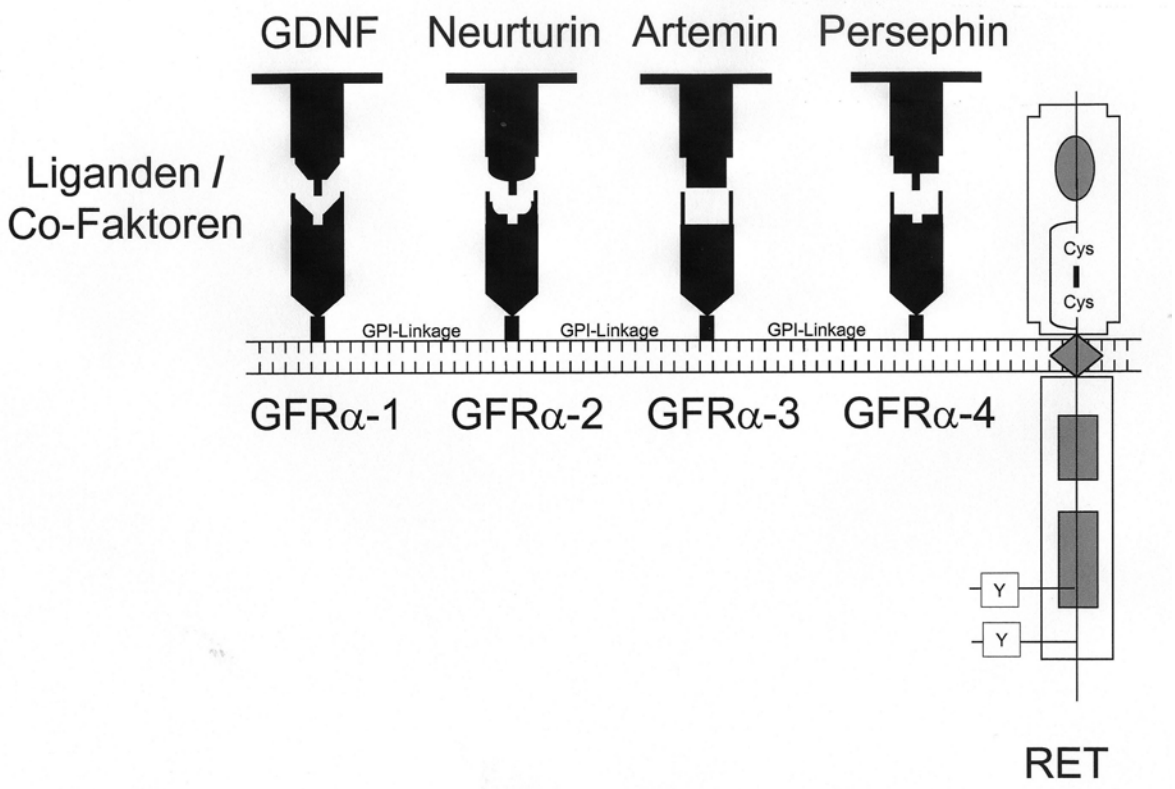
RET - Rearranged during transfection
MEN - Multiple endokrine Neoplasie

Im Gegensatz zu den hereditären medullären Schilddrüsenkarzinomen ist die Pathogenese sporadischer medullärer Schilddrüsenkarzinome weitgehend unbekannt. Je nach angewandter Methode können somatische *RET*-Mutationen bei sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen in 30-70% (im Mittel 40%) nachgewiesen werden. Allerdings sind diese Mutationen innerhalb eines sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinoms zum Teil sehr heterogen [22], so dass sie eher im Rahmen der Tumorevolution auftreten als dass sie das initiale Ereignis der Pathogenese darstellen. Am häufigsten (>95%) findet man die Mutation M918T, welche, wenn Sie in der Keimbahn auftritt, mit einem MEN 2B-Syndrom einhergeht. Patienten mit einem MEN 2B-Syndrom erkranken in der Regel sehr viel früher an einem medullären Schilddrüsenkarzinom als Patienten mit einem MEN 2A-Syndrom (Tab. 1). Daher wurde vermutet, dass Patienten mit einem sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinom und somatischer M918T-Mutation in diesem Tumor eine schlechtere Prognose haben als Patienten mit einem sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinom ohne diese somatische Mutation. Tatsächlich konnten einige Gruppen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Prognose zeigen [92, 98, 119], jedoch konnte dies nicht in allen Studien bestätigt werden [64]. Über die pathogenetische Bedeutung sogenannter polymorpher *RET*-Sequenzvarianten war nichts bekannt. Polymorphismen im gesamten Genom und deren regulierende Bedeutung sind Gegenstand andauernder Untersuchungen [10, 57]. Unter anderem wurde vermutet, das hoch-polymorphe Allele epidemiologisch gesehen vermutlich älter sind und für die Betroffenen einen Vorteil bedeuten können, jedoch sind diese aufgrund eines nur schwachen Linkage-Disequilibriums mit anderen Markern weniger geeignet für das „Positional Cloning“ [15]. In *RET* gibt es mindestens 7 polymorphe exonische Sequenzvarianten [13, 91]. Wir entschlossen uns, die Häufigkeit der polymorphen *RET*-Sequenzvarianten bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom zu bestimmen und mit der einer Kontrollgruppe zu vergleichen (Originalarbeit 03; [33]).

Die physiologische Aktivierung von RET geschieht über Bindung eines Liganden und eines Co-Faktors. Einer von derzeit vier identifizierten Liganden, GDNF, Neurturin, Persephin und Artemin (Abb. 2) muss zunächst an einen von vier GPI-gebundenen Co-Faktoren binden, wodurch es zur Ausbildung eines heterotetramerischen Komplexes kommt, der dann RET binden kann (Abb. 1a) [6, 20, 24, 53, 54, 59, 72, 109, 111]. Ein weiter Ligand, der Enovin genannt wurde, ist identisch mit Artemin [67]. Jeder Ligand bindet bevorzugt einen der Co-Faktoren (Abb. 2), *in vitro* wurden jedoch auch schwächere Bindungen zu anderen Co-Faktoren nachgewiesen [6, 24, 54, 56, 72, 95, 112]. Die Aktivierung von RET durch Liganden/Co-Faktoren-Bindung spielte eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung [94, 99], aber auch eine Bedeutung im Erwachsenenalter wird diskutiert [67]. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass RET, seine Liganden und deren Co-Faktoren gewebsspezifisch und zeitspezifisch exprimiert werden [2, 5, 54, 67, 80, 95]. Da eine Aktivierung von RET zur Entstehung eines medullären Schilddrüsenkarzinoms führt, ist es denkbar, dass auch die Liganden bzw. die Co-Faktoren eine

pathogenetische Rolle spielen. Eine Mutationsanalyse des Liganden GDNF hatte keine somatischen Mutationen nachgewiesen [65]. Wir entschlossen uns, die Co-Faktoren *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* auf Sequenzvarianten innerhalb der kodierenden Exons zu analysieren (Originalarbeit 04; [29]).

Abb. 2: Angenommene Struktur von RET, seinen Liganden GDNF, Neurturin, Artemin und Persephin sowie den Co-Faktoren GFRα-1, GFRα-2, GFRα-3 und GFRα-4 (modifiziert nach [30])



RET - Rearranged during transfection
GDNF - Glial cell line-derived neurotropic factor
GFRα - Glial cell cine-derived neurotropic factor receptor alpha (Protein)

Eine andere Tyrosinkinase, NTRK1 (auch als TrkA bezeichnet), ist ebenso wie RET in neuralen und nicht-neuralen Geweben exprimiert [58, 63]. *NTRK1* kodiert für einen „Nerve Growth Factor“, besteht aus mindestens 17 Exons und wurde auf Chromosom 1q21-22 lokalisiert [39]. Ebenso wie *RET*, so ist auch *NTRK1* häufig aktiviert in papillären Schilddrüsenkarzinomen [8]. Ähnlich wie *RET* erfolgt die Aktivierung von *NTRK1* dabei ebenfalls durch Rearrangements mit einem von mindestens drei anderen Genen (TFG, TPR, TPM3). Die dadurch entstehenden Gene wurden mit *TRK-T1-3* bezeichnet [37, 38, 103]. Aufgrund der Bedeutung von *RET* sowohl

hinsichtlich der Pathogenese papillärer als auch medullärer Schilddrüsenkarzinome auf der einen Seite und aufgrund der Ähnlichkeiten der Gene *RET* und *NTRK1* bezüglich der Pathogenese papillärer Schilddrüsenkarzinome erschien es möglich, dass *NTRK1* auch eine pathogenetische Bedeutung bei sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen haben könnte. Daher analysierten wir sporadische medulläre Schilddrüsenkarzinome bezüglich vorhandenener Mutationen in *NTRK1* (Originalarbeit 01; [32]).
In Analogie dazu scheinen auch die Tyrosinkinasen NTRK2 (auch als TrkB bezeichnet [79]) sowie NTRK3 (auch als TrkC bezeichnet [69]) bezüglicher der Pathogenese von medullären Schilddrüsenkarzinomen eine Rolle zu spielen. So wurde gezeigt, dass in fortgeschrittenen Stadien des medullären Schilddrüsenkarzinoms die Expression von NTRK2 stark reduziert, hingegen die Expression von NTRK3 stark erhöht ist [70]. Wir analysierten daher, ob Mutationen in den Genen *NTRK2* und *NTRK3* für die unterschiedliche Expression auf Proteinebene verantwortlich gemacht werden können (Originalarbeit 02; [28]).

1.6 Fragestellungen

Folgende Fragen sollten geklärt werden:

1. Gibt es in Analogie zu *RET* somatische Mutationen in *NTRK1* in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen?

2. Welche genomische Struktur hat *NTRK2*? Aus wie vielen Exons besteht *NTRK2* und wie groß sind diese? Sind somatische Mutationen in *NTRK2* bzw. *NTRK3* verantwortlich für die reduzierte Expression von NTRK2 bzw. die erhöhte Expression von NTRK3 in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen?

3. Wie hoch ist die Häufigkeit somatischer *RET*-Mutationen in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen von Patienten aus Deutschland? Spielen polymorphe Sequenzvarianten eine Rolle bezüglich der Pathogenese sporadischer medullärer Schilddrüsenkarzinome?

4. Spielen somatische Mutationen bzw. polymorphe Sequenzvarianten in *GFRA1*, *GFRA2* bzw. *GFRA3* eine Rolle bei der Pathogenese sporadischer medullärer Schilddrüsenkarzinome?

2. Material und Methoden

2.1 Materialgewinnung

Die Untersuchungen wurden durch die Ethik-Kommision der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. Alle Patienten willigten ein, dass Ihr Gewebe bzw. Blut entnommen und untersucht werden konnte. Die untersuchten Gewebe und Blutproben der Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom sowie die Blutproben der Kontrollpatienten stammen von Patienten, welche in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie operiert bzw. behandelt wurden. Zum Zeitpunkt der Operation wurden von den Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom Tumorgewebe und korrespondierendes Blut entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Von den Kontrollpatienten wurden nur Blutproben entnommen.
Die Einteilung der Tumoren in sporadische medulläre Schilddrüsenkarzinome erfolgte dann, wenn mittels Sequenzierung in dem Blut der Patienten keine Keimbahnmutation innerhalb der Exons 10, 11, 13, 14, 15 und 16 des Protoonkogens *RET* nachweisbar war. Zudem durfte kein weiteres Familienmitglied an einem medullären Schilddrüsenkarzinom erkrankt sein, noch durfte ein Phäochromozytom oder ein primärer Hyperparathyreoidismus nachgewiesen worden sein.

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion von DNA aus Tumorgewebe oder Blut erfolgte mit Hilfe des QIAamp Tissue–Kits (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikationen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurden in 1x PCR-Puffer (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA bzw. Qiagen) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch von 50 µl enthielt ferner 200 µmol/L dNTPs, 0,6-1 µmol/L von jedem Primer, 2,5 U *Taq* Polymerase (Perkin-Elmer Corp.) und 100-200 ng genomischer DNA. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 35-40 Zyklen mit 95^0C für 1 Minute, 55-62^0C für 1 Minute und 72^0C für 1 Minute, gefolgt von 1 Zyklus mit 72^0C für 10 Minuten. In den Fällen, wo eine Mutationsanalyse mit Hilfe der Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)-Methode erfolgen sollte, wurden große Exons

unterteilt und die Primer entsprechend gewählt. Bei PCR-Produkten >200 bp wurde ferner überprüft, ob es eine Restriktionsendonuklease gab, mit deren Hilfe das PCR-Produkt in kleinere Fragmente geschnitten werden konnte, weil dies die Sensitivität der SSCP-Methode erhöhen soll [55]. Der Verdau mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA).

2.2.3 RNA-Extraktion und RT-PCR

Die Extraktion von RNA aus Tumorgewebe erfolgte mit Hilfe des TRIzol-Kits (Life Technologies, Rockville, MD, USA) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Im Anschluss darauf erfolgte die Herstellung von cDNA mittels der Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) unter Verwendung des 1st Strand cDNA Synthesis-Kits (Roche, Indianapolis, IN, USA) gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

2.2.4 Long-Range-PCR

Zur Durchführung der Long-Range-PCR verwendeten wir das LA PCR-Kit (Takara Shuzo, Kyoto, Japan) entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Die PCR-Amplifikation fand in einem Reaktionsgemisch mit einem Volumen von 50 µl statt, welches 1x PCR-Puffer (Takara Shuzo), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µmol/l dNTPs, 0,4 µmol/l von jedem Primer, 2,5 U Taq-Polymerase (Takara Shuzo) sowie 100-200 ng genomischer DNA enthielt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: Nach einem Zyklus mit 94^0C für 2 Minuten folgten 35 Zyklen bei 98^0C für 20 Sekunden, gefolgt von 60^0C für 30 Sekunden und 68^0C für 15 Minuten. Der abschließend Zyklus wurde bei 72^0C für 10 Minuten durchgeführt.

2.2.5 Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)

Vor jeder SSCP wurden zu 2 µl des PCR- bzw. Verdau-Produktes 3 µl Formamid-Puffer gegeben, für 10 Minuten bei 95^0C erhitzt und anschließend auf Trockeneis abgekühlt. Unmittelbar vor der SSCP wurden die Proben schnell aufgetaut und dann auf ein 10% Polyacrylamid/1xTris-Bor-EDTA-Gel augetragen. In einigen Fällen erfolgte zudem die Zugabe von 10% Glyzerol. Die Gele liefen dann zwischen 14-16 h mit 100-150 V bei 4^0C bzw. Raumtemperatur. Die anschließende Gelfärbung erfolgte mit Hilfe der Silberfärbung. Zunächst wurde das Gel zur Fixierung für 10 Minuten in 0,5% Essigsäure mit 10% Äthanol gegeben,

anschließend zur Färbung für 10 Minuten in 0,1% Silbernitratlösung. Zur Entwicklung wurde das Gel für 20 Minuten in 1,5% Natriumhydroxid, 0,01% Natriumborhydrid und 0,05% Formaldehyd gegeben. Die abschließende Fixierung erfolgte für 10 Minuten in 0,75% Natriumcarbonat.
In den Fällen, in denen eine Abweichung des normalen Bandenmusters gesehen wurde, wurde das PCR-Produkt gereinigt und sequenziert. In den Fällen, in denen zunächst Tumor-DNA untersucht wurde, erfolgte anschließend die Analyse der Blut-DNA auf die gleiche Weise, um zu bestimmen, ob die Mutation somatischer Natur war bzw. die Keimbahn betraf. Ferner analysierten wir, ob durch die Mutation die Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease geändert wurde, um so durch drei unterschiedliche Methoden (SSCP, Sequenzieren, Restriktionsverdau) die Existenz der Mutation zu bestätigen. Für den Fall einer bestätigten Mutation analysierten wir deren Häufigkeit sowohl im Gesamtkollektiv der Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom, als auch innerhalb der Kontrollgruppe.

2.3 Spezielle Methoden

2.3.1 Mutationsanalysen von *NTRK1*

Zunächst konnten wir zeigen, dass *NTRK1* in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen exprimiert wird (Originalarbeit 01; [32]). Mit Hilfe der in Tab. 2 angegeben Primersequenzen erfolgte die Generierung von DNA-Amplicons zur Mutationsanalyse von *NTRK1* mittels SSCP (Tab. 5). Parallel dazu wurden bei mindestens fünf Karzinomen alle Exons sequenziert, um vermeintlich von der SSCP nicht erkannte Mutationen zu identifizieren. In keinem Fall wurde dabei mit Hilfe des Sequenzierens eine Mutation identifiziert, welche nicht schon zuvor mittels SSCP entdeckt worden war. Insgesamt wurden 31 sporadische medulläre Schilddrüsenkarzinome untersucht.

2.3.2 Bestimmung der genomischen Struktur von *NTRK2*

Um die genomische Struktur von *NTRK2* zu bestimmen, verwendeten wie eine Long-Range-PCR (Originalarbeit 02; [28]). Die Primer wurden in der Annahme ausgewählt, dass die Intron-Exon-Grenzen zwischen den für die Tyrosinkinasen kodierenden Genen *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3* konserviert sind. Forward- und Reverse-Primer wurden entsprechend dieser angenommenen Intron-Exon-Grenzen bestimmt, dabei wurde die cDNA-Sequenz zu Grunde gelegt, wie sie von Nakagawara veröffentlicht wurde (Accession Number U12140) [79].

Tab. 2: *NTRK1* (*TrkA*)-Primersequenzen zur Generierung von DNA-Amplicons für die Mutationsanalyse mittels SSCP

• Exon	• Primername	• Primersequenzen (5' nach 3')	• Größe des PCR-Produktes
2	NTRK1-2F	AACTCAAGTGTGGCCTGAGC	193
	NTRK1-2R	CCTCCCTGACCTTCTGGTCT	
3	NTRK1-3F	GAGTAGCTGAGACCTGGGGA	180
	NTRK1-3R	CATTAGCAGCCCAAGTCTGG	
4	NTRK1-4F	CAAGGGGTCTGTCTTGCTGT	173
	NTRK1-4R	AACAGACCCAAGTGCACACA	
5	NTRK1-5F	GGCCCTTTCCTTGACTCTGT	218
	NTRK1-5R	CTTACACCACCTCCCTCACC	
6	NTRK1-6F	GCCACTCCCAGCTCTAACAC	214
	NTRK1-6R	GCCAGCGAAGGTCTTCTCAC	
7	NTRK1-7F	AAAGCTCCTTCTTATTCCCCC	216
	NTRK1-7R	GAGATGAGTAGGGGGTGGGT	
8a	NTRK1-8aF	CCTCCTGCTGTTGCTCTTTC	229
	NTRK1-8aR	TGGTTGAGGCGCAGACAC	
8b	NTRK1-8bF	TTCACTGAGTTCCTGGAGCC	249
	NTRK1-8bR	GCTGTAACCCAGGAGGAGC	
9	NTRK1-9F	CGTCCCATGAAGGAATGAGT	176
	NTRK1-9R	CTCCAGAGACCAGGCAGAAC	
10	NTRK1-10F	AGTGTGTGTCAAGGCTCACC	213
	NTRK1-10R	GAGCTCAGGCCAGATGGTAG	
11	NTRK1-11F	GAGGAGCCCCTGGATCTAAC	203
	NTRK1-11R	GCCAGTAGGAAACAAAGCCA	
12	NTRK1-12F	CTGCAAGTTACAAGGTGGGG	293
	NTRK1-12R	ACACACACACACTCGTCCCT	
13	NTRK1-13F	AAGACAGTCCCCGCTACAAC	300
	NTRK1-13R	ATGTCAGCCCTCTGCATCTC	
14	NTRK1-14F	CCAACTCAGTCCTGTCCCTG	274
	NTRK1-14R	TATAGGGAAGGGAAGACGGG	
15	NTRK1-15F	GGAGTTCTATCCTCCCAGCC	335
	NTRK1-15R	GAAAAAGGAACCTGAAGGGG	
16	NTRK1-16Fb	CCTGGAATTGATGCAGTGTC	294
	NTRK1-16R	CTACAGTTTGGATGCAGGGG	
17a	NTRK1-17aF	GGACTGGCCTCACTCTCTTG	294
	NTRK1-17aR	CCAGTATTCCGGCTAACCAC	
17b	NTRK1-17bF	GCACCTCCTGTCTACCTGGA	273
	NTRK1-17bR	ACGTCATCCCAATAACTGGC	

DNA - Desoxyribonukleinsäure
SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism
PCR - Polymerasekettenreaktion

Nach Durchführung der Long-Range-PCR entsprechend der oben beschriebenen Methode wurde das PCR-Produkt auf ein 1% Low-Melt Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch

getrennt. Die UV-Darstellung erfolgte nach Färbung mit Ethidiumbromid. Die kräftigste bzw. klarste Bande wurde ausgeschnitten, mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gereinigt und anschließend sequenziert, wobei sowohl der Forward-Primer als auch der Reverse-Primer verwendet wurde.
Während wir an der Bestimmung der genomischen Struktur von *NTRK2* arbeiteten, wurde eine „Working Draft" von Chromosom 9 im Internet veröffentlicht. Diese „Working Draft" enthielt alle Exons von *NTRK2* außer Exon 9. Um schließlich die intronischen Sequenzen „upstream" und „downstream" von Exon 9 zu bestimmen, verwendeten wir das Vectorette-System (Sigma, The Woodlands, TX, USA) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Dazu wurde genomische DNA mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Hind*III, *Taq*I und *EcoR*I verdaut und anschließend mit einer Vectorette-Unit ligiert. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt, wobei der eine Primer spezifisch für die Vectorette-Unit war, während der andere Primer spezifisch für *NTRK2*-Exon 9 war. Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde schließlich sequenziert.

2.3.3 Mutationsanalysen von *NTRK2* und *NTRK3*

Zur Mutationsanalyse von *NTRK2* und *NTRK3* wurde eine Kombination aus SSCP und direktem Sequenzieren angewandt (Originalarbeit 02; [28]). Die Primer, welche benutzt wurden, um die Exons von *NTRK2* zu amplifizieren, wurden entsprechend dem Sequenzergebnis gewählt, welches mit Hilfe der Long-Range-PCR, der im Internet zugänglichen Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi ; Database: htgs) sowie der Vectorette-PCR ermittelt wurde (Tab. 3). Die genomische Struktur sowie die Intron-Exon-Grenzen von *NTRK3* waren bereits beschrieben worden [50]. Dem entsprechend wurden die Primer entwickelt, um die Exons von *NTRK3* zu amplifizieren (Tab. 4). Die PCR-Bedingungen entsprachen den oben angegebenen.
Für die meisten Exons (Ausnahme: Exon 18 von *NTRK3*) wurde die Mutationsanalyse mit Hilfe der SSCP-Methode durchgeführt (Tab. 5). Parallel dazu wurden bei mindestens fünf Karzinomen alle Exons sequenziert, um vermeintlich von der SSCP nicht erkannte Mutationen zu identifizieren. In keinem Fall wurde dabei mit Hilfe des Sequenzierens eine Mutation identifiziert, welche nicht schon zuvor mittels SSCP entdeckt worden war. Insgesamt wurden 31 sporadische medulläre Schilddrüsenkarzinome untersucht.

Tab. 3: *NTRK2* (*TrkB*)-Primersequenzen zur Generierung von DNA-Amplicons für die Mutationsanalyse mittels SSCP

• Exon	• Primername	• Primersequenzen (5' nach 3')	• Größe des PCR-Produktes
1	TRKB-I-1F	CTGGCACTGGCTGCTAGG	271
	TRKB-I-1R	AGGGCAAGGAGAAAAAGGAG	
2	TRKB-I-2F	CACTGCGATTCACTCTCTGC	166
	TRKB-I-2R	TGACCAGAGCAGACAACAGG	
3	TRKB-I-3F	CCTGTTGTCTGCTCTGGTCA	177
	TRKB-I-3R	CCTGGGAAGCAAAAGAATCA	
4	TRKB-I-4F	AAATTCATGTTTAATGTTTTTGATTCC	147
	TRKB-I-4R	CCTTTGAAAACATTTCCCCA	
5	TRKB-I-5F	GGAAAAAGGAACTTGATCTGTTG	255
	TRKB-I-5R	CCAAGGCAATGAGAATAATTAATAG	
6	TRKB-I-6F	GCCTCTGTTTACTTTTCTTGTTCC	197
	TRKB-I-6R	TCTATTAAGACACAGCCAAACACA	
7	TRKB-I-7F	TTGTCTGTTAATTCATTTGTAG	249
	TRKB-I-7R	CAAATTTAAGCAGCACCCAGA	
8	TRKB-I-8F	GGGAGAATTCTGAGCTTTCTGA	388
	TRKB-I-8R	CTCCCCACATACAAAAGTGTCA	
9	TRKB-I-9F	TGACTCCAAAATGCATACTTACAAA	156
	TRKB-I-9R	TTCAGTTGATTTACTTCATGATACACA	
10	TRKB-I-10Fc	ATGTCTTCCTCATTCCCCCT	180
	TRKB-I-10R	TCCAAAATGCTCAGAACCAA	
11	TRKB-I-11F	TAACCACCCTCCCTTCCTTT	179
	TRKB-I-11R	CATAAGCCAAAAATGATCCACA	
12	TRKB-I-12F	CAGCTCAATAAAGCCATTGAT	283
	TRKB-I-12R	TGCAGCAAATGGGACAATAA	
13	TRKB-I-13F	CCATTCTGTCTTTGTTTTGCAG	189
	TRKB-I-13R	TCATGGTTAATGAGACATTCTGG	
14	TRKB-I-14F	TCTTTTAACACCCATCCCCA	241
	TRKB-I-14R	CTGAAGGCCTGCTCCCTC	
15	TRKB-I-15F	GAAAATGCTGAGGCCCCC	350
	TRKB-I-15R	GCAAACAAATACAGCAGGGGT	
16	TRKB-I-16F	CTGTTGATCCCTTTCTCCCC	239
	TRKB-I-16R	AATGGATGCCTCTGGGATCT	
17	TRKB-I-17F	TCCTATCTTTGATCTCCATCCA	250
	TRKB-2510R	TGAGGAGTACGTTGGGAAGG	

DNA - Desoxyribonukleinsäure
SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism
PCR - Polymerasekettenreaktion

Tab. 4: *NTRK3* (*TrkC*)-Primersequenzen zur Generierung von DNA-Amplicons für die Mutationsanalyse mittels SSCP

• Exon	• Primername	• Primersequenzen (5' nach 3')	• Größe des PCR-Produktes
1	TRKC-1F	TTTTAGAAGCAGCGATCGGA	326
	TRKC-1R	CAGGAGGGAGACGCAGAG	
2	TRKC-2F	TCTGGCTGACCGTTACCTTT	239
	TRKC-2R	AAAAGAAGACCTGGGGGAGA	
3	TRKC-3F	GAGCAGATATCCCTCTGCCA	189
	TRKC-3R	TTCACTGCCCCAAGAGTACC	
4	TRKC-4F	GCATTATTTGTGCCAGACTTG	208
	TRKC-4R	AGGTGGTTCCACTGCTTGAC	
5	TRKC-5F	TCCCTTCCCCTCTCTCTTTG	248
	TRKC-5R	CCATCTCTGGTGTCTGAGGG	
6	TRKC-6F	GTTTGCCTGTCTTTTCACCC	224
	TRKC-6R	CACTCCCTAGCCTCCTGATG	
7	TRKC-7F	GGGGATTAGGTAGCAGAGCC	233
	TRKC-7R	CCCCCACAATAACATGCACT	
8	TRKC-8F	ATTTCAGCAGGCTTCTCCCT	341
	TRKC-8R	CAGCTACGCTGCCCTCAC	
9	TRKC-9F	TGAGACCACCCCCTAAACTG	241
	TRKC-9R	TCAAAGCAACAGGTAAAGCAGA	
10	TRKC-10F	CAAGAGCCTGGCTTTCAGAG	238
	TRKC-10R	TGCCAGTCAACACACTCCTC	
11	TRKC-11F	GGGTTTTCTGTGATTGTTGCT	179
	TRKC-11R	CGCCCTTGAAAATGAAACTC	
12	TRKC-12F	CTGCGTCTCTCTTGGTGTGT	294
	TRKC-12R	GTTCCAGAACCCCAGGTACA	
13	TRKC-13F	TGTCTCCCTGTGTCACCAAA	213
	TRKC-13R	GCATGCCTCTGGGGTTTAC	
14	TRKC-14F	CCCCTGCCCTGTAGTTGTTA	243
	TRKC-14R	AGGGGAAGACAATCCTTGCT	
15	TRKC-15F	CTCTTCTCCCCATGCTCTTG	295
	TRKC-15R	AGTCCTGCAGCTGGGAAAGT	
16	TRKC-16F	AAGGCCTTCCTTTTCTGAGG	297
	TRKC-16Rb	GAACACATTGCATTTTGGCA	
17	TRKC-17F	TGTGCCTCTATCTCAACCCC	222
	TRKC-17R	CTCCCCCAATCAAGATTCCT	
18	TRKC-18F	AGGCTGAGCTTTGGGTGTAA	341
	TRKC-18R	TGAAGATGTTCGCTTCAGTCA	

DNA - Desoxyribonukleinsäure
SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism
PCR – Polymerasekettenreaktion

Tab. 5: SSCP-Bedingungen zur Mutationsanalyse von *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3*

• Gen • Exon	• Restriktions-endonuklease	• Fragment-größen	• PAA-Konzentration (Verhältnis Acryl:Bis)	• SSCP-Bedingungen
NTRK1				
1				Sequenzieren
2			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
3			10% (37,5:1)	4^0C, 16h, 150V
4			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
5			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
6			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
7			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
8a			10% (37,5:1)	4^0C, 16h, 150V
8b	*Eae*I	117 + 132	10% (37,5:1)	4^0C, 16h, 150V
9			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
10			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
11			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
12	*Alu*I	168 + 125	10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
13	*Xmn*I	140 +160	10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
14	*Pst*I	105 + 169	10% (37,5:1) + 10% Glycerol	RT, 14h, 100V
15	*Hpa*II	186 + 149	10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
16	*Sau3A*I	178 + 116	10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
17a	*Ban*II	164 + 130	10% (37,5:1)	4^0C, 16h, 150V
17b				
NTRK2				
1			10% (60:1)	RT, 14h, 100V
2			12% (30:1)	4^0C, 16h, 200V
3			14% (100:1)	4^0C, 16h, 150V
4			14% (100:1)	RT, 14h, 100V
5			10% (60:1)	RT, 14h, 100V
6			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
7			14% (100:1)	RT, 14h, 100V
8	*Hha*I	140 + 248	10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
9			12% (30:1)	4^0C, 16h, 150V
10			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
11			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
12			10% (37,5:1)	4^0C, 16h, 150V
13			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
14			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
15	*Eae*I	186 + 164	14% (100:1)	RT, 14h, 100V
16			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
17			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
NTRK3				
1	*ScrF*I	190 + 136	12% (30:1)	RT, 14h, 100V
2			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
3			14% (100:1)	4^0C, 16h, 150V
4			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
5			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
6			14% (100:1)	RT, 14h, 100V
7			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
8	*Hinf*I	149 + 192	10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
9			10% (37,5:1)	RT, 14h, 100V
10			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
11			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
12			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
13			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
14			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
15	*Rsa*I	139 + 156	12% (30:1)	RT, 14h, 100V
16	*BsmF*I	168 + 129	14% (100:1)	RT, 14h, 100V
17			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
18	*Sau3A*I	168 + 173		Sequenzieren

SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism; PAA - Polyacrylamid;
Acryl - Acrylamid; Bis - Bisacrylamid; RT - Raumtemperatur

2.3.4 Mutationsanalysen von *RET*

Zur Untersuchung der sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome auf das Vorliegen einer somatischen M918T-Mutation in Exon 16 wurden Exon 16-Amplicons mittels PCR unter Verwendung der Primer fRET16 und fRET16 [45] bzw. der Primer CRT5H und CRT5G [23] hergestellt (Originalarbeit 03; [33]). Anschließend erfolgte eine Second-Round-PCR unter Verwendung eines speziell entwickelten Primers, f16Rsa, welcher im Falle des Vorliegens einer M918T-Mutation eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Rsa*I erzeugt [64]. Der Verdau erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (New England Biolabs). Zudem erfolgte ein Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Sau*3AI als Positivkontrolle für den Verdau.

Des weiteren wurde die Häufigkeit der 7 beschriebenen exonischen Polymorphismen (Exon 2, 3, 7, 11, 13, 14 und 15) des *RET*-Protoonkogens analysiert [13, 91]. Die PCR-Bedingungen und die dabei verwendeten Primer wurden bereits beschrieben [76], abweichend davon verwendeten wir für Exon 7 den Reverse-Primer RET-7R (5‘-TTGTACTGGACGTTGATGCC-3‘). Bis auf Exon 3 können alle Polymorphismen durch den Verdau mit einer Restriktionsendonuklease (siehe Ergebnisteil) analysiert werden. Um auch den Polymorphismus in Exon 3 mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease untersuchen zu können, entwickelten wir den Primer f3-Sau3AI (5‘-CTTTCCCCTGCTCACCGTCTACCTCAAGAT-3‘), welcher eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Sau3A*I erzeugt (Originalarbeit 03; [33]).

2.3.5 Genomische Struktur von *GFRA2*

Die genomische Struktur von *GFRA1* und *GFRA3* einschließlich der Beschreibung der Intron-Exon-Grenzen waren bereits beschrieben worden [3, 78, 83]. Die genomische Struktur von *GFRA2* wurde von uns mittels Long-Range-PCR und Vectorette-PCR bestimmt [114]. Wir konnten 9 Exons nachweisen, welche zwischen 105 bp und 489 bp groß waren.

2.3.6 Mutationsanalysen von *GFRA1*, *GFRA*2 und *GFRA3*

Die Primersequenzen und PCR-Bedingungen zur Amplifikation der einzelnen Exons von *GFRA1* wurden von uns bereits an anderer Stelle beschrieben [31]. Die Primersequenzen und PCR-Bedingungen (Tab. 6) zur Amplifikation der einzelnen Exons von *GFRA2* wurden entsprechend der Sequenzen festgelegt, welche mittels Long-Range-PCR und Vectorette-PCR bestimmt worden waren [114].

Tab. 6: *GFRA2*-Primersequenzen zur Generierung von DNA-Amplicons für die Mutationsanalyse mittels SSCP

• Exon	• Primername	• Primersequenzen (5' nach 3')	• Größe des PCR-Produktes
1	Ra2-I-1F	AAAAACGGTGGGATTTATTTAACA	105
	Ra2-I-1Rc	CTTCTCGCCTCCCCCTC	
1	Ra2-I-2F	TTGGGTGGGAGATTGTGG	457
	Ra2-I-2R	CTCCCTCCTGAACCCCTG	
2	Ra2-I-3Fb	GTAGAGAGCTTTCCTCCGGC	193
	Ra2-I-3R	CCCAGTGCGAGCTCACTTA	
3	Ra2-I-4F	GCCTCTGACCTGCTCTCTTG	489
	Ra2-I-4R	GGTCATAATTCGATGCACCC	
4	Ra2-I-5F	CCCCTGTTTTCTCTATTGCG	170
	Ra2-I-5R	CAGGTGAGCAGGAAGAGCTTA	
5	Ra2-I-6F	CCGTACCTCTCTCCTCTCCC	205
	Ra2-I-6R	TTGGGGAGAACATCCAGAAC	
6	Ra2-I-7F	ACTTCTCTGCATCGTCCCTC	272
	Ra2-I-7R	GAGTCATTTCCCATGCCACT	
7	Ra2-I-8F	GCTGAGGGTGTCAGAGAAGG	243
	Ra2-E-8R	CTCTGTGAAGCACATGCTTAAC	
8	Ra2-E-9F	CTCACGACAAATATCATCCC	127
	Ra2-1434R	CAGCCTACAAGGCCTGTTTC	

DNA - Desoxyribonukleinsäure
SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism
PCR - Polymerasekettenreaktion

Anhand der zuvor beschrieben Struktur des humanen *GFRA3*-Lokus [83] wurden die Primersequenzen und PCR-Bedingungen zur Amplifikation der einzelnen Exons von *GFRA3* festgelegt (Tab. 7).

Tab. 7: *GFRA3*-Primersequenzen zur Generierung von DNA-Amplicons für die Mutationsanalyse mittels SSCP

• Exon	• Primername	• Primersequenzen (5' nach 3')	• Größe des PCR-Produktes
1	Ra3-I-1F	5'-TCTCAGAGCTCCAGGGGAGGAGC-3'	207
	Ra3-I-1R	5'-CTACACCTCACCTCCCCCTC-3'	
2	Ra3-E-2F	5'-GAGACCCCCTTCCCACAGA-3'	378
	Ra3-I-2Rb	5'-CTACCATGTGGCCCATATCC-3'	
3	Ra3-I-3F	5'-CACAGCTTGCAGCTGGTTAG-3'	265
	Ra3-I-3R	5'-CTCTGGTTCCCGAGCCTAGT-3'	
4	Ra3-I-4Fc	5'-TTGTCAAATCAGGGGTTTCC-3'	429
	Ra3-I-4R	5'-CCCTGTCCTCCCAAACTACA-3'	
5	Ra3-I-5F	5'-CCTGGGCAAGAGAGAGTGAG-3'	240
	Ra3-I-5R	5'-CCGGAGCATTCTTACCTCAG-3'	
6	Ra3-I-6F	5'-TGGAAGAAGGTGGGAGCTAA-3'	226
	Ra3-I-6R	5'-CTGGGAGCAAGTACAGCACA -3'	
7	Ra3-I-7F	5'-ACCCTTCCAATGAGCCTTCT-3'	207
	Ra3-I-7R	5'-CGCCTCTATCCCTTTGTCTG-3'	
8	Ra3-I-8F	5'-GGGCTAAAGAAAATCCCCTG-3'	226
	Ra3-I-8R	5'-CTTCCTGCTGCTGTCCTTTC-3'	

DNA - Desoxyribonukleinsäure
SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism
PCR - Polymerasekettenreaktion

Zur Mutationsanalyse von *GFRA1*, *GFRA*2 und *GFRA3* wurde eine Kombination aus SSCP und direktem Sequenzieren angewandt (Tab. 8) (Originalarbeit 04; [29]). Parallel dazu wurden bei mindestens drei Karzinomen alle Exons sequenziert, um vermeintlich von der SSCP nicht erkannte Mutationen zu identifizieren. In keinem Fall wurde dabei mit Hilfe des Sequenzierens eine Mutation identifiziert, welche nicht schon zuvor mittels SSCP entdeckt worden war. Für das Exon 1 von *GFRA1* und *GFRA2* konnten keine geeigneten SSCP-Bedingungen gefunden werden. In diesen beiden Fällen erfolgte die Mutationsanalyse durch Sequenzieren. Insgesamt wurden 31 sporadische medulläre Schilddrüsenkarzinome untersucht.

Tab. 8: SSCP-Bedingungen zur Mutationsanalyse von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3*

• Gen • Exon	• Restriktions-endonuklease	• Fragment-größen	• PAA-Konz. (Verhältnis Acryl:Bis)	• SSCP-Bedingungen
GFRA1				
1				Sequenzieren
2			10% (37.5:1)	RT, 14h, 100V
3			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
4	*Ava*II	206 + 196	10% (37.5:1)	4^0C, 16h, 150V
5			10% (37.5:1)	RT, 14h, 100V
6			10% (37.5:1)	RT, 14h, 100V
7			10% (37.5:1)	4^0C, 16h, 150V
8			14% (100:1)	RT, 14h, 100V
9			14% (100:1)	RT, 14h, 100V
GFRA2				
1				Sequenzieren
2	*Bgl*I	210 + 247	12% (30:1)	4^0C, 16h, 150V
3			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
4	*Ban*I	223 + 266	10% (37.5:1)	4^0C, 16h, 150V
5			10% (37.5:1)	4^0C, 16h, 150V
6			12% (30:1)	4^0C, 16h, 150V
7			10% (37.5:1), 10% Glycerol	4^0C, 16h, 150V
8			10% (37.5:1), 10% Glycerol	RT, 14h, 100V
9			10% (37.5:1)	RT, 14h, 100V
GFRA3				
1			12% (30:1)	4^0C, 16h, 150V
2	*Hpa*II	221 + 157	10% (37.5:1)	RT, 14h, 100V
3			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
4	*Pvu*II	218 + 211	10% (37.5:1)	4^0C, 16h, 150V
5			10% (37.5:1)	4^0C, 16h, 150V
6			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
7			12% (30:1)	RT, 14h, 100V
8			12% (30:1)	RT, 14h, 100V

SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism; PAA - Polyacrylamid;
Acryl - Acrylamid; Bis - Bisacrylamid; RT - Raumtemperatur

2.3.7 Expressionsanalysen von *GFRA1*

Um den Expressionslevel von *GFRA1* auf der mRNA-Ebene zu bestimmen, erfolgte eine semiquantitative Duplex-PCR (Originalarbeit 04; [29]). Der Reaktionsansatz enthielt 1 µl cDNA, 1,2 µmol/l der intronischen *GFRA1*-Primer (5‘-GATATATTCCGGGTGGTCCC-3‘ bzw. 5‘-AAACAGTTGGGCTTCTCCCT-3‘) und 0,2 µmol von jedem Primer für das Housekeeping-Gen Glucosyl-Phosphatidylinositol (GPI) (5‘-GACCCCCAGTTCCAGAAGCTGC-3‘ bzw. 5‘-GCATCACGTCCTCCGTCACC-3‘). Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: nach einem Zyklus

von 15 Minuten bei 95^{0}C folgten 30 Zyklen mit 95^{0}C für 45 Sekunden, 58^{0}C für 30 Sekunden und 72^{0}C für 15 Sekunden, gefolgt von 1 Zyklus mit 72^{0}C für 10 Minuten.

2.3.8 GFRα-1-Immunhistochemie

Um die Expression von GFRα-1 auf der Proteinebene zu analysieren, führten wir eine Immunhistochemie durch (Originalarbeit 04; [29]). Dafür wurden 4 µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe auf Superfrost plus-Objektträger übertragen und für 2 h bei 60^{0}C gebacken. Die Immunhistochemie erfolgte wie bereits beschrieben [34], wobei wir als Antikörper einen gegen GFRα-1 gerichteten, kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörper verwendeten (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA). Über die Spezifität des Antikörpers war bereits berichtet worden. Nach dem Deparaffinisieren und Rehydrieren der Schnitte mit Hilfe von Xylene- und Ethanol-Lösungen erfolgte das Antigen-Retrieving durch Erhitzen auf 98^{0}C für die Dauer von 20 Minuten in einer 0,01 M Natriumcitratpufferlösung mit einem pH von 6,4. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte anschließend für ca. 30 Minuten mit 1% Wasserstoffperoxid in PBS bis zum Erreichen der Raumtemperatur abgekühlt. Nach Blockierung in 0,75% Pferdeserum wurden die Schnitte über Nacht bei 4^{0}C mit dem GFRα-1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies) bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Die Lokalisierung des primären Antikörpers erfolgte mit Hilfe des Avidin-Biotin-Peroxidase-Kits (Vector Biolabs, Burlingame, CA, USA) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Die anschließende Färbung erfolgte mit 0,05% 3‘,3‘-Diaminobenzidin (Sigma, St. Louis, MO, USA) und Nickel-Kobalt als Verstärker. Die daraus resultierende Färbung ist schwarz. Die Färbeintensität wurde separat für den Zellkern und das Zytoplasma bestimmt. Die Einteilungsgrade waren stark (+++), mäßig (++), schwach (+) und nicht vorhanden (-). Als Gegenfärbung verwendeten wir Kernechtrot („Nuclear Fast Red“) (Rowley Biochemical Institute, Danvers, MA, USA).

2.4 Statistische Analysen

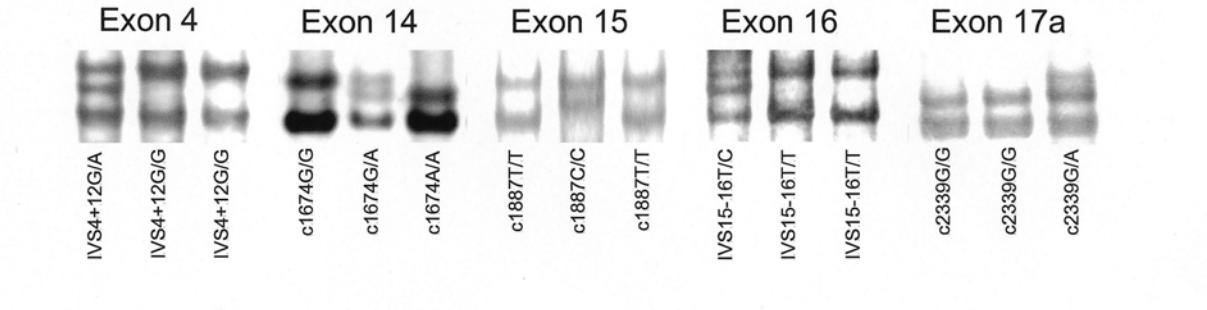
Jeder in der vorliegenden Arbeit untersuchte Genlokus wird durch 2 Allele bzw. 2 Chromosome dargestellt. Für die statistische Analyse wurde jedes Allel gewertet, d.h. dass z.B. bei 50 Tumoren insgesamt 100 Allele bzw. Chromosome in den statistischen Berechnungen berücksichtigt wurden. Zur Anwendung kamen der Chi-Quadrat-Test, Fishers exakter Test sowie der t-Test. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Mutationsanalysen von *NTRK1*

Die Mutationsanalyse von *NTRK1* bei 31 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome konnte veränderte SSCP-Bandenmuster in 5 Exons (Exon 4, 14, 15, 16 sowie 17a) nachweisen (Abb. 3) (Originalarbeit 01; [32]). Mittels Sequenzieren wurde in Exon 4, 14, 16 und 17a jeweils eine Sequenzvariante nachgewiesen, in Exon 15 waren es 4 Sequenzvarianten (Tab. 9). Diese konnten mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen verifiziert werden (Tab. 9). Die Untersuchung der korrespondierenden Blut-DNA bestätigte, das alle Sequenzvarianten in der Keimbahn zu finden sind. Interessanterweise wurden die Sequenzvarianten in Codon 604 (c.1810C>T) und Codon 613 (c.1838G>T) in Exon 15 immer gemeinsam beobachtet. Die Häufigkeit der Sequenzvarianten innerhalb der Gruppe der Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom unterschied sich nicht signifkant von der Häufigkeit in der Kontrollgruppe (Tab. 9).

Abb. 3: Bandenmuster nach Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)-Mutationsanalyse von Tumor-DNA für *NTRK1*-Exons 4, 14, 15, 16 und 17a sowie die dazu korrespondierenden Sequenzierungsergebnisse (modifiziert nach Originalarbeit 01; [32])



SSCP - SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism
DNA - Desoxyribonukleinsäure

Tab. 9: Häufigkeit von polymorphen Sequenzvarianten in *NTRK1* bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom (sMTC) und Kontrollpatienten

• Exon	• Nukleotidaustausch • Aminosäuren-austausch	• Restriktions-endonuklease (schneidet in der Gegenwart von)		• sMTC-Patienten Allel 1-Häufigkeit*	• Kontrollpatienten Allel 1-Häufigkeit*	p-Wert§
4	IVS4+12G>A N/A	*Hha*I	(G)	98%	100%	n.s.
14	c.1674G>A Q558Q	*Mae*II¥	(A)	19%	27%	n.s.
	c.1767T>C F589F	*Mbo*II	(C)	0%	0%	n.s.
15	IVS14-4delA N/A	*BamH*I+	(delA)	8%	4%	n.s.
	c.1810C>T Y604H#	*Sty*I	(C)	95%	93%	n.s.
	c.1838G>T V613G#	-		95%	93%	n.s.
	c.1887T>C A629A	*Hae*III	(C)	35%	27%	n.s.
16	IVS15-16T>C N/A	*Hga*I	(C)	8%	3%	n.s.
17a	c.2339G>A R780Q	*Alu*I	(A)	2%	0%	n.s.

N/A - nicht anwendbar; n.s. – nicht signifikant

* Allel 1 ist definiert als das Allel, welches von der Restriktionsendonuklease geschnitten werden würde.

§ p-Wert für den Vergleich der Häufigkeiten zwischen Patienten mit sMTC und den Kontrollpatienten.

\# Durch Sequenzieren konnte nachgewiesen werden, dass diese zwei Sequenzvarianten stets gemeinsam auftreten.

¥ Die Häufigkeit dieser Sequenzvariante wurde nicht mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Mae*II bestimmt, aber *Mae*II könnte diesbezüglich benutzt werden.

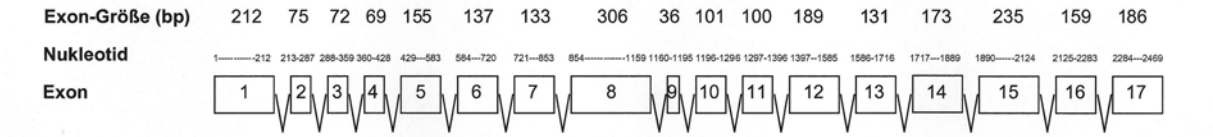
\+ Die Restriktionsendonuklease *BamH*I würde nach Amplifikation von Exon 15 schneiden insofern die Primer TRK15F-BamHI (5'-CCCAGCCTATCCCCTCTCCTTTTCTGGATC-3') und NTRK1-15R (Tab. 2) zur Amplifikation verwendet würden.

3.2 Analysen von *NTRK2* und *NTRK3*

3.2.1 Genomische Struktur von *NTRK2*

Mit Hilfe der Long-Range-PCR sowie der Vectorette-PCR konnten wir für *NTRK2* 17 Exons nachweisen, welche zwischen 36 und 306 Basenpaare (bp) groß waren (Abb. 4).

Abb. 4: Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *NTRK2* (modifiziert nach Originalarbeit 02; [28])



bp - Basenpaare

3.2.2 Mutationsanalysen von *NTRK2*

Sowohl die SSCP-Analyse als auch das direkte Sequenzieren aller 17 Exons bei insgesamt 31 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen ergaben keinen Nachweis für Sequenzvarianten in *NTRK2*.

3.2.3 Mutationsanalysen von *NTRK3*

Die SSCP-Analyse aller 18 Exons von *NTRK3* bei insgesamt 31 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen ergab differente Bandenmuster in 3 Exons (Exon 5, 6 und 12) (Abb. 5). Sequenzieren konnte in jedem dieser Exons jeweils eine Variante nachweisen (Tab. 10). Die Analyse der korresponiderenden genomischen DNA ergab, dass die Sequenzvariante in allen Fällen stets auch in der Keimbahn vorhanden war.

Abb. 5: Bandenmuster nach Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)-Mutationsanalyse von Tumor-DNA für *NTRK3*-Exons 5, 6 und 12 sowie die dazu korrespondierenden Sequenzierungsergebnisse (modifiziert nach Originalarbeit 02; [28])

SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism
DNA - Desoxyribonukleinsäure

Die Häufigkeit der Sequenzvarianten in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen unterschied sich nicht signifikant von der Häufigkeit in der Kontrollgruppe (Tab. 10).

Tab. 10: Häufigkeit von polymorphen Sequenzvarianten in *NTRK3* bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom (sMTC) und Kontrollpatienten

• Exon	• Nukleotidaustausch • Aminosäuren-austausch	• sMTC-Patienten Allel 1-Häufigkeit*	• Kontrollpatienten Allel 1-Häufigkeit*	• p-Wert§
5	c.573C>T N191N	31%	27%	n.s.
6	c.678T>C N226N	2%	0%	n.s.
12	c.1488C>G A496A	39%	29%	n.s.

n.s. – nicht signifikant
* Häufigkeit der weniger häufigen Sequenzvariante.
§ p-Wert für den Vergleich der Häufigkeiten zwischen Patienten mit sMTC und den Kontrollpatienten.

3.3 Mutationsanalyse von *RET*

Die Analyse der DNA von 50 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen auf das Vorliegen einer M918T-Mutation mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Rsa*I konnte eine solche in 25 Fällen (50%) nachweisen (Originalarbeit 03; [33]). Die anschließende Analyse der jeweils korrespondierenden Keimbahn-DNA konnte die Mutation in keinem Fall nachweisen, so dass alle M918T-Mutationen somatisch waren. Sequenzieren der Tumor-DNA in den 25 Fällen, in denen mittels Verdau keine M918T-Mutation nachgewiesen worden war, konnte die Mutation ebenfalls nicht nachweisen. Andere Sequenzvarianten wurde in Exon 16 nicht nachgewiesen. Die Analyse der Häufigkeit der 7 exonischen Polymorphismen bei 50 Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom sowie bei der Kontrollgruppe ist in Tab. 11 zu sehen.

Tab. 11: Häufigkeit von polymorphen Sequenzvarianten in *RET* bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom (sMTC) und Kontrollpatienten

• Exon	• Nukleotidaustausch • Aminosäuren-austausch	• Restriktions-endonuklease (schneidet in der Gegenwart von)	• MTC-Patienten Allel 1-Häufigkeit*	• Kontrollpatienten Allel 1-Häufigkeit*	• p-Wert§
2#	GCG->GCA A45A	*Eag*I	30%	29%	n.s.
3	GTC->GTA V125V	*Sau*3AI	3%	2%	n.s.
7	GCG->GCA A432A	*Bsm*I	75%	71%	n.s.
11	GGT->AGT G691S	*Ban*I	23%	21%	n.s.
13	CTT->CTG L769L	*Taq*I	26%	26%	n.s.
14	AGC->AGT S836S	*Alu*I	**9%**	**3.7%**	**<0,05**
15	TCC->TCG S904S	*Rsa*I	80%	79%	n.s.

n.s. – nicht signifikant

* Allel 1 wurde definiert als das Allel, welches die Restriktionsendonuklease nicht schnitt.

§ p-Wert für den Vergleich der Häufigkeiten zwischen Patienten mit sMTC und den Kontrollpatienten.

PCR-Bedingungen und Primer wurden zuvor beschrieben [76], für Exon 3 (f3-Sau3AI: 5'-CTTTCCCCTGCTCACCGTCTACCTCAAGAT-3') und Exon 7 (RET-7R: 5'-TTGTACTGGACGTTGATGCC-3') wurden zum Teil andere Primer verwendet.

Die Häufigkeit von 6 Polymorphismen unterschied sich nicht signifikant zwischen Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom und der Kontrollgruppe, bei dem Polymorphismus in Exon 14 (c.2439C>T bzw. S836S) war ein signifikanter Unterschied nachweisbar. Bei den Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom wurde die seltene Sequenzvariante T bei 9 der insgesamt 98 untersuchten Allelen nachgewiesen, dies entspricht einer Häufigkeit von 9%. Hingegen wurde die seltenere Sequenzvariante innerhalb der Kontrollgruppe nur in 5 der 140 untersuchten Allele nachgewiesen (Originalarbeit 03; [33]), dies entspricht einer Häufigkeit von 3,6%. Die Häufigkeit innerhalb der Kontrollgruppe ist vergleichbar mit der von 3,7% in einer französischen Studie [91]. Der Unterschied zwischen der Häufigkeit des selteneren T-Allels (c.2439T) innerhalb der Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom und der Kontrollgruppe war signifikant ($p<0,05$) und betrug das 2,5-fache.
Bei einer Analyse der somatischen M918T-Mutation sowie des S836S-Polymorphismus zeigte sich, dass überproportional mehr Patienten mit dem selteneren T-Allel (c.2439T) zusätzlich eine somatische M918T-Mutation aufwiesen ($p=0,01$) (Originalarbeit 03, Tab. 2; [33]). Aus diesem Grund untersuchten wir, ob in diesen Fällen beide Sequenzvarianten auf dem selben Allel (*in cis*) oder auf verschiedenen Allels (*in trans*) lagen. Dafür stand bei 7 der 9 Patienten, bei denen beide Sequenzvarianten nachgewiesen worden waren, DNA aus Stickstoff-gefrorenem Gewebe zur Verfügung. Wir führten eine Long-Range-PCR mit den Primern CRT4N [76] sowie M918T-R (5‘-AAAAGGGATTCAATTGCCG-3‘) durch. Der Primer CRT4N liegt im Intron 13 „upstream“ von Codon 836 (Abb. 6). Der Primer M918T-R wurde derart gewählt, dass er unter den angegeben Long-Range-PCR-Bedingungen (Originalarbeit 03; [33]) nur ein PCR-Produkt entstand, wenn eine somatische M918T-Mutation vorlag, d.h es wurden sogenannte M918T-spezifische Allele erzeugt (Abb. 6 und Abb. 7).

Abb. 6: **Algorithmus, um zu bestimmen, ob S836S T und M918T auf dem selben Allel liegen (modifiziert nach Originalarbeit 03; [33])**

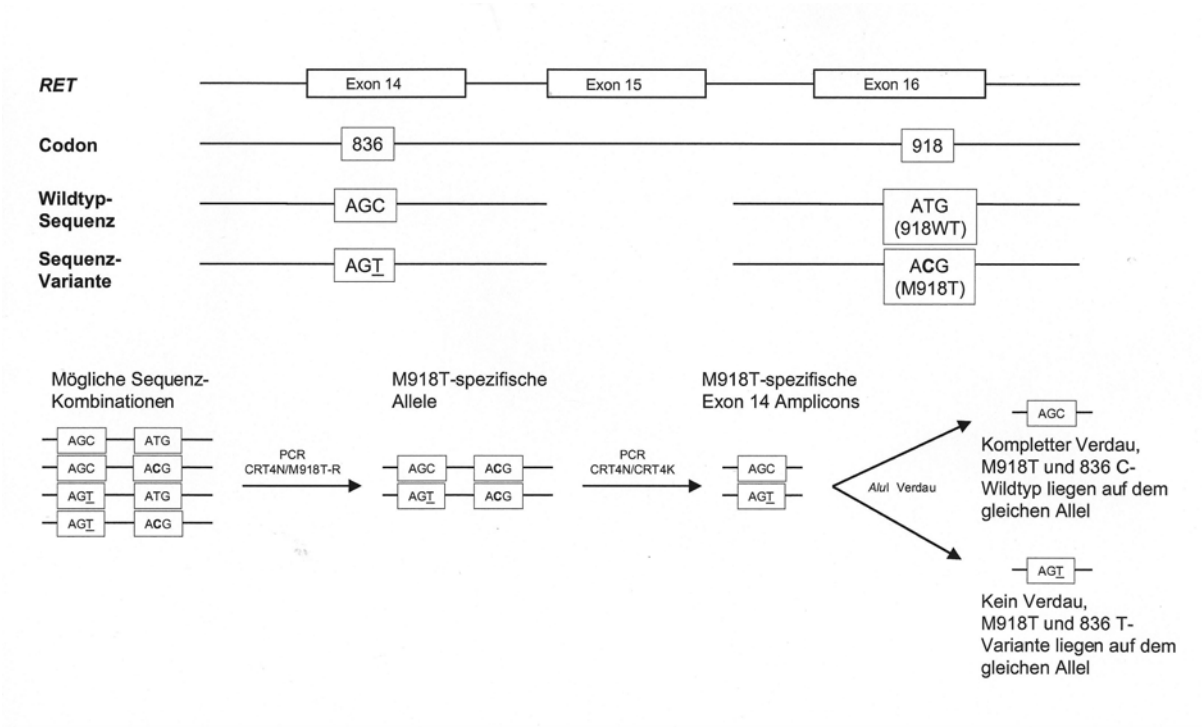
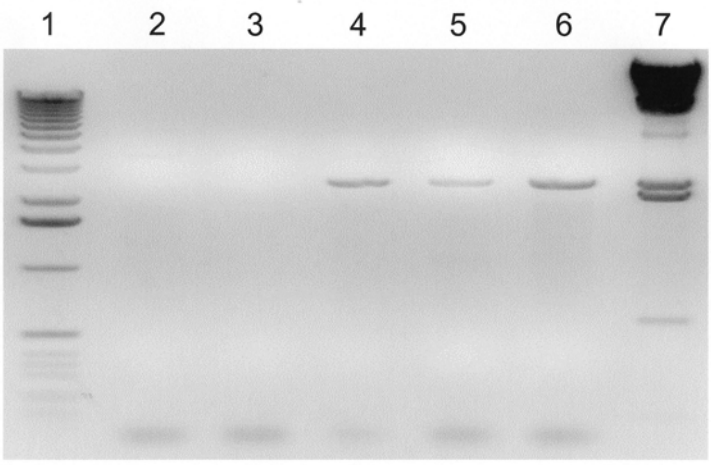
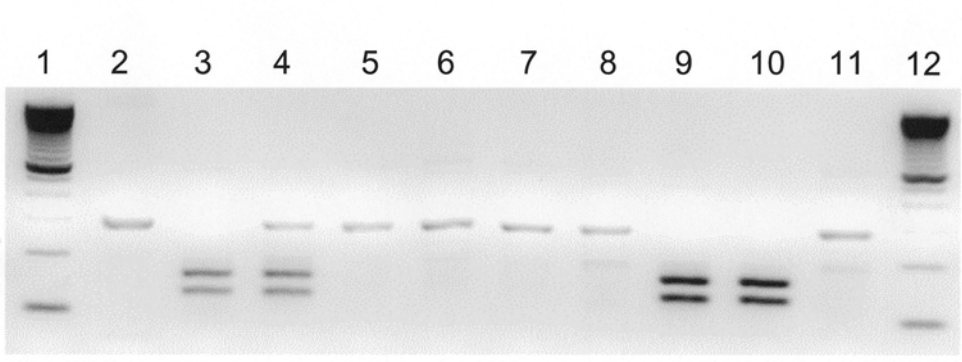


Abb. 7: **Untersuchung, ob S836S T und M918T auf dem selben Allel liegen (modifiziert nach Originalarbeit 03; [33]). Erzeugung M918T-spezifischer Allele mittels Long-Range-PCR (siehe Text und Abb. 6).**
Spalte 1, 1kb DNA-Leiter (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); Spalten 2 and 3, zwei Proben ohne M918T-Mutation (kein PCR-Produkt), Spalten 4 and 5, Tumor-DNA von MTCs mit somatischer M918T-Mutation (PCR-Produkt); Spalte 6, DNA eines Patienten mit bekannter Keimbahn M918T-Mutation (MEN 2B-Patient, PCR-Produkt), Spalte 7, λ DNA/Hind III-Leiter (Gibco).



Die Sequenzierung dieser M918T-spezifischen Allele zeigte, dass nur das Allel mit der M918T-Mutation (c.2684C bzw. A**C**G) durch die PCR amplifiziert wurde. Dieses PCR-Produkt wurde dann als Template für eine zweite PCR mit den Exon 14-spezischen Primern CRT4N und CRT4K [76] benutzt (Abb. 6). Dieses neue PCR-Produkt wurde darauf einem Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Alu*I ausgesetzt (Abb. 6 bzw. Abb. 8). Bei Vorliegen der Wildtyp-Sequenz c.2439C würde *Alu*I das PCR-Produkt verdauen können. Im Gegensatz dazu würde bei Vorliegen des Sequenzvariante c.2439T kein Verdau stattfinden. Der *Alu*I-Verdau der M918T-spezifischen Exon 14-Amplicons zeigte keinen Verdau bei 5 der 7 untersuchten PCR-Produkte (Abb. 8), d.h. in diesen Fällen lagen die Sequenzvariante c.2439T und die somatische M918T-Mutation auf dem selben Allel (*in cis*). In den anderen 2 M918T-spezifischen Exon 14-Amplicons kam es zu einem vollständigen Verdau (Abb. 8), d.h. in diesen Fällen lagen die Wildtypsequenz c.2439C und die somatische M918T-Mutation auf dem selben Allel und somit die Sequenzvariante c.2439T und die somatische M918T-Mutation auf einem anderen Allel (*in trans*).

Abb. 8: **Untersuchung, ob S836S T und M918T auf dem selben Allel liegen (modifiziert nach Originalarbeit 03; [33]). *Alu*I-Verdau von M918T-spezifischen Exon 14-Amplicons (siehe Text und Abb. 6).**
Spalte 1, 100 bp DNA-Leiter (Gibco); Spalte 2, Exon 14-Amplicon; Spalte 3, S836S-Wildtyp C Allel (kompletter Verdau); Spalte 4, Exon 14-Amplicon mit heterozygoter [c.2439C>T] Sequenz (kompletter Verdau nur des C Allels); Spalten 5-11, M918T-spezifische Exon 14-Amplicons; Spalten 5, 6, 7, 8 und 11, M918T Allel-spezifische Exon 14-Amplicons homozygot für die [c.2439T] Variante (kein Verdau); Spalten 9 and 10, 2 MTC-Proben mit M918T-spezifischem Exon 14-Amplicon homozygot für die [c.2439C] Variante (kompletter Verdau); Spalte 12, 100 bp DNA-Leiter (Gibco).



3.4 Analysen von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3*

3.4.1 Mutationsanalysen von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3*

Die Mutationsanalyse aller kodierenden Exons sowie der Intron-Exon-Grenzen von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* bei 31 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen fand 6 Sequenzvarianten für *GFRA1*, eine Variante für *GFRA2* und zwei Varianten für *GFRA3* (Tab. 12 bzw. Abb. 9). Die Analyse der korrespondierenden Keimbahn-DNA zeigte, dass alle Sequenzvarianten auch dort zu finden waren. Die Häufigkeit von zwei Sequenzvarianten in *GFRA1* unterschied sich signifikant ($p<0,05$) zwischen Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom und den Kontrollpatienten (Tab. 12).

Tab. 12: Häufigkeit von polymorphen Sequenzvarianten in *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom (sMTC) und Kontrollpatienten

• Gen • Exon	• Nukleotidaustausch • Aminosäuren-austausch	• sMTC-Patienten Allel 1-Häufigkeit*	• Kontrollpatienten Allel 1-Häufigkeit*	• p-Wert§
GFRA1				
N/A	-193C>G N/A	**15%**	**0%**	**p<0.05**
N/A	-106G>A N/A	8%	8%	n.s.
N/A	-78T>C N/A	24%	32%	n.s.
4	537T>C N179N	**35%**	**55%**	**p<0.05**
5	IVS5+21G>A N/A	8%	5%	n.s.
7	1081A>G T361A	3%	7%	n.s.
GFRA2				
2	78G>T L26L	2%	0%	n.s.
GFRA3				
7	IVS7+39G>A N/A	13%	7%	n.s.
7	IVS7+7insGG N/A	2%	2%	n.s.

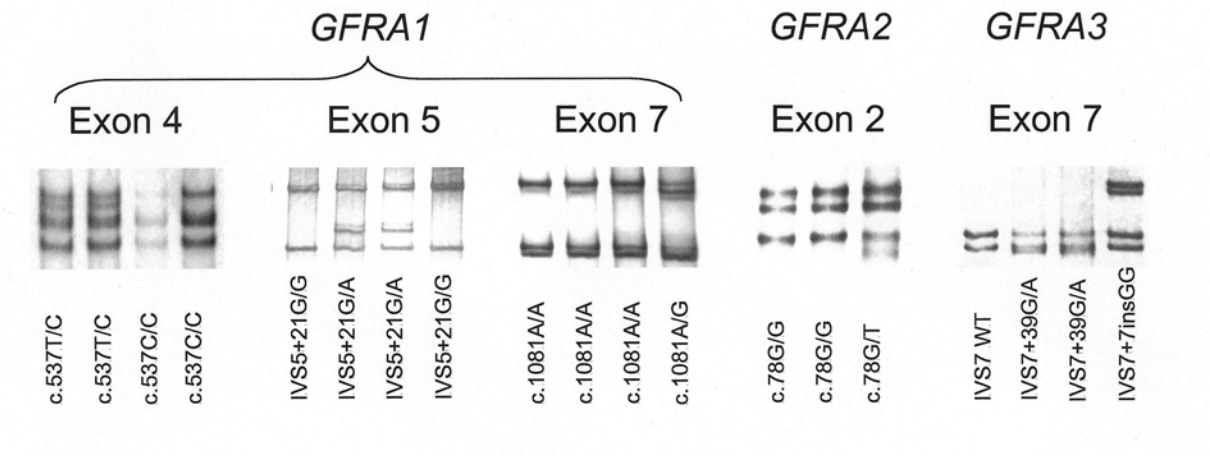
N/A – nicht anwendbar; n.s. – nicht signifikant

* Häufigkeit der weniger häufigen Sequenzvariante.

§ p-Wert für den Vergleich der Häufigkeiten zwischen Patienten mit sMTC und den Kontrollpatienten.

Die eine Variante (c.537C>T bzw. N179N in Exon 4) war bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom unterrepräsentiert. Da zwischen Exon 3 und Exon 4 alternatives Splicing beschrieben war [78], untersuchten wir, ob die Sequenzvariante mit dem Auftreten des alternativen Splicings korrelierte, konnten dies aber nicht nachweisen (Originalarbeit 04; [29]). Die andere Variante (-193C>G) lag in der 5'UTR-Region und ist nur sehr selten zu finden [78]. Wir konnten diese Sequenzvariente in keinem der 62 Kontrollallele nachweisen. Im Gegensatz dazu fand sich diese Variante in 9 von 62 untersuchten Allelen von Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom ($p<0,05$). Bei drei Patienten war die Sequenzvariante heterozygot, bei drei anderen Patienten homozygot nachzuweisen (Tab. 13).

Abb. 9: Bandenmuster nach Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)-Mutationsanalyse von Tumor-DNA für *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* sowie die dazu korrespondierenden Sequenzierungsergebnisse (modifiziert nach Originalarbeit 04; [29])



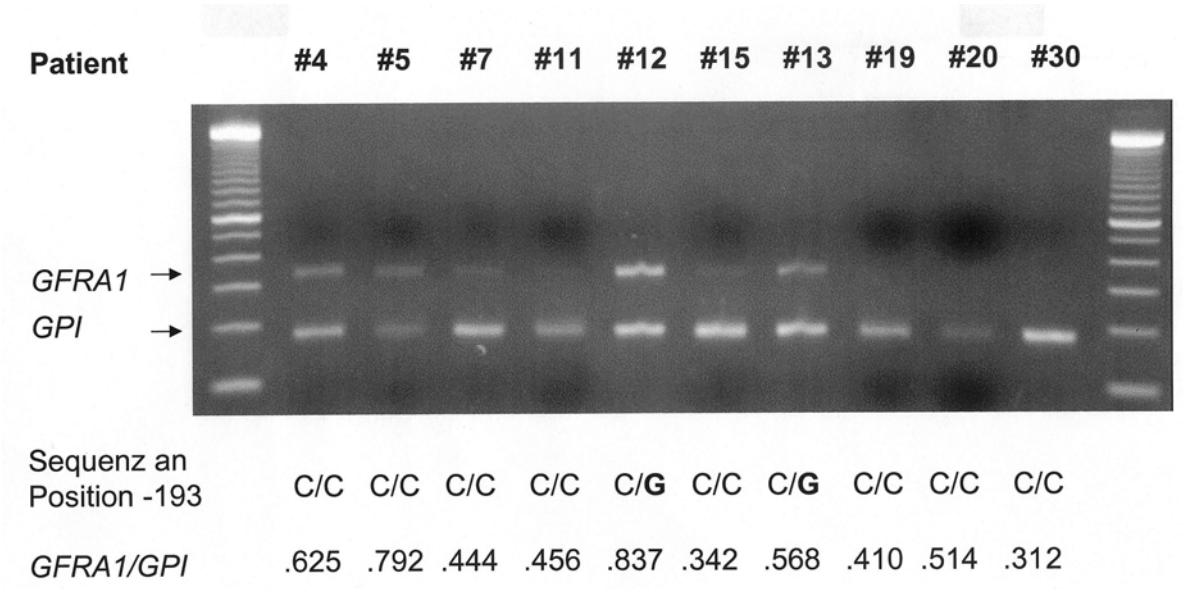
SSCP - Single-Strand Conformational Polymorphism
DNA - Desoxyribonukleinsäure

3.4.2 Analysen bezüglich der Expression von *GFRA1* bzw. GFRα-1

Da die Variante -193C>G in der 5'-UTR-Region lokalisiert ist, untersuchten wir, ob dadurch die Transkription von *GFRA1* beeinflusst wird (Originalarbeit 04; [29]). Zu diesem Zweck führten wir eine semi-quantitative Duplex-RT-PCR durch und analysierten die Expression von *GFRA1* in Abhängigkeit von der Sequenz an Position –193, als Vergleichsgen nahmen wir das Housekeeping-Gen *GPI* (Abb. 10 bzw. Tab. 13). *GFRA1*-mRNA-Levels waren höher (Durchschnitt±Standardabweichung: 0,70±0,13) in den Tumoren mit der Sequenzvariante –

193C/G im Vergleich zu Tumoren mit der Wildtypsequenz –193C/C (Durchschnitt±Standardabweichung: 0,49±0,15), der Unterschied war jedoch gerade nicht signifikant (p=0,065, t-Test).

Abb. 10: Analyse der Expression von *GFRA1* in Abhängigkeit von der Sequenz an Position –193 mittels Duplex-RT-PCR (*GFRA1* und *GPI* wurden ko-amplifiziert) in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen (n=10). *GPI* diente als Referenz (modifiziert nach Originalarbeit 04; [29])



RT-PCR – Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Darauf untersuchten wir die Expression von GFRα-1 auf der Proteinebene (Tab. 13 bzw. Originalarbeit 04, Figure 3 [29]). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *GFRA1*-mRNA-Untersuchungen fand sich in allen Tumoren zumindest eine schwache Expression von GFRα-1. Im allgemeinen war die Expression im Zytoplasma schwach bis mäßig, im Zellkern hingegen schwach bis stark (Tab. 13). Alle medullären Schilddrüsenkarzinome der drei Patienten mit homozygoter Sequenzvariante –193G/G hatten eine starke Färbung des Zellkerns, wohingegen des Zytoplasma schwach bis mäßig färbte (Originalarbeit 04, Figure 3a-c [29]). Das histologische Erscheinungsbild dieser drei Tumoren war dahingehend auffallend, dass es viele apoptotische Zellen aufwies. Die medullären Schilddrüsenkarzinome der drei Patienten mit heterozygoter Sequenzvariante –193C/G zeigten eine mäßige Färbung des Zytoplasmas (Originalarbeit 04, Figure 3d-f [29]). Apoptotische Zellen waren vereinzelt zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigten die meisten medullären Schilddrüsenkarzinome von Patienten mit homozygoter Wildtyp-Sequenz –

193C/C eine schwache Zytoplasmafärbung (Originalarbeit 04, Figure 3g-i [29]). Es gab jedoch auch medulläre Schilddrüsenkarzinome von Patienten mit homozygoter Wildtyp-Sequenz – 193C/C, die eine mäßige bis starke Zytoplasma- bzw. Zellkernfärbung zeigten (Originalarbeit 04, Figure 3k-m [29]). Apoptotische Zellen wurden bei diesen Tumoren nur selten beobachtet.

Tab. 13: **Korrelation zwischen der Keimbahn-Sequenzvariante S836S (*RET*), der somatischen Mutation M918T (*RET*), der Sequenz an Position –193 (*GFRA1*) sowie der Expression von *GFRA1* auf mRNA-Ebene sowie von GFRα-1 auf der Proteinebene bei 31 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen**

• Patient	• RET§ S836S	M918T	• *GFRA1*-Sequenz an Position -193	• *GFRA1* mRNA†	• GFRα-1-Immunhistochemie# Zytoplasma	Zellkern
1	WT	WT	WT	n.d.	+	+/++
2	WT	WT	-193C/G	n.d.	++	+/++
3	WT	M918T	WT	n.d.	++	+
4	WT	WT	WT	0.625	++	+
5	S836S	M918T	WT	0.792	++	+
6	WT	WT	WT	n.d.	++/+++	++
7	WT	M918T	WT	0.444	+/++	+/++
8	S836S	M918T	-193G/G	n.d.	+	+++
9	WT	WT	-193G/G	n.d.	++	+++
10	WT	WT	WT	n.d.	+/++	++/+++
11	WT	M918T	WT	0.456	++	+/++
12	S836S	M918T	-193C/G	0.837	++	++
13	S836S	M918T	-193C/G	0.568	++	+
14	WT	M918T	WT	n.d.	++	+
15	S836S	M918T	WT	0.342	-/+	+
16	WT	WT	WT	n.d.	++	+
17	WT	WT	WT	n.d.	++	++/+++
18	WT	WT	WT	n.d.	+++	++
19	WT	WT	WT	0.410	+	+/++
20	WT	WT	WT	0.514	+/++	++/+++
21	S836S	M918T	WT	n.d.	++	+/++
22	WT	WT	WT	n.d.	+/++	+/++
23	WT	M918T	WT	n.d.	-/+	+
24	WT	WT	WT	n.d.	n.d.	n.d.
25	WT	WT	WT	n.d.	n.d.	n.d.
26	WT	M918T	-193G/G	n.d.	++	+++
27	WT	WT	WT	n.d.	++	+
28	WT	WT	WT	n.d.	+	+
29	S836S	M918T	WT	n.d.	++	+/++
30	WT	M918T	WT	0.312	-/+	+/++
31	WT	M918T	WT	n.d.	++	+

WT – Wildtyp-Sequenz ; n.d. – nicht durchgeführt
§ Die Ergebnisse bezüglich S836S und M918T wurden bereits in Originalarbeit 03 [33] veröffentlicht.
† *GFRA1*-mRNA-Level im Vergleich zum *GPI*-mRNA-Level (siehe auch Abb. 10).
# Intensität der Immunhistochemie: stark (+++), mäßig (++), schwach (+) und nicht vorhanden (-).

Die Expression von GFRα-1 korrelierte nicht mit irgendeiner anderen polymorphen Sequenzvariante in *GFRA1*, *GFRA2* oder *GFRA3* (Tab. 13). Auch fand sich keine Korrelation zwischen der Expression von GFRα-1 und dem Vorhandensein einer somatischen M918T-Mutation bzw. dem Vorliegen der Keimbahnvariante S836S (Tab. 13). Allerdings fanden sich unter den 25 Patienten mit Wildtyp-Sequenz –193C/C zwei Patienten (#6 und #18, Tab. 13 bzw. Originalarbeit 04, Figure 3l [29]) mit starker Zytoplasmafärbung sowie drei Patienten (#10, #17 und #20, Tab. 13) mit starker Zellkernfärbung wie sie in der Regel nur in medullären Schilddrüsenkarzinomen von Patienten mit homozygoter Sequenzvariante –193G/G beobachtet wurde. Alle diese fünf medullären Schilddrüsenkarzinome wiesen den Wildtyp an Codon 836 auf und hatten keine somatische M918T-Mutation. Bei den sechs Patienten mit hetero- bzw. homozygoter Sequenzvariante an Position –193 waren sowohl die Sequenzvariante S836S als auch die somatische M918T-Mutation anscheinend willkürlich verteilt (Tab. 13).

4. Diskussion

4.1 Analysen von *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK 3*

Mit Hilfe der Mutationsanalysen von *NTRK1* bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom konnten wir 3 bereits vorher beschriebene [26] und 5 neue polymorphe Sequenzvarianten identifizieren (Originalarbeit 01; [32]). Wir bestimmten zudem die Häufigkeit der einzelnen Sequenzvarianten. Eine bereits zuvor beschriebene Sequenzvariante in Exon 14 (c.1767T>C; [26]) konnten wir bei insgesamt 126 untersuchten Allelen (60 Allele bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom und 66 Allele bei Patienten der Kontrollgruppe) nicht nachweisen. In keinem der 31 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome konnten wir somatische Mutationen in *NTRK1* nachweisen. Das Nicht-Vorhandensein von somatischen *NTRK1*-Mutationen in sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen ist aufgrund der Bedeutung von *RET* sowohl hinsichtlich der Pathogenese papillärer als auch medullärer Schilddrüsenkarzinome auf der einen Seite und aufgrund der Ähnlichkeiten der Gene *RET* und *NTRK1* bezüglich der Pathogenese papillärer Schilddrüsenkarzinome überraschend. Dennoch ermöglichen die beschriebenen SSCP-Bedingungen und das Wissen um Art und Häufigkeit der verschiedenen polymorphen Sequenzvarianten gleichartige Untersuchungen bei anderen neuralen und nicht-neuralen Geweben, in denen eine Expression von NTRK1 nachgewiesen worden ist, z.B. Plattenepithelkarzinomen des Ösphagus, des Uterus bzw. duktalen Mammakarzinomen [58].
McGregor et al. untersuchten die Expression der Tyrosinkinaserezeptoren NTRK1, NTRK2 und NTRK3 bei medullären Schilddrüsenkarzinomen, bei deren Vorstufe, der C-Zell-Hyperplasie sowie bei normalen C-Zellen [70]. Sie fanden, dass in normalen C-Zellen die verschiedenen Tyrosinkinasen sehr unterschiedlich exprimiert sind sowie dass bei der C-Zell-Hyperplasie NTRK2 stets exprimiert wird und die Expression von NTRK1 und NTRK3 hingegen sehr variabel ist. In fortgeschrittenen medullären Schilddrüsenkarzinomen war NTRK2 deutlich schwächer exprimiert, NTRK3 hingegen sehr viel stärker. Aus diesem Grund untersuchten wir, ob Mutationen innerhalb der Gene *NTRK2* und *NTRK3* eine Rolle bezüglich der unterschiedlichen Expression spielen (Originalarbeit 02; [28]). Zunächst mussten wir dafür die genomische Struktur von *NTRK2* bestimmen und fanden, dass *NTRK2* aus mindestens 17 Exons besteht, welche in ihrer Größe zwischen 36 bp und 306 bp variieren. Wir konnten zudem 3 vorher nicht beschrieben polymorphe Sequenzvarianten in *NTRK3* nachweisen. In keinem der insegsamt 31 untersuchten sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome konnten wir jedoch eine somatische Mutation nachweisen, so dass wir davon ausgehen, dass Mutationen innerhalb von *NTRK2* und *NTRK3* keine Rolle bezüglich der unterschiedlichen Expression auf Proteinebene in medullären Schilddrüsenkarzinomen spielen [70]. Daher müssen andere Mechanismen für die reduzierte

Expression von NTRK2 und die gesteigerte Expression von NTRK3 in fortgeschrittenen medullären Schilddrüsenkarzinomen erwogen werden. Zum Beispiel konnte nachgewiesen werden, dass BDNF, ein Ligand von NTRK2, bei Ratten zur Reduzierung der Expression von NTRK2 in kultivierten neuronalen Zellen führt [25, 102]. Ob der gleiche Mechanismus auch bei medullären Schilddrüsenkarzinomen eine Rolle spielt, muss allerdings erst noch gezeigt werden. Zudem wurde gezeigt, dass NTRK3 in Lymphozyten zu einer Beschleunigung des Zellzyklus führen kann, ohne einen Einfluss auf das Überleben der Zellen zu haben [16]. Diesbezüglich müssen Untersuchungen zeigen, ob ein ähnlicher Mechanismus bei fortgeschrittenen medullären Schilddrüsenkarzinomen zu beobachten ist. Andere Ursachen für die reduzierte Expression von NTRK2 und die gesteigerte Expression von NTRK3 in fortgeschrittenen medullären Schilddrüsenkarzinomen, wie z.B. größere Deletionen (*NTRK2*) oder Genamplifkationen (*NTRK3*) können durch unsere Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Obwohl wir keine somatischen Mutationen innerhalb von *NTRK2* und *NTRK3* bei sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen nachweisen konnten, so kann das Wissen um die genomische Struktur von NTRK2, die SSCP-Bedingungen zur Mutationsanalyse von *NTRK2* und *NTRK3* sowie die Häufigkeit der verschiedenen polymorphen Sequenzvarianten hilfreich bei der Mutationsanalyse anderer nervaler und nicht-nervaler Gewebe sein, in denen *NTRK2* und *NTRK3* exprimiert werden [16, 82].

4.2 Analysen von *RET*

Bei der Untersuchung von 50 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen konnten wir in 25 Tumoren eine somatische M918T-Mutation nachweisen (Originalarbeit 03; [33]). Desweiteren zeigten wir, dass einer von 7 exonischen polymorphen Sequenzvarianten, S836S bzw. c.2439C>T, bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom überproportional gegenüber Patienten der Kontrollgruppe (9% versus 3,6%) zu finden ist ($p<0,05$). Die Häufigkeit der sehr seltenen Sequenzvariante S836S wird in der Literatur mit 3,7% angegeben [91] und ist sehr ähnlich der von uns ermittelten Häufigkeit von 3,6% in 140 Kontrollallelen. Gegen das Argument, dass die unterschiedliche Häufigkeit dieser seltenen polymorphen Sequenzvariante bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom ein Artefakt der relativ kleinen Zahl an untersuchten Tumoren ist, spricht, dass die Häufigkeit aller anderen polymorphen Sequenvarianten sehr der in der Literatur angegebenen entsprach [13]. Wenn die Keimbahnsequenvariante S836S bzw. c.2439C>T eine Rolle bezüglich der Pathogenese medullärer Schilddrüsenkarzinome spielt, z.B. im Sinne eines Low-Penetrance-Allels, so ist anzunehmen, dass in einigen Familien mit medullären Schilddrüsenkarzinomen, in denen keine typische MEN 2-assoziierte *RET*-Mutation gefunden wurde, eben diese Keimbahnsequenvariante S836S nachzuweisen ist. Tatsächlich konnten wir für eine Familie, bei

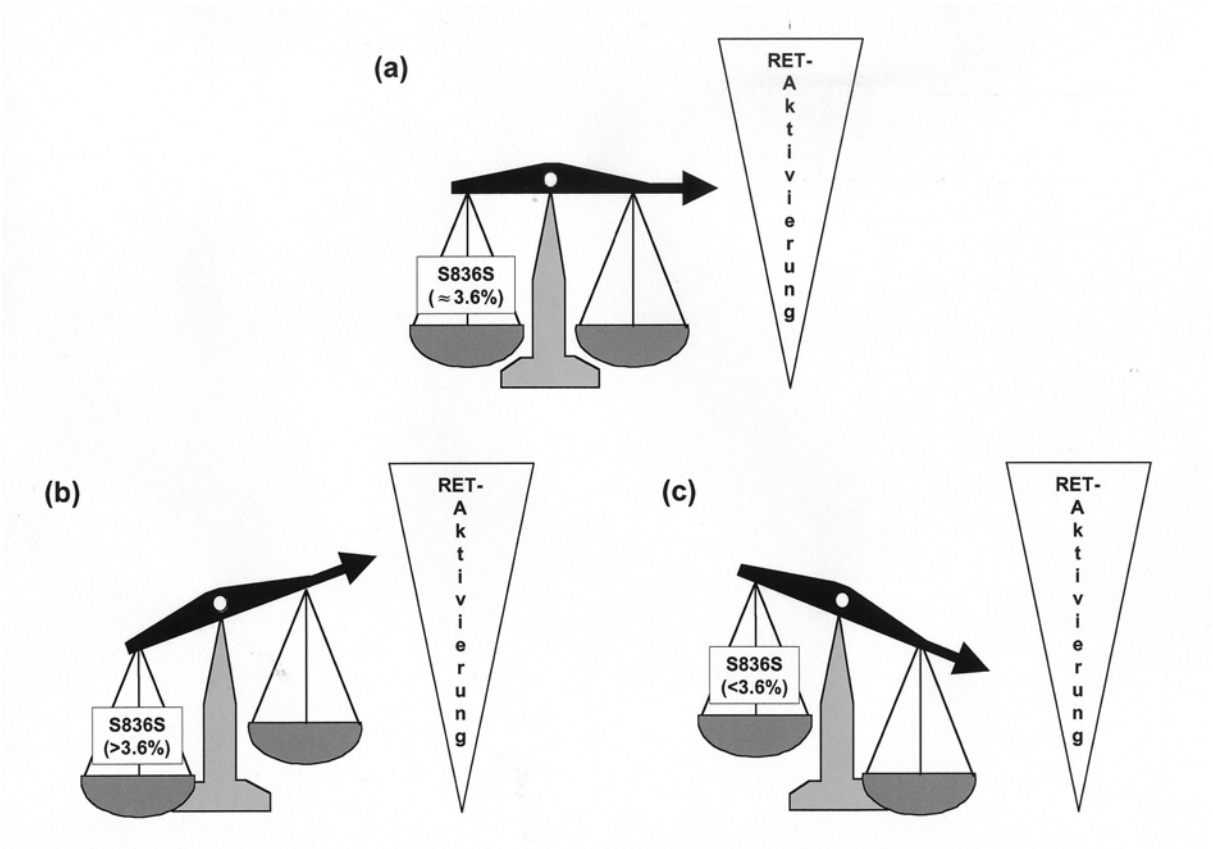
der mehrere Mitglieder ein medulläres Schilddrüsenkarzinom hatten, eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein der Sequenzvariante S836S und dem Vorhandensein eines medullären Schilddrüsenkarzinoms zeigen (Gimm und Eng, unveröffentlichte Ergebnisse).

Interessanterweise wurde in den sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinom bei Patienten mit dieser polymorphen Sequenzvariante überproportional häufig auch eine somatische M918T-Mutation nachgewiesen (p=0,01). Der Mechanismus, inwiefern die Sequenzvariante c.2439C>T zur Entstehung medullärer Schilddrüsenkarzinome bzw. dem Auftreten einer somatischen M918T-Mutation führen kann, ist nicht bekannt und lässt zahlreiche Spekulationen zu. Da die Sequenzvariante c.2439C>T nicht zur Änderung einer Aminosäure führt (S836S), ist ein Mechanismus, der die Aktivität von RET beeinflusst, nicht unmittelbar evident. Möglich wäre, dass die Sequenzvariante c.2439C>T die Expression von *RET* auf der mRNA-Ebene erhöht. Ein solcher Mechanismus ist für andere Gene beschrieben worden [61]. Auf der Nukleotidebene sind weitere Mechanismen denkbar. So kann spekuliert werden, dass durch die Sequenzvariante c.2439C>T bzw. AGC>A**GT** ein neuer Splice-Donor, **Splice-Acceptor** bzw. Splice-Enhancer erzeugt wird. Diesbezüglich gibt es Beispiele für andere Gene. So wurde z.B. gezeigt, das alternatives Splicing des „Human Growth Hormone“ aufgrund eines seltenen Polymorphismus auftritt [104]. Für Episialin wurde nachgewiesen, dass alternatives Splicing durch einen, ein einzelnes Nukleotid betreffendenden, exonischen Polymorphismus bestimmt wird [62]. Für die Tuberöse Sklerose Typ 2 wurde zudem gezeigt, dass ein Splice-Site-assoziierter Polymorphimus zu der Entstehung sporadischer Gangliogliome prädisponiert [86]. Möglich wäre auch, dass Allele mit der Sequenz c.2439T bevorzugt gegenüber Allelen mit der Sequenz c.2439C translatiert werden. Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine mRNA der entsprechenden medullären Schilddrüsenkarzinome zur Verfügung stand, konnte dieser Aspekt leider nicht untersucht werden.

Die Tatsache, dass die Sequenzvariante c.2439C>T sowohl mit somatischen M918T-Mutationen auf dem gleichen Allel (*in cis*) als auch auf dem anderen Allel (*in trans*) nachgewiesen wurde, bedarf einer Erklärung. Bei 5 sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen lagen die Keimbahnsequenzvariante c.2439C>T und die somatische M918T-Mutation auf dem gleichen Allel (*in cis*). Für diese Fälle kann spekuliert werden, dass die Sequenzvariante c.2439C>T eine DNA-Region mit verminderter Stabilität „downstream“ von c.2439 erzeugt. Ein solcher Mechanismus ist für das *APC*-Gen angenommen worden. So wurde bei 28% von Ashkenazim-Juden, welche eine scheinbar unbedeutende Keimbahnsequenzvariante hatten, die lediglich zu einem konservativen Aminosäreaustausch (I1307K) führt, zusätzliche somatische Mutationen des *APC*-Gens „downstream“ der Keimbahnsequenzvariante nachgewiesen [60]. Letztendlich vermag dieser Mechanismus zwar das Vorhandensein beider Sequenzvarianten *in cis* erklären, eine Erklärung für das Auftreten *in trans* kann er jedoch nicht geben. Kritisch betrachtet kann die Koexistenz der Keimbahnsequenzvariante c.2439C>T und der somatischen M918T-Mutation jedoch auch lediglich Ausdruck der kleinen Probengröße sein.

Die überproportionale Häufigkeit der polymorphen Sequenzvariante S836S bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom konnte inzwischen jedoch in weiteren Studien bestätigt werden [41, 93]. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter anderem der Polymorphismus S836S ein prädisponierender Faktor für die Entstehung eines medullären Schilddrüsenkarzinoms im jungen Alter ist [117]. Auch bei anderen *RET*-Polymorphismen wurden inzwischen eine genetisch-modifizierende Wirkung vermutet [27, 90]. Dass der hypothetisch-aktivierende Effekt der Sequenzvariante S836S auf RET insgesamt geringer ist als die Aktivierung von RET durch bekannte MEN 2A/FMTC-assoziierte *RET*-Mutationen, legen die Daten einer kürzlich veröffentlichten Studie nahe [85].

Abb. 11: **Hypothetische Beeinflussung der Aktivierung von RET durch die polymorphe Sequenzvariante S836S: (a) indifferenter („normaler“) Zustand, (b) gesteigerte RET-Aktivierung bei überproportionalem Vorliegen von S836S, (c) verminderte RET-Aktivierung bei unterproportionalem Vorliegen von S836S**



Auch folgender Aspekt erscheint bezüglich des Polymorphismus S836S interessant. Bei Patienten mit Morbus Hirschsprung liegen oft inaktivierende Mutationen im Protoonkogen *RET* vor [21]. Interessanterweise konnte bei Patienten mit Morbus Hirschsprung eine signifikant verminderte Häufigkeit des Polymorphismus S836S nachgewiesen werden [41], was die pathogenetische Bedeutung dieses Polymorphismus weiter unterstreicht. So wird ein überproportionales Vorliegen von S836S bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom (Abb. 11b), welches durch aktivierende *RET*-Mutationen ausgelöst werden kann, gefunden. Hingegen wird ein unterproportionales Vorliegen von S836S bei Patienten mit Morbus Hirschsprung, bei denen ansonsten häufig inaktivierende *RET*-Mutationen identifiziert werden, nachgewiesen (Abb. 11c).

4.3 Analysen von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* bzw. GFRα-1

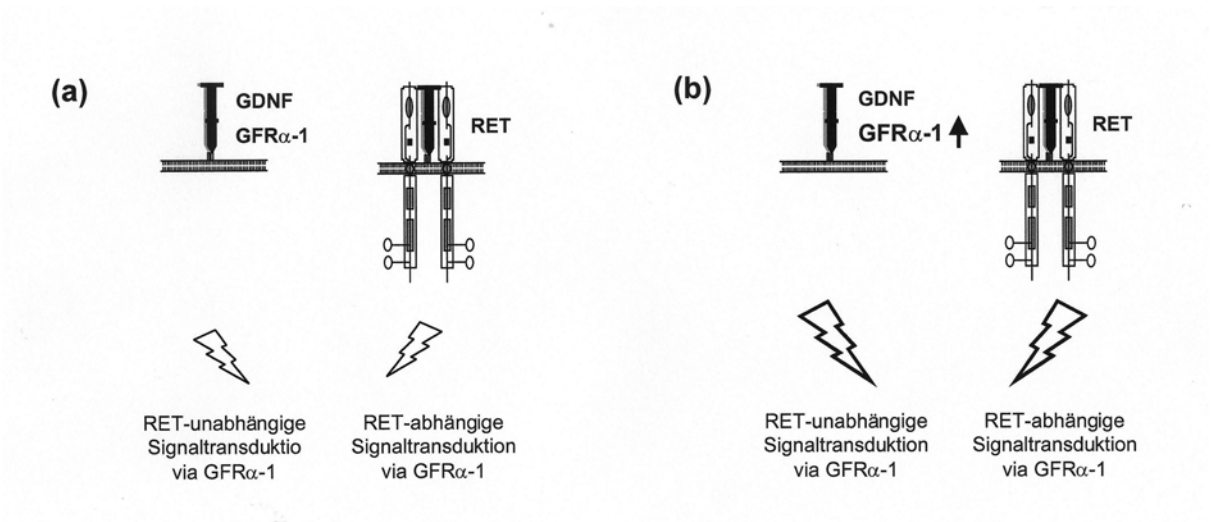
Die Mutationsanalyse von *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* bei 31 Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom wies 6 Sequenzvarianten in *GFRA1*, 1 Sequenzvariante in *GFRA2* und 2 Sequenzvarianten in *GFRA3* nach (Originalarbeit 04; [29]). Alle Sequenzvarianten wurden auch in der Keimbahn nachgewiesen, es wurden keine somatischen Mutationen gefunden. Zwei der Sequenzvarianten in *GFRA1* unterschieden sich in ihrer Häufigkeit signifikant von der in der Kontrollgruppe. Die eine Sequenzvariante, c.537T>C (Exon 4), war bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom gegenüber der Kontrollgruppe unterrepräsentiert (35% versus 55%, $p<0,05$). Da zwischen Exon 3 und Exon 4 von *GFRA1* alternatives Splicing beobachtet worden war [78], untersuchten wir, ob das Vorhandensein der Sequenzvariante c.537T>C mit dem Auftreten des alternativen Splicings korreliert, konnten dies aber nicht nachweisen. Da die Sequenzvariante c.537T>C zudem zu keinem Aminosäurenaustausch führt (N179N), bleibt ein Mechanismus, der zur Entstehung eines medullären Schilddrüsenkarzinoms führen könnte, spekulativ.

Das überproportional häufige Auftreten der Sequenzvariante an Position –193 von *GFRA1* bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom gegenüber den Patienten der Kontrollgruppe (15% versus 0%, $p<0,05$) war bemerkenswert, insbesonders da die seltene Sequenzvariante –193C>G bei drei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom homozygot auftrat und wir bei keinem von 62 Kontrollallelen diese Sequenzvariante nachweisen konnten. Kürzlich konnte eine überproportionale Häufigkeit dieser polymorphen Sequenzvariante bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom in einer Studie aus Spanien bestätigt werden, jedoch erreichte der Unterschied in jener Studie keine Signifikanz [9]. Da die Position –193 in der nicht-translatierten Region von *GFRA1* liegt, eventuell in unmittelbarer Nähe zu der Promoterregion von *GFRA1*, untersuchten wir, ob das Vorhandensein der Sequenzvariante –193C>G mit der Expression von

GFRA1 korrelierte. Tatsächlich konnten wir eine erhöhte Expression von *GFRA1* auf der mRNA-Ebene in den Tumoren nachweisen, welche die Sequenzvariante –193C>G aufwiesen, der Unterrschied war aber statistisch nicht signifikant (p=0,065). Die Ergebnisse der Immunhistochemie unterstützen die Hypothese einer gesteigerten Expression zusätzlich. So wiesen medulläre Schilddrüsenkarzinome mit heterozygoter (-193C/G) oder homozygoter (–193G/G) Sequenzvariante eine erhöhte Expression von GFRα-1 auf der Proteinebene auf. Besonders bei den Tumoren mit homozygoter Sequenzvariante –193G/G waren eine starke Zellkernexpression und zahlreiche apoptotische Zellen nachgewiesen worden, was für gewöhnlich ein Zeichen für gesteigertes Tumorwachstum ist. Dass die Expression von *GFRA1* bzw. GFRα-1 nicht allein von der Sequenzvariante an Position –193 abhängt, wird dadurch deutlich, dass zum Teil auch sporadische medulläre Schilddrüsenkarzinome mit der Wildtypsequenz –193C/C eine starke Expression aufwiesen.

Die funktionelle Bedeutung der Überexpression von GFRα-1 ist nicht offensichtlich. Denkbar ist, dass eine erhöhte Expression in Gegenwart eines geeigneten Liganden (z.B. GDNF bzw. Neurturin) zur erhöhten Interaktion und Aktivierung von RET führt (Abb. 12). Für GFRα-1 wurde gezeigt, dass es auch unabhängig von RET zur intrazellulären Signaltransduktion kommen kann [113]. Eine erhöhte Expression von GFRα-1 könnte in diesen Fällen zu einer erhöhten Steigerung dieser RET-unabhängigen Signaltransduktion führen (Abb. 12).

Abb. 12: RET-unabhängige und RET-abhängige Signaltransduktion via GFRα-1: (a) indifferenter („normaler“) Zustand, (b) hypothetische Steigerung der Signaltransduktion durch eine erhöhte Expression von GFRα-1



Ein solcher Mechanismus wäre auch für sporadische medulläre Schilddrüsenkarzinome denkbar, ist bisher aber nicht gezeigt worden. Diese spekulativen Mechansimen stehen nicht in Widerspruch zu unser Beobachtung, dass die sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome mit homozygoter Sequenzvariante –193G/G vermehrt apoptotische Zellen aufweisen. Möglich ist auch, dass die Sequenzvariante –193C>G im Linkage-Disequilibrium mit einem anderen Lokus steht, der letztendlich eine Rolle bezüglich der Pathogenese dieser Tumoren spielt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Habilitationsschrift wurden bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom die für Tyrosinkinasen kodierenden Gene *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3* auf Mutationen untersucht. Für *NTRK2* musste zunächst die genomische Struktur bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass *NTRK2* aus mindestens 17 Exons besteht, welche zwischen 36 und 306 Basenpaare groß sind. In allen 3 Genen konnten keine somatischen Mutationen nachgewiesen werden. Es wurden jedoch eine Reihe polymorpher Sequenzvarianten gefunden. *NTRK1* hat mindestens 6, *NTRK3* mindestens 3 exonische Polymorphismen. Die Häufigkeit dieser Polymorphismen unterscheidet sich nicht signifkant zwischen Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom im Vergleich mit einer Kontrollgruppe. Somatische Mutationen in *NTRK1, NTRK2 und NTRK3* scheinen somit keine große Rolle bezüglich der Pathogenese sporadischer medullärer Schilddrüsenkarzinome zu spielen. Insbesondere scheinen exonische Mutationen in *NTRK2* und *NTRK3* nicht für die reduzierte Expression von NTRK2 und die gesteigerte Expression von NTRK3 in fortgeschrittenen medullären Schilddrüsenkarzinomen ursächlich zu sein.

Mutationsanalysen des ebenfalls für eine Tyrosinkinase kodierenden Gens *RET* wiesen bei 50% der sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome die somatische Mutation M918T nach, welche eine prognostische Bedeutung haben soll. Zudem wurde nachgewiesen, dass die polymorphe Sequenzvariante in Exon 14, S836S, bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom ca. 2,5-mal so häufig vorliegt wie bei Patienten der Kontrollgruppe ($p<0,05$), S836S könnte eine „Low-Penetrance“-Mutation darstellen. Es konnte zudem eine Korrelation zwischen der polymorphen Sequenzvariante S836S und der somatischen Mutation M918T nachgewiesen werden ($p=0,01$).

Wir untersuchten ferner die für Co-Faktoren von RET kodierenden Gene *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* auf das Vorliegen von Mutationen. Somatische Mutationen in diesen 3 Genen konnten nicht nachgewiesen werden, es wurden jedoch polymorphe Sequenzvarianten gefunden. *GFRA1* hat mindestens 2 und *GFRA2* mindestens 1 exonischen Polymorphismus. Ein seltener Polymorphismus an Position –193 von *GFRA1* liegt überproportional häufig bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom im Vergleich zu der Kontrollgruppe vor ($p<0,05$). Bei Vorliegen dieses Polymorphismus war die Expression sowohl von *GFRA1* (mRNA-Ebene) als auch GFRα-1 (Proteinebene) erhöht.

6. Literaturverzeichnis

1. Acton DS, Velthuyzen D, Lips CJ, Hoppener JW. Multiple endocrine neoplasia type 2B mutation in human RET oncogene induces medullary thyroid carcinoma in transgenic mice. Oncogene 2000;19(27):3121-5.
2. Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? Mol Cell Neurosci 1999;13(5):313-25.
3. Angrist M, Jing S, Bolk S, Bentley K, Nallasamy S, Halushka M, Fox GM, Chakravarti A. Human GFRA1: cloning, mapping, genomic structure, and evaluation as a candidate gene for Hirschsprung disease susceptibility. Genomics 1998;48(3):354-62.
4. Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Takahashi M. Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. Mol Cell Biol 1995;15(3):1613-9.
5. Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Jr., Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. Curr Opin Neurobiol 2000;10(1):103-10.
6. Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM, Jr., Milbrandt J. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. Neuron 1998;21(6):1291-302.
7. Bergholm U, Bergstrom R, Ekbom A. Long-term follow-up of patients with medullary carcinoma of the thyroid. Cancer 1997;79(1):132-8.
8. Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, Mondellini P, Manenti G, Donghi R, Pilotti S, Grieco M, Santoro M, Fusco A, et al. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. Oncogene 1989;4(12):1457-62.
9. Borrego S, Fernandez RM, Dziema H, Japon MA, Marcos I, Eng C, Antinolo G. Evaluation of germline sequence variants of GFRA1, GFRA2, and GFRA3 genes in a cohort of Spanish patients with sporadic medullary thyroid cancer. Thyroid 2002;12(11):1017-22.
10. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA, Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. Nat Genet 2003;33(4):518-21.
11. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, Wells SA, Jr., Goodfellow PJ, Donis-Keller H. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91(4):1579-83.
12. Casanova S, Rosenberg-Bourgin M, Farkas D, Calmettes C, Feingold N, Heshmati HM, Cohen R, Conte-Devolx B, Guillausseau PJ, Houdent C, et al. Phaeochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2 A: survey of 100 cases. Clin Endocrinol (Oxf) 1993;38(5):531-7.
13. Ceccherini I, Hofstra RM, Luo Y, Stulp RP, Barone V, Stelwagen T, Bocciardi R, Nijveen H, Bolino A, Seri M, et al. DNA polymorphisms and conditions for SSCP analysis of the 20 exons of the ret proto-oncogene [published erratum appears in Oncogene 1995 Mar 16;10(6):1257]. Oncogene 1994;9(10):3025-9.
14. Christensen SB, Ljungberg O, Tibblin S. A clinical epidemiologic study of thyroid carcinoma in Malmo, Sweden. Curr Probl Cancer 1984;8(14):1-49.
15. Collins A, Lonjou C, Morton NE. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(26):15173-7.
16. D'Onofrio M, de Grazia U, Morrone S, Cuomo L, Spinsanti P, Frati L, Gulino A, Ragona G. Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. Eur Cytokine Netw 2000;11(2):283-91.
17. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum Mol Genet 1993;2(7):851-6.
18. Dralle H, Damm I, Scheumann GF, Kotzerke J, Kupsch E, Geerlings H, Pichlmayr R. Compartment-oriented microdissection of regional lymph nodes in medullary thyroid carcinoma. Surg Today 1994;24(2):112-21.
19. Dralle H, Gimm O, Simon D, Frank-Raue K, Gortz G, Niederle B, Wahl RA, Koch B, Walgenbach S, Hampel R, Ritter MM, Spelsberg F, Heiss A, Hinze R, Hoppner W. Prophylactic thyroidectomy in 75 children and adolescents with hereditary medullary thyroid carcinoma: German and Austrian experience. World J Surg 1998;22(7):744-50; discussion 50-1.
20. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiowaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, et al. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase . Nature 1996;381(6585):789-93.
21. Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, Holder S, Nihoul-Fékété C, Ponder BAJ, Munnich A. Mutations of the *RET* proto-oncogene in Hirschsprung's disease. Nature 1994;367:378-80.

22. Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, Thomas GA, Ponder BA. Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. Cancer Res 1996;56(9):2167-70.
23. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, Gardner E, Scheumann GF, Jackson CE, Tunnacliffe A, et al. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours [published erratum appears in Hum Mol Genet 1994 Apr;3(4):686]. Hum Mol Genet 1994;3(2):237-41.
24. Enokido Y, de Sauvage F, Hongo JA, Ninkina N, Rosenthal A, Buchman VL, Davies AM. GFR alpha-4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin . Curr Biol 1998;8(18):1019-22.
25. Frank L, Ventimiglia R, Anderson K, Lindsay RM, Rudge JS. BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. Eur J Neurosci 1996;8(6):1220-30.
26. George DJ, Suzuki H, Bova GS, Isaacs JT. Mutational analysis of the TrkA gene in prostate cancer. Prostate 1998;36(3):172-80.
27. Gil L, Azanedo M, Pollan M, Cristobal E, Arribas B, Garcia-Albert L, Garcia-Saiz A, Maestro ML, Torres A, Menarguez J, Rojas JM. Genetic analysis of RET, GFR alpha 1 and GDNF genes in Spanish families with multiple endocrine neoplasia type 2A. Int J Cancer 2002;99(2):299-304.
28. Gimm O, Dziema H, Brown J, de la Puente A, Hoang-Vu C, Dralle H, Plass C, Eng C. Mutation analysis of NTRK2 and NTRK3, encoding 2 tyrosine kinase receptors, in sporadic human medullary thyroid carcinoma reveals novel sequence variants. Int J Cancer 2001;92(1):70-4.
29. Gimm O, Dziema H, Brown J, Hoang-Vu C, Hinze R, Dralle H, Mulligan LM, Eng C. Over-representation of a germline variant in the gene encoding RET co-receptor GFRalpha-1 but not GFRalpha-2 or GFRalpha-3 in cases with sporadic medullary thyroid carcinoma. Oncogene 2001;20(17):2161-70.
30. Gimm O, Eng C. Medullary carcinoma of the thyroid. In: Souhami R, Tannock I, Hohenberger P, editors. Oxford Textbook of Oncology. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2001. p. 2771-85.
31. Gimm O, Gossling A, Marsh DJ, Dahia PL, Mulligan LM, von Deimling A, Eng C. Mutation and deletion analysis of GFR alpha-1, encoding the co-receptor for the GDNF/RET complex, in human brain tumours. Br J Cancer 1999;80(3-4):383-6.
32. Gimm O, Greco A, Hoang-Vu C, Dralle H, Pierotti MA, Eng C. Mutation analysis reveals novel sequence variants in NTRK1 in sporadic human medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1999;84(8):2784-7.
33. Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H, Eng C. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. Oncogene 1999;18(6):1369-73.
34. Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees JA, Mutter GL, Robinson BG, Komminoth P, Dralle H, Eng C. Differential Nuclear and Cytoplasmic Expression of PTEN in Normal Thyroid Tissue, and Benign and Malignant Epithelial Thyroid Tumors. Am J Pathol 2000;156(5):1693-700.
35. Gomez JM, Biarnes J, Volpini V, Marti T. Neuromas and prominent corneal nerves without MEN 2B. Ann Endocrinol (Paris) 1998;59(6):492-4.
36. Gordon CM, Majzoub JA, Marsh DJ, Mulliken JB, Ponder BA, Robinson BG, Eng C. Four cases of mucosal neuroma syndrome: multiple endocrine neoplasm 2B or not 2B? J Clin Endocrinol Metab 1998;83(1):17-20.
37. Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M, Pierotti MA. The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. Mol Cell Biol 1995;15(11):6118-27.
38. Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G. TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. Oncogene 1992;7(2):237-42.
39. Greco A, Villa R, Pierotti MA. Genomic organization of the human NTRK1 gene. Oncogene 1996;13(11):2463-6.
40. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Vecchio G. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. Cell 1990;60(4):557-63.
41. Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Bocciardi R, Hofstra R, Ravazzolo R, Devoto M, Romeo G, Ceccherini I. A single-nucleotide polymorphic variant of the RET proto-oncogene is underrepresented in sporadic Hirschsprung disease. Eur J Hum Genet 2000;8(9):721-4.
42. Hazard JB, Hawk WA, Crile G. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid - a clinicopathologic entity. J Clin Endocrinol Metab 1959;19:152-61.
43. Henry JF, Denizot A, Puccini M, Gramatica L, Kvachenyuk A, Conte Devolx B, De Micco C. Latent subclinical medullary thyroid carcinoma: diagnosis and treatment. World J Surg 1998;22(7):752-6; discussion 6-7.

44. Heshmati HM, Gharib H, van Heerden JA, Sizemore GW. Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. Am J Med 1997;103(1):60-9.
45. Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Höppener JWM, Ploos van Amstel HK, Romeo G, Lips CJM, Buys CHCM. A mutation in the *RET* proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. Nature 1994;367:375- 6.
46. Hoie J, Jorgensen OG, Stenwig AE, Langmark F. Medullary thyroid cancer in Norway. A 30-year experience. Acta Chir Scand 1988;154(5-6):339-43.
47. Hoppner W, Dralle H, Brabant G. Duplication of 9 base pairs in the critical cysteine-rich domain of the RET proto-oncogene causes multiple endocrine neoplasia type 2A . Hum Mutat 1998;Suppl 1(6):S128-30.
48. Hoppner W, Ritter MM. A duplication of 12 bp in the critical cysteine rich domain of the RET proto-oncogene results in a distinct phenotype of multiple endocrine neoplasia type 2A. Hum Mol Genet 1997;6(4):587-90.
49. Horn RC. Carcinoma of the thyroid: description of a distinctive morphological variant and report of seven cases. Cancer 1951;4:697-707.
50. Ichaso N, Rodriguez RE, Martin-Zanca D, Gonzalez-Sarmiento R. Genomic characterization of the human trkC gene. Oncogene 1998;17(14):1871-5.
51. Ishizaka Y, Kobayashi S, Ushijima T, Hirohashi S, Sugimura T, Nagao M. Detection of retTPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method. Oncogene 1991;6(9):1667-72.
52. Jaquet AJ. Ein Fall von metastasierenden Amyloidtumoren (Lymphosarcoma). Virchows Archiv [Pathol Anat] 1906;185:251.
53. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW, Fox GM. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. Cell 1996;85(7):1113-24.
54. Jing S, Yu Y, Fang M, Hu Z, Holst PL, Boone T, Delaney J, Schultz H, Zhou R, Fox GM. GFRalpha-2 and GFRalpha-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. J Biol Chem 1997;272(52):33111-7.
55. Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I. SSCP analysis: a blind sensitivity trial. Hum Mutat 1997;10(1):65-70.
56. Klein RD, Sherman D, Ho WH, Stone D, Bennett GL, Moffat B, Vandlen R, Simmons L, Gu Q, Hongo JA, Devaux B, Poulsen K, Armanini M, Nozaki C, Asai N, Goddard A, Phillips H, Henderson CE, Takahashi M, Rosenthal A. A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor [published erratum appears in Nature 1998 Mar 12;392(6672):210]. Nature 1997;387(6634):717-21.
57. Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. Nat Genet 2003;33(4):469-75.
58. Koizumi H, Morita M, Mikami S, Shibayama E, Uchikoshi T. Immunohistochemical analysis of TrkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinomas. Pathol Int 1998;48(2):93-101.
59. Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM, Jr., Milbrandt J. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. Nature 1996;384(6608):467-70.
60. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D, Jhanwar S, Winawer S, Offit K, Luce MC, Kinzler KW, Vogelstein B. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. Nat Genet 1997;17(1):79-83.
61. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17(11):2935-9.
62. Ligtenberg MJ, Gennissen AM, Vos HL, Hilkens J. A single nucleotide polymorphism in an exon dictates allele dependent differential splicing of episialin mRNA. Nucleic Acids Res 1991;19(2):297-301.
63. Lomen-Hoerth C, Shooter EM. Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. J Neurochem 1995;64(4):1780-9.
64. Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson AL, Delbridge L, Eng C, Robinson BG. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf) 1996;44(3):249-57.
65. Marsh DJ, Zheng Z, Arnold A, Andrew SD, Learoyd D, Frilling A, Komminoth P, Neumann HP, Ponder BA, Rollins BJ, Shapiro GI, Robinson BG, Mulligan LM, Eng C. Mutation analysis of glial cell line-derived neurotrophic factor, a ligand for an RET/coreceptor complex, in multiple endocrine neoplasia type 2 and sporadic neuroendocrine tumors. J Clin Endocrinol Metab 1997;82(9):3025-8.
66. Marzano LA, Porcelli A, Biondi B, Lupoli G, Delrio P, Lombardi G, Zarrilli L. Surgical management and follow-up of medullary thyroid carcinoma. J Surg Oncol 1995;59(3):162-8.

67. Masure S, Geerts H, Cik M, Hoefnagel E, Van Den Kieboom G, Tuytelaars A, Harris S, Lesage AS, Leysen JE, Van Der Helm L, Verhasselt P, Yon J, Gordon RD. Enovin, a member of the glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) family with growth promoting activity on neuronal cells. Existence and tissue-specific expression of different splice variants. Eur J Biochem 1999;266(3):892-902.
68. Mathew CG, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Carter C, Liou GI, Fong SL, Bridges CD, Haak H, Kruseman AC, et al. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. Nature 1987;328(6130):527-8.
69. McGregor LM, Baylin SB, Griffin CA, Hawkins AL, Nelkin BD. Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. Genomics 1994;22(2):267-72.
70. McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, Ball DW, Baylin SB, Nelkin BD. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(8):4540-5.
71. Michiels FM, Chappuis S, Caillou B, Pasini A, Talbot M, Monier R, Lenoir GM, Feunteun J, Billaud M. Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(7):3330-5.
72. Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kotzbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Vandlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Gray C, Garces A, Johnson EM, Jr., et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. Neuron 1998;20(2):245-53.
73. Miyauchi A, Matsuzuka F, Hirai K, Yokozawa T, Kobayashi K, Ito Y, Nakano K, Kuma K, Futami H, Yamaguchi K. Prospective trial of unilateral surgery for nonhereditary medullary thyroid carcinoma in patients without germline RET mutations. World J Surg 2002;26(8):1023-8.
74. Modigliani E, Vasen HM, Raue K, Dralle H, Frilling A, Gheri RG, Brandi ML, Limbert E, Niederle B, Forgas L, et al. Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2: European study. The Euromen Study Group. J Intern Med 1995;238(4):363-7.
75. Moley JF. Medullary thyroid cancer. Surg Clin North Am 1995;75(3):405-20.
76. Mulligan LM, Eng C, Attie T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ, Robinson BG, Frilling A, Verellen-Dumoulin C, Safar A, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene. Hum Mol Genet 1994;3(12):2163-7.
77. Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A, Ponder BAJ. Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. Nature 1993;363:458-60.
78. Myers SM, Salomon R, Goessling A, Pelet A, Eng C, von Deimling A, Lyonnet S, Mulligan LM. Investigation of germline GFR alpha-1 mutations in Hirschsprung disease. J Med Genet 1999;36(3):217-20.
79. Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum LM, Biegel JA, Brodeur GM. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). Genomics 1995;25(2):538-46.
80. Naveilhan P, Baudet C, Mikaels A, Shen L, Westphal H, Ernfors P. Expression and regulation of GFRalpha3, a glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(3):1295-300.
81. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. Endocr Pathol 2002;13(1):3-16.
82. Okazawa H, Kamei M, Imafuku I, Kanazawa I. Gene regulation of trkB and trkC in the chick retina by light/darkness exposure. Oncogene 1994;9(7):1813-8.
83. Onochie CI, Korngut LM, Vanhorne JB, Myers SM, Michaud D, Mulligan LM. Characterization of the human GFRalpha-3 locus and investigation of the gene in Hirschsprung disease. J. Med. Genet. 2000;37:674-9.
84. Pacini F, Fontanelli M, Fugazzola L, Elisei R, Romei C, Di Coscio G, Miccoli P, Pinchera A. Routine measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma . J Clin Endocrinol Metab 1994;78(4):826-9.
85. Patocs A, Valkusz Z, Igaz P, Balogh K, Toth M, Varga I, Racz K. Segregation of the V804L mutation and S836S polymorphism of exon 14 of the RET gene in an extended kindred with familial medullary thyroid cancer. Clin Genet 2003;63(3):219-23.
86. Platten M, Meyer-Puttlitz B, Blumcke I, Waha A, Wolf HK, Nothen MM, Louis DN, Sampson JR, von Deimling A. A novel splice site associated polymorphism in the tuberous sclerosis 2 (TSC2) gene may predispose to the development of sporadic gangliogliomas. J Neuropathol Exp Neurol 1997;56(7):806-10.
87. Pujol RM, Matias-Guiu X, Miralles J, Colomer A, de Moragas JM. Multiple idiopathic mucosal neuromas: a minor form of multiple endocrine neoplasia type 2B or a new entity? J Am Acad Dermatol 1997;37(2 Pt 2):349-52.

88. Raue F, Kotzerke J, Reinwein D, Schroder S, Roher HD, Deckart H, Hofer R, Ritter M, Seif F, Buhr H, et al. Prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: evaluation of 741 patients from the German Medullary Thyroid Carcinoma Register. Clin Investig 1993;71(1):7-12.
89. Rieu M, Lame MC, Richard A, Lissak B, Sambort B, Vuong-Ngoc P, Berrod JL, Fombeur JP. Prevalence of sporadic medullary thyroid carcinoma: the importance of routine measurement of serum calcitonin in the diagnostic evaluation of thyroid nodules . Clin Endocrinol (Oxf) 1995;42(5):453-60.
90. Robledo M, Gil L, Pollan M, Cebrian A, Ruiz S, Azanedo M, Benitez J, Menarguez J, Rojas JM. Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. Cancer Res 2003;63(8):1814-7.
91. Rodien P, Jeunemaitre X, Dumont C, Beldjord C, Plouin PF. Genetic alterations of the RET proto-oncogene in familial and sporadic pheochromocytomas. Horm Res 1997;47(4-6):263-8.
92. Romei C, Elisei R, Pinchera A, Ceccherini I, Molinaro E, Mancusi F, Martino E, Romeo G, Pacini F. Somatic mutations of the ret protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma are not restricted to exon 16 and are associated with tumor recurrence. J Clin Endocrinol Metab 1996;81(4):1619-22.
93. Ruiz A, Antinolo G, Fernandez RM, Eng C, Marcos I, Borrego S. Germline sequence variant S836S in the RET proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. Clin Endocrinol (Oxf) 2001;55(3):399-402.
94. Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. Nature 1996;382(6586):70-3.
95. Sanicola M, Hession C, Worley D, Carmillo P, Ehrenfels C, Walus L, Robinson S, Jaworski G, Wei H, Tizard R, Whitty A, Pepinsky RB, Cate RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(12):6238-43.
96. Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R, Pierotti MA, Bongarzone I, Della Porta G, Berger N, et al. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. J Clin Invest 1992;89(5):1517-22.
97. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco A, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. Science 1995;267(5196):381-3.
98. Schilling T, Burck J, Sinn HP, Clemens A, Otto HF, Hoppner W, Herfarth C, Ziegler R, Schwab M, Raue F. Prognostic value of codon 918 (ATG-->ACG) RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. Int J Cancer 2001;95(1):62-6.
99. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret . Nature 1994;367(6461):380-3.
100. Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDermid H, Myers S, Kidd JR, Jackson CE, Duncan AM, Farrer LA, Brasch K, et al. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. Nature 1987;328(6130):528-30.
101. Sipple JH. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. Am J Med 1961;31:163-6.
102. Sommerfeld MT, Schweigreiter R, Barde YA, Hoppe E, Frank L, Ventimiglia R, Anderson K, Lindsay RM, Rudge JS. Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. J Biol Chem 2000;275(12):8982-90.
103. Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, Cariani CT, Mondellini P, Calderone C, Pilotti S, Pierotti MA, Della Porta G. Cytogenetic and molecular genetic characterization of papillary thyroid carcinomas. Genes Chromosomes Cancer 1992;5(3):212-8.
104. Stallings-Mann ML, Ludwiczak RL, Klinger KW, Rottman F. Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(22):12394-9.
105. Steiner AL, Goodman AD, Powers SR. Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma, hyperparathyroidism and Cushing's disease: multiple endocrine neoplasia, type 2. Medicine (Baltimore) 1968;47(5):371-409.
106. Takahashi M, Cooper GM. ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. Mol Cell Biol 1987;7(4):1378-85.
107. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. Cell 1985;42(2):581-8.
108. Tallini G, Asa SL. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. Adv Anat Pathol 2001;8(6):345-54.
109. Thompson J, Doxakis E, Pinon LG, Strachan P, Buj-Bello A, Wyatt S, Buchman VL, Davies AM. GFRalpha-4, a new GDNF family receptor. Mol Cell Neurosci 1998;11(3):117-26.
110. Trump DL, Mendelsohn G, Baylin SB. Discordance between plasma calcitonin and tumor-cell mass in medullary thyroid carcinoma. N Engl J Med 1979;301(5):253-5.

111. Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Grueso E, Pachnis V, Arumae U, et al. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene . Nature 1996;381(6585):785-8.
112. Trupp M, Raynoschek C, Belluardo N, Ibanez CF. Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase. Mol Cell Neurosci 1998;11(1-2):47-63.
113. Trupp M, Scott R, Whittemore SR, Ibanez CF. Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. J Biol Chem 1999;274(30):20885-94.
114. Vanhorne JB, Gimm O, Myers SM, Kaushik A, von Deimling A, Eng C, Mulligan LM. Cloning and characterization of the human GFRA2 locus and investigation of the gene in Hirschsprung disease. Hum Genet 2001;108(5):409-15.
115. Vierhapper H, Raber W, Bieglmayer C, Kaserer K, Weinhausl A, Niederle B. Routine measurement of plasma calcitonin in nodular thyroid diseases. J Clin Endocrinol Metab 1997;82(5):1589-93.
116. Wells SA, Jr., Chi DD, Toshima K, Dehner LP, Coffin CM, Dowton SB, Ivanovich JL, DeBenedetti MK, Dilley WG, Moley JF, et al. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. Ann Surg 1994;220(3):237-47; discussion 47-50.
117. Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, Wloch J, Oczko M, Jarzab B. The genetic background of medullary thyroid carcinoma in young patients. Folia Histochem Cytobiol 2001;39 Suppl 2:163-4.
118. Williams ED. A review of 17 cases of carcinoma of the thyroid and phaechromocytoma. J. Clin. Path. 1965;18:288-92.
119. Zedenius J, Larsson C, Bergholm U, Bovee J, Svensson A, Hallengren B, Grimelius L, Backdahl M, Weber G, Wallin G. Mutations of codon 918 in the RET proto-oncogene correlate to poor prognosis in sporadic medullary thyroid carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 1995;80(10):3088-90.

7. Originalarbeiten

7.1 Originalarbeit 01:

Gimm O, Greco A, Hoang-Vu C, Dralle H, Pierotti MA, Eng C

Mutation analysis reveals novel sequence variants in *NTRK1* in sporadic human medullary thyroid carcinoma

J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:2784-2787

0021-972X/99/$03.00/0
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
Copyright © 1999 by The Endocrine Society
Vol. 84, No. 8
Printed in U.S.A.

Mutation Analysis Reveals Novel Sequence Variants in *NTRK1* in Sporadic Human Medullary Thyroid Carcinoma*

OLIVER GIMM†, ANGELA GRECO, CUONG HOANG-VU, HENNING DRALLE, MARCO A. PIEROTTI, AND CHARIS ENG

Clinical Cancer Genetics and Human Cancer Genetics Programs (O.G., C.E.), Comprehensive Cancer Center, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210; Division of Experimental Oncology A (A.G., M.A.P.), Istituto Nazionale Tumori, Via G. Venetion, 20133 Milan, Italy; Department of General Surgery (C.H.-V., H.D.), Martin Luther University of Halle-Wittenberg, 06097 Halle/Saale, Germany; Cancer Research Campaign Human Cancer Genetics Research Group (C.E.), University of Cambridge, Cambridge CB2 2QQ, United Kingdom

ABSTRACT

Tyrosine kinase NTRK1 is expressed in neural and nonneuronal tissues. Like *RET*, *NTRK1* is often activated by rearrangements that involve one of at least five other genes in papillary thyroid carcinoma (PTC). Because of similarities in involvement of the two tyrosine kinases RET (rearranged during transfection) and NTRK1 in the pathogenesis of PTC, the obvious parallels between *RET* and *NTRK1* and between PTC and medullary thyroid carcinoma (MTC), *NTRK1* seemed to be an excellent candidate gene to play a role in the genesis of MTC. Single-strand conformational polymorphism analysis of 16 exons of *NTRK1*, from 31 sporadic MTC, revealed variants in five exons (exons 4 and 14–17). Sequence analysis demonstrated one sequence variant each in exons 4, 14, 16, and 17, and four different variants in exon 15. Differential restriction enzyme digestion specific for each variant confirmed the sequencing results. All variants were also present in the corresponding germline DNA. Interestingly, the sequence variants at codon 604 (c1810C>T) and codon 613 (c1838G>T) of exon 15 always occurred together and might represent linkage disequilibrium. The frequencies of the sequence variants in germline DNA from patients with sporadic MTC did not differ significantly from those in a race-matched control group. Although we did not find any somatic mutations of *NTRK1* in sporadic MTC, the single-strand conformational polymorphism conditions reported here, together with the knowledge of the frequency of various sequence variants, may help in future mutation analyses of DNA from other neural and nonneural tissues. (*J Clin Endocrinol Metab* **84:** 2784–2787, 1999)

MOST THYROID carcinomas derive from thyroid follicular cells, among which papillary thyroid carcinoma (PTC) is, by far, the most common type (60–80%). The diagnosis is based on a constellation of features, such as papillary architecture, the presence of psammoma bodies, ground-glass nuclei, and indentations of the nuclear membrane (grooved nuclei), not all of which may be present in a single tumor. Although PTC metastasizes relatively early, usually by the lymphatic system, hematogenous metastasis is infrequent. The prognosis is generally considered to be good. In contrast, medullary thyroid carcinoma (MTC) derives from the parafollicular C cells and is less common (5–10%). The histopathological pattern may vary considerably (such as classic, papillary, amyloid-rich, insular, trabecular, small-cell variants). Lymphogenous and hematogenous metastases are common clinical presentations, and the overall prognosis is worse, compared with patients having PTC. Surprisingly, despite these obvious differences, PTC and MTC have one gene in common that somehow contributes to their distinct carcinogenesis: the protooncogene *RET*.

In 1985, Takahashi *et al*. found this new transforming gene, activated by DNA rearrangement during transfection (RET) of NIH 3T3 cells (1). *RET* encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor that is expressed in neural and neuroendocrine tissues (2). As of today, at least five types of *RET* rearrangements (translocations and inversions) have been found in PTC (RET/PTC1–5) (3–7). The subsequent activation of RET, in this manner, seems to be restricted to PTCs (8), although one study reports *RET* rearrangement in a thyroid adenoma (9).

In 1993, *RET* was also found to be involved in the pathogenesis of MTC. Germline mutations of *RET* have been found to be associated with familial forms of MTC (FMTC, MEN 2A, MEN 2B; for review see Ref. 10) (11–15). Of interest, 30–70% of sporadic MTC harbor a somatic *RET* mutation (16). In contrast to PTC, mutations found in MTC are almost exclusively missense mutations.

Another tyrosine kinase, NTRK1 (also known as TrkA), has also been found to be widely expressed in neural and nonneuronal tissues (17, 18), and we have shown that NTRK1 is expressed in MTC (Gimm and Eng, unpublished data). *NTRK1*, encoding one of the receptors for nerve growth factor, consists of at least 17 exons and is located on chromo-

Received March 11, 1999. Revision received April 5, 1999. Accepted April 15, 1999.

Address all correspondence and requests for reprints to: Charis Eng, M.D., Ph.D., Human Cancer Genetics Program, Comprehensive Cancer Center, Ohio State University, 420 West 12th Avenue, Room 690C MRF, Columbus, Ohio 43210. E-mail: eng-1@medctr.osu.edu.

* This study was supported partially by P30CA16058 from the National Cancer Institute (Comprehensive Cancer Center), and generous donations from the Brown family and the Abrams family (to C.E.).

† Recipient of a fellowship from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

some subband 1q21–22 (19). Furthermore, like *RET*, *NTRK1* is often activated in PTC (20). Similar to *RET*, the activation is also caused by rearrangements that involve one of at least three (TFG, TPR, TPM3) genes (TRK-T1–3) (21–23). Because of similarities in involvement of the two tyrosine kinases RET and NTRK1 in the pathogenesis of PTC, the obvious parallels between *RET* and *NTRK1*, and between PTC and MTC, *NTRK1* seemed to be an excellent candidate gene to play a role in the genesis of MTC. Here, we report the results of mutation analysis of *NTRK1* in sporadic MTC.

Materials and Methods

Tumor and peripheral blood leucocyte DNA was obtained from 31 patients who underwent surgery for MTC at the Department of General Surgery, University of Halle, Germany. All samples were obtained with informed consent. Patients were classified as having sporadic MTC in the absence of any MEN 2-specific *RET* mutation in the germline, *i.e.* no mutation in exons 10, 11, 13, 14, 15, or 16. DNA extraction was performed using the QIAamp tissue kit (Qiagen, Santa Clarita, CA) according to the manufacturer's instruction.

PCR amplifications were carried out in 1× PCR buffer (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) containing 200 μmol/L deoxynucleotide triphosphate, 1 μmol/L of each primer (see Table 1), 2.5 U *Taq* polymerase (Perkin-Elmer Corp.), and 100–200 ng of genomic DNA template in a 50-μL vol. PCR conditions were: 40 cycles of 1 min at 95 C, 1 min at 60–62 C (see Table 1), 1 min at 72 C followed by 10 min at 72 C. Exon 1 could not be amplified, and exons 8 and 17 were divided into two (a and b) because of their large sizes. Some PCR products (see Table 1) were subjected to further digestion to get smaller fragments that are believed to be more likely to show alternate banding patterns using single-strand conformational polymorphism (SSCP) (24). The digestion was performed according to the manufacturer's recommendation (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA).

Before SSCP, 2 μL of the resulting PCR/digestion product were added to 3 μL of formamide buffer, then heated to 95 C for 10 min, and subsequently cooled on dry ice. Immediately before SSCP, the samples were quickly thawed and then run on a 10% polyacrylamide/1×Tris-Borate-EDTA gel, except exon 14, which was electrophoresed through a 10% polyacrylamide/1×Tris-Borate-EDTA/10% glycerol gel. Gels were run either at 100 V for 14 h at room temperature (exons 2, 4–7, 9–16, and 17a) or at 150 V for 16 h at 4 C (exons 3, 8a, 8b, and 17b). Subsequent silver staining was performed as follows: 10 min in 0.5% acetic acid and 10% ethanol (fixation), 10 min in 0.1% silver nitrate (staining), 20 min in 1.5% sodium hydroxide and 0.01% sodium borohydride and 0.05% formaldehyde (development), and 10 min in 0.75% sodium carbonate (fixation).

If variant SSCP banding patterns were seen, the remaining PCR aliquot was subjected to purification and semiautomated sequencing using the above primers and dye terminator technology, as previously described (25, 26). If sequencing revealed a sequence variant, the corresponding leucocyte DNA was examined in the same manner to determine whether the sequence variant is somatic or germline. Further, we analyzed whether the nucleotide change would create or remove the recognition site of a restriction enzyme to prove, by three different means, the existence of this variant. The frequencies of these sequence variants, in patients with MTC and in a race-matched control group, were determined.

TABLE 1. NTRK1 primer sequences, PCR conditions, and restriction enzymes to generate DNA fragments for SSCP

Primer name	Primer sequence (5′ to 3′)	Annealing temp. PCR product size	Restriction enzyme fragment size
NTRK1-2F:	AACTCAAGTGTGGCCTGAGC	62 C	
NTRK1-2R:	CCTCCCTGACCTTCTGGTCT	193	
NTRK1-3F:	GAGTAGCTGAGACCTGGGGA	62 C	
NTRK1-3R:	CATTAGCAGCCCAAGTCTGG	180	
NTRK1-4F:	CAAGGGGTCTGTCTTGCTGT	62 C	
NTRK1-4R:	AACAGACCCAAGTGCACACA	173	
NTRK1-5F:	GGCCCTTTCCTTGACTCTGT	62 C	
NTRK1-5R:	CTTACACCACCTCCCTCACC	218	
NTRK1-6F:	GCCACTCCCAGCTCTAACAC	62 C	
NTRK1-6R:	GCCAGCGAAGGTCTTCTCAC	214	
NTRK1-7F:	AAAGCTCCTTCTTATTCCCCC	62 C	
NTRK1-7R:	GAGATGAGTAGGGGGTGGGT	216	
NTRK1-8aF:	CCTCCTGCTGTTGCTCTTTC	62 C	
NTRK1-8aR:	TGGTTGAGGCGCAGACAC	229	
NTRK1-8bF:	TTCACTGAGTTCCTGGAGCC	62 C	*Eae*I
NTRK1-8bR:	GCTGTAACCCAGGAGGAGC	249	117 + 132
NTRK1-9F:	CGTCCCATGAAGGAATGAGT	60 C	
NTRK1-9R:	CTCCAGAGACCAGGCAGAAC	176	
NTRK1-10F:	AGTGTGTGTCAAGGCTCACC	62 C	
NTRK1-10R:	GAGCTCAGGCCAGATGGTAG	213	
NTRK1-11F:	GAGGAGCCCCTGGATCTAAC	60 C	
NTRK1-11R:	GCCAGTAGGAAACAAAGCCA	203	
NTRK1-12F:	CTGCAAGTTACAAGGTGGGG	62 C	*Alu*I
NTRK1-12R:	ACACACACACACTCGTCCCT	293	168 + 125
NTRK1-13F:	AAGACAGTCCCCGCTACAAC	62 C	*Xmn*I
NTRK1-13R:	ATGTCAGCCCTCTGCATCTC	300	140 + 160
NTRK1-14F:	CCAACTCAGTCCTGTCCCTG	61 C	*Pst*I
NTRK1-14R:	TATAGGGAAGGGAAGACGGG	274	105 + 169
NTRK1-15F:	GGAGTTCTATCCTCCCAGCC	60 C	*Hpa*II
NTRK1-15R:	GAAAAAGGAACCTGAAGGGG	335	186 + 149
NTRK1-16Fb:	CCTGGAATTGATGCAGTGTC	62 C	*Sau3A*I
NTRK1-16R:	CTACAGTTTGGATGCAGGGG	294	178 + 116
NTRK1-17aF:	GGACTGGCCTCACTCTCTTG	62 C	*Ban*II
NTRK1-17aR:	CCAGTATTCCGGCTAACCAC	294	164 + 130
NTRK1-17bF:	GCACCTCCTGTCTACCTGGA	62 C	
NTRK1-17bR:	ACGTCATCCCAATAACTGGC	273	

Results

SSCP analysis of all 16 exons of *NTRK1* from 31 sporadic MTC revealed variants in five exons (exons 4, 14–16, and 17a; Fig. 1). Sequencing revealed 1 sequence variant each in exons 4, 14, 16, and 17a, and 4 different variants in exon 15 (Table 2). Differential restriction enzyme digestion, specific for each variant, confirmed the sequencing results. Corresponding germline DNA was examined for the presence of each of these variants, and all were also present in the germline. Interestingly, the sequence variants at codon 604 (c1810C>T) and codon 613 (c1838G>T) of exon 15 always occurred together. The frequencies of the sequence variants in DNA from patients with sporadic MTC did not differ significantly from those in a race-matched control group (Table 2).

One previously described variant (27) was not detected (c1767T>C) in this study either by SSCP or restriction analysis (Table 2).

Discussion

In the present study, we detected 3 previously reported polymorphisms (27) and 5 novel sequence variants in *NTRK1*, and we determined their frequencies in DNA from patients with sporadic MTC and a race-matched control group. One previously reported sequence variant (27) in exon 14 (c1767T>C) could not be detected by SSCP and restriction analysis of 126 total alleles (60 MTC alleles, 66 control alleles).

We did not detect any somatic mutations of *NTRK1* in tumor DNA from 31 independent patients with sporadic MTC. The absence of any somatic sequence variant of *NTRK1* is somewhat surprising. Though it is obvious that high-penetrance mutations of *NTRK1* are not associated with medullary thyroid tumorigenesis, it is becoming more and more evident that development of a cancer can result from an interplay of either a few high penetrance mutations in key genes or from several, or many, sequence variants of unknown significance (28). For example, overrepresentation of a rare sequence variant of *RET* has been observed in patients with sporadic MTC (29); this variant, together with variants in other genes, may somehow predispose to MTC in a low penetrance fashion.

Although we did not find any somatic mutations of *NTRK1* in sporadic MTC, nor did we find an association with sequence variants, the SSCP conditions reported here, together with the knowledge of the frequency of various sequence variants, may help in future mutation analyses of DNA from other neural and nonneural tissues, such as squamous cell carcinoma of the esophagus, squamous cell carcinoma of the uterus, and ductal carcinoma of the breast (18).

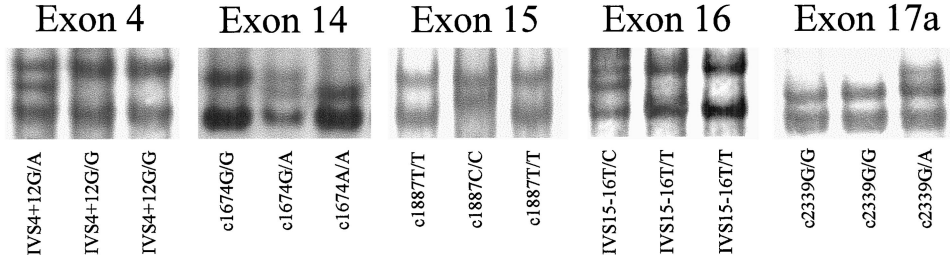


FIG. 1. SSCP of tumor DNA for *NTRK1* exons 4, 14–16, and 17a and corresponding sequencing results.

TABLE 2. Frequency of polymorphic sequence variants in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and race-matched controls

Exon	Codon	Nucleotide change / Amino acid change	Restriction enzyme (cuts in the presence of)	Frequency of allele 1[a] MTC (alleles tested)	Controls (alleles tested)
4	N/A	IVS4+12G>A N/A	*Hha*I (G)	98% (62)	100% (96)
14	558	c1674G>A Gln-Gln	*Mae*II[b] (A)	19% (58)	27% (64)
	589	c1767T>C Phe-Phe	*Mbo*II (C)	0% (60)	0% (66)
15	N/A	IVS14-4delA	*BamHI*[c] (delA)	8% (62)	4% (56)
	604[d]	c1810C>T Tyr-His	*Sty*I (C)	95% (62)	93% (64)
	613[d]	c1838G>T Val-Gly		95% (62)	93% (94)
	629	c1887T>C Ala-Ala	*Hae*III (C)	35% (62)	27% (92)
16	N/A	IVS15-16T>C N/A	*Hga*I (C)	8% (62)	3% (78)
17a	780	c2339G>A Arg-Gln	*Alu*I (A)	2% (60)	0% (76)

N/A, Not applicable.

[a] Allele 1 is defined as that allele that would be cut by the restriction enzyme.

[b] The frequency of this polymorphism has not been determined using the restriction enzyme *Mae*II, but *Mae*II could be used in this regard.

[c] Restriction enzyme *BamH*I would cut after amplification of exon 15 using the primers TRK15F-BamHI (5′-CCCAGCCTATCCCCTCTC-CTTTTCTGGATC-3′) and NTRK1-15R.

[d] Sequencing revealed that these two sequence variants always occur together.

Acknowledgments

The authors thank K. Hammje, M. Sitte, I. Schwarz, and Drs. Patricia L. M. Dahia, Debbie J. Marsh, and Sig Verselis for technical assistance.

References

1. **Takahashi M, Ritz J, Cooper GM.** 1985 Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. Cell. 42:581–588.
2. **Takahashi M, Cooper GM.** 1987 *ret* transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. Mol Cell Biol. 7:1378–1385.
3. **Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al.** 1990 PTC is a novel rearranged form of the *ret* proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. Cell. 60:557–563.
4. **Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, et al.** 1994 A t(10;17) translocation creates the *RET/PTC2* chimeric transforming sequence in papillary thyroid carcinoma. Genes Chromosom Cancer. 9:244–250.
5. **Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, et al.** 1994 Molecular characterization of *RET/PTC3*; a novel rearranged version of the *RET* proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. Oncogene. 9:509–516.
6. **Fugazzola L, Pierotti MA, Vigano E, Pacini F, Vorontsova TV, Bongarzone I.** 1996 Molecular and biochemical analysis of *RET/PTC4*, a novel oncogenic rearrangement between *RET* and *ELE1* genes, in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. Oncogene. 13:1093–1097.
7. **Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM.** 1998 Detection of a novel type of *RET* rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene *RFG5*. Cancer Res. 58:198–203.
8. **Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, et al.** 1992 *Ret* oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. J Clin Invest. 89:1517–1522.
9. **Ishizaka Y, Kobayashi S, Ushijima T, Hirohashi S, Sugimura T, Nagao M.** 1991 Detection of retTPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method. Oncogene. 6:1667–1672.
10. **Eng C.** 1999 *RET* proto-oncogene in the development of human cancer. J Clin Oncol. 17:380–393.
11. **Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al.** 1993 Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. Nature. 363:458–460.
12. **Donis-Keller H, Dou S, Chi D, et al.** 1993 Mutations in the *RET* proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum Mol Genet. 2:851–856.
13. **Eng C, Smith DP, Mulligan LM, et al.** 1994 Point mutation within the tyrosine kinase domain of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. Hum Mol Genet. 3:237–241.
14. **Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, et al.** 1994 A mutation in the *RET* proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. Nature. 367:375–376.
15. **Carlson KM, Dou S, Chi D, et al.** 1994 Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the *RET* protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. Proc Natl Acad Sci USA. 91:1579–1583.
16. **Eng C, Mulligan LM.** 1997 Mutations of the *RET* proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease. Hum Mutat. 9:97–109.
17. **Lomen-Hoerth C, Shooter EM.** 1995 Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. J Neurochem. 64:1780–1789.
18. **Koizumi H, Morita M, Mikami S, Shibayama E, Uchikoshi T.** 1998 Immunohistochemical analysis of TrkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinomas. Pathol Int. 48:93–101.
19. **Greco A, Villa R, Pierotti MA.** 1996 Genomic organization of the human *NTRK1* gene. Oncogene. 13:2463–2466.
20. **Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, et al.** 1989 High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. Oncogene. 4:1457–1462.
21. **Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, et al.** 1992 Cytogenetic and molecular genetic characterization of papillary thyroid carcinomas. Genes Chromosom Cancer. 5:212–218.
22. **Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G.** 1992 *TRK-T1* is a novel oncogene formed by the fusion of *TPR* and *TRK* genes in human papillary thyroid carcinomas. Oncogene. 7:237–242.
23. **Greco A, Mariani C, Miranda C, et al.** 1995 The DNA rearrangement that generates the *TRK-T3* oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. Mol Cell Biol. 15:6118–6127.
24. **Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, et al.** 1997 SSCP analysis: a blind sensitivity trial. Hum Mutat. 10:65–70.
25. **Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, et al.** 1997 Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. J Clin Endocrinol Metab. 82:3902–3904.
26. **Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al.** 1997 Germline mutations of the *PTEN* gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet. 16:64–67.
27. **George DJ, Suzuki H, Bova GS, Isaacs JT.** 1998 Mutational analysis of the *TrkA* gene in prostate cancer. Prostate. 36:172–180.
28. **Storey A, Thomas M, Kalita A, et al.** 1998 Role of a *p53* polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. Nature. 393: 229–234.
29. **Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, et al.** 1999 Over-representation of a germline *RET* sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic *RET* codon 918 mutation. Oncogene. 18:1369–1373.

7.2 Originalarbeit 02:

Gimm O, Dziema H, Brown J, de la Puente A,
Hoang-Vu C, Dralle H, Plass C, Eng C

**Mutation analysis of *NTRK2* and *NTRK3*,
encoding 2 tyrosine kinase receptors,
in sporadic human medullary thyroid carcinoma
reveals novel sequence variants**

Int J Cancer 2001;92:70-74

Int. J. Cancer: **92,** 70–74 (2001)
© 2001 Wiley-Liss, Inc.

Publication of the International Union Against Cancer

MUTATION ANALYSIS OF *NTRK2* AND *NTRK3*, ENCODING 2 TYROSINE KINASE RECEPTORS, IN SPORADIC HUMAN MEDULLARY THYROID CARCINOMA REVEALS NOVEL SEQUENCE VARIANTS

Oliver GIMM[1,2], Heather DZIEMA[1,2], Jessica BROWN[1,2], Aranzazu DE LA PUENTE[2], Cuong HOANG-VU[3], Henning DRALLE[3], Christoph PLASS[2] and Charis ENG[1,2,4]*

[1]*Clinical Cancer Genetics Program, Division of Human Genetics, Department of Internal Medicine, Ohio State University, Columbus, OH, USA*
[2]*Human Cancer Genetics Program, Comprehensive Cancer Center, Division of Human Cancer Genetics, Ohio State University, Columbus, OH, USA*
[3]*Department of General Surgery, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Germany*
[4]*Cancer Research Campaign Human Cancer Genetics Research Group, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom*

Somatic mutations in the proto-oncogene *RET* are found in 25% to 80% of sporadic medullary thyroid carcinomas (MTCs). The significance of somatic *RET* mutation in MTC initiation and progression, however, remains unknown. Like RET, TRK is a neurotrophic receptor tyrosine kinase. Immunostaining has shown that only a subset of normal C cells expresses Trk family receptors, but in C-cell hyperplasia, they consistently express NTRK2, with variable expression of NTRK1 and NTRK3. In later stages of MTC, NTRK2 expression was reduced while NTRK3 expression was increased. In the context of these data, we sought to determine whether sequence variants in *NTRK2* and *NTRK3* are responsible for these differences in protein expression. We determined the genomic structure of *NTRK2* and found that it consists of at least 17 exons varying in size from 36 to 306 bp. Mutation analysis of sporadic MTC did not reveal any sequence variants in *NTRK2* but did reveal 3 variants in *NTRK3,* c.573C>T (N191N, exon 5), c.678T>C (N226N, exon 6) and c.1488C>G (A496A, exon 12) occurring among 19 chromosomes (31%), 1 chromosome (2%) and 24 chromosomes (39%), respectively. Corresponding germline also harbored these variants. There was a trend toward excess association of the *NTRK3* variant c.1488C>G (A496A) in cases (24/62 chromosomes, 39%) compared to controls (18/62, 29%), but this difference did not reach significance ($p > 0.05$). The remaining 2 *NTRK3* variants occurred with similar frequencies between MTC cases and population-matched controls (19 *vs.* 17 and 1 *vs.* 0, $p > 0.05$). We conclude that sequence variants in *NTRK2* and *NTRK3* are not likely to be responsible for large differences in expression at the protein level, but we cannot exclude very low penetrance effects.
© *2001 Wiley-Liss, Inc.*

Key words: *tyrosine kinase;* NTRK2; NTRK3; *genomic structure; mutation analysis; medullary thyroid carcinoma*

Medullary thyroid carcinoma (MTC) occurs in hereditary and sporadic forms in a 1:3 ratio. Germline mutations in *RET,* a receptor tyrosine kinase expressed in neural crest derivatives, cause the inherited cancer syndrome multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2).[1–3] Somatic *RET* mutations have been found in sporadic MTC.[4–6] Approximately 25% to 80% of sporadic MTCs have been found to harbor somatic mutations.[7] However, mutation analysis in subpopulations of sporadic MTC has shown that these somatic mutations are heterogeneously present.[8] This may suggest that *RET* mutations occur during tumor evolution rather than being the initial step. A rare germline polymorphism in exon 14 (S836S) has been found to be over-represented in patients with sporadic MTC when compared to control groups.[9,10] In general, while somatic missense mutations in *RET* are found in sporadic MTC, translocations or inversions involving *RET* are found in another type of thyroid carcinoma, papillary thyroid carcinoma (PTC).[11–13]

Similar to RET, another tyrosine kinase receptor, NTRK1, also known as TRKA, is involved in the pathogenesis of PTC.[11,14,15] Because of similarities in the involvement of the 2 tyrosine kinases RET and TRKA in the pathogenesis of PTC and the parallels between *RET* and *NTRK1* and between PTC and MTC, as noted above, *NTRK1* appeared to be an excellent candidate gene to play a role in the genesis of MTC. Mutation analysis, however, did not reveal any non-polymorphic sequence variants.[10] In agreement with this finding, immunohistochemical analysis instead suggested a role for NTRK2 (also known as TRKB[16]) and NTRK3 (also known as TRKC[17]), which are also neurotrophin receptors, in the pathogenesis of MTC.[17] In advanced stages of MTC, NTRK2 expression was substantially reduced compared to NTRK3 expression, which was increased.[17] Therefore, we sought to determine whether mutations in *NTRK2* and *NTRK3* account for the observed difference in protein expression in MTC.

MATERIAL AND METHODS

Patients and specimens

A series of 31 German patients diagnosed with sporadic MTC was ascertained. Patients were classified as having sporadic MTC when no germline mutations could be identified in the *RET* proto-oncogene.[10] In addition, there was no family history of MTC, pheochromocytoma or parathyroid disease. At operation, tumor tissue and corresponding peripheral blood samples were obtained from all patients and flash frozen in liquid nitrogen. All samples were obtained with informed consent.

Peripheral blood was obtained from a population-matched, geographically matched control group. This ethnicity-matched control group consisted of patients who were admitted to the Department of General Surgery, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle, Germany), for non-MTC-related diseases. Informed consent was given in all cases.

DNA extraction

Genomic DNA from flash-frozen tissue and blood DNA were extracted using the QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA) according to the manufacturer's instructions.

Genomic structure and intron–exon boundaries in NTRK2

To determine the genomic structure of *NTRK2*, we performed long-range PCR using the LA PCR Kit (Takara Shuzo, Kyoto,

Grant sponsor: National Cancer Institute; Grant number: P30CA16058.

*Correspondence to: Human Cancer Genetics Program, Ohio State University, 420 W. 12th Avenue, Room 690C MRF, Columbus, OH 43210, USA. Fax: +614-688-3582 or +614-688-4245.
E-mail: eng-1@medctr.osu.edu

Received 27 July 2000; Revised 26 October 2000; Accepted 3 November 2000

Japan) according to the manufacturer's instructions. Briefly, PCR amplification was carried out in 1× PCR buffer (Takara Shuzo) containing 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μmol/l dNTP, 0.4 μmol/l of each primer, 2.5 U Taq polymerase (Takara Shuzo) and 100 to 200 ng of genomic DNA template in a 50 μl volume. Primers were chosen assuming that the positions of exon–intron boundaries are conserved among the 3 *Trk* genes. Forward and reverse primers to delineate the *NTRK2* genomic structure were selected based on these predicted boundaries, using the reference cDNA sequence of Nakagawara *et al.*[16] (accession number U12140). PCR conditions were as follows: 1 cycle of 2 min at 94°C; 35 cycles of 20 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 15 min at 68°C; followed by 1 cycle of 10 min at 72°C. PCR product was subjected to electrophoresis through a 1% low-melt agarose gel and visualized by UV transillumination after ethidium bromide staining. The most distinctly visualized bands were subjected to purification using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations and semi-automated sequencing using the both forward and reverse primers and dye terminator technology, as previously described.[18]

We also chose BAC library screening as another approach to obtain intronic sequences. Four PCR-generated, radiolabeled probes (Prime-It II Random Primer Labeling Kit; Stratagene, La Jolla, CA) containing sequences within the human *NTRK2* cDNA were used to hybridize against the 12× coverage human BAC library (RPCI-11). For BAC library screening, the 2 5′-end probes and the 2 3′-end probes were pooled.

While we were screening our BAC libraries, a working draft of human chromosome 9 became available on the Internet. This working draft covered all exons but exon 9 of *NTRK2*. Finally, to obtain the intronic sequence around exon 9, we used the Vectorette System (Sigma, The Woodlands, TX) according to the manufacturer's instructions. In brief, genomic DNA was digested with HindIII, TaqI and EcoRI and subsequently ligated to a Vectorette unit. PCR using 1 primer directed at the Vectorette unit and 1 primer within that specific exon was performed. PCR product was visualized, purified and sequenced as described above.

PCR, mutation analysis, SSCP

Mutation analysis was performed using a combination of single-strand conformational polymorphism (SSCP) and direct sequencing. Primers used to amplify exons of *NTRK2* were designed according to the sequencing results obtained by long-range PCR, BAC library screening, use of genomic sequences in databases available to the public (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi ; database htgs) and Vectorette PCR (Table I). The genomic structure of *NTRK3*, including intron–exon boundaries, has been described,[19] and primers to generate amplicons of NTRK3 were designed accordingly (Table IIA).

PCR amplification was carried out in 1× PCR buffer (Qiagen) containing 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μmol/l dNTP, 0.6 mol/l of both sense and anti-sense primer, 2.5 U Taq polymerase (Qiagen) and 100 to 200 ng of tumor DNA template in a 50 μl volume. PCR conditions were as follows: 1 cycle of 15 min at 95°C; 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55° to 58°C (Tables I, II), 1 min at 72°C; followed by 1 cycle of 10 min at 72°C.

For most exons, mutation analysis was performed using SSCP. For each exon, at least 5 randomly chosen samples were sequenced, to exclude the possibility that sequence variants were missed by SSCP analysis.

Before SSCP, some PCR products (Table IIB) were subjected to further digestion, to obtain smaller fragments, which are more likely to show alternate banding patterns using SSCP.[20] Of the resulting PCR/digestion product, 2 μl were added to 3 μl of formamide buffer, then heated to 95°C for 10 min and subsequently cooled on ice. Samples were subjected to electrophoresis through polyacrylamide/Tris-borate-EDTA gels (Table IIB). Subsequent silver staining was done as previously described.[10] If

TABLE I – *NTRK2* (*TRKB*) PRIMER SEQUENCES TO GENERATE DNA FRAGMENTS FOR SSCP (ANNEALING TEMPERATURE 58°C)

Exon	Name	Sequence	Size (bp)
1	TRKB-I-1F	5′-CTGGCACTGGCTGCTAGG-3′	271
	TRKB-I-1R	5′-AGGGCAAGGAGAAAAAGGAG-3′	
2	TRKB-I-2F	5′-CACTGCGATTCACTCTCTGC-3′	166
	TRKB-I-2R	5′-TGACCAGAGCAGACAACAGG-3′	
3	TRKB-I-3F	5′-CCTGTTGTCTGCTCTGGTCA-3′	177
	TRKB-I-3R	5′-CCTGGGAAGCAAAAGAATCA-3′	
4	TRKB-I-4F	5′-AAATTCATGTTTAATGTTTTTGATTCC-3′	147
	TRKB-I-4R	5′-CCTTTGAAAACATTTCCCCA-3′	
5	TRKB-I-5F	5′-GGAAAAAGGAACTTGATCTGTTG-3′	255
	TRKB-I-5R	5′-CCAAGGCAATGAGAATAATTAATAG-3′	
6	TRKB-I-6F	5′-GCCTCTGTTTACTTTTCTTGTTCC-3′	197
	TRKB-I-6R	5′-TCTATTAAGACACAGCCAAACACA-3′	
7	TRKB-I-7F	5′-TTGTCTGTTAATTCATTTGTAG-3′	249
	TRKB-I-7R	5′-CAAATTTAAGCAGCACCCAGA-3′	
8	TRKB-I-8F	5′-GGGAGAATTCTGAGCTTTCTGA-3′	388
	TRKB-I-8R	5′-CTCCCCACATACAAAAGTGTCA-3′	
9	TRKB-I-9F	5′-TGACTCCAAAATGCATACTTACAAA-3′	156
	TRKB-I-9R	5′-TTCAGTTGATTTACTTCATGATACACA-3′	
10	TRKB-I-10Fc	5′-ATGTCTTCCTCATTCCCCCT-3′	180
	TRKB-I-10R	5′-TCCAAAATGCTCAGAACCAA-3′	
11	TRKB-I-11F	5′-TAACCACCCTCCCTTCCTTT-3′	179
	TRKB-I-11R	5′-CATAAGCCAAAAATGATCCACA-3′	
12	TRKB-I-12F	5′-CAGCTCAATAAAGCCATTGAT-3′	283
	TRKB-I-12R	5′-TGCAGCAAATGGGACAATAA-3′	
13	TRKB-I-13F	5′-CCATTCTGTCTTTGTTTTGCAG-3′	189
	TRKB-I-13R	5′-TCATGGTTAATGAGACATTCTGG-3′	
14	TRKB-I-14F	5′-TCTTTTAACACCCATCCCCA-3′	241
	TRKB-I-14R	5′-CTGAAGGCCTGCTCCCTC-3′	
15	TRKB-I-15F	5′-GAAAATGCTGAGGCCCCC-3′	350
	TRKB-I-15R	5′-GCAAACAAATACAGCAGGGGT-3′	
16	TRKB-I-16F	5′-CTGTTGATCCCTTTCTCCCC-3′	239
	TRKB-I-16R	5′-AATGGATGCCTCTGGGATCT-3′	
17	TRKB-I-17F	5′-TCCTATCTTTGATCTCCATCCA-3′	250
	TRKB-2510R	5′-TGAGGAGTACGTTGGGAAGG-3′	

TABLE IIA – *NTRK3* (*TRKC*) PRIMER SEQUENCES TO GENERATE DNA FRAGMENTS FOR SSCP (ANNEALING TEMPERATURE 55°C)

Exon	Name	Sequence	Size (bp)
1	TRKC-1F	5′-TTTTAGAAGCAGCGATCGGA-3′	326
	TRKC-1R	5′-CAGGAGGGAGACGCAGAG-3′	
2	TRKC-2F	5′-TCTGGCTGACCGTTACCTTT-3′	239
	TRKC-2R	5′-AAAAGAAGACCTGGGGGAGA-3′	
3	TRKC-3F	5′-GAGCAGATATCCCTCTGCCA-3′	189
	TRKC-3R	5′-TTCACTGCCCCAAGAGTACC-3′	
4	TRKC-4F	5′-GCATTATTTGTGCCAGACTTG-3′	208
	TRKC-4R	5′-AGGTGGTTCCACTGCTTGAC-3′	
5	TRKC-5F	5′-TCCCTTCCCCTCTCTCTTTG-3′	248
	TRKC-5R	5′-CCATCTCTGGTGTCTGAGGG-3′	
6	TRKC-6F	5′-GTTTGCCTGTCTTTTCACCC-3′	224
	TRKC-6R	5′-CACTCCCTAGCCTCCTGATG-3′	
7	TRKC-7F	5′-GGGGATTAGGTAGCAGAGCC-3′	233
	TRKC-7R	5′-CCCCCACAATAACATGCACT-3′	
8	TRKC-8F	5′-ATTTCAGCAGGCTTCTCCCT-3′	341
	TRKC-8R	5′-CAGCTACGCTGCCCTCAC-3′	
9	TRKC-9F	5′-TGAGACCACCCCCTAAACTG-3′	241
	TRKC-9R	5′-TCAAAGCAACAGGTAAAGCAGA-3′	
10	TRKC-10F	5′-CAAGAGCCTGGCTTTCAGAG-3′	238
	TRKC-10R	5′-TGCCAGTCAACACACTCCTC-3′	
11	TRKC-11F	5′-GGGTTTTCTGTGATTGTTGCT-3′	179
	TRKC-11R	5′-CGCCCTTGAAAATGAAACTC-3′	
12	TRKC-12F	5′-CTGCGTCTCTCTTGGTGTGT-3′	294
	TRKC-12R	5′-GTTCCAGAACCCCAGGTACA-3′	
13	TRKC-13F	5′-TGTCTCCCTGTGTCACCAAA-3′	213
	TRKC-13R	5′-GCATGCCTCTGGGGTTTAC-3′	
14	TRKC-14F	5′-CCCCTGCCCTGTAGTTGTTA-3′	243
	TRKC-14R	5′-AGGGGAAGACAATCCTTGCT-3′	
15	TRKC-15F	5′-CTCTTCTCCCCATGCTCTTG-3′	295
	TRKC-15R	5′-AGTCCTGCAGCTGGGAAAGT-3′	
16	TRKC-16F	5′-AAGGCCTTCCTTTTCTGAGG-3′	297
	TRKC-16Rb	5′-GAACACATTGCATTTTGGCA-3′	
17	TRKC-17F	5′-TGTGCCTCTATCTCAACCCC-3′	222
	TRKC-17R	5′-CTCCCCCAATCAAGATTCCT-3′	
18	TRKC-18F	5′-AGGCTGAGCTTTGGGTGTAA-3′	341
	TRKC-18R	5′-TGAAGATGTTCGCTTCAGTCA-3′	

TABLE IIB – SSCP CONDITIONS FOR *NTRK2* AND *NTRK3* AMPLICONS

Exon	Digestion	Fragments (bp)	PAA conc. (acryl/bis)[1]	Running conditions
NTRK2				
1			10% (60:1)	RT,[2] 14 hr, 100 V
2			12% (30:1)	4°C, 16 hr, 200 V
3			14% (100:1)	4°C, 16 hr, 150 V
4			14% (100:1)	RT, 14 hr, 100 V
5			10% (60:1)	RT, 14 hr, 100 V
6			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
7			14% (100:1)	RT, 14 hr, 100 V
8	HhaI	140 + 248	10% (37.5:1)	RT, 14 hr, 100 V
9			12% (30:1)	4°C, 16 hr, 150 V
10			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
11			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
12			10% (37.5:1)	4°C, 16 hr, 150 V
13			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
14			10% (37.5:1)	RT, 14 hr, 100 V
15	EaeI	186 + 164	14% (100:1)	RT, 14 hr, 100 V
16			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
17			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
NTRK3				
1	ScrFI	190 + 136	12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
2			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
3			14% (100:1)	4°C, 16 hr, 150 V
4			10% (37.5:1)	RT, 14 hr, 100 V
5			10% (37.5:1)	RT, 14 hr, 100 V
6			14% (100:1)	RT, 14 hr, 100 V
7			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
8	HinfI	149 + 192	10% (37.5:1)	RT, 14 hr, 100 V
9			10% (37.5:1)	RT, 14 hr, 100 V
10			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
11			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
12			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
13			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
14			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
15	RsaI	139 + 156	12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
16	BsmFI	168 + 129	14% (100:1)	RT, 14 hr, 100 V
17			12% (30:1)	RT, 14 hr, 100 V
18	Sau3AI	168 + 173		Sequencing

[1]PAA conc., polyacrylamide concentration.–[2]RT, room temperature.

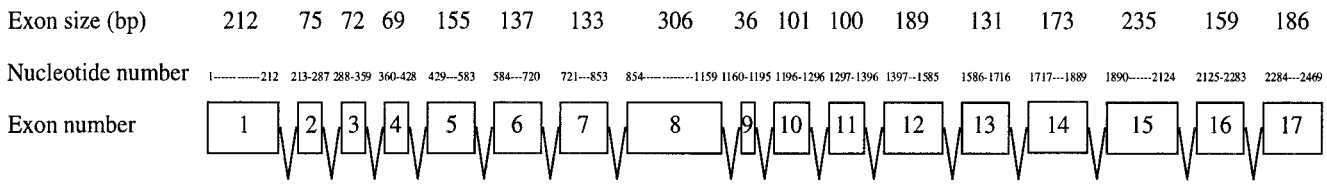


FIGURE 1 – Schematic representation of the genomic structure of *NTRK2.*

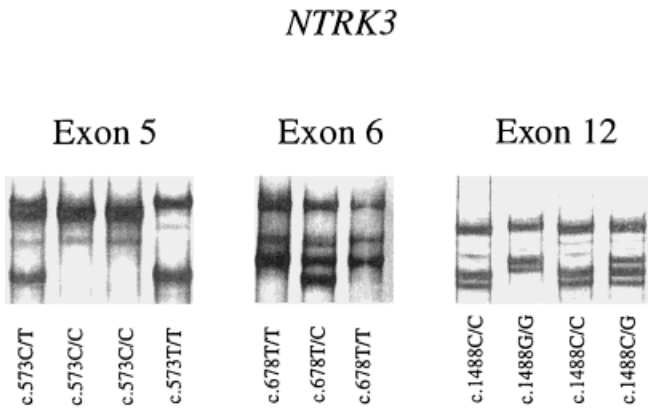


FIGURE 2 – SSCP showing exons with variant banding patterns of tumor DNA for *NTRK3.* The sequences of each of the variants are noted below each SSCP lane.

SSCP revealed a different banding pattern, the remaining PCR aliquot was subjected to purification and semi-automated sequencing as described above.

Statistical analysis

Each locus had 2 alleles or 2 chromosomes, so each case or tumor is comprised of 2 chromosomes or alleles at each polymorphic locus. For the statistical analysis, each allele at each locus was counted. Thus, for a total of 31 MTC cases, 62 total chromosomes or alleles are involved per locus.

Frequencies of polymorphic allelic variants were compared using the χ^2 statistic or Fisher's exact test, as previously employed.[10] A 2-tailed $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Genomic structure of NTRK2

As a result of long-range PCR followed by sequencing, BAC library screening and vectorette PCR, we found that *NTRK2* spans 17 exons varying in size from 36 to 306 bp (Fig. 1). Two out of several clones obtained by BAC screening, clone 11E18 (AC013261) obtained using the 5′ probe and clone 700N14 (no accession number) obtained using the 3′ probe, were subjected to sequence analysis. Clone 11E18 contained exons 1–5 of *NTRK2* and clone 700N14 contained exons 12–17 of *NTRK2.* Four other BAC clones in addition to these 2 contained all exons (the authors may be contacted for further details of exon coverage by these BACs).

Mutation analysis

SSCP analysis and direct sequencing of all 17 exons of *NTRK2* from 31 sporadic MTCs did not reveal any sequence variants. SSCP analysis of all 18 exons of *NTRK3* from 31 sporadic MTCs revealed variants in 3 exons (exons 5, 6 and 12; Fig. 2). Sequencing demonstrated 1 variant in each exon, c.573C>T (N191N), c.678T>C (N226N) and c.1488C>G (A496A) occurring in 31% (19 chromosomes), 2% (1 chromosome) and 39% (24 chromosomes) out of a total of 62 case chromosomes, respectively. Corresponding germline DNA was examined for the presence of each of these variants, and all were also present in the germline. There was a trend toward excess association of the *NTRK3* variant c.1488C>G (A496A) in cases (24/62 chromosomes, 39%) compared to controls (18/62, 29%), but this did not reach statistical significance ($p > 0.05$). The remaining 2 *NTRK3* variants occurred with similar frequencies between MTC cases and population-matched controls (19 *vs.* 17 and 1 *vs.* 0, $p > 0.05$).

DISCUSSION

In the present study, we determined the genomic structure of *NTRK2* and detected 3 novel sequence variants in *NTRK3.* We also determined the frequency of these sequence variants in patients with sporadic MTC and a matched control group.

McGregor *et al.*[17] examined the role of the Trk receptor tyrosine kinase family of neurotrophin receptors in MTC. They found that only a subset of normal C cells expresses Trk family receptors but that C-cell hyperplasias consistently express NTRK2, with variable expression of NTRK1 and NTRK3. In later stages of macroscopic MTC tumors, NTRK2 expression was clearly reduced, while NTRK3 expression was increased and often intense. In a previous study, we showed that somatic mutations in *NTRK1* are not common in sporadic MTCs.[10] In the present study, we did not find any somatic mutations of *NTRK2* and *NTRK3* in tumor DNA from 31 independent patients with sporadic MTC. Hence, we conclude that sequence variants in these genes are not likely to be responsible for differences in expression at the protein level, as previously reported.[17] Hence, some other mechanism must be found to explain the reduced expression of NTRK2 and the increased expression of NTRK3. BDNF, one of the ligands of NTRK2, down-regulated NTRK2 protein levels in cultured rat neuronal cell lines.[21,22] Whether the same mechanism is responsible for down-regulation of NTRK2 in advanced stages of MTC remains to be shown. Also of note, analyses of lymphocytes suggest that NTRK3 increases (speeds) progression through the cell cycle without affecting cell survival.[23] Therefore, increased expression of NTRK3 may have the same effect in later stages of MTC.

Although we did not find any somatic mutations of *NTRK2* or *NTRK3* in sporadic MTC or an association with sequence variants in this relatively small number of cases, the genomic structure of *NTRK2,* the SSCP conditions reported here and the knowledge of the frequency of various sequence variants may help in future mutation analyses of DNA from other neural and non-neural tissues that express NTRK2 or NTRK3.[23,24] It is our hope that independent studies of the TRK family in larger series will identify these as low-penetrance modifiers of sporadic MTC risk.

ACKNOWLEDGEMENTS

OG thanks Dr. S.M. Tanner for helpful discussions. The authors are grateful to J. Hall, K. Hammje, M. Sitte and I. Schwarz for technical assistance. This study was partially funded by P30CA16058 from the National Cancer Institute (to The Ohio State University Comprehensive Cancer Center) and generous donations from the Brown family in memory of Welton Brown and the Abrams family (to CE).

REFERENCES

1. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum Mol Genet 1993;2:851–6.
2. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2: International RET Mutation Consortium analysis. JAMA 1996;276:1575–9.
3. Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germline mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. Nature 1993;363:458–60.
4. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Healey CS, Frilling A, Raue F, et al. Mutation in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 19955;12:209–12.
5. Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson A-L, et al. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol 1996;44:249–57.
6. Zedenius J, Wallin G, Hamberger B, Nordenskjöld M, Weber G, Larsson C. Somatic and MEN 2A de novo mutations identified in the RET proto-oncogene by screening of sporadic MTCs. Hum Mol Genet 1994;3:1259–62.
7. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. J Clin Oncol 1999;17:380–93.
8. Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, et al. Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. Cancer Res 1996;56:2167–70.
9. Ceccherini I, Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Bocciardi R, Hofstra R, et al. Decreased frequency of a neutral sequence variant of the RET proto-oncogene in sporadic Hirschsprung disease. Am J Hum Genet 1999;65:A266.
10. Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PLM, Hoang-Vu C, Raue F, et al. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. Oncogene 1999;18:1369–70.
11. Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G. Trk-t1 is a novel oncogene formed by the fusion of tpr and trk genes in human papillary thyroid carcinomas. Oncogene 1992;7:237–42.
12. Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. Detection of a novel type of RET rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. Cancer Res 1998;58:198–203.
13. Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, et al. Molecular characterisation of RET/PTC3, a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. Oncogene 1990;9:509–16.
14. Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M, et al. The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. Mol Cell Biol 1995;15:6118–27.
15. Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, Borrello MG, Blutti MG, Pilotti S, et al. A t(10;17) translocation creates the RET/PTC2 chimeric transforming sequence in papillary thyroid carcinoma. Gene Chromosomes Cancer 1992;9:244–50.
16. Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum LM, et al. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). Genomics 1995;25:538–46.
17. McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, et al. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:267–72.
18. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PLM, Wang SI, Zheng Z, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet 1997;16:64–7.
19. Ichaso N, Rodriguez RE, Martin-Zanca D, Gonzalez-Sarmiento R. Genomic characterization of the trkc gene. Oncogene 1998;17:1871–5.
20. Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, et al. SSCP analysis: a blind sensitivity trial. Hum Mutat 1997;10:65–70.
21. Frank L, Ventimiglia R, Anderson K, Lindsay RM, Rudge JS. BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. Eur J Neurosci 1996;8:1220–30.
22. Sommerfeld MT, Schweigreiter R, Barde YA, Hoppe E. Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. J Biol Chem 2000;275:8982–90.
23. D'Onofrio M, Grazia UD, Morrone S, Guomo L, Spinsanti P, Frati L, et al. Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant b lymphocytes. Eur Cytokine Netw 2000;11:283–92.
24. Okazawa H, Kamei M, Imafuku I, Kanazawa I. Gene regulation of trkB and trkC in the chick retina by light/darkness exposure. Oncogene 1994;9:1813–8.

7.3 Originalarbeit 03:

Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PLM, Hoang-Vu C,
Raue F, Hinze R, Dralle H, Eng C

Over-representation of a germline *RET* sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic *RET* codon 918 mutation

Oncogene 1999;18:1369-1373

Oncogene (1999) 18, 1369–1373
© 1999 Stockton Press All rights reserved 0950–9232/99 $12.00
http://www.stockton-press.co.uk/onc

SHORT REPORT

Over-representation of a germline *RET* sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic *RET* codon 918 mutation

Oliver Gimm[1,2], Donna S, Neuberg[2], Debbie J Marsh[1,2], Patricia LM Dahia[1,2], Cuong Hoang-Vu[3], Friedhelm Raue[4], Raoul Hinze[5], Henning Dralle[3] and Charis Eng*[,1,2,6]

[1]*Human Cancer Genetics Program, Comprehensive Cancer Center, Ohio State University, 420 W. 12th Avenue, 690 MRF, Columbus, Ohio 43210, USA;* [2]*Dana-Farber Cancer Institute, Harvard University, Boston, Massachusetts 02115, USA;* [3]*Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Klinik für Allgemeinchirurgie, Ernst-Grube-Str. 40, 06097 Halle/Saale, Germany;* [4]*Endokrinologische Gemeinschaftspraxis, Brückenstraße 21, 69120 Heidelberg-Neuenheim, Germany;* [5]*Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pathologie, Magdeburger Str. 14, 06097 Halle/Saale, Germany;* [6]*Cancer Research Campaign Human Cancer Genetics Research Group, University of Cambridge, Cambridge CB2 2QQ, UK*

The aetiology of sporadic medullary thyroid carcinoma is unknown. About 50% harbour a somatic mutation at codon 918 of *RET* (M918T). To investigate whether other *RET* sequence variants may be associated with or predispose to the development of sporadic medullary thyroid carcinoma, we analysed genomic DNA from the germline and corresponding tumour from 50 patients to identify *RET* sequence variants. In one patient, tumour DNA showed a novel somatic 12 bp in-frame deletion in exon 15. More interestingly, we found that the rare polymorphism at codon 836 (c.2439C>T; S836S) occurred at a significantly higher frequency than that in control individuals without sporadic medullary thyroid carcinoma (Fisher's exact test, $P=0.03$). Further, among the nine evaluable cases with germline c.2439C/T, eight also had the somatic M918T mutation in MTC DNA which was more frequent than in patients with the more common c.2439C/C (89% vs 40%, respectively; Fisher's exact test, $P=0.01$). These findings suggest that the rare sequence variant at codon 836 may somehow play a role in the genesis of sporadic medullary thyroid carcinoma.

Keywords: tyrosine kinase; polymorphism; germline mutation; somatic mutation; medullary thyroid cancer

Medullary thyroid carcinoma (MTC) comprises approximately 5–10% of all thyroid malignancies (Bergholm *et al*., 1990). About 75% of all MTCs are believed to be sporadic (Bergholm *et al*., 1990; Raue *et al*., 1993), and the remaining 25% comprise the autosomal dominant multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) syndromes, MEN 2A, MEN 2B and familial MTC (Farndon *et al*., 1986; Schimke, 1984). Germline mutations of the *RET* proto-oncogene affecting exons 10, 11, 13, 14, 15 and 16 have been found to be associated with MEN 2 (Bolino *et al*., 1995; Carlson *et al*., 1994; Donis-Keller *et al*., 1993; Eng *et al*., 1994, 1995; Farndon *et al*., 1986; Gimm *et al*., 1997; Hofstra *et al*., 1994; Mulligan *et al*., 1993; Schimke, 1984; Smith *et al*., 1997). Specifically, germline mutation at codon 918 (M918T) in exon 16 is associated with >95% of MEN 2B (Eng *et al*., 1996), which is characterized by a more severe form of MTC and phaeochromocytoma occurring at a young age and classic stigmata such as ganglioneuromatosis and a marfanoid habitus. Functional, biochemical and limited animal modelling studies have demonstrated that the *RET* mutations which characterize MEN 2 are capable of activation, sometimes in a constitutive manner, of the RET signalling pathway (Borrello *et al*., 1995; Ceccherini *et al*., 1997; Michiels *et al*., 1997; Pasini *et al*., 1997; Santoro *et al*., 1995). The MEN 2B-type mutation, M918T, has been shown to alter substrate specificity (Borrello *et al*., 1995; Santoro *et al*., 1995; Songyang *et al*., 1995). Interestingly, a median of 50% of sporadic MTC harbour somatic M918T mutations (Eng and Mulligan, 1997). Despite our rapidly accumulating knowledge of the genetics and biochemistry of *RET*, it is not really known how M918T occurs. Further, while a number of the MEN 2- and MTC-associated *RET* mutations have been shown to be functionally significant, it is not known whether neutral sequence variants play other interacting, predisposing or modifying roles in the pathogenesis of MEN 2 or sporadic MEN 2-related tumours.

In this study, we analysed paired somatic and germline DNA from 50 sporadic MTC cases (German origin 38, US origin 12) to determine the frequency of somatic M918T and the frequency of other *RET* sequence variants in the germline of individuals versus race-matched, region-matched control individuals. Patients were classified as having sporadic MTC when no MEN 2-specific germline *RET* mutations could be identified. Clinically, none of the cases had family histories of MTC, phaeochromocytoma or parathyroid disease.

MTC tumour specimens were obtained from each of 36 patients and flash frozen in liquid nitrogen. In the remaining 14 patients, MTC samples were paraffin-embedded. All samples were obtained with informed consent. Blood and tumour DNA were extracted using the QIAamp tissue kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA).

*Correspondence: C Eng, Human Cancer Genetics Program, Comprehensive Cancer Center, Ohio State University, 420 W. 12th Avenue, 690 MRF, Columbus, Ohio 43210, Ohio, USA
Received 6 July 1998; revised 9 September 1998; accepted 9 September 1998

To screen for the presence of somatic M918T in each of these tumours, exon 16 amplicons were prepared using either fRET16 and rRET16 (Hofstra *et al*., 1994) or CRT5H and CRT5G (Eng *et al*., 1994) and PCR conditions as previously described. An additional second-round PCR using identical conditions was performed using primers designed to introduce a *Rsa*I restriction site in the presence of the codon M918T mutation (Marsh *et al*., 1996). Overnight digestion of the f16Rsa-generated exon 16 amplicon was then performed with an excess of the restriction endonuclease *Rsa*I (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA). Additionally, overnight digestion of the f16Rsa-generated PCR product was also performed with an excess of the restriction endonuclease *Sau*3AI as a control for digestion. Of 50 sporadic MTCs, 25 (50%) were found to have somatic M918T, a frequency similar to that reported in the literature (Eng and Mulligan, 1997). M918T was shown to be absent in the corresponding germline DNA. Semi-automated sequence analysis (Liaw *et al*., 1997) of purified exon 16 amplicons (Wizard PCR Prep, Promega, Madison, WI, USA) in the remaining 25 tumours confirmed the absence of M918T. No other sequence variants were noted in exon 16.

In an attempt to search for additional somatic mutations in these MTC, PCR amplicons of exons 13–15 were subjected to direct sequencing. We did detect a somatic 12-bp deletion in exon 15, which was absent in the germline. This novel mutation, c.2622/3/4/5-2633/4/5/6del12 (because of repetitive sequences, it was impossible to determine which of four possible combinations of 12 nucleotides had been deleted) results in a 4-amino acid in-frame deletion (RDVYEE to RE).

We next turned our attention to examining the frequency of seven known *RET* sequence variants/polymorphisms in the germline of the 50 sporadic MTC patients and comparing them to that in race- and region-matched normal controls. The frequencies of both alleles at six of the seven polymorphic sites were similar in cases and controls (Table 1). Of interest, we found an over-representation of a rare sequence variant, c.2439C>T/S836S (exon 14), in the germline of patients with sporadic MTC (Table 1). In one case, neither sequence analysis nor restriction analysis could clearly delineate the presence or absence of the c.2439C>T sequence variant in the germline despite multiple repetitions. Therefore, this case was excluded for the purpose of statistical analyses. Of 49 evaluable patients, nine had the heterozygous germline sequence variant c.2439C>T (9%, i.e. 9T:89C). Analysis of 140 chromosomes from 70 race-matched, region-matched control patients (German origin 50, US origin 20) demonstrated the presence of the T sequence variant in 5 (3.6%) alleles (data not shown). The 3.6% allele frequency in our controls is similar to the 3.7% in 188 French alleles reported in the literature (Rodien *et al*., 1997). Therefore, the 9% T allele frequency in our cohort of MTC patients is significantly higher than that occurring in controls without MTC (Fisher's exact test, $P=0.03$). Further, eight of those nine patients who carried the rare sequence variant at codon 836 (c.2439C>T) also had tumours with somatic M918T mutation (c.2684T>C). The association of the c.2439C>T sequence variant and the presence of somatic M918T in corresponding tumours is also statistically significant (Table 2, Fisher's exact test, $P=0.01$).

To determine whether the c.2439T variant lies on the same allele as the M918T mutation, we used genomic DNA extracted from seven flash frozen tumours and

Table 2 Association of the germline (c.2439C>T) sequence variant and the presence of somatic M918T in corresponding tumour DNA in 49 patients with sporadic MTC

	836 wildtype (c.2439C)	*836 variant (c.2439T)*
918 wildtype (c.2684T)	24	1
M918T mutant (c.2684C)	16	8

(Fisher's exact test, $P=0.01$)

Table 1 Polymorphic nucleotide changes of *RET* in sporadic MTC[a]

Exon	*Nucleotide change/codon*	*Restriction site changed*	*MTC alleles tested*	*MTC allele 1[b] frequency*	*Control allele 1[b] frequency*
2[c]	GCG->GCA A45A	*Eag*I	96	30%	29%
3	GTC->GTA V125V	*Sau*3AI	86	3%	2%
7	GCG->GCA A432A	*Bsm*I	96	75%	71%
11	GGT->AGT G691S	*Ban*I	94	23%	21%
13	CTT->CTG L769L	*Taq*I	96	26%	26%
14	AGC->AGT S836S	*Alu*I	98	**9%**	**3.7%**
15	TCC->TCG S904S	*Rsa*I	94	80%	79%

[a]All polymorphic variant frequencies are similar to that for controls reported in the literature except for S836S where the frequency in the literature as well as that in our control population is 3.7 and 3.6% respectively (see text for details). [b]Allele 1 is always defined as the one with the restriction site absent. [c]PCR conditions and primers have been previously described (Mulligan *et al*., 1994), except for primers used to amplify exon 3: f3-Sau3AI (5′-CTTTCCCCTGCTCACCGTCTACCTCAAGAT-3′), and exon 7: RET-7R (5′-TTGTACTGGACGTTGATGCC-3′)

performed long distance PCR encompassing *RET* exons 14, 15 and 16. This analysis could not be done in the remaining two tumours because they were paraffin-embedded and a fragment of about 2.5 kb could not be amplified. Long distance PCR was performed using 100–200 ng of genomic DNA template, 0.4 μM of primer CRT4N, 0.4 μM of primer M918T-R (5′-AAAAGGGATTCAATTGCCG-3′), and the TaKaRa LA PCR Kit Ver 2 (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Japan): 1 × PCR buffer, 8 μl of dNTP, and 0.5 μl LA *Taq* in a final volume of 50 μl. The PCR was hot started at 94°C for 2 min, after which the LA *Taq* was added, followed by 30 cycles of 20 s at 98°C, 30 s at 62°C, and 15 min at 68°C, and a final extension of 10 min at 72°C. The forward primer CRT4N was positioned in intron 13 upstream of codon 836. The novel M918T-R primer was designed such that it would anneal to the template only in the presence of the M918T (c.2684T>C) mutation. Under these PCR conditions, therefore, the primer M918T-R was shown to amplify only the allele carrying the mutation M918T (c.2684T>C). This was a method for selecting for only the allele bearing M918T (Figures 1 and 2a). Sequence analysis of this long distance amplicon confirmed the homogenous presence of only the M918T (ACG) allele in all instances (data not shown). Using this allele-specific PCR product as template, a second round PCR was performed using the exon 14-specific primers CRT4N and CRT4K. This exon 14 amplicon was subjected to *Alu*I digestion. In the presence of the c.2439C wildtype sequence, *Alu*I would digest the amplicon. In contrast, in the presence of the variant (c.2439T) allele, *Alu*I would not digest the amplicon. Of the 7 M918T-specific exon 14 amplicons generated, five were not digested by this enzyme and thus contained the c.2439T variant, while two were completely digested and thus, was shown to contain the c.2439C wildtype sequence (Figure 2a). In summary, the c.2439C>T variant was on the same allele as the M918T mutation in five MTCs while in the remaining two cases, the T variant and the M918T mutation were on opposite alleles.

In sum, only the c.2439C>T variant appeared to be over-represented in sporadic MTC cases compared to geographic controls. More interestingly, eight of the nine patients with the C/T variant also had somatic M918T. This variant at codon 836 has been described in the literature with a frequency of 3.7% (Rodien *et al*., 1997), which is very similar to the frequency of 3.6% which we found among our 140 control alleles. One could argue that the higher incidence of this sequence variant in patients with MTC in our study is an artefact secondary to small sample size. However, the frequencies of all other sequence polymorphisms noted in our series of MTC patients were similar to those previously reported by others (Ceccherini *et al*., 1994). These observations argue strongly against the S836S-M918T association as coincidence due to small sample size and suggest that the association of the germline c.2439C>T variant is somehow related to somatic M918T and the pathogenesis of a subset of sporadic MTC. If the germline c.2439C>T variant is associated with the development of MTC, i.e., a low penetrance allele, then, it may be postulated, without experimental evidence thus far, that some instances of 'FMTC', especially families which comprise only two affected cases, might be due to the presence of this low penetrance allele and not the classic FMTC mutations. If this was true, such 'small' FMTC families should have germline S836S, no typical MEN 2 type mutation, and the MTC tumour should have somatic M918T. Anecdotally, one FMTC family with no classic MEN 2-type *RET* mutations had the germline c.2439C>T variant which appeared to segregate with disease (Gimm and Eng, unpublished observations). Obviously, a concerted effort, perhaps by the Interna-

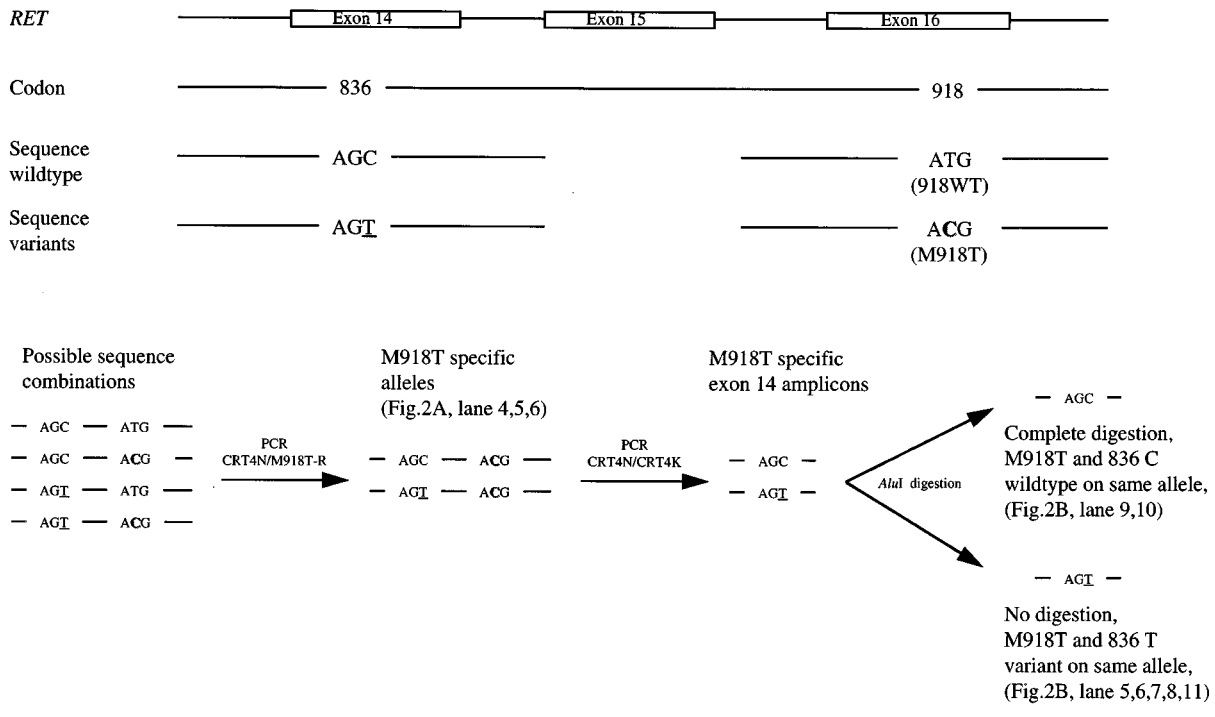


Figure 1 Algorithm to determine whether the S836S T variant lies on the same allele as the M918T (ACG) mutation

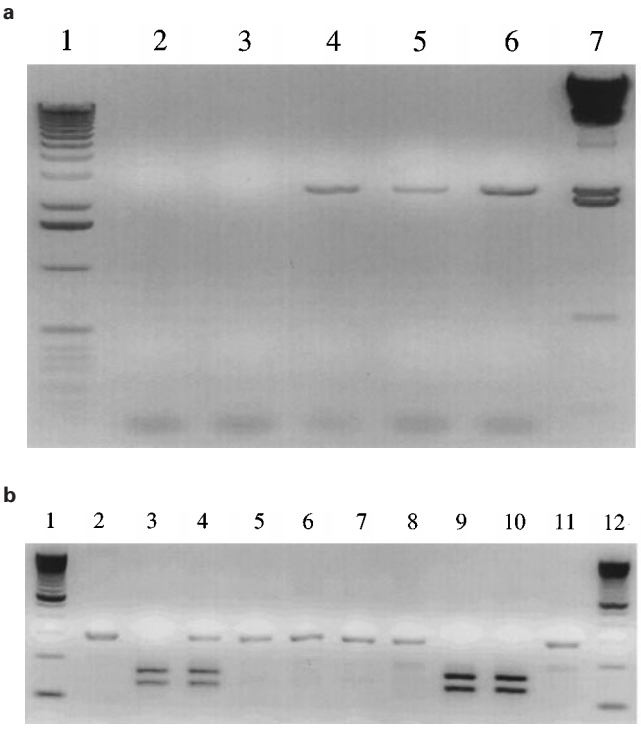


Figure 2 Determination of whether S836S T and M918T lie on the same allele. (**a**) Long distance PCR using primers CRT4N and M918T-R (see text). Lane 1, 1 kb DNA ladder (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); lanes 2 and 3, two samples negative for M918T mutation (− PCR product), lanes 4 and 5, DNA samples from MTCs with somatic M918T mutation (+ PCR product); lane 6, DNA with known germline M918T mutation (MEN 2B patient, + PCR product), lane 7, λ DNA/*Hind*III ladder (Gibco). (**b**) *Alu*I restriction digestion of exon 14 amplicons (see text). Lane 1, 100 bp DNA ladder (Gibco); lane 2, exon 14 amplicon, undigested; lane 3, S836S wildtype C allele (completely digested); lane 4, control exon 14 amplicon containing heterozygous (c.2439C>T) sequence (complete digestion of only the C allele); lanes 5–11, M918T-enriched exon 14 amplicons; lanes 5, 6, 7, 8, and 11, M918T allele specific exon 14 amplicon homozygous for the (c.2439T) variant (no digestion); lanes 9 and 10, two MTC samples with M918T-specific exon 14 amplicon homozygous for (c.2439C) variant (completely digested); lane 12, 100 bp DNA ladder (Gibco)

tional *RET* Mutation Consortium would be needed to prove this postulate with adequate statistical power.

The precise mechanism by which c.2439T and M918T may interact in sporadic MTC genesis is unknown and open to speculation. Since this sequence variant does not lead to an amino acid alteration, S836S, it is difficult to imagine how this conserved polymorphism may affect RET. However, it is conceivable that the sequence variant c.2439T enhances the expression of *RET*. In this regard, it has been shown that polymorphic sequence variants can lead to production of different amounts of mRNA (Leviev *et al*., 1997). At the nucleotide level, several possibilities exist. One might hypothesize that the AGC>AGT polymorphism causes the creation of a cryptic splice donor, splice acceptor or splice enhancer, therefore, leading to an altered protein. There is precedent in this regard. For example, alternative splicing of the human growth hormone transcript might be the result of an unusual polymorphism (Stallings-Mann *et al*., 1996). Differential splicing of episialin mRNA has been shown to be dictated by a single exonic nucleotide polymorphism (Ligtenberg *et al*., 1991). Further data demonstrate that a splice site-associated polymorphism in the tuberous sclerosis 2 (*TSC2*) gene may predispose to the development of sporadic gangliogliomas (Platten *et al*., 1997). Similar mechanisms are conceivable in alternative splicing of *RET* mRNA. Unfortunately, cDNA was not available in our patients and this postulate remains speculative.

The observation of the germline c.2439T variant in both *cis* and *trans* with the somatic M918T mutation must also be explained. In five patients, it appears that the somatic M918T mutation occurs on the c.2439T allele rather than in the wildtype allele. In this situation, the c.2439T variant may create an unstable sequence downstream at codon 918, resulting in the somatic M918T mutation instead of directly participating in the tumourigenic process. Such a mechanism has been observed in the *APC* gene in a fraction (28%) of Ashkenazim with familial colorectal cancer where additional somatic mutations were more often found on that allele carrying a seemingly innocuous germline missense mutation predicted to result in a conservative amino acid change (I1307K) (Laken *et al*., 1997). Although a plausible explanation when the c.2439T and M918T variants are on the same allele, this mechanism cannot explain the origin of the somatic M918T mutation in *trans* with the c.2439T variant in the remaining two patients. Finally, the apparent preference of the M918T mutation to occur on the c.2439T allele might be due to the small sample size.

While our data suggest that a neutral germline sequence variance *RET* may somehow predispose to sporadic MTC, especially those that harbour somatic M918T, it remains for further largescale molecular epidemiologic studies to determine if this is a phenomenon generalizable to different populations and for functional analyses to prove that this variant indeed contributes to the MTC phenotype.

Acknowledgements
The authors thank K Hammje, M Sitte and I Schwarz for technical assistance. The Dana-Farber Cancer Institute Molecular Biology Core Facility is acknowledged for running the sequence gels. This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to OG) and a Barr Investigatorship (to CE). CE is the Lawrence and Susan Marx Investigator in Human Cancer Genetics.

References

Bergholm U, Adami HO, Telenius-Berg M, Johansson H and Wilander E. (1990). *Acta. Oncol.,* **29,** 9–15.

Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, Seri M, Silengo M, Tocco T, Chabrier G, Houdent C, Murat A, Schlumberger M, Tournaire J, Lenoir GM and Romeo G. (1995). *Oncogene,* **10,** 2415–2419.

Borrello MG, Smith DP, Pasini B, Bongarzone I, Greco A, Lorenzo MJ, Arighi E, Miranda C, Eng C, Alberti L, Bocciardi R, Mondellini P, Scopsi L, Romeo G, Bonder BAJ and Pierotti MA. (1995). *Oncogene,* **11,** 2419–2427.

Carlson KM, Bracamontes J, Jackson CE, Clark R, Lacroix A, Wells Jr, SA and Goodfellow PJ. (1994). *Am. J. Hum. Genet.,* **55,** 1076 – 1082.

Ceccherini I, Hofstra RM, Luo Y, Stulp RP, Barone V, Stelwagen T, Bocciardi R, Nijveen H, Bolino A, Seri M, Ronchetto P, Pasini B, Bozzano M, Buys CHCM and Romeo G. (1994). *Oncogene,* **9,** 3025 – 3029.

Ceccherini I, Pasini B, Pacini F, Gullo M, Bongarzone I, Romei C, Santamaria G, Matera I, Mondellini P, Scopsi L, Pinchera A, Pierotti MA and Romeo G. (1997). *Oncogene,* **14,** 2609 – 2612.

Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P and Wells Jr SA. (1993). *Hum. Mol. Genet.,* **2,** 851 – 856.

Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, Ploos van Amstel HK, Lips CJM, Nishisho I, Takai S-I, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjöld M, Komminoth P, Hendy GN, Gharib H, Thibodeou SN, Lacroix A, Frilling A, Ponder BAJ and Mulligan LM. (1996). *Jama,* **276,** 1575 – 1579.

Eng C and Mulligan LM. (1997). *Hum. Mutat.,* **9,** 97 – 109.

Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Healey CS, Zvelebil MJ, Stonehouse TJ, Ponder MA, Jackson CE, Waterfield MD and Ponder BA. (1995). *Oncogene,* **10,** 509 – 513.

Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, Gardner E, Scheumann GF, Jackson CE, Tunnacliffe A, Ponder BAJ. (1994). *Hum. Mol. Genet.,* **3,** 237 – 241.

Farndon JR, Leight GS, Dilley WG, Baylin SB, Smallridge RC, Harrison TS and Wells Jr SA. (1986). *Br. J. Surg.,* **73,** 278 – 281.

Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dahia PL, Mulligan LM, Zajac JD, Robinson BG and Eng C. (1997). *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **82,** 3902 – 3904.

Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Höppener JW, Ploos van Amstel HK, Romeo G, Lips CJM and Buys CHCM. (1994). *Nature,* **367,** 375 – 376.

Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D, Jhanwar S, Winawer S, Offit K, Luce MC, Kinzler KW and Vogelstein B. (1997). *Nat. Genet.,* **17,** 79 – 83.

Leviev I, Negro F and James RW. (1997). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,* **17,** 2935 – 2939.

Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C and Parsons R. (1997). *Nat. Genet.,* **16,** 64 – 67.

Ligtenberg MJ, Gennissen AM, Vos HL and Hilkens J. (1991). *Nucleic Acids Res.,* **19,** 297 – 301.

Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson AL, Delbridge L, Eng C and Robinson BG. (1996). *Clin. Endocrinol.,* **44,** 249 – 257.

Michiels FM, Chappuis S, Caillou B, Pasini A, Talbot M, Monier R, Lenoir GM, Feunteun J and Billaud M. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **94,** 3330 – 3335.

Mulligan LM, Eng C, Attie T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ, Robinson BG, Frilling A, Verellen-Dumoulin C, Safar A, Venter DJ, Munnich A and Ponder BAJ. (1994). *Hum. Mol. Genet.,* **3,** 2163 – 2167.

Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Tunnicliffe A and Ponder BAJ. (1993). *Nature,* **363,** 458 – 460.

Pasini A, Geneste O, Legrand P, Schlumberger M, Rossel M, Fournier L, Rudkin BB, Schuffenecker I, Lenoir GM and Billaud M. (1997). *Oncogene,* **15,** 393 – 402.

Platten M, Meyer-Puttlitz B, Blumcke I, Waha A, Wolf HK, Nothen MM, Louis DN, Sampson JR and von Deimling A. (1997). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* **56,** 806 – 810.

Raue F, Kotzerke J, Reinwein D, Schröder S, Röher HD, Deckart H, Höfer R, Ritter M, Seif F, Buhr H, Beyer J, Schober O, Becker W, Neumann H, Calvi J, Winter J and Vogt H. (1993). *Clin. Invest.* **71,** 7 – 12.

Rodien P, Jeunemaitre X, Dumont C, Beldjord C and Plouin PF. (1997). *Horm Res.,* **47,** 263 – 268.

Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco A, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH and DiFiore PP. (1995). *Science,* **267,** 381 – 383.

Schimke RN. (1984). *Annu. Rev. Med.,* **35,** 25 – 31.

Smith DP, Houghton C and Ponder BA. (1997). *Oncogene,* **15,** 1213 – 1217.

Songyang Z, Carraway KL, Eck MJ, Harrison SC, Feldman RA, Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR, Smith DP, Eng C, Lorenzo MJ, Ponder BA, Mayer BJ and Cantley LC. (1995). *Nature,* **373,** 536 – 539.

Stallings-Mann ML, Ludwiczak RL, Klinger KW and Rottman F. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **93,** 12394 – 12399.

7.4 Originalarbeit 04:

Gimm O, Dziema H, Brown J, Hoang-Vu C, Hinze R,
Dralle H, Mulligan LM, Eng C

Over-representation of a germline variant in the gene encoding RET co-receptor GFRα-1 but not GFRα-2 or GFRα-3 in cases with sporadic medullary thyroid carcinoma

Oncogene 2001; 20:2161-2170

Oncogene (2001) 20, 2161–2170
© 2001 Nature Publishing Group All rights reserved 0950–9232/01 $15.00
www.nature.com/onc

Over-representation of a germline variant in the gene encoding RET co-receptor GFRα-1 but not GFRα-2 or GFRα-3 in cases with sporadic medullary thyroid carcinoma

Oliver Gimm[1], Heather Dziema[1], Jessica Brown[1], Cuong Hoang-Vu[2], Raoul Hinze[3], Henning Dralle[2], Lois M Mulligan[4,5] and Charis Eng*[,1,6]

[1]*Clinical Cancer Genetics and Human Cancer Genetics Programs, Comprehensive Cancer Centre, and Division of Human Genetics, Department of Internal Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio, OH 43210, USA;* [2]*Department of General Surgery, Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany;* [3]*Institute of Pathology, Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany;* [4]*Department of Pathology, Queen's University, Kingston, Ontario, ON K7L 3NR, Canada;* [5]*Department of Paediatrics, Queen's University, Kingston, Ontario, ON K7L 3NR, Canada;* [6]*Cancer Research Campaign Human Cancer Genetics Research Group, University of Cambridge, Cambridge CB2 2QQ, UK*

In contrast to the hereditary form of medullary thyroid carcinoma (MTC), little is known about the etiology of sporadic MTC. Somatic gain-of-function mutations in the *RET* proto-oncogene, encoding a receptor tyrosine kinase, are found in an average of 40% of sporadic MTC. We analysed 31 sporadic MTC for somatic and germline variants in *GFRA1, GFRA2* and *GFRA3* which encode the co-receptors of RET. Although there were no somatic mutations in any of the three genes, a sequence variant (−193C>G) in the 5′-UTR of *GFRA1* was found in 15% of cases. Three patients were heterozygous (het); another three patients homozygous (hom) for the G variant. The G allele was not observed in 31 race-matched normal controls. Hence, the relative frequency of this variant in sporadic MTC cases and controls differed significantly ($P<0.05$). Since this variant lies in the 5′ UTR, likely at the transcriptional start site, we analysed for differential expression of GFRα-1 at the transcript and protein levels. At the mRNA level, *GFRA1* was over-expressed in tumors harboring the rare variant ($P=0.06$). The presence of the G polymorphic allele seemed to be associated with increased expression by immunostaining for GFRα-1. Interestingly, cytoplasmic staining was stronger in intensity for het patients and nuclear staining predominant in hom cases. In conclusion, mutation analysis of *GFRA1, GFRA2* and *GFRA3* revealed over-representation of a rare variant in *GFRA1* (−193C>G) in the germline of sporadic MTC cases. Our data suggest that the mechanism is related to over-expression of GFRα-1 and differential subcellular compartmentalization but the precise mechanism as to how it acts as a low penetrance susceptibility allele for the development of sporadic MTC remains to be elucidated. *Oncogene* (2001) **20,** 2161–2170.

*Correspondence: C Eng, Human Cancer Genetics Program, The Ohio State University, 420 W. 12th Avenue, Suite 690 TMRF, Columbus, OH 43210, USA
Received 2 November 2000; revised 16 January 2001; accepted 18 January 2001

Keywords: MEN 2; RET; common low penetrance alleles; polymorphisms; thyroid

Introduction

Medullary thyroid carcinoma (MTC) accounts for 5–10% of all thyroid malignancies. About 25% are hereditary, the etiology of which is well known. Germline gain-of-function mutations in the *RET* proto-oncogene, encoding a receptor tyrosine kinase (Takahashi and Cooper, 1987), cause the inherited multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) syndromes, MEN 2A, MEN 2B and familial MTC (Carlson *et al*., 1994; Donis-Keller *et al*., 1993; Eng *et al*., 1994, 1996a; Hofstra *et al*., 1994; Mulligan *et al*., 1993). As of 1996, germline *RET* mutations have been described in 92% of all MTC with a hereditary background (Eng *et al*., 1996a). Further work in the intervening 4 years suggest that >95% of all MEN 2 have demonstrable germline *RET* mutations. In contrast, little is known about the etiology of the majority (75%) of all MTC, which are sporadic. Depending on the method used and perhaps the region of origin, somatic *RET* mutations, predominantly M918T, are found in about 30–70% of sporadic MTC (Eng and Mulligan, 1997). However, mutation analysis in subpopulations of sporadic MTC showed that these somatic mutations are heterogeneously present (Eng *et al*., 1996b). It was, therefore, postulated that they might occur during tumor evolution rather than being the initiating step. A rare sequence variant in exon 14 (S836S) has been found to be over-represented in patients with sporadic MTC when compared to geographically matched control groups (Ceccherini *et al*., 1999; Gimm *et al*., 1999c). The precise mechanism remains to be elucidated.

Physiologic RET activation requires binding with ligand and co-receptor. One of four related ligands, GDNF, NTN, PSP, and ART, needs to interact with

one of four glycosyl-phosphoinositol (GPI)-linked co-receptors, GFRα-1, GFRα-2, GFRα-3 and GFRα-4, before the heterotetrameric complex can bind RET (Baloh *et al*., 1998; Durbec *et al*., 1996; Enokido *et al*., 1998; Jing *et al*., 1996, 1997; Kotzbauer *et al*., 1996; Milbrandt *et al*., 1998; Thompson *et al*., 1998; Trupp *et al*., 1996). Recently, another ligand, Enovin (EVN), was described but EVN is identical to ART (Masure *et al*., 1999). While each ligand preferentially binds to one co-receptor, low affinity interactions with other co-receptors has also been noted for some ligands *in vitro* (Baloh *et al*., 1998; Enokido *et al*., 1998; Jing *et al*., 1997; Klein *et al*., 1997; Milbrandt *et al*., 1998; Sanicola *et al*., 1997; Trupp *et al*., 1998). Activation of RET in this manner plays a significant role during human development (Sanchez *et al*., 1996; Schuchardt *et al*., 1994) but may also be important during adulthood (Masure *et al*., 1999). There is also growing evidence that RET, each of the ligands and each of the co-receptors are differentially expressed in a tissue-specific and time-specific manner (Airaksinen *et al*., 1999; Baloh *et al*., 2000; Jing *et al*., 1997; Masure *et al*., 1999; Naveilhan *et al*., 1998; Sanicola *et al*., 1997).

If gain-of-function *RET* mutations are associated with human MTC, then it is equally plausible that mutations in the gene encoding one of the human co-receptor homologues, GFRα-1, GFRα-2 or GFRα-3, could play a role in the pathogenesis of MTC. Hence, we sought to examine the presence of high penetrance somatic mutations or low penetrance germline variants in the genes encoding the three human co-receptors in sporadic MTC.

Results

Mutation analysis of GFRA1, GFRA2 and GFRA3

Mutation analysis of all coding exons and flanking intronic sequences of *GFRA1*, *GFRA2* and *GFRA3* of genomic DNA from 31 sporadic MTC tumors revealed six variants in *GFRA1*, one variant in *GFRA2* and two variants in *GFRA3* (Table 3; Figure 1). Corresponding germline DNA was examined for the presence of each of these variants, and all were also present in the germline. The frequencies of two variants in *GFRA1* differed significantly from those in a race-matched control group (Table 1). The variant c.537C>T (N179N; exon 4) was under-represented in sporadic MTC when compared to the normal controls ($P<0.05$). We analysed whether this sequence variant correlates with the presence of an alternatively spliced exon between exon 3 and exon 4 (Myers *et al*., 1999) but did not confirm this hypothesis (data not shown). The other sequence variant (−193C>G) lies in the 5′UTR likely at or near to the transcriptional start site. This sequence variant is normally very rare (Myers *et al*., 1999) and was not found among 62 race-matched control alleles in this study. In contrast, among 62 MTC alleles, nine carried the polymorphic G allele at nucleotide −193. Thus, this G variant was heterozygously present in three patients and homozygously present in another three patients with sporadic MTC (Table 2, $P<0.05$).

GFRA1 expression analyses

Because we felt that the C/G variation at −193 might affect transcription, we performed semi-quantitative duplex PCR comparing *GFRA1* to the housekeeping gene GPI to analyse whether any correlation exists between *GFRA1* mRNA levels and the sequence at position −193 (Figure 2). *GFRA1* expression at the mRNA level was seen in all 10 tumors that had RNA available. Interestingly, the heterozygous presence of the rare sequence variant −193C>G seemed to be an associative trend with higher *GFRA1* transcript levels ($P=0.06$). Unfortunately, no cDNA was available from those three patients with homozygous −193G/G variant.

We then analysed the expression of GFRα-1 at the protein level by immunohistochemistry (Table 2,

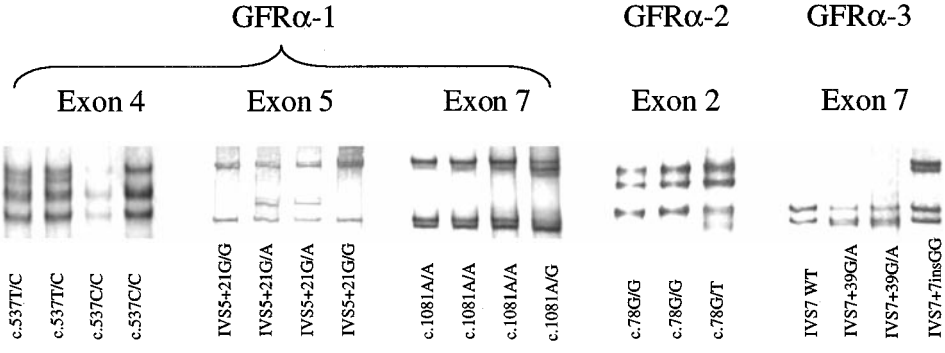


Figure 1 SSCP showing exons with variant band patterns in tumor-derived DNA for *GFRA1*, *GFRA2* and *GFRA3*, respectively. The corresponding sequencing results are depicted below

Table 1 Sequence variants in *GFRA1*, *GFRA2* and *GFRA3* identified in patients with sporadic MTC (sporadic MTC) vs controls

Exon	*Nucleotide change/ Amino acid change*	*Allele frequency (%)*[a] *Sporadic MTC*	*Controls*	*Literature*[c]	P *value*[b]
GFRA1					
N/A	−193C>G N/A	15	0	2–7	<0.05
N/A	−106G>A N/A	8	8	4–7	n.s.
N/A	−78T>C N/A	24	32	31–33	n.s.
4	537T>C N179N	35	55	40–46	<0.05
5	IVS5+21G>A N/A	8	5	8–18	n.s.
7	1081A>G T361A	3	7	7–12	n.s.
GFRA2					
2	78G>T L26L	2	0	n.r.	n.s.
GFRA3					
7	IVS7+39G>A N/A	13	7	n.r.	n.s
7	IVS7+7insGG N/A	2	2	0–2	n.s.

[a]Frequency of the less frequent sequence variant. [b]*P* value comparing the frequency in MTS vs controls. [c]Frequency according to Gimm *et al*., 1999a; Myers *et al*., 1999; Onochie *et al*., 2000). n.r., not reported; n.s., not significant; MTC, medullary thyroid carcinoma

Table 2 Correlation between the −193 sequence variant and *GFRA1* expression, at the transcript and immunohistochemical levels

Patient #	*RET*[b] *S836S*	*M918T*	*GFRA1 −193 sequence*	*GFRα−1 mRNA*[a]	*Immunohistochemistry Cytoplasm*	*Nucleus*
1	WT	WT	WT	n.d.	+	+/++
2	WT	WT	−193C/G	n.d.	++	+/++
3	WT	M918T	WT	n.d.	++	+
4	WT	WT	WT	0.625	++	+
5	S836S	M918T	WT	0.792	++	+
6	WT	WT	WT	n.d.	++/+++	++
7	WT	M918T	WT	0.444	+/++	+/++
8	S836S	M918T	−193G/G	n.d.	+	+++
9	WT	WT	−193G/G	n.d.	++	+++
10	WT	WT	WT	n.d.	+/++	++/+++
11	WT	M918T	WT	0.456	++	+/++
12	S836S	M918T	−193C/G	0.837	++	++
13	S836S	M918T	−193C/G	0.568	++	+
14	WT	M918T	WT	n.d.	++	+
15	S836S	M918T	WT	0.342	−/+	+
16	WT	WT	WT	n.d.	++	+
17	WT	WT	WT	n.d.	++	++/+++
18	WT	WT	WT	n.d.	+++	++
19	WT	WT	WT	0.410	+	+/++
20	WT	WT	WT	0.514	+/++	++/+++
21	S836S	M918T	WT	n.d.	++	+/++
22	WT	WT	WT	n.d.	+/++	+/++
23	WT	M918T	WT	n.d.	−/+	+
24	WT	WT	WT	n.d.	n.d.	n.d.
25	WT	WT	WT	n.d.	n.d.	n.d.
26	WT	M918T	−193G/G	n.d.	++	+++
27	WT	WT	WT	n.d.	++	+
28	WT	WT	WT	n.d.	+	+
29	S836S	M918T	WT	n.d.	++	+/++
30	WT	M918T	WT	0.312	−/+	+/++
31	WT	M918T	WT	n.d.	++	+

WT, wild-type; n.d., not done. [a]*GFRA1* compared to GPI mRNA levels (see also Figure 3). [b]Results have been published (S836S is germline, M918T is somatic) (Gimm *et al*., 1999c)

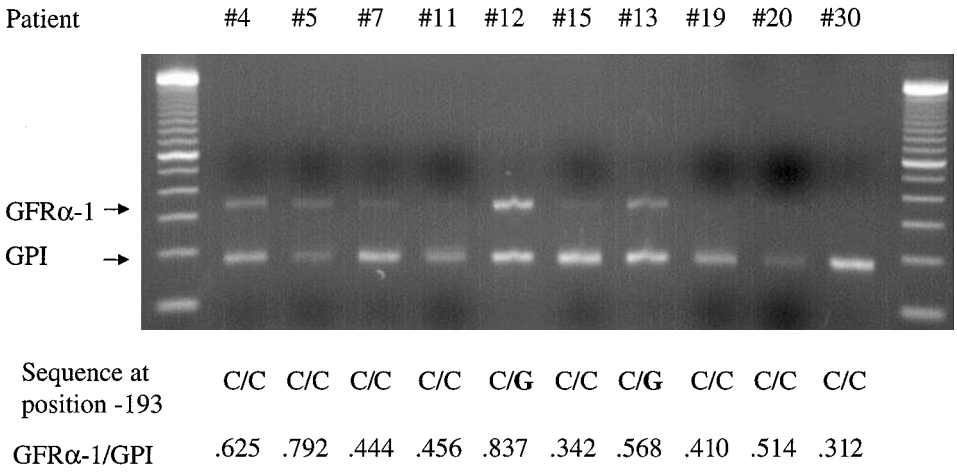


Figure 2 Ethidium-bromide stained agaros gel of duplex RT–PCR products. *GFRA1* and a housekeeping gene, GPI, were co-amplified from DNA extracted from each of 10 sporadic MTC. *GFRA1* mRNA levels were higher (mean 0.7025) in cases with the −193C/G sequence variant versus those with wild-type −193C/C (mean 0.4869) when compared to the housekeeping gene GPI ($P=0.065$, one-tailed *t*-test); *NA, see Table 2

Figure 3). Overall, in agreement with the *GFRA1* mRNA levels, at least weak expression of GFRα-1 protein was noted in all tumors. Generally, cytoplasmic staining was weak to moderate while nuclear staining varied from weak to strong (Table 2). Interestingly, tumors from all three patients with homozygous −193G/G showed strong nuclear staining intensity while cytoplasmic staining intensity was weak to moderate (Figure 3a–c). The histopathologic appearance of these three tumors was remarkable in that there were many apoptotic cells present, perhaps indicating a fast-growing tumor. The three tumors with heterozygous −193C/G showed moderate cytoplasmic staining intensity (Figure 3d–f). Apoptotic cells were only seen occasionally. In contrast, most tumors with the wild-type −193C/C showed rather weak GFRα-1 staining (Figure 3g–i). However, there were a few exceptions (Table 2), i.e. tumors wild-type at position −193 (C/C) and moderate or strong cytoplasmic and/or nuclear staining (Figure 3k–m). Apoptotic cells were rarely observed among tumors with the wild-type −193C/C.

GFRα-1 expression was not associated with the presence of any of the other polymorphic sequence variants in *GFRA1*, *GFRA2*, and *GFRA3* (data not shown). As shown in Table 2, GFRA1 expression neither correlated with the presence of the somatic M918T mutation nor the germline S836S sequence variant. However, among the 25 tumors wild-type at position −193 in *GFRA1*, two tumors (Patient #6 and #18, Table 2 and Figure 3l) showed strong cytoplasmic and three others (Patient #10, #17, #20) strong nuclear staining intensity for GFRα-1, patterns normally seen in the presence of the −193 variant. All these five tumors harbored the wild-type sequence at codons 836 and 918 of RET. In contrast, the status at codons 836 and 918 were random among the six cases with either −193G/G or −193C/G.

Discussion

In this study, we have demonstrated absence of somatic mutations in *GFRA1*, *GFRA2* and *GFRA3* in a series of sporadic MTC, but we have found two germline sequence variants in *GFRA1* which differed in frequency between sporadic MTC cases and matched normal controls. One variant c.573T>C was located in exon 4 and under-represented in sporadic MTC cases, as compared to controls. Interestingly, the frequency of this variant in our control group (55%) was higher than the frequency reported in the literature (40–46%), although the values from the literature were derived from a Canadian control group as well as from Germans with brain tumors. Thus, in this German-based case-control comparison, the difference in variant frequency between the MTC (35%) and controls (55%) is significant ($P<0.05$). Why under-representation of this polymorphic allele, which does not alter the amino acid and does not alter splicing, is associated with sporadic MTC is unclear, although linkage disequilibrium with other loci is a plausible explanation.

Even more striking was the over-representation of a rare sequence variant at position −193 in *GFRA1* in sporadic MTC, especially since three patients were homozygous for this sequence variant and we did not find this variant in any of 62 control alleles. The difference was significant, whether we compared genotypes or alleles. Of note, the −193C>G variant

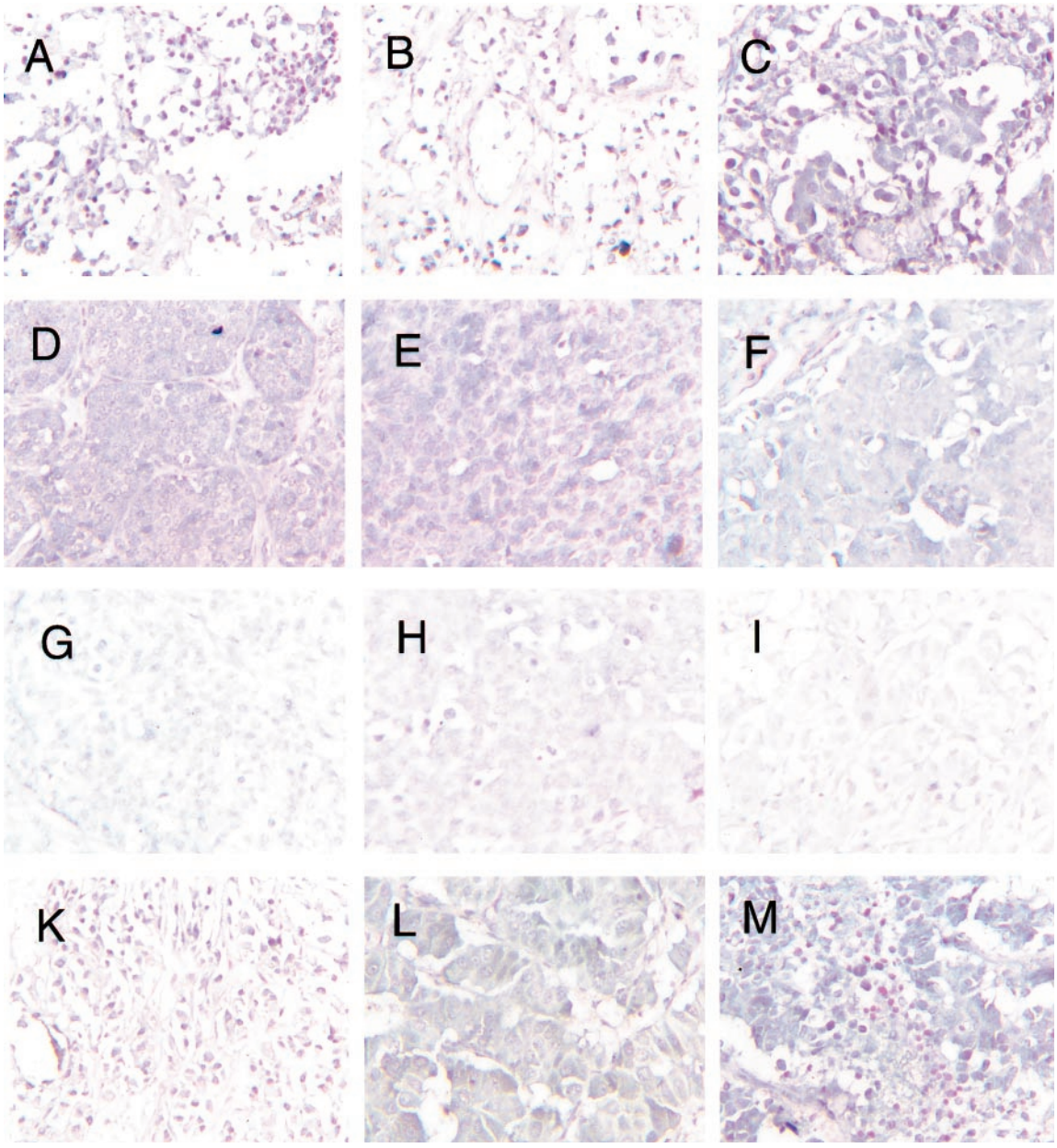


Figure 3 GFRα-1 immunohistochemistry in sporadic medullary thyroid carcinoma (×20). (**a–c**) Strong nuclear staining intensity in tumors from patients with −193G/G (#8, #9, #26). (**d–f**) Moderate cytoplasmic staining intensity in tumors from patient with −193C/G (#2, #12, #13). (**g–i**) Mainly weak cytoplasmic and nuclear staining intensity in tumors from patient with wild-type C/C at position −193 (#7, #15, #23). (**k–m**) Tumors that are exceptions (see text for details), i.e. tumors with strong cytoplasmic and/or nuclear staining intensity in patients with wild-type C/C at position −193 (#10, #18, #20)

was always either heterozygously or homozygously present in both germline and tumor DNA. Hence, it is unlikely that *GFRA1* functions as a tumor suppressor gene in this situation; further, LOH on 10q26 has not been reported in MTC. Because the presence or absence of the *GFRA1* −193 variant was randomly associated with the presence or absence of the *RET* S836S variant and the presence or absence of somatic *RET* M918T, it suggests that the −193 variant might be a low penetrance allele, independent of *RET*, associated with sporadic MTC risk.

Because −193 lies in the 5′UTR, likely at or around the transcriptional start site, and perhaps even within the promoter, a variation in that region associated with sporadic MTC risk is interesting and might suggest the mechanism of the association. In agreement with our

hypothesis, overall, we observed that the presence of the sequence variant −193C>G was associated with higher *GFRA1* transcript levels. Immunohistochemistry further supported this impression. By immunohistochemistry, it would appear that either the heterozygous or homozygous presence of the polymorphic G allele was associated with increased expression compared to tumors that are wild-type at −193, although the former had predominant cytoplasmic expression and the latter nuclear. Of interest, tumors with the homozygous sequence variant (−193G/G) showed strong GFRα-1 immunoreactivity accompanied by increased numbers of apoptotic cells, which is usually associated with rapidly growing tumors. Our data also suggest that the −193 variant status alone is not the only modulator of high GFRα-1 expression as a few tumors without the G variant were found to express GFRα-1 as well: other mechanisms must exist that influence the level of *GFRA1* transcription and subsequent translation in sporadic MTC.

The functional meaning of the overall higher levels of GFRα-1 associated with the presence of the −193G allele is not obvious. It is conceivable that, in the presence of appropriate ligands (e.g. GDNF, NTN), higher levels of GFRα-1 may lead to increased interaction with and subsequent activation of RET. Because GFRα-1 not only interacts with its major ligand GDNF but it can also interact with lower affinity with NTN and ART (Baloh *et al*., 1998; Jing *et al*., 1997), it is possible that increased GFRα-1 expression could mean further activation of RET via ligands other than GDNF. GFRα-1, like many GPI-linked membrane-bound proteins, form into complexes around lipid rafts at the membrane and has recently been shown to recruit RET to these lipid rafts after GDNF binding, followed by increased RET phosphorylation and increased Src-RET interaction. Increased GFRα-1 expression in the presence of the *GFRA1* −193 variant would be predicted to lead to increased numbers of such complexes at the lipid rafts and hence, increased recruitment of RET to them with subsequent increased signaling. Although controversial, it has been described that GFRα-1 can signal down a pathway independent of RET and its ligands (Trupp *et al*., 1998). Thus, increased levels of this co-receptor would increase signaling down this other pathway as well. All these postulates do not contradict our observation of increased apoptotic cells associated with more rapidly growing tumors in the individuals with the G/G genotype at position −193.

Despite the location of −193 in the 5′UTR/promoter region with all its functional implications, it is also equally plausible that the variant −193C>G may be in linkage disequilibrium with another locus which directly contributes to low penetrance susceptibility to sporadic MTC; such a locus would most likely lie upstream of *GFRA1*. In summary, mutation analysis of *GFRA1*, *GFRA2* and *GFRA3* revealed over-representation of an upstream variant in *GFRA1* −193C>G as well as under-representation of *GFRA1* variant c.573T>C in sporadic MTC cases compared to matched controls. The *GFRA1* −193 variant might lend low level susceptibility to sporadic MTC by a mechanism related to increased expression, as suggested by our data. However, the precise mechanisms for both these variants and how they can act as low penetrance susceptibility loci for the development of sporadic MTC remains to be elucidated. To date, therefore, we have shown that both *RET* and *GFRA1* and/or loci in proximity to them might represent low penetrance susceptibility genes for sporadic MTC with relative risks ranging from 2 to 7 (Gimm *et al*., 1999c and this study).

Materials and methods

Patients and specimens

A series of 31 German patients diagnosed with sporadic MTC was accrued after informed consent was given. Patients were classified as having sporadic MTC when no germline mutations could be identified in the *RET* proto-oncogene (Gimm *et al*., 1999c). In addition, there was no family history of MTC, pheochromocytoma or parathyroid disease. At operation, tumor tissue and corresponding peripheral blood samples were obtained from each patient. A piece of the tumor, which macroscopically appeared to be free of normal tissue, was excised and flash frozen in liquid nitrogen for all patients. The remaining tissue was fixed by immersion in 10% buffered formalin for histopathological analysis.

Peripheral blood was obtained from a race-matched control group, with their informed consent. This control group consisted of patients who were admitted to the Department of General Surgery, Halle, Germany, for non-thyroid-related diseases.

DNA extraction

Genomic DNA from flash frozen tissue and peripheral blood leucocytes was extracted using the QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Genomic structure and intron-exon boundaries in GFRA2

The genomic structure of *GFRA1* and *GFRA3* including the intron-exon boundaries have been previously described (Angrist *et al*., 1998; Myers *et al*., 1999; Onochie *et al*., 2000). The genomic structure of *GFRA2* had to be determined and is described in detail elsewhere (Mulligan *et al*., in preparation).

PCR-based mutation analysis

Primers and PCR conditions used to amplify exons of *GFRA1* have been previously described (Gimm *et al*., 1999a). Primers to generate amplicons of *GFRA2* were designed according to the sequences obtained from long range and Vectorette PCR (Table 3). The human *GFRA3* locus has recently been described (Onochie *et al*., 2000) and primers to generate amplicons of *GFRA3* were designed accordingly (Table 3). PCR amplification was carried out in 1× PCR buffer (Qiagen) containing 1.5 mM $MgC1_2$, 200 μmol/l dNTP, 0.6 μmol/l of both sense and antisense primer, 2.5 U Taq

Table 3 Primers and PCR conditions for *GFRA2* and *GFRA3*

Exon	*Name*	*Sequence*	*Size*	*AT* (°C)
GFRA2				
1	Ra2-I-1F	5′-AAAAACGGTGGGATTTATTTAACA-3′	105	58
	Ra2-I-1Rc	5′-CTTCTCGCCTCCCCCTC-3′		
2	Ra2-I-2F	5′-TTGGGTGGGAGATTGTGG-3′	457	62
	Ra2-I-2R	5′-CTCCCTCCTGAACCCCTG-3′		
3	Ra2-I-3Fb	5′-GTAGAGAGCTTTCCTCCGGC-3′	193	58
	Ra2-I-3R	5′-CCCAGTGCGAGCTCACTTA-3′		
4	Ra2-I-4F	5′-GCCTCTGACCTGCTCTCTTG-3′	489	60
	Ra2-I-4R	5′-GGTCATAATTCGATGCACCC-3′		
5	Ra2-I-5F	5′-CCCCTGTTTTCTCTATTGCG-3′	170	58
	Ra2-I-5R	5′-CAGGTGAGCAGGAAGAGCTTA-3′		
6	Ra2-I-6F	5′-CCGTACCTCTCTCCTCTCCC-3′	205	58
	Ra2-I-6R	5′-TTGGGGAGAACATCCAGAAC-3′		
7	Ra2-I-7F	5′-ACTTCTCTGCATCGTCCCTC-3′	272	58
	Ra2-I-7R	5′-GAGTCATTTCCCATGCCACT-3′		
8	Ra2-I-8F	5′-GCTGAGGGTGTCAGAGAAGG-3′	243	58
	Ra2-E-8R	5′-CTCTGTGAAGCACATGCTTAAC-3′		
9	Ra2-E-9F	5′-CTCACGACAAATATCATCCC-3′	127	58
	Ra2-1434R	5′-CAGCCTACAAGGCCTGTTTC-3′		
GFRA3				
1	Ra3-I-1F	5′-TCTCAGAGCTCCAGGGGAGGAGC-3′	207	60
	Ra3-I-1R	5′-CTACACCTCACCTCCCCCTC-3′		
2	Ra3-E-2F	5′-GAGACCCCCTTCCCACAGA-3′	378	60
	Ra3-I-2Rb	5′-CTACCATGTGGCCCATATCC-3′		
3	Ra3-I-3F	5′-CACAGCTTGCAGCTGGTTAG-3′	265	60
	Ra3-I-3R	5′-CTCTGGTTCCCGAGCCTAGT-3′		
4	Ra3-I-4Fc	5′-TTGTCAAATCAGGGGTTTCC-3′	429	60
	Ra3-I-4R	5′-CCCTGTCCTCCCAAACTACA-3′		
5	Ra3-I-5F	5′-CCTGGGCAAGAGAGAGTGAG-3′	240	60
	Ra3-I-5R	5′-CCGGAGCATTCTTACCTCAG-3′		
6	Ra3-I-6F	5′-TGGAAGAAGGTGGGAGCTAA-3′	226	60
	Ra3-I-6R	5′-CTGGGAGCAAGTACAGCACA-3′		
7	Ra3-I-7F	5′-ACCCTTCCAATGAGCCTTCT-3′	207	60
	Ra3-I-7R	5′-CGCCTCTATCCCTTTGTCTG-3′		
8	Ra3-I-8F	5′-GGGCTAAAGAAAATCCCCTG-3′	226	60
	Ra3-I-8R	5′-CTTCCTGCTGCTGTCCTTTC-3′		

AT, annealing temperature

polymerase (Qiagen), and 100–200 ng or tumor DNA template in a 50 μl volume. PCR conditions were: one cycle of 15 min at 95°C, 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 58-62°C (Table 3), and 1 min at 72°C, followed by one cycle of 10 min at 72°C.

Mutation analysis was performed using a combination of single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) and direct sequencing (Table 4). For each exon, at least three randomly chosen samples were sequenced to exclude the possibility that sequence variants were missed by SSCP. No optimal SSCP conditions were found for exon 1 of *GFRA1* and *GFRA2*. Instead, mutation analysis was performed by direct sequencing.

Before SSCP, some PCR products (Table 4) were subjected to further digestion to obtain smaller fragments that are believed to be more likely to reveal variant patterns using SSCP (Jordanova *et al*., 1997). Two microliters of the resulting PCR/digestion product were added to 3 μl of formamide buffer, then heated to 95°C for 10 min, and subsequently cooled on ice. The samples were subjected to electrophoresis through polyacrylamide/Tris-Borate-EDTA gels (Table 4). Subsequent silver staining was done as previously described (Gimm *et al*., 1999b). If SSCP revealed a different banding pattern, the remaining PCR aliquot was subjected to purification and semi-automated sequencing as described (Gimm *et al*., 1997).

RNA extraction and expression analysis of GFRA1

To analyse whether the presence of the rare sequence variant −193C>G influences expression of *GFRA1* at the mRNA level, we extracted RNA from 10 tumors using TRIzol reagent (Life Technologies, Rockville, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. RT–PCR was performed using the 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer's instructions. To determine the expression level of *GFRA1* at the mRNA level, 1 μl cDNA was used in a duplex PCR containing 1.2 μmol/l each of intron-spanning *GFRA1* primers (5′-GATATATTCCGGGTGGTCCC-3′; 5′-AAACAGTTGGGCTTCTCCCT-3′) and 0.2 μmol/l each of primers for the housekeeping gene glucosyl-phosphatidylinositol (GPI) (5′-

Table 4 SSCP conditions for mutation scanning of *GFRA1*, *GFRA2* and *GFRA3*

Exon	*Digestion*	*Fragments*	*% PAA conc. (acryl/bis)*	*Running conditions*
GFRA1				
1				Sequencing
2			10 (37.5 : 1)	RT, 14 h, 100 V
3			12 (30 : 1)	RT, 14 h, 100 V
4	*Ava*II	206 + 196	10 (37.5 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
5			10 (37.5 : 1)	RT, 14 h, 100 V
6			10 (37.5 : 1)	RT, 14 h, 100 V
7			10 (37.5 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
8			14 (100 : 1)	RT, 14 h, 100 V
9			14 (100 : 1)	RT, 14 h, 100 V
GFRA2				
1				Sequencing
2	*Bgl*I	210 + 247	12 (30 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
3			12 (30 : 1)	RT, 14 h, 100 V
4	*Ban*I	223 + 266	10 (37.5 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
5			10 (37.5 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
6			12 (30 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
7			10 (37.5 : 1), 10% Glycerol	4°C, 16 h, 150 V
8			10 (37.5 : 1), 10% Glycerol	RT, 14 h, 100 V
9			10 (37.5 : 1)	RT, 14 h, 100 V
GRFA3				
1			12 (30 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
2	*Hpa*II	221 + 157	10 (37.5 : 1)	RT, 14 h, 100 V
3			12 (30 : 1)	RT, 14 h, 100 V
4	*Pvu*II	218 + 211	10 (37.5 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
5			10 (37.5 : 1)	4°C, 16 h, 150 V
6			12 (30 : 1)	RT, 14 h, 100 V
7			12 (30 : 1)	RT, 14 h, 100 V
8			12 (30 : 1)	RT, 14 h, 100 V

RT, room temperature; PAA conc., polyacrylamide concentration

GACCCCCAGTTCCAGAAGCTGC-3′; 5′-GCATCACGT-CCTCCGTCACC-3′). PCR conditions were: one cycle of 15 min at 95°C, 30 cycles of 45 s at 95°C, 30 s at 58°C, 15 s at 72°C, followed by one cycle of 10 min at 72°C. The PCR product was then subjected to electrophoresis through a 2% agarose gel and visualized by UV transillumination after ethidium bromide staining. The intensity of the PCR products was measured using ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

GFRα-1 immunohistochemistry

To analyse the expression of GFRα-1 at the protein level, we performed immunohistochemistry. Four-micron sections of paraffin-embedded, formalin-fixed tissue were cut, mounted on Superfrost plus slides and baked for 2 h at 60°C. Immunostaining was performed as previously described (Gimm *et al*., 2000) except using a primary goat polyclonal antibody raised against GFRα-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The specificity of this antibody has been previously reported. In brief, sections were deparaffinized and rehydrated by passing through xylene and a graded series of ethanol solutions. Antigen retrieval was performed by boiling at 98°C in 0.01 M sodium citrate buffer pH 6.4 in a microwave oven for 20 min. In order to block endogenous peroxidase activity, the sections were incubated with 1% hydrogen peroxide in PBS for 30 min after cooling to room temperature. After blocking for 30 min in 0.75% horse serum, the sections were incubated overnight at 4°C with a primary goat polyclonal antibody against GFRα-1 (Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1 : 200. Primary antibody binding was localized by using an avidin-biotin-peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. The chromogenic reaction was carried out with 0.05% 3,3′ diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO, USA) using nickel cobalt amplification, which gives a black product. Following counterstaining with Nuclear Fast Red (Rowley Biochemical Institute, Danvers, MA, USA) and mounting, the slides were evaluated under a light microscope. Intensity of staining was classified separately for the nucleus and the cytoplasm and graded strong (+ + +), moderate (+ +), weak (+) or absent (−).

RET sequence variants and GFRα-1 expression

Germline S836S and somatic M918T sequence variants have been found to be associated with MTC. Since the sequence status at those positions in the MTCs analysed here was known (Gimm *et al*., 1999c), we analysed by inspection whether they correlated with expression levels of GFRα-1.

Acknowledgments
O Gimm thanks Dr Stephan M Tanner for helpful discussions. The authors acknowledge Kathrin Hammje, Marion Sitte and Irene Schwarz for technical assistance and Terry Bradley for graphics advice and assistance. This study was partially funded by 1R01HD39058-01 from the National Institutes of Health (to C Eng) and P30CA16058 from the National Cancer Institute (to Ohio State University Comprehensive Cancer Center).

References

Airaksinen MS, Titievsky A and Saarma M. (1999). *Mol. Cell. Neurosci.,* **13,** 313–325.
Angrist M, Jing S, Bolk S, Bentley K, Nallasamy S, Halushka M, Fox GM and Chakravarti A. (1998). *Genomics,* **48,** 354–362.
Baloh RH, Enomoto H, Johnson Jr EM and Milbrandt J. (2000). *Curr. Opin. Neurobiol,* **10,** 103–110.
Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson Jr EM and Milbrandt J. (1998). *Neuron,* **21,** 1291–1302.
Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, Wells Jr SA, Goodfellow PJ and Donis-Keller H. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **91,** 1579–1583.
Ceccherini I, Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Bocciardi R, Hofstra R, Ravazzolo R, Romeo G and Devoto M. (1999). *Am. J. Hum. Genet.,* **65,** A266.
Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P and Wells Jr SA. (1993). *Hum. Mol. Genet,* **2,** 851–856.
Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiowaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, Sariola H and Pachnis V. (1996). *Nature,* **381,** 789–793.
Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, van Amstel HK, Lips CJ, Nishisho I, Takai SI, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjold M, Komminoth P, Hendy GN, Gharib H, Thibodeau SN, Lacroix A, Frilling A, Ponder BA and Mulligan LM. (1996a). *JAMA,* **276,** 1575–1579.
Eng C and Mulligan LM. (1997). *Hum. Mutat.,* **9,** 97–109.
Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Grilling A, Raue F, Thomas GA and Ponder BA. (1996b). *Cancer Res.,* **56,** 2167–2170.
Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, Gardner E, Scheumann GF, Jackson CE, Tunnacliffe A and Ponder BAJ. (1994). *Hum. Mol. Genet.,* **3,** 237–241.
Enokido Y, de Sauvage F, Hongo JA, Ninkina N, Rosenthal A, Buchman VL and Davies AM. (1998). *Curr. Biol.,* **8,** 1019–1022.
Gimm O, Attie-Bitach T, Lees JA, Vekemans M and Eng C. (2000). *Hum. Mol. Genet.,* **9,** 1633–1639.
Gimm O, Gossling A, Marsh DJ, Dahia PL, Mulligan LM, von Deimling A and Eng C. (1999a). *Br. J. Cancer,* **80,** 383–386.
Gimm O, Greco A, Hoang-Vu C, Dralle H, Pierotti MA and Eng C. (1999b). *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **84,** 2784–2787.
Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dahia PL, Mulligan LM, Zajac JD, Robinson BG and Eng C. (1997). *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **82,** 3902–3904.
Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H and Eng C.(1999c). *Oncogene,* **18,** 1369–1373.
Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Hoppener JW, van Amstel HK, Romeo G, Lips CJM and Buys CHCM. (1994). *Nature,* **367,** 375–376.
Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW and Fox GM. (1996). *Cell,* **85,** 1113–1124.
Jing S, Yu Y, Fang M, Hu Z, Holst PL, Boone T, Delaney J, Schultz H, Zhou R and Fox GM. (1997). *J. Biol. Chem.,* **272,** 33111–33117.
Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T and Kremensky I. (1997). *Hum. Mutat.,* **10,** 65–70.
Klein RD, Sherman D, Ho WH, Stone D, Bennett GL, Moffat B, Vandlen R, Simmons L, Gu Q, Hongo JA, Devaux B, Poulsen K, Armanini M, Nozaki C, Asai N, Goddard A, Phillips H, Henderson CE, Takahashi M and Rosenthal A. (1997). *Nature,* **387,** 717–721.
Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson Jr EM and Milbrandt J. (1996). *Nature,* **384,** 467–470.
Masure S, Geerts H, Cik M, Hoefnagel E, Van Den Kieboom G, Tuytelaars A, Harris S, Lesage AS, Leysen JE, Van Der Helm L, Verhasselt P, Yon J and Gordon RD. (1999). *Eur. J. Biochem,* **266,** 892–902.
Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kotzbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Vandlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Gray C, Garces A and Johnson Jr EM. (1998). *Neuron,* **20,** 245–253.
Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A and Ponder BA. (1993). *Nature,* **363,** 458–460.
Myers SM, Salomon R, Goessling A, Pelet A, Eng C, von Deimling A, Lyonnet S and Mulligan LM. (1999). *J. Med. Genet.,* **36,** 217–220.
Naveilhan P, Baudet C, Mikaels A, Shen L, Westphal H and Ernfors P. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **95,** 1295–1300.
Onochie CI, Korngut LM, Vanhorne JB, Myers SM, Michaud D and Mulligan LM. (2000). *J. Med. Genet.,* (in press).
Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA and Barbacid M. (1996). *Nature,* **382,** 70–73.
Sanicola M, Hession C, Worley D, Carmillo P, Ehrenfels C, Walus L, Robinson S, Jaworski G, Wei H, Tizard R, Whitty A, Pepinsky RB and Cate RL. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **94,** 6238–6243.
Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F and Pachnis V. (1994). *Nature,* **367,** 380–383.
Takahashi M and Cooper GM. (1987). *Mol. Cell. Biol.,* **7,** 1378–1385.

Thompson J, Doxakis E, Pinon LG, Strachan P, Buj-Bello A, Wyatt S, Buchman VL and Davies AM. (1998). *Mol. Cell. Neurosci.,* **11,** 117–126.

Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Grueso E, Pachnis V, Arumae U, Sariola H, Saarma M and Ibánez CF. (1996). *Nature,* **381,** 785–788.

Trupp M, Raynoschek C, Belluardo N and Ibanez CF. (1998). *Mol. Cell. Neurosci,* **11,** 47–63.

8. Thesen der Habilitationsschrift

1. Somatische Mutationen in *NTRK1* wurden bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom nicht nachgewiesen und scheinen keine große Rolle bezüglich der Pathogenese zu spielen. *NTRK1* hat mindestens 6 exonische Polymorphismen, welche sich auf Exon 14 (Q558Q und F589F), Exon 15 (Y604H, V613G, A629A) und Exon 17 (R780Q) verteilen. Die Polymorphismen Y604H und V613G in Exon 15 sind stets gemeinsam nachgewiesen worden und liegen mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem gleichen Allel (*in cis*). Die Häufigkeit der Polymophismen unterscheidet sich bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom nicht signifikant von einer Kontrollgruppe, eine pathogenetische Bedeutung der Polymorphismen scheint daher nicht zu bestehen.

2. *NTRK2*, lokalisiert auf Chromosom 9q22.1, besteht aus mindestens 17 Exons. Diese variieren in ihrer Größe von 36 bis 306 Basenpaaren. Somatische Mutationen in *NTRK2* bzw. *NTRK3* wurden bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom nicht nachgewiesen und scheinen keine große Rolle bezüglich der Pathogenese zu spielen. Insbesondere scheinen Mutationen in *NTRK2* und *NTRK3* nicht ursächlich zu sein für die reduzierte Expression von NTRK2 bzw. gesteigerte Expression von NTRK3 in fortgeschrittenen medullären Schilddrüsenkarzinomen. Für *NTRK3* konnten 3 exonische polymorphe Sequenzvarianten identifizert werden, welche sich auf Exon 5 (N191N), Exon 6 (N226N) und Exon 12 (A496A) verteilen. Die Häufigkeit der Polymophismen unterscheidet sich bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom nicht signifkant von einer Kontrollgruppe, eine pathogenetische Bedeutung der Polymorphismen scheint daher nicht zu bestehen.

3. Mutationsanalysen von *RET* wiesen die somatische M918T-Mutation, der eine prognostische Bedeutung zugeschrieben wird, bei 50% der sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinome nach. Von den 7 exonischen polymorphen Sequenzvarienten in *RET* ist der Polymorphismus in Exon 14 (S836S) 2,5-mal so häufig bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom nachzuweisen wie in der Gruppe der Kontrollpatienten ($p<0,05$). S836S könnte eine „Low-Penetrance“-Mutation darstellen. Patienten mit der polymorphen Sequenzvariante haben zudem signifikant häufiger die somatische Mutation M918T ($p=0,01$).

4. Somatische Mutationen in *GFRA1*, *GFRA2* und *GFRA3* wurden bei Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom nicht nachgewiesen und scheinen

keine große Rolle bezüglich der Pathogenese zu spielen. *GFRA1* hat mindestens 2 exonische Polymorphismen, welche sich auf Exon 4 (N179N) und Exon 7 (T361A) verteilen. Für *GFRA1* wurden des weiteren 3 polymorphe Sequenzvarianten in der 5‘UTR-Region nachgewiesen, diese liegen an den Positionen -78, -106 und -193. *GFRA2* hat mindestens 1 exonischen Polymorphismus in Exon 2 (L26L). Die Häufigkeit von 2 polymorphen Sequenzvarianten in *GFRA1* (N179N und –193C>G) unterscheidet sich signifikant zwischen Patienten mit sporadischem medullären Schilddrüsenkarzinom und der Kontrollgruppe ($p<0,05$). Die Sequenzvariante N179N ist nicht verantwortlich für das beobachtete alternative Splicing zwischen Exon 3 und Exon 4 von *GFRA1*. Aufgrund der Sequenzvarianten -193C>G in *GFRA1* scheint die Expression sowohl auf der mRNA-Ebene als auch auf der Proteinebene erhöht zu sein. Eine pathogenetische Bedeutung kann vermutet werden.

B. Anhang

1. Lebenslauf

Name:	Oliver Gimm
Geburtsdatum:	2. September 1967
Geburtsort:	Flensburg

Schulausbildung

1974 - 1978	Grundschule Ramsharde, Flensburg
1978 - 1987	Altes Gymnasium Flensburg
19.05.1987	Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

1987 - 1988	Grundwehrdienst

Hochschulstudium der Medizin

1988 - 1994	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)
1990 - 1994	Studentische Hilfskraft (Tutor) des Instituts für Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover
1992	Studentische Hilfskraft (Tutor) des Instituts für Physiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Aufenthalte während des Studiums

02/1993-02/1993	Peninsula Medical Center, Department of General Surgery, Ormond Beach, Florida, U.S.A.
02/1994-05/1994	Vanderbilt Medical School, Department of General Surgery, Cardiovascular Surgery, Plastic Surgery, Otorhinolaryngology, Nashville, Tennessee, U.S.A. als Stipendiat des Biomedical Exchange Program (BMEP) und des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
06/1994-09/1994	Kantonales Spital Altstätten, Medizinische Abteilung, Altstätten, Schweiz

Dissertation

08.02.1995	“Die prognostische Bedeutung von Lymphknotenmetastasen beim papillären Schilddrüsenkarzinom und deren chirurgische Therapie” (Note „sehr gut“)

Facharztausbildung

01/1995-06/1996	Arzt im Praktikum der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr.med. Henning Dralle)
01.07.1996	Approbation zum Arzt
07/1996-07/1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr.med. Henning Dralle)
seit 08/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr.med. Henning Dralle)
22.04.2003	Facharztprüfung (Facharzt für Chirurgie)

2. Wissenschaftlicher Werdegang

Wissenschaftlicher Mitarbeiter (01/1995-07/1997) der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie in Halle (Direktor: Prof. Dr.med. Henning Dralle):

Projektinitiierung, Leitung und Publikation der Ergebnisse der folgenden monozentrischen klinischen Studien (siehe auch Publikationsverzeichnis):

- Bestimmung des Musters der Lymphknotenmetastasierung beim primären papillären Schilddrüsenkarzinom
- Korrelation zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasierung zum Zeitpunkt der Reoperation beim medullären Schilddrüsenkarzinom
- Bestimmung prädiktiver Faktoren bezüglich der biochemischen Heilung beim primären und rezidivierenden medullären Schilddrüsenkarzinom

Projektbetreuung, Durchführung und Publikation der folgenden multizentrischen klinischen Studie (siehe auch Publikationsverzeichnis):

- Prophylaktische Thyreoidektomie bei Patienten mit multiple endokriner Neoplasie vom Typ 2A

Postdoktorand (08/1997-07/2000) am Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA sowie an der Ohio State University, Columbus, USA (Principal Investigator: Prof. Charis Eng, MD, PhD):

Planung, Leitung, Durchführung und Publikation der folgenden experimentellen Studien (siehe auch Publikationsverzeichnis):

- Identifizierung einer neuen, seltenen Keimbahnmutation im *RET*-Protoonkogen (A883F) bei Patienten mit multipler endokriner Neoplasie vom Typ 2B (MEN 2B)
- Analyse der pathogenetischen Bedeutung des Glial cell line-derived neurotropic factors alpha (GFRα) bei verschiedenen Hirntumoren
- Molekulargenetische Untersuchungen der für die Tyrosinkinasen NTRK1, NTRK2 und NTRK3 kodierenden Gene bei sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen; dabei Charakterisierung des Genlocus von *NTRK2*

- Molekulargenetische Untersuchungen des für die Tyrosinkinase RET kodierenden Gens bei sporadischen medullären Schilddrüsendrüsen-karzinomen
- Immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen der Liganden-bindenden Co-Faktoren GFRα–1, GFRα–2 und GFRα–3 bei sporadischen medullären Schilddrüsendrüsenkarzinomen; dabei Charakterisierung des Genlocus von *GFRA2*
- Molekulargenetische Analysen des für die Phosphatase MINPP1 kodierenden Gens bezüglich der Pathogenese follikulärer Schilddrüsenadenome und –karzinome
- Immunhistochemische Untersuchungen bezüglich der Bedeutung der Phosphatase PTEN während der menschlichen Embryogenese sowie immunhistochemische, molekulargenetische und zellbiologische Untersuchungen bezüglich der Bedeutung von PTEN bei der Pathogenese nicht-medullärer Schilddrüsenkarzinome
- Molekulargenetische Analysen des für die Dehydrogenase SDHD kodierenden Gens bezüglich der Pathogenese von Phäochromozytomen

Wissenschaftlicher Mitarbeiter (seit 08/2000) der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie in Halle (Direktor: Prof. Dr.med. Henning Dralle):

Projektinitiierung, Leitung und Publikation der folgenden multizentrischen klinischen Studien (siehe auch Publikationsverzeichnis):

- Genotyp-Phänotyp-Korrelationen seltener Mutationen im *RET*-Protoonkogen und deren klinische Konsequenzen

Projektbetreuung, Durchführung und Publikation der folgenden multizentrischen experimentellen Studien (siehe auch Publikationsverzeichnis):

- Promotermethylierung von RASSF1A bei Schilddrüsenkarzinomen
- Molekulargenetische Analysen des für den Tumorsuppressor PRKAR1A kodierenden Gens bei sporadischen Schilddrüsenkarzinomen
- Regulation von PPARγ bei follikulären Schilddrüsentumoren
- Molekulargenetische Analysen bezüglich der Inaktivierung von RASSF1A bei Pankreaskarzinomen
- Molekulargenetische Analysen bezüglich der Bedeutung von Caveolin-1 und Caveolin-2 bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen

Mitglied des Editorial Boards von Cancer Letters (seit 01/2001)

- Begutachtung zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten

3. Lehre

Durchgeführte Praktika und Kurse an der Universität in Halle:

- ***Kurs "Allgemeine und klinische Untersuchungen im Fachgebiet Chirurgie"***
  wöchentlich Di, Do 14:15 - 16:15 Uhr, Chirurgie, 5. Semester (SS 1995-SS 1997, WS 2001-WS 2003)

- ***Bed-side-teaching "Spezielle Chirurgie"***
  wöchentlich Mo 15:00 - 16:30 Uhr, Fr 14:00 - 15:30 Uhr, Chirurgie, 7. Semester (SS 1995-SS 1997, WS 2000-WS 2003)

- ***Doktorandenkolloquien der Klinik für Allgemeinchirurgie***
  vierteljährlich, Seminarraum der Klinik für Allgemeinchirurgie, Doktoranden (SS 1995-SS 1997, WS 2000-WS 2003); seit 1996 Mentor von Doktoranden

4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Habilitationsleistung selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Zugleich erkläre ich, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Habilitationsverfahren derzeit anhängig ist bzw. jemals anhängig gewesen ist.

Halle, den 29.08.2003 Dr.med. Oliver Gimm

5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.med. Henning Dralle, Direktor der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie in Halle, ohne dessen Förderung und Unterstützung die Erhebung der in dieser Habilitationschrift bearbeiteten Daten nicht möglich gewesen wäre. Zugleich stammt das in meinen Arbeiten untersuchte Material fast ausschließlich aus seiner Klinik und es ist sein Verdienst, dass mir dieses auch auf internationaler Ebene nahezu einmalige Material zur Verfügung stand. Zudem möchte ich ihm danken für das in mir bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt meiner Ausbildung geweckte Interesse an wissenschaftlicher Arbeit. Dieses hat er nicht nur in klinischer, sondern auch in experimenteller Sicht stets sehr intensiv gefördert. Zugleich verdanke ich ihm die Möglichkeit, meine zahlreichen wissenschaftlichen Ergebnisse in Form von Vorträgen und Postern bei einer Vielzahl nationaler und internationaler Kongresse vortragen zu können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend während meines dreijährigen Forschungsaufenthalts in den USA als Postdoktorand unter der Leitung von Prof. Charis Eng, MD, PhD, erhoben. Ihr gilt daher mein Dank, mich in ihr Labor aufgenommen und mir die zahlreichen experimentellen Arbeiten, die dieser Habilitationsschrift zu Grunde liegen, ermöglicht zu haben. Profitiert habe ich dabei von Ihrer sowohl klinischen als auch wissenschaftlichen einzigartigen Expertise. Durch Ihre großzügige Förderung konnte ich zudem die dabei gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse mehrfach vor internationalem Publikum vortragen.

Bei meinen Kollegen in den amerikanischen Labors, namentlich Deborah J. Marsh, PhD, Patricia L.M. Dahia, MD, PhD, Dr. med. Aurel Perren, Liang-Ping Weng, MD, MS, möchte ich mich ausdrücklich bedanken, da sie mir bei der Erlernung der in dieser Habilitationsschrift angewandten Methoden sehr hilfreich zu Seite standen. Mein Dank gilt ferner den technischen Assistentinnen, Jennifer B. Kum, Jessica Brown sowie Heather Dziema, die mich bei meinen experimentellen Arbeiten tatkräftig unterstützt haben.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Cuong Hoang-Vu, Leiter des Labors für experimentelle und chirurgische Onkologie der Universitäts- und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie in Halle gilt mein Dank für sein Engagement, mich bei allen meinen Arbeiten zu unterstützen. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen mit ihm haben mein wissenschaftliches Denken weiter geformt. Frau Kathrin Hammje danke ich für die Aufarbeitung des Materials sowie für die Erstellung zahlreicher und sehr hilfreicher Tabellen.

Herrn Dr. med. Raoul Hinze, jetzt Chefarzt des Instituts für Pathologie in Schwerin und seinerzeit Oberarzt des Instituts für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für seine stets sehr hilfreiche Aufarbeitung und Bereitstellung pathologischer Präparate. Seine schnelle und immer zuverlässige Zuarbeit hat wesentlich dazu beigetragen, dass die zahlreichen Ergebnisse in entsprechend kurzer Zeit zustande kamen. Mein Dank gilt insbesondere auch seinem ehemaligen Chef, Herr Prof. Dr. med. Friedrich Wilhelm Rath, seinerzeit Direktor des Instituts für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die großzügige Zurverfügungsstellung des Materials.

Mein Dank gilt ferner den nationalen und internationalen Kollegen, deren Expertise zu zahlreichen interessanten Diskussionen im Laufe der Studien beigetragen hat. In alphabetischer Reihenfolge sind dies: Angela Greco, PhD, Lois M. Mulligan, PhD, Marco A. Pierotti, PhD, Christoph Plass, PhD, Aranzazu de la Puente, PhD, und Prof. Dr. med. Friedhelm Raue. Die Auswertung jeder wissenschaftlichen Arbeit hängt zudem sehr von der adäquaten statistischen Analyse der Ergebnisse ab. Daher gilt ein besonderer Dank Donna S. Neuberg.

Nicht genug danken kann ich zudem meinen Kollegen der Universitäts- und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie in Halle, deren klinisch-operative Tätigkeit eine wichtige Voraussetzung für das Zusammentragen des von mir untersuchten Materials war.