

Masterarbeit

Morbus Hirschsprung

**Ätiologie, Pathophysiologie und molekulargenetische
Untersuchung**

eingereicht von

Dr.in med. univ. Elisabeth Sterl

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

(Msc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von Betreuerin

Assoz. Prof.in Priv.-Doz.in Mag.a Dr.in rer. nat Ellen Heitzer

Singapore, 31.08.2019

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Dr.in med.univ. Elisabeth Sterl

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Fr. Assoz. Prof.in Priv.-Doz.in Mag.a Dr.in rer. nat Ellen Heitzer, bedanken. Sie stand mit ihrer Expertise jederzeit zur Verfügung und hat mit bereichernden Anregungen und Ratschlägen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Kolleginnen, Dr.in Andrea Huber-Zeyringer und Dr.in Eva Amerstorfer, möchte ich für ihre Anregungen, Tipps, fürs Zuhören und das Korrekturlesen danken. Vielen Dank auch allen MitarbeiterInnen der Humangenetik und der Ambulanz für Funktionsdiagnostik, die in die Durchführung der Studie involviert waren.

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken. Besonders erwähnen möchte ich meine Eltern, Waltraud und Peter Maier, deren Hilfe und Unterstützung mich ein Leben lang begleiten. Sie sind großartige Vorbilder. Ihr bedingungsloses Vertrauen hat mir schon als Kind das Gefühl vermittelt, alles sei erreichbar. Vielen Dank, Mama und Papa!

Meinem Mann Gilbert und meiner Tochter Susanna danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung, ihre Geduld, Liebe und ihren Humor. Ohne euch wäre meine Welt nicht annähernd so bunt, spannend, lustig und großartig!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Glossar	8
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	10
Zusammenfassung.....	11
Abstract.....	13
Einleitung.....	14
Grundlagen.....	17
1. Historisches.....	17
2. Der Gastrointestinaltrakt.....	20
3. Das enterale Nervensystem	22
4. Embryologie	24
Embryonale Entwicklung des Gastrointestinaltraktes.....	25
Embryonale Entwicklung des enteralen Nervensystems.....	27
Morbus Hirschsprung	31
1. Definition und Epidemiologie.....	31
2. Ätiologie	33
Isolierte Formen	33
Syndromale Formen.....	38
Chromosomenaberrationen.....	40
Assoziierte Fehlbildungen	40
Nichtgenetische Faktoren.....	41
3. Pathophysiologie	42

4. Diagnostik	43
Radiologisch.....	44
Funktionell.....	45
Histologisch.....	46
Molekulargenetisch	47
5. Therapie.....	48
Material und Methoden.....	50
1. PatientInnen	50
2. Klinische Daten	50
3. Probengewinnung und Aufbereitung.....	51
4. Molekulargenetische Untersuchungen	51
Ergebnisse	54
Diskussion.....	61
Literaturverzeichnis	66

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
ACMG	American College of Medical Genetics
AF	Allelfrequenz
ASD II	Atriumseptumdefekt Typ II
CCHS	kongenitales zentrales Hypoventilationssyndrom
DNA	deoxyribonucleic acid
cDNA	complementary DNA
ECE1	endothelin converting enzyme 1
EDNRB	Endothelin Rezeptor B
EDN3	Endothelin 3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENCC	enteric neural crest cell (enterale Zellen der Neuralleiste)
EMT	epithelial-mesenchymale Transformation
ENS	Enterales Nervensystem
FG	Frühgeborenes
FMTC	familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom
GDNF	Glial Cellline Derived Neurotrophic Factor
GFR α 1	glycosylphosphatidylinositol-linked receptor α 1
h	Stunde
HSCR	Morbus Hirschsprung
IFAN	intestinofugale afferente Neurone

IPAN	intrinsische primär afferente Neurone
Jhdt.	Jahrhundert
L-HSCR	langstreckiger Mb. Hirschsprung
Mb.	Morbus
MEN	multiple endokrine Neoplasie
MH	Morbus Hirschsprung
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCC	neural crest cell (Zellen der Neuralleiste)
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
neg.	negativ
NGS	Next Generation Sequencing
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PDGFR α	platelet-derived growth factor Rezeptor α
PNS	Peripheres Nervensystem
pos.	positiv
RARE	retinoid acid response elements
RET	Rezeptor Tyrosin Kinase
RefSeq	Reference Sequence
RNA	ribonucleic acid
S-HSCR	kurzstreckiger Mb. Hirschsprung

SNP	single nucleotid Polymorphismus
SSW	Schwangerschaftswoche
TCA	totale Kolonanglionose
TERPT	transanaler endorektaler pull- through
WES	whole exome sequencing
UK	Universitätsklinik
USCS	University of California, Santa Cruz
ZNS	Zentrales Nervensystem

Glossar

Anorektalmanometrie/ anorektale Manometrie/ Rektummanometrie

Untersuchungstechnik, bei der die Druckcharakteristika des anorektalen Schließmuskelsystems unter standardisierten Bedingungen im Funktionslabor gemessen werden. Sie gilt als diagnostischer Standard zur Beurteilung der motorischen Funktion des anorektalen Schließmuskels und dient der therapeutischen Entscheidungsfindung bei Inkontinenz und Obstipation. Mit dieser Untersuchungsmethode werden die willkürlichen und unwillkürlichen Anteile des anorektalen Schließmuskelsystems untersucht (aus Freys, 1997).

cDNA DNA, die mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA (mRNA) hergestellt wird

Chromosomenaberration Strukturelle oder numerische Veränderung der Chromosomen, die lichtmikroskopisch darstellbar ist

EUROCAT Organisation, die europaweit die Register für Fehlbildungen in einem Netzwerk zusammenfasst, um epidemiologische Daten für ganz Europa zu erheben und in einem zusammenfassenden Fehlbildungsregister zur Verfügung zu stellen

gain-of-function Mutation Mutation aufgrund derer das Genprodukt eine verstärkte Aktivität oder eine zusätzliche Wirkungsweise erlangt

loss-of- function Mutation Mutation aufgrund derer das Genprodukt einen Funktionsverlust erleidet

Kolostomie chirurgische Anlage einer Dickdarmausleitung durch die Bauchwand an die Körperoberfläche

Neurokristopathie Erkrankung, deren Pathogenese sich auf Entwicklungsstörungen von Zellen der Neuralleiste zurückführen lässt

RefSeq Kurzform für: NCBI Reference Sequence Database. Eine umfassende, kuratierte Sammlung öffentlich zugänglicher genomischer Nukleotidsequenzen, deren Transkripten und Proteinprodukten

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Aufbau des Darms.....	21
Abbildung 2. Neurulation.....	28
Abbildung 3. Defäkographie Morbus Hirschsprung,	45
Abbildung 4. Anorektalmanometriekurve.....	46
<i>Abbildung 5. Immunhistochemie des Mb. Hirschsprung</i>	47
Abbildung 6. cDNA Analyse von Patient 01.....	56
Abbildung 7. RET Mutation c.2469delG, p.Pro824Leufs*45.....	57
Abbildung 8. NRG1 Mutation c.1300A>T, p.Lys434*	58
Abbildung 9. USCS Genome Browser Darstellung der mutierten Region in unterschiedlichen NRG1 Transkripten.....	59
Abbildung 10. RET Mutation c.750_751delCG, p.Glu251Glyfs*102.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Typen, Klinik und Mutationen von MEN2.....	38
Tabelle 2. Untersuchte HSCR-assoziierte Gene pro Betroffenen.....	52
Tabelle 3. RefSeq Accession Nummern der untersuchten Gene	53
Tabelle 4. Klinische Daten der untersuchten Betroffenen mit HSCR.....	54
Tabelle 5. Mutationen, die bei HSCR-Patienten identifiziert wurden.	55
Tabelle 6. Ergebnisse.....	64

Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchung war es, neben der Aufbereitung wissenschaftlicher Erkenntnisse hinsichtlich der Ätiologie und Pathophysiologie des Morbus Hirschsprung (HSCR) krankheitsrelevante Veränderungen in Kandidatengenomen bei PatientInnen mit histologisch verifiziertem Morbus Hirschsprung zu erfassen.

HSCR ist eine kongenitale Aganglionose, die distale Darmabschnitte variabler Länge betreffen kann. In ca. 80% der Fälle ist das Rektum bis maximal zum Sigmoid betroffen (S-HSCR), bei ca. 15% reicht die Aganglionose über das Sigmoid hinaus (L-HSCR) und in ca. 5% der Fälle ist das gesamte Kolon betroffen (TCA). Als Rarität gibt es eine totale intestinale Aganglionose oder ein ultrakurzes Segment. Das enggestellte, aganglionäre Segment bedingt funktionelle Stenosen, die zu entsprechender Symptomatik führen. Zur Diagnosestellung wird mittels Biopsien der Nachweis des Fehlens der enteralen Ganglienzellen gemeinsam mit dem Vorliegen von hyperplastischen cholinergen Nervenfasern und dem immunhistochemischen Nachweis einer erhöhten Azetylcholinesteraseaktivität erbracht. Die Erkrankung kann isoliert, assoziiert mit weiteren Fehlbildungen oder im Rahmen von Syndromen und Chromosomenaberrationen vorkommen. Die Genese ist multifaktoriell mit starker genetischer Komponente. Es gibt familiäres und sporadisches Auftreten.

Die Aganglionose entsteht in Folge einer gestörten Proliferation, Migration, Differenzierung oder einer verfrühten Apoptose von Vorläuferzellen des enteralen Nervensystems (ENS) aus der Neuralleiste. Die Ursache dieser Störung ist noch nicht restlos geklärt. Es können verschiedene Signalwege der Neurulation und Migration betroffen sein. Gene, die für Proteine dieser Signalwege kodieren, sind Kandidatengene für die Entstehung von HSCR. Laut bisher publizierter Daten finden sich bei familiärem HSCR in ca. 50% der Fälle und bei sporadischem HSCR in ca. 15% der Fälle genetische Veränderungen in einem der bisher beschriebenen Kandidatengene. Am häufigsten betroffen ist das *RET*-Gen. Bestimmte aktivierende Mutationen dieses Gens verursachen eine multiple endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN2) und führen zu einem erhöhten Risiko an einem medullären Schilddrüsenkarzinom und/oder Phäochromozytom zu erkranken. Diese Mutationen betreffen meist PatientInnen mit L-HSCR und/oder familiäre Formen, können aber auch bei sporadischen Fällen und S-HSCR vorkommen. Aus unserem

Kollektiv wurden 12 PatientInnen (♂:♀, 9:3) molekulargenetisch untersucht und bei vier konnten krankheitsverursachende Veränderungen gefunden werden. Diese befinden sich im *RET*- (n=3) bzw. im *NRG1*-Gen (n=1). Bezogen auf die diagnostische Ausbeute und die Genotyp-Phänotyp Korrelation stimmen unsere Ergebnisse mit früheren Berichten überein.

Abstract

The aim of this study was to give insights into etiology and pathophysiology of Hirschsprung's disease (HSCR) and to identify pathogenic variants in genes known to be associated with HSCR by Next Generation Sequencing (NGS).

Hirschsprung's disease, a congenital intestinal aganglionosis, is characterized by the absence of enteric ganglion cells in a part of variable length of the distal intestinal tract. A narrowed aganglionic segment causes a functional intestinal obstruction with symptoms of impaired intestinal motility beginning in the neonatal period. In 80% of cases the aganglionosis affects the rectosigmoid colon (S-HSCR), in about 15 % it does extend beyond the sigmoid affecting a longer segment of the colon called L-HSCR, a total colonic aganglionosis (TCA) is found in about 5% of patients. Rare cases of total intestinal aganglionosis and ultra short HSCR have been reported. Diagnosis of HSCR requires histopathological evidence of absence of enteric ganglion cells and increased acetylcholinesterase activity in the distal rectum. Beside presenting as an isolated trait HSCR may occur in association with monogenetic syndromes, chromosomal abnormalities or additional congenital malformations. There are sporadic and familial cases.

Aganglionosis is caused by impaired migration, proliferation, differentiation or survival of progenitors of the enteric nervous system (ENS) derived from neural crest cells (NCC). Since these processes are regulated by a complex interaction of signaling pathways, genes coding for proteins of these signaling pathways are rated as candidate genes causing HSCR. As known so far in 50% of familial cases and 15% of sporadic cases disease-causing mutations can be found in one of these candidate genes. *RET*-Gene is the most frequent affected gene. Specific gain-of-function mutations of *RET* are causing Multiple Endocrine Neoplasia (MEN) and are increasing the risks of developing medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. These specific mutations are mostly identified in patients with L-HSCR or familial cases but can also be found in sporadic HSCR or S-HSCR.

In our cohort 12 patients (♂:♀, 9:3) underwent molecular genetic testing. We identified disease causing mutations in four. Affected genes were *RET* (n=3) and *NRG1* respectively. With respect to diagnostic yield and phenotype-genotype correlation our findings are consistent with previous reports.

Einleitung

Ca. eines von 5000 Kindern wird mit Morbus Hirschsprung (HSCR) geboren. Die Inzidenz der Erkrankung zeigt ethnische Unterschiede und reicht von 4,1:10000 Geburten bei afroamerikanischer Bevölkerung in Kalifornien (Anderson et al, 2018) bis zu 1,09: 10000 Geburten in Europa (Best et al, 2014). Das männliche Geschlecht ist häufiger betroffen (♀:♂; 1:4) (Amiel und Lyonnet, 2001).

Bei HSCR handelt es sich um eine Erkrankung des enteralen Nervensystems, bei der es in der 5.-12. Schwangerschaftswoche (SSW) bzw. 3.-10. Embryonalwoche zu einer gestörten Proliferation, Migration und/oder Differenzierung von Vorläuferzellen aus der Neuralleiste in distale Darmabschnitte kommt. Als Folge davon findet sich eine Aganglionose des entsprechenden Abschnittes (Nagy und Goldstein, 2017, Rolle und Puri, 2019). Je nach Ausdehnung des betroffenen Abschnittes spricht man von kurzstreckigem Morbus Hirschsprung (S-HSCR), langstreckigem Morbus Hirschsprung (L-HSCR), totaler Kolonaganglionose (TCA) oder den äußerst seltenen Formen von totaler intestinaler Aganglionose und ultrakurzem Morbus Hirschsprung (Amiel et al, 2008). Die entstehenden funktionellen Stenosen bedingen Obstipationsepisoden und Dilatation der vorgeschalteten Darmabschnitte. Unbehandelt führt dies zu starken Schmerzen und Entzündungen, die häufig letal enden. Meist manifestiert sich die Erkrankung in den ersten Lebensstunden und -tagen. Eine entsprechende Verdachtsdiagnose kann radiologisch sowie manometrisch erhärtet und schlussendlich histologisch gesichert werden. Die Therapie ist chirurgisch und besteht in der überwiegenden Anzahl der Fälle aus einer operativen Entfernung des aganglionären Darmabschnittes und Durchzug des euganglionären Darms unter Schonung des Beckenbodens und des analen Sphinkters (Metzger, 2017).

Obwohl die Erkrankung an sich schon seit langem bekannt ist, ist die Ursache noch nicht restlos geklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Genese mit starker genetischer Beteiligung aus, was sich aus den unterschiedlichen Formen des Auftretens der Erkrankung ableiten lässt. HSCR kann sowohl sporadisch als auch familiär vorkommen. Die Erkrankung kann isoliert auftreten (ca. 70% der Fälle) oder in Zusammenhang mit Chromosomenaberrationen (12% der Fälle). In 18% der Fälle

finden sich assoziierte Fehlbildungen, wobei letzter Gruppe auch monogen-
verursachte Syndrome zugeordnet werden. In den betroffenen Familien findet man
meist autosomal-dominante Erbgänge mit unvollständiger geschlechtsabhängiger
Penetranz und variabler Expression und aber auch solche, die einem autosomal-
rezessiven Erbgang zu folgen scheinen (Amiel et al, 2008).

In den frühen 90er Jahren wurden Deletionen des Chromosoms 10 bei Betroffenen
mit TCA nachgewiesen. Damit konnte erstmals das Vorkommen von HSCR mit
einer konkreten chromosomalen Region assoziiert werden (Martucciello et al, 1992,
Fewtrell et al, 1994). Kurz darauf wurde ein Zusammenhang zwischen dem in
diesem Bereich liegenden *RET*-Protoonkogen und dem Auftreten von HSCR
nachgewiesen (Lyonnet et al, 1993, Luo et al, 1993). Veränderungen des *RET*-
Protoonkogens sind die am häufigsten auffindbare genetische Ursache bei HSCR
und finden sich gehäuft bei PatientInnen mit L-HSCR sowie bei familiärem Auftreten
(Amiel et al, 2008). Dies ist von Bedeutung, da bestimmte Mutationen dieses Gens
die molekulargenetische Ursache von MEN2 (Multiple endokrine Neoplasie Typ 2)
sind. MEN2 ist ein genetisches Syndrom, das in 3 Subtypen eingeteilt wird, die das
Risiko an einem isolierten medullären Schilddrüsenkarzinoms (FMTC) bzw. das
Risiko an einem medullären Schilddrüsenkarzinom und Phäochromozytom
(MEN2A, MEN2B) zu erkranken, deutlich erhöht (Marquard und Eng, 2015). Dies
muss in der Betreuung der Betroffenen berücksichtigt werden.

Mit dem besseren Verständnis der Embryologie des enteralen Nervensystems und
der Ätiopathogenese der Erkrankung sowie der Verbesserung
molekulargenetischer Untersuchungsmethoden konnten in den folgenden Jahren
weitere Kandidatengene (u.a. *GDNF*, *EDNRB*, *EDN3*, *SOX10*, *ECE1* etc.) für HSCR
beschrieben werden. Derzeit geht man davon aus, dass man bei ca. 50% der
familiären Fälle und bei 15% der sporadischen Fälle genetische Veränderungen in
codierenden Sequenzen identifizieren kann (Amiel et al, 2008).

An der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie Graz wurde bis dato
PatientInnen mit familiären oder mit langstreckigen Formen des Morbus
Hirschsprung aus zuvor genannten Gründen eine molekulargenetische
Untersuchung von Hotspots des *RET*-Protoonkogens nahegelegt. Da mit der
Methodik des Next Generation Sequencing (NGS) die Möglichkeit besteht, mehrere

Kandidatengene parallel molekulargenetisch zu untersuchen, wird nun allen in Betreuung stehenden PatientInnen bzw. deren Eltern eine molekulargenetische Untersuchung von Kandidatengen angeboten. Zusätzlich wird denjenigen PatientInnen, bei denen in der molekulargenetischen Diagnostik des *RET*-Gens keine krankheitsrelevante Veränderung gefunden wurde, ebenfalls eine NGS-Paneltestung angeboten. Aufgrund bisher publizierter Daten kann man davon ausgehen, dass man bei ca. 15% der zusätzlich getesteten Betroffenen eine krankheitsrelevante Veränderung finden kann, die auch bei kurzstreckigen und sporadischen Fällen im *RET*-Gen liegen kann und damit direkte Auswirkungen für die weitere Betreuung haben kann. Es ist dies die erste umfassende molekulargenetische Diagnostik unseres PatientInnenkollektivs.

Im Rahmen dieser Masterarbeit sollen ätiologische und pathophysiologische Mechanismen dargestellt und erste Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung präsentiert werden. Zusätzlich werden klinische Parameter wie Alter bei Erstsymptomatik, Länge des aganglionären Segmentes, Vorhandensein von Begleitfehlbildungen und die Familienanamnese der Betroffenen zusammengefasst und mit den Ergebnissen der molekulargenetischen Testung berichtet.

Grundlagen

1. Historisches

1886 hielt der dänische Kinderarzt Harald Hirschsprung (1830-1916) am Kongress der Gesellschaft für Kinderheilkunde in Berlin einen Vortrag über die „Stuhlträgheit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Colons“. Er berichtete von zwei verstorbenen Säuglingen, die an einer Obstipation mit Dilatation und Hypertrophie des Kolons gelitten hatten. Einer Erkrankung, die später seinen Namen tragen sollte: Morbus Hirschsprung. Aufgrund dieses Vortrages und der nachfolgenden Publikation 1888 gilt er als Erstbeschreiber dieser Entität (Höllwarth und Grosfeld, 2019). Im Jahr 1890 berichtete Harald Hirschsprung in der Festschrift anlässlich des 70. Geburtstags von Eduard Hensch von drei weiteren Betroffenen und betonte, dass es sich um eine angeborene Erkrankung handeln müsste, die bei erfolgreicher Behandlung mit dem Leben vereinbar sei. Als Beleg dafür nannte er neben einem Säugling, der ab Geburt keine spontanen Stuhlentleerungen hatte und im 2. Lebensmonat verstarb, auch einen 10-jährigen Jungen, der mittels regelmäßiger Einläufe gut gedieh. Er wies in seiner Arbeit auch darauf hin, dass alle bisher beschriebenen Fälle Jungen betrafen (Hirschsprung, 1890).

Die Erkrankung selbst war allerdings nicht neu. Schon in der Sushruta Samhita, einer altindischen Hinduschrift deren Aufzeichnung ins 12.-6. Jhdt. vor Christi datiert wird, wird diese Pathologie ausführlich beschrieben (Raveenthiran, 2011). Und auch in Europa wird eine fatale Obstipation im Säuglings- und Kindesalter verbunden mit massiv dilatierten Kolonabschnitten in mehreren Publikationen beginnend im 17. Jhdt. mit Fredericus Ruysch erwähnt (Sergi, 2015, Höllwarth und Grosfeld, 2019). Bemerkenswert ist eine von Domenico Battini im Jahr 1800 veröffentlichte ausführliche Beschreibung der 10-jährigen Leidensgeschichte eines betroffenen Kindes, inklusive auffälliger Familienanamnese, Therapieversuchen und Autopsieergebnissen, die schon eine Mitbeteiligung der „Nervenschichten“ des Darms postulierte (Fiori, 1998). Um 1900 ging Lennander ebenfalls von einer neurogenen Ursache aus und behandelte einen 4-jährigen Jungen, bei dem er ein Megasigmoid aber keine mechanische Obstruktion feststellte, erfolgreich mit „faradischen“ Einläufen, wie Höllwarth und Grosfeld in ihrem Buchbeitrag berichten.

Die Bestätigung dieser These mittels histologischen Nachweises eines fehlenden bzw. nur spärlich vorhandenen Nervenplexus im Kolon bei Vorhandensein desselben im Ileum wurde von Tittel in der Wiener Klinischen Wochenschrift 1901 veröffentlicht (Höllwarth und Grosfeld, 2019). Fast zwanzig Jahre später bestätigte und konkretisierte Dalla Valle diese Ergebnisse, indem er das Fehlen von Ganglienzellen im Sigmoid zweier betroffener Brüder bei unauffälligem proximalem Kolon beschrieb (Dalla Valle, 1920).

Trotzdem war eine neurogene Ursache der Erkrankung weiterhin umstritten. So ging zum Beispiel Ehrenpreis davon aus, dass das Fehlen der Ganglienzellen eine Folge der chronischen Dilatation des Darmabschnittes sei und nicht die Ursache der Erkrankung (Ehrenpreis, 1945). Diese Annahme konnte drei Jahre später widerlegt werden, indem gezeigt wurde, dass bei Patienten mit chronischer Obstipation die Ganglienzellen zwar spärlicher und weiter auseinander liegend aber immer noch nachweisbar waren (Whitehouse und Kernohan, 1948). Lange Zeit herrschte außerdem die Meinung vor, dass der krankheitsverursachende Teil des Darmes der dilatierter Abschnitt sein musste, da dieser keine ausreichende Entleerung erreichen konnte (Hiatt, 1951). Der Durchbruch in dieser Fragestellung gelang Swenson et al, als sie sowohl den radiologischen Nachweis des enggestellten Segments mittels Bariumeinlaufs als auch die erfolgversprechende operative Therapie publizierten. Sie berichteten von 26 betroffenen Kindern, bei denen das aganglionäre enggestellte Segment radiologisch diagnostiziert worden war. Bei zuerst drei Patienten wurde eine Kolostomie proximal des betroffenen, enggestellten Abschnittes angelegt, woraufhin sich die Symptome erst besserten, aber nach Verschluss der Kolostomie wieder einstellten. Die Autoren schlossen daraus, dass die Ursache der Symptome im enggestellten Segment liegen musste und entfernten dieses. Damit war eine kurative Behandlung der Erkrankung erreicht. Sie berichteten, dass alle Betroffenen einerseits symptomfrei und andererseits zufriedenstellend kontinent waren (Swenson und Bill, 1948, Swenson et al, 1949). Es bestätigten sich damit Fallbeschreibungen aus dem 19. Jhd. von Jacobi (1869) und Treves (1898), die schon von einer operativen Entfernung des betroffenen Abschnittes berichtet hatten (Höllwarth und Grosfeld, 2019).

In weiterer Folge wurden unterschiedliche Varianten der chirurgischen Therapie publiziert, die es zum Ziel hatten, möglichst kontinenzerhaltend und

gewebeschonend zu operieren (Duhamel, 1956, Rehbein, 1958, Soave, 1964). All diese Techniken wurden primär zweizeitig mit Anlage einer passageren Kolostomie durchgeführt. Ab den 80er Jahren wurden erfolgreich einzeitige (So et al, 1980) und später laparoskopische (Georgeson et al, 1995) Verfahren angewandt. De la Torre und Ortega-Salgado zeigten 1998 eine Technik (transanal endorectal pull-through; TERPT), bei der die Operation einzeitig, transanal ohne Laparotomie oder Laparoskopie durchgeführt werden konnte (De la Torre-Mondragon und Ortega-Salgado, 1998). Diese Technik ist heutzutage das bevorzugte Vorgehen bei S-HSCR mit komplikationslosem Verlauf nach frühzeitiger Diagnosestellung (Metzger, 2017).

Zur Diagnosesicherung und zur Feststellung der Ausdehnung des betroffenen Segments empfahl die Arbeitsgruppe um Swenson in den 50er Jahren Vollwandbiopsien des Rektums (Swenson et al, 1955). Später konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Aganglionose in der Submucosa annähernd dem des Plexus myentericus entsprach (Gherardi, 1960) und Meier-Ruge konnte zeigen, dass der histologische Nachweis auch mittels Rektum-Saugbiopsie möglich ist (Meier-Ruge et al, 1972). Dies wird heutzutage meist zur histologischen Diagnosesicherung verwendet. Intraoperativ kann mittels Biopsien und Acetylcholinesterasereaktion die Ausdehnung des betroffenen Segmentes im Schnellschnitt innerhalb von 10 min verifiziert werden (Kobayashi et al, 1994).

Ein weiteres diagnostisches Tool wurde von Hiatt 1951 vorgestellt. Er konnte in manometrischen Untersuchungen zeigen, dass im Bereich des aganglionären Segments anstatt der propulsiven Peristaltik Massenkontraktionen auftraten und dass es zu keiner reflektorischen Relaxation des inneren analen Sphinkters kommt (Hiatt, 1951). Auch diese Technik wurde im Laufe der Jahre kontinuierlich verbessert und erlaubt nun zuverlässige Aussagen ab den ersten Lebensmonaten (Tamate et al, 1984).

In den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurde im New England Journal of Medicine eine Arbeit veröffentlicht, in der anhand von Untersuchungen von 63 betroffenen Familien die genetischen Aspekte der Erkrankung diskutiert wurden (Passarge, 1967). In den frühen 90ern veröffentlichten 2 Arbeitsgruppen jeweils Fallberichte von Betroffenen mit TCA, die Deletionen am langen Arm des

Chromosoms 10 aufwiesen. In beiden Fällen war das *RET*-Gen im deletierten Bereich mitbetroffen (Martucciello et al, 1992, Fewtrell et al, 1994). Dass dieses Gen mit dem Vorhandensein der Erkrankung in Zusammenhang steht, konnte in weiterer Folge bestätigt werden (Lyonnet et al, 1993, Luo et al, 1993) und es konnten auch Punktmutationen dieses Gens mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert werden (Romeo et al, 1994). Im selben Jahr wurden das Gen für den Endothelin- B Rezeptor (*EDNRB*) sowie für Endothelin 3 (*EDN3*) mit der Erkrankung in Verbindung gebracht (Baynash et al, 1994, Puffenberger et al, 1994). Daraufhin wurden 41 PatientInnen mit sporadischem HSCR hinsichtlich des Vorhandenseins von Mutation in diesen Genen untersucht. Es konnten dabei bei 3 PatientInnen Mutationen im *RET*-Gen, bei zwei Mutationen im *EDNRB*-Gen und keine Mutationen im *EDN3*-Gen gefunden werden (Kusafuka et al, 1997). In den folgenden Jahren konnten weitere Gene mit der Erkrankung assoziiert werden (Amiel und Lyonnet, 2001).

2. Der Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt ist das Organsystem, das für die Verdauung von Nahrung und damit die Versorgung des Körpers mit Nährstoffen verantwortlich ist. Er besteht aus Mundhöhle, Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Coecum, Kolon, Sigmoid, Rektum und Analkanal sowie Pankreas, Leber und Gallenblase. Zu den Aufgaben des Gastrointestinaltraktes gehören Zerkleinerung und enzymatische Aufspaltung der Nahrung, Resorption der Nährstoffe, sowie Sekretion, Exkretion und Defäkation. Außerdem verfügt der Gastrointestinaltrakt über ein immunologisches System, welches in der Lage sein muss, aus der Vielzahl von Antigenen denen es ausgesetzt ist, Pathogene zu erkennen und abzuwehren. All diese Aufgaben werden erfüllt, während der Speisebrei koordiniert durch den Körper transportiert wird (Wilk, 2013). Die Wand des Gastrointestinaltraktes ist in allen Abschnitten ähnlich aufgebaut und besteht von innen nach außen aus (vgl. Abb. 1) (Ulfig, 2015):

- Tunica mucosa mit Lamina epithelialis, Lamina propria und Lamina muscularis mucosae
- Tela submucosa
- Tunica muscularis mit Stratum circulare und Stratum longitudinale

- Tunica adventitia oder Tela subserosa und Tunica serosa

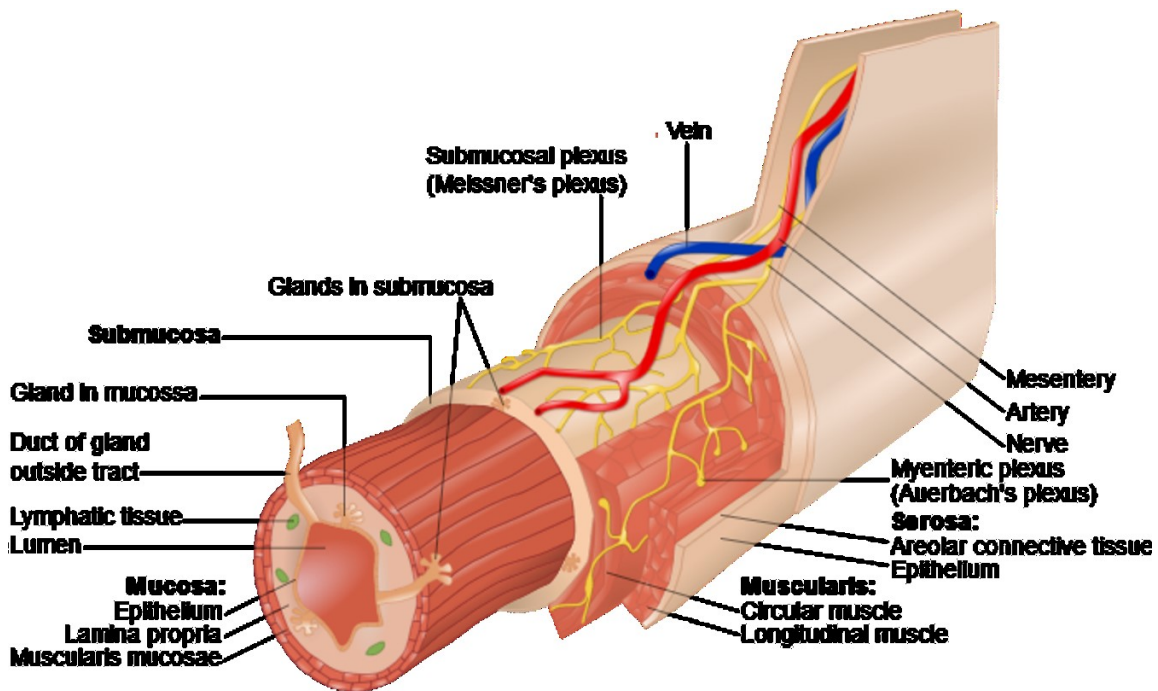


Abbildung 1. Aufbau des Darms.

Abbildung von Goran tek-en, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=31413106>

Es sind die vier Schichten des Darms abgebildet. Diese sind (von innen nach außen):

Tunica mucosa (Mucosa, Schleimhaut): Bestehend aus einer Epithelschicht, die auf einer bindegewebigen Lamina propria sitzend das Lumen des Verdauungstraktes begrenzt und Lamina muscularis mucosae, einer Schicht aus glatten Muskelzellen, die eine Eigenbeweglichkeit der Schleimhaut ermöglichen.

Tela submucosa (Submucosa): Eine Schicht lockeren Bindegewebes, in die Blutgefäße, lymphatisches Gewebe, Drüsen, Nervenfasern und Ganglienzellen (Plexus submucosus: Meissner'scher Plexus, Schabada'scher Plexus) eingelagert sind.

Tunica muscularis (Muscularis, Muskelschicht): Bestehend aus zwei Schichten glatter Muskulatur, einer inneren Ringmuskelschicht (Stratum circulare) und einer äußeren Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale). Zwischen den beiden Muskelschichten befinden sich die Ganglien- und Nervenzellen des Auerbach'schen Plexus (Plexus myentericus) in einer dünnen Bindegewebsschicht.

Die äußere Umhüllung des Darms wird entweder von Serosa gebildet- bestehend aus einer Bindegewebsschicht (Tela subserosa) und Peritonealüberzug (Tunica serosa)- oder es folgt eine Bindegewebsschicht (Tunica adventitia) als Übergang zum Einbau in die Umgebung (Ulfig, 2015).

Die Motilität des Gastrointestinaltrakts wird von vier unterschiedlichen Zellsystemen generiert: Den Zellen des enteralen Nervensystems (ENS), den glatten Muskelzellen der Muskelschichten von Tunica muscularis und Lamina muscularis mucosae, den interstitiellen Cajal-Zellen und platelet-derived growth factor Rezeptor α pos. Zellen (PDGFR α -Zellen). Glatte Muskelzellen erzeugen synchrone langsame Wellen mittels zyklischer Veränderungen der Membranpotentiale, was zu

zyklischen Kontraktionen der Muskulatur führt. Diese Aktivität wird von interstitiellen Cajal-Zellen, die Schrittmacherfunktion haben, induziert. PDGFR α - Zellen fungieren als Mediator zwischen den unterschiedlichen Zellsystemen. Steuernd involviert ist das autonome Nervensystem via ENS unter Einflüssen von Sympathikus (hemmend) und Parasympathikus (fördernd) (O'Donnell et al, 2019).

Es sind zwei Formen der Darmmotilität zu unterscheiden, die beide vom ENS generiert und extrinsisch beeinflusst werden. Die Grundaktivität wandert als myoelektrische Welle während der Fastenphase alle 80- 110min von oral nach anal. Sie benötigt für die Darmpassage 6-10min und erzeugt im Verlauf rhythmische Kontraktionen der Ringmuskulatur. Dies ermöglicht den Transport von Abfallprodukten und dürfte auch der Aufrechterhaltung des Mikrobioms dienen. Die Wellen werden nach Beginn der Nahrungsaufnahme unterbrochen. Die Peristaltik, die mit der Verdauung einhergeht, besteht aus propulsiver und nicht- propulsiver Peristaltik. Nicht- propulsive Peristaltik dient der Zerkleinerung und Durchmischung der Nahrungsbreis. Die propulsive Peristaltik erzeugt oral des Bolus eine Kontraktion der Ringmuskulatur und Relaxation der Längsmuskulatur und anal des Bolus eine Relaxation der Ringmuskulatur und Kontraktion der Längsmuskulatur. Diese Peristaltik dient der Durchmischung und dem Transport des Nahrungsbreis. Die propulsive Peristaltik ist durch das enterale Nervensystem (ENS) reflexgesteuert und wird getriggert durch Dehnung des Lumens und Freisetzung von Neurotransmittern. Sie findet auch ohne extrinsische Einflüsse statt (O'Donnell et al, 2019).

3. Das enterale Nervensystem

Das ENS, das intrinsische Nervensystem des Darms, besteht aus mehr als 100 Millionen Neuronen. Es ist die größte Untereinheit des autonomen Nervensystems und zeigt zwei Besonderheiten: Erstens ist es in der Lage, autonom die Motilität, die sekretorische und absorptive Aktivität, die immunologische Tätigkeit sowie die Reinigung und das intraluminale Milieu des Darms zu regulieren. Zweitens vermittelt es gastrointestinale Reflexe ohne Beteiligung des Zentralnervensystems (ZNS) (Gershon und Nakamura, 2019). Letzteres wurde erstmals zu Beginn des 19.Jhdts. von Bayliss und Starling entdeckt und als „ law of the intestine“, „Gesetz des Darms“

bezeichnet. Sie konnten zeigen, dass eine Druckänderung auf eine aus der eröffneten Abdominalhöhle eines betäubten Hundes herausluxierte Darmschlinge eine peristaltische Welle der Darmmuskulatur zur Folge hatte (Bayliss und Starling, 1899). Auch nach Durchtrennung sämtlicher Nervenverbindungen zum ZNS konnte diese peristaltische, aboral gerichtete Welle mittels intraluminaler Druckerhöhung generiert werden (Bayliss und Starling, 1900). Heutzutage ist dieser „peristaltische Reflex“ als unabdingbare Voraussetzung eines funktionell gesunden Gastrointestinaltraktes bekannt.

Das ENS besteht aus zwei Ganglienzellgeflechten, die miteinander verbunden in die Darmwand eingebettet sind (siehe Abb. 1). Der größere Plexus myentericus (Auerbach'scher Plexus) befindet sich im gesamten Gastrointestinaltrakt zwischen den longitudinalen und zirkulären Muskelschichten der Tunica muscularis und ist für die Motilität des Darms und Regulation der Enzymsekretion der Anhangsdrüsen des Verdauungstraktes zuständig. Der kleinere Plexus submucosus befindet sich in der Tela submucosa und gliedert sich in einen internen (Meissner'scher Plexus) und einen externen Anteil (Schabada'scher Plexus), die allerdings eng miteinander verschaltet und funktionell nicht unterscheidbar sind. Er reguliert die Feinmotorik des Darms sowie die Sekretion der Verdauungsdrüsen und ist in die Regulation immunologischer Vorgänge involviert. Im Bereich des Ösophagus ist kein Plexus submucosus ausgebildet (Nagy und Goldstein, 2017).

Der Aufbau des ENS ähnelt in seiner Struktur und seiner Funktionalität eher dem ZNS als dem peripheren Nervensystem (PNS). Es finden sich im ENS zum Beispiel keine Kollagenhüllen oder Schwann'sche Zellen, wie man sie im PNS antrifft. Stattdessen findet man Gliazellen, die am ehesten den Astrozyten des ZNS entsprechen. Zusätzlich beinhaltet es interstitielle Cajal-Zellen, die eine Intermediärposition zwischen glatten Muskelzellen und Nervenzellen des ENS haben und in der Lage sind, als Schrittmacherzellen slow-wave-Kontraktionen glatter Muskelzellen in unmittelbarer Umgebung zu stimulieren (siehe oben). Und es finden sich alle Neurotransmitter die im ZNS vorkommen auch im ENS (Gershon, 1999, Gershon und Nakamura, 2019). Die Neurone des ENS kommen in zumindest 18 unterschiedlichen Subtypen vor und werden in vier Gruppen eingeteilt: Motoneurone, intrinsische primär afferente Neurone (IPAN), Interneurone und intestinofugale afferente Neurone (IFAN) (Nagy und Goldstein, 2017). Das

Zusammenspiel all dieser Komponenten ist Voraussetzung einer koordinierten Darmtätigkeit. Die extrinsische Nervenversorgung des Darms kann via Parasympathikus und Sympathikus modulierend in diese Vorgänge eingreifen (Gershon, 1999).

4. Embryologie

Der für die Organogenese entscheidende Zeitraum beginnt mit der dritten Entwicklungswoche und endet mit der achten Entwicklungswoche. In dieser Phase, der Embryonalperiode, differenzieren sich die drei Keimblätter, aus denen die Anlagen aller wichtigen Organsysteme hervorgehen. Die Embryonalperiode wird auch als teratogene Periode bezeichnet, da der menschliche Organismus in diesem Entwicklungsstadium sehr vulnerabel gegenüber Noxen ist. Viele angeborene Fehlbildungen entstehen in dieser Entwicklungsphase (Sadler, 2014).

Am Beginn der Embryonalperiode (3. Embryonalwoche) steht die Gastrulation, wo sich aus der zweiblättrigen Keimscheibe¹ die dreiblättrige Keimscheibe² entwickelt und die Festlegung der Körperachsen stattfindet. Zuerst proliferieren Epiblastzellen an der dorsalen, der Amnionhöhle zugewandten Seite, häufen sich in der Mittellinie an und bilden den Primitivstreifen. Der Primitivstreifen legt die Längsachse des Embryos fest. Er wird von Zellen des Epiblasts durchwandert, die sich zu Entoderm und Mesoderm differenzieren. Dieser Vorgang wird als Invagination bezeichnet. Aus den zurückbleibenden Zellen des Epiblasts entsteht das Ektoderm. Die Invagination und spezifische Differenzierung der Keimblätter beginnt im kranialen Abschnitt des Primitivstreifens und dauert im kaudalen Abschnitt bis zum Ende der 4. Embryonalwoche an (Sadler, 2014).

Am kranialen Ende des Primitivstreifens befindet sich der Primitivknoten. Hier invaginieren Zellen, die weiter nach kranial bis zur Prächordalplatte wandern und den Chordafortsatz bzw. die Chorda dorsalis, das primitive Achsenorgan des Embryos bilden. Dieses trennt gemeinsam mit dem Mesoderm das Entoderm vom Ektoderm. Ausgenommen davon sind die Bereiche kranial der Prächordalplatte und kaudal des Bereiches der späteren Kloakenmembran, wo Ektoderm und Entoderm

¹ Bestehend aus Epiblast und Hypoblast

² Bestehend aus Entoderm, Mesoderm und Ektoderm

direkt aufeinandertreffen. Das Lumen des Chordafortsatzes verschwindet, wenn dieser vorübergehend als Chordalplatte in die Entodermis eingegliedert wird, indem der Boden des Chordafortsatzes mit dem Entoderm verschmilzt. Im Bereich der Primitivgrube bleibt ein kleiner Kanal zurück, der die Amnionhöhle mit dem Dottersack und nach Schluss des Neuralrohres den Neuralkanal mit der Darmrinne verbindet (Canalis neurentericus). Schlussendlich löst sich die Chorda dorsalis als solider Strang wieder aus dem Entoderm heraus und bildet die Leitstruktur zur Entstehung des Nervensystems. Reste der Chorda dorsalis sind als Nuclei pulposi der Zwischenwirbelscheiben erhalten (Sadler, 2014).

Die Lokalisation der Invagination der Epiblastzellen determiniert ihre weitere Entwicklung. Das paraaxiale Mesoderm, Ausgangspunkt der Somiten, entsteht aus Zellen, die seitlich durch den Primitivknoten bzw. durch den kranialen Abschnitt des Primitivstreifens wandern. Zellen, die durch den mittleren Abschnitt des Primitivstreifens wandern, werden zu intermediärem Mesoderm, welches Ausgangspunkt für das Urogenitalsystem ist. Durch den kaudalen Abschnitt des Primitivstreifens wandern Epiblastzellen, die in weiterer Folge das Seitenplattenmesoderm und damit den Ursprung der bindegewebigen Komponenten für Darmwand und Körperwand bilden. Zellen, die zum extraembryonalen Mesoderm und schlussendlich zum Chorionmesoderm werden, wandern durch den kaudalsten Abschnitt des Primitivstreifens (Sadler, 2014).

Embryonale Entwicklung des Gastrointestinaltraktes

Der Gastrointestinaltrakt besteht aus Anteilen aller drei Keimblätter- Entoderm, Ektoderm und Mesoderm. Aus dem Entoderm entstehen die epitheliale Auskleidung des Gastrointestinaltraktes und die Parenchymzellen von Leber und Pankreas. Aus dem Mesoderm entstehen unter anderem glatte Muskelzellen und Stromazellen, aus dem Ektoderm entstehen die Neuronen des ENS (Rolle und Puri, 2019).

Das Darmrohr, die embryonale Vorläuferstruktur des Gastrointestinaltraktes, entwickelt sich aus dem Entoderm. Dieses liegt im Stadium der Keimscheibe flach am Dach des Dottersacks. Mit dem Wachstum des Neuralrohres und der zunehmenden Krümmung des Embryos wölbt sich dieser in die Amnionhöhle vor. Es bilden sich die seitlichen Bauchfalten aus, die sich ebenso wie die

Schwanzknospe und die Kopffalte mit dem Amnion nach ventral bewegen. Schlussendlich fusionieren die Bauchfalten in der Mittellinie mit Ausnahme der Nabelregion. Das Entoderm befindet sich nun innerhalb des Körpers und bildet das Darmrohr, dessen kranialer Abschluss die Rachenmembran und kaudaler Abschluss die Kloakenmembran ist. Das Darmrohr wird in drei Teile gegliedert, dem Vorderdarm, den Mitteldarm und dem Hinterdarm. Im Bereich des Mitteldarms besteht eine breite Verbindung zum Dottersack (Ductus omphaloentericus), die im Laufe des Wachstums immer schmaler wird und schlussendlich obliteriert (Sadler, 2014).

Aus dem Vorderdarm entstehen der Ösophagus, der Magen und das Duodenum sowie Lungenknospe, Trachea, Leber- und Gallenblasenanlage sowie die beiden Pankreasknospen. Im Bereich des späteren Magens kommt es zu einer spindelförmigen Erweiterung des Darmrohres und aufgrund unterschiedlicher Wachstumsraten der Wandabschnitte zur Ausbildung einer großen Krümmung (dorsal) sowie einer kleinen Krümmung (ventral). Nach der Magendrehung, die 90° im Uhrzeigersinn um eine kranio-kaudale Achse und 30° im Uhrzeigersinn um eine dorsoventrale Achse stattfindet, kommt die große Krümmung nach links unten gerichtet zu liegen. Aufgrund der Magendrehung bildet der kaudal anschließende Teil des Vorderdarms, der erste Teil des späteren Duodenums, eine Schlinge, die gemeinsam mit dem aus der Pankreasknospe entstehenden Pankreaskopf gegen die dorsale Körperwand gedrückt werden und retroperitoneal zu liegen kommt (Sadler, 2014).

Der Mitteldarm beginnt mit der vorderen Darmöffnung, die später dem Bereich distal der Einmündung des Ductus choledochus entspricht, und endet an der hinteren Darmöffnung, die später im Bereich des distalen Drittels des Colon transversum zu finden ist. Im Bereich des Mitteldarms führt ein rasches Längenwachstum zur Entstehung der Nabelschleife und zum physiologischen Nabelbruch, sodass ab der sechsten Woche Darmschlingen über die Nabelschnur austreten und extraembryonal zu liegen kommen. Außerdem vollzieht die Nabelschleife eine Drehung um eine Achse die von der A. mesenterica superior gebildet wird. Die Drehung erfolgt um 270° gegen den Uhrzeigersinn. Ab der 10. Embryonalwoche bildet sich der physiologische Nabelbruch zurück (Sadler, 2014).

Aus dem Enddarm entwickeln sich das letzte Drittel des Colon transversum, das Colon descendens, das Sigmoid, Rektum und der obere Anteil des Analkanals (Sadler, 2014).

Sowohl kranial als auch kaudal trifft das entodermal gebildete Darmrohr auf ektodermal ausgekleidetes Gewebe: Kranial auf das Stomodeum, die primitive Mundhöhle, kaudal auf das Proktodeum, dem untersten Anteil des Analkanals. In der vierten Embryonalwoche entsteht durch das Aufreißen der Rachenmembran eine offene Verbindung zwischen Amnionhöhle und primitivem Darm in der siebten Embryonalwoche durch Aufreißen der Analmembran der Anus (Sadler, 2014).

Die Muskelschichten und Bindegewebsschichten des Gastrointestinaltraktes bilden sich aus dem viszeralem Mesoderm, das gemeinsam mit dem parietalen Mesoderm auch das Peritoneum bildet. Beides entstammt dem Seitenplattenmesoderm (Sadler, 2014).

Embryonale Entwicklung des enteralen Nervensystems

Das ENS entwickelt sich aus dem Ektoderm, welches der Ursprung für das Oberflächenektoderm und die ZNS-Anlage ist. Während der dritten Entwicklungswoche wandern Zellen des Epiblasts durch den Primitivknoten nach kranial und bilden den Chordafortsatz (siehe oben). Dieser induziert als Chorda-Mesoderm-Komplex die Bildung der Neuralplatte, einer Verdickung des Ektoderms vor dem Primitivknoten, die die ZNS- Anlage darstellt. Diese Neuralplatte wird sich in weiterer Folge beidseits des Primitivstreifens nach kaudal ausdehnen. Während im Bereich des Primitivstreifens zunehmend regressive Veränderungen auftreten und dieser langsam verschwindet, beginnen sich die Ränder der Neuralplatte aufzurichten und Neuralfalten zu bilden, die eine Neuralrinne umgeben. Deren Verschluss beginnt in der vierten Embryonalwoche auf Höhe des 5. Somiten und schreitet nach kranial und kaudal fort. Die kraniale Öffnung, Neuroporus anterior, verschließt sich ca. am 25. Embryonaltag, die kaudale Öffnung, Neuroporus posterior, ca. am 28. Embryonaltag (Sadler, 2014).

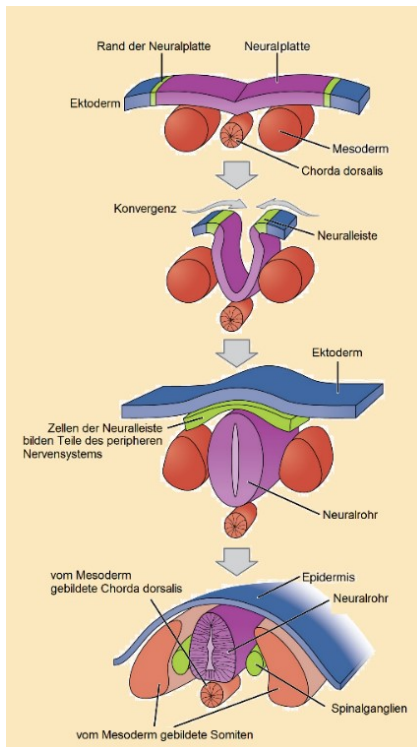


Abbildung 2. Neurulation.

1. Der Chorda-Mesoderm-Komplex induziert die Bildung der Neuralplatte- einer Verdickung neuroektodermalen Gewebes.
2. Die Ränder der Neuralplatte richten sich auf und bilden Neuralfalten, die eine Neuralrinne umgeben. Die Ränder der Neuralplatte am Übergang zum Oberflächenektoderm werden nun als Neuralleiste bezeichnet.
3. Schluss des Neuralrohrs mit Beginn in der 4. Embryonalwoche auf Höhe des 5. Somiten nach kranial und kaudal fortschreitend. Gleichzeitig vermehren sich Zellen der Neuralleiste, trennen sich vom Oberflächenektoderm, durchlaufen eine EMT und wandern ins seitliche Mesoderm aus.
4. Das Neuralrohr ist geschlossen. Die Chorda dorsalis degeneriert und bleibt in Resten als Nuclei pulposi der Disci intervertebralis erhalten. Die mesodermalen Somiten als Ausgangspunkt des Achsenskeletts und der Gliedmaßen liegen beidseits des Neuralrohrs. Die Zellen der Neuralleiste wandern entlang unterschiedlicher Migrationsrouten in ihre Zielgebiete und bilden hier z.B. die Spinalganglien der Dorsalwurzeln (Sadler, 2014, Nagy und Goldstein, 2017).

Abbildung aus *Anatomy & Physiology, Connexions Website*. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013

2912 Neurulation-02.jpg translated into German, CC BY-SA 3.0

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/90/Neurulation_2.png/608px-Neurulation_2.png

Die Zellen der Neuralleiste (NCC) entstammen dem Rand der Neuralplatte dem Übergang des Oberflächenektoderms zum Neuroektoderm. Es sind multipotente Stammzellen. Sie verlieren im Gegensatz zu den Zellen des Oberflächenektoderms, die E- Cadherin exprimieren, und den Zellen des Neuroektoderms, die N- Cadherin exprimieren, kurzfristig ihre Adhäsionsmoleküle, unterlaufen eine Epithelial-Mesenchymale-Transformation und wandern nach der Auffaltung der Neuralfalten ins seitliche Mesoderm aus. Ihre endgültige oft weit entfernte Position im Embryo erreichen sie, indem sie unterschiedlichen Migrationsrouten zu unterschiedlichen Entwicklungszeiten folgen (Nagy und Goldstein, 2017, Uribe et al, 2018).

Die Zellen der kranialen und kardialen Region der Neuralleiste wandern vor Verschluss des Neuralrohrs in die entsprechenden Regionen aus. Sie sind Vorläuferzellen von u.a. Hirnnerven, Bindegewebe und Knochen des Schädels, Grenzstrang und präaortalen Ganglien, Nebennierenmark, Schwann- Zellen, etc.. Kaudal davon beginnt die Migration erst nach dem Neuralrohrverschluss. Sie erfolgt in zwei Migrationswellen entlang zweier unterschiedlicher Routen: Die erste Welle

betrifft NCC, die nach lateral direkt unter dem Oberflächenepithel die Somiten entlangwandern und als Vorläuferzellen der Melanozyten in der Epidermis fungieren. NCC, die medial durch den cranialen Anteil der Somiten wandern, sind u.a. Vorläuferzellen der Spinalganglien, der vegetativen Ganglienzellen des Grenzstrangs und der unterschiedlichen Neuronen des ENS (Sadler, 2014).

Die Vorläuferzellen des ENS entstammen größtenteils der vagalen Region der Neuralleiste in geringem Ausmaß auch dem sacralen und thorakalen Anteil. Die Zellen der vagalen Region verlassen die Neuralleiste in der 3. Embryonalwoche und besiedeln den Darm von rostral nach kaudal, wobei das kaudale Ende in der 8. Embryonalwoche erreicht wird. Die Zellen der sacralen Region der Neuralleiste besiedeln zusätzlich den kolorektalen Darmabschnitt, nachdem dieser von Zellen der vagalen Region besiedelt worden ist. (Goldstein et al, 2013, Heuckeroth und Schäfer, 2016). Dabei bildet sich zuerst der Plexus myentericus, der auf dem Stratum circulare der Tunica muscularis liegt und nach Ausbildung des Stratum longitudinale von diesem bedeckt wird. Nachdem die kraniokaudale Besiedelung des Darm abgeschlossen ist, wandern Neuroblasten des Plexus myentericus durch das Stratum circulare in die Submucosa und bilden dort den Plexus submucosus aus. Dieser Vorgang findet ebenfalls in kraniokaudaler Richtung statt (Rolle et al, 2002).

Nagy und Goldstein berichten, dass die Migration entlang der Somiten eine der kritischen Phasen in der Entwicklung des ENS darstellt. In dieser Phase wird unter dem Einfluss von Retinsäure, die vom paraaxialen Mesoderm gebildet wird, die Expression von Rezeptor Tyrosin Kinase (RET) in NCC aktiviert, was eine Voraussetzung zur Proliferation und weiteren Differenzierung der Zellen darstellt. Diese nun RET exprimierenden Zellen werden, sobald sie in das Mesenchym des Vorderdarms einwandern, als enterale Neuralleistenzellen (ENCC) bezeichnet. (Nagy und Goldstein, 2017). Während der Migration proliferieren die ENCC extensiv, um einen ausreichend großen Pool an Vorläuferzellen zu erzeugen. Dieser Vorläuferzellpool ist unentbehrlich für die Migration aller Nervenzellen des Gastrointestinaltraktes mit Ausnahme derer des Ösophagus/Magens. Die Proliferation wird durch die Stimulation des RET-Rezeptors durch einen Komplex, der aus glial cellline derived neurotrophic factor (GDNF) und glycosylphosphatidylinositol-linked receptor (GFR α 1) gebildet wird, ermöglicht

(Butler Tjaden und Trainor, 2013). Ein partieller Verlust des GDNF-RET Komplexes führt zu einem zu geringen Vorläuferzellpool, um den gesamten Darm zu kolonisieren. Ein totaler Ausfall führt zu einer Aganglionose aboral des Magens (Gershon, 1999). Ein weiterer Signalweg, der in die Proliferation des Vorläuferzellpools involviert ist, ist der EDNRB/ EDN3 Signalweg. EDNRB und dessen aktivierender Ligand EDN3 verhindern ein vorzeitiges Ausscheiden der Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus und damit eine frühzeitige Differenzierung der ENCC und sie fördern die Migration der Zellen bis ins Colon (Nagy und Goldstein, 2017).

Eine wichtige Rolle für die Migration spielen auch interzelluläre Kontakte. Wie Nagy und Goldstein berichten, konnte gezeigt werden, dass einzelne Vorläuferzellen nicht so schnell und zielgerichtet migrieren wie solche, die sogenannte „Zellketten“ bilden. Diese Beobachtung scheint sich dadurch zu bestätigen, dass Mutationen im *L1CAM*- Gen, das für Oberflächenmoleküle der Zellen codiert, zum Auftreten von HSCR führen können (Nagy und Goldstein, 2017).

Retinsäure ist nicht nur für die Expression von RET von entscheidender Bedeutung. Im Zebrafischmodell wurde gezeigt, dass ein Mangel von Retinsäure während der Migrationsphase zu einem Auflösen der Zellkettenformation führt, was einen Stillstand der Migration und eine Ansammlung von Vorläuferzellen im Vorderdarm verursacht (Uribe et al, 2018).

Schon während der Migration beginnen sich Zellen des Vorläuferpools zu Neuronen und Gliazellen zu differenzieren, bündeln sich zu Ganglien und erzeugen schlussendlich das neuronale Netzwerk des ENS. Dabei ist die weitere Entwicklung der unterschiedlichen Nervenzelllinien von unterschiedlichen Genen, Signalwegen und Wachstumsfaktoren abhängig (Heuckeroth und Schäfer, 2016). Retinsäure spielt auch hierbei eine Rolle, indem sie fürs Überleben der ausdifferenzierten Zellen notwendig ist. So findet zwar trotz eines Mangels an Retinsäure die Differenzierung zu Neuronen statt, allerdings kommt es anschließend zur Apoptose der Neuronen und konsekutiv zu einer Aganglionose des betroffenen Darmabschnittes (Uribe et al, 2018).

Morbus Hirschsprung

1. Definition und Epidemiologie

Morbus Hirschsprung oder kongenitales Megacolon ist eine Erkrankung des enteralen Nervensystems, bei der es aufgrund einer fehlerhaften Proliferation, Migration und/oder Differenzierung von Vorläuferzellen des ENS aus der Neuralleiste in den Plexus submucosus und den Plexus myentericus des Darms zu einer Aganglionose des betroffenen Darmabschnittes kommt (Metzger, 2017). Sie wird den „dysgenetischen Neurocristopathien“ zugerechnet (Bolande, 1974). Dazu zählen auch weitere intestinale Innervationsstörungen, die als „Hirschsprung disease allied disorders“ bezeichnet werden. Beispiele hierfür sind u.a. Hypoganglionosen, Ganglienzellunreife und intestinale neuronale Dysplasie Typ A und B (Friedmacher und Puri, 2019).

Aufgrund der fehlenden Ganglienzellen kommt es zu einer unkoordinierten, dysfunktionalen Darmtätigkeit mit funktionellen Stenosen des betroffenen Darmabschnittes und erweitertem Darmanteil (Megacolon) proximal der Läsion (O'Donnell et al, 2019).

In den meisten Fällen (90%) manifestiert sich die Erkrankung postpartal mit einem verzögerten oder ausbleibenden Mekoniumabgang innerhalb der ersten 24h. Zusätzlich können sich Symptome einer Kolonobstruktion wie ein aufgetriebenes Abdomen, Erbrechen, Stuhlverhalten, Nahrungsverweigerung bis hin zum Schock bei toxischem Megacolon zeigen. Bei Spätmanifestationen kommt es entweder im Rahmen der Umstellung auf Beikost zu zunehmender Obstipation, Gedeihstörungen und Subileusepisoden, im Kleinkind- und Schulalter zusätzlich zu den zuvor geschilderten Symptomen auch zum Auftreten einer Überlaufenkopresis. Eine fieberhafte Diarrhoe mit aufgetriebenem Abdomen ist bei PatientInnen mit HSCR in den meisten Fällen eine Enterocolitis, die die Hauptursache von Morbidität und Mortalität der Betroffenen ist (Puri und Nakamura, 2019).

HSCR wird je nach Länge des betroffenen Darmabschnittes in unterschiedliche Typen eingeteilt. Die distale Grenze der Läsion ist dabei immer der innere anale Sphinkter, während die proximale Grenze variabel ist. Am häufigsten (ca. 80%) findet sich ein kurzstreckiger oder klassischer Morbus Hirschsprung (S-HSCR), wo

die Übergangszone im Bereich des Sigmoids zu finden ist. Bei einem langstreckigen Morbus Hirschsprung (L-HSCR) (ca. 15% der Fälle) sind Darmabschnitte proximal des Sigmoids bis zur Flexura coli sinistra oder bis ins Colon transversum betroffen. Selten (3-8% der Fälle) findet man eine Totale Kolon Aganglionose (TCA), die auch ein kurzes Stück des terminalen Ileums umfassen kann und welche auch als Zuelzer- Wilson- Syndrom bekannt ist oder ein ultrakurzes Segment, wo lediglich der Bereich zwischen Beckenboden und innerem analen Sphinkter betroffen ist. Eine Rarität (<1%) ist das Auftreten einer Totalen Intestinalen Aganglionose (Amiel und Lyonnet, 2001, Tam et al, 2019).

Es finden sich geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten der Aganglionose. Das Verhältnis von männlichen Betroffenen zu weiblichen Betroffenen beträgt 4:1. Allerdings ist die Geschlechtsabhängigkeit bei den verschiedenen Formen von HSCR unterschiedlich stark ausgeprägt. So ist bei L- HSCR der geschlechtsspezifische Unterschied deutlich geringer ($\text{♂}:\text{♀}$ 1:1 - 2:1) und das Geschlechtsverhältnis kehrt sich bei einer TCA sogar um ($\text{♂}:\text{♀}$ 0,8:1) (Puri und Nakamura, 2019).

Die Inzidenz der Erkrankung wird weltweit mit ca. 1:5000 Geburten angegeben. Allerdings finden sich ethnische Unterschiede. So zeigten sich bei verschiedenen epidemiologischen Studien Inzidenzen von 1:2000 bis 1:12000. Wobei Studien, die die höchsten und niedrigsten Inzidenzen aufzeigen, aus den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts stammen (Puri und Nakamura, 2019). Rezentere Studien zeigen in Europa eine Inzidenz von 1:8840 Geburten (Best et al, 2014) in Taiwan und Kalifornien Inzidenzen von 1:4545 (Chia et al, 2016, Anderson et al, 2018). In der Bevölkerung Kaliforniens wurden auch die unterschiedlichen Inzidenzen der ethnischen Gruppierungen untersucht. So fand sich HSCR bei 4,1:10000 Geburten der Afro/Amerikanischen Bevölkerungsgruppe, bei 2,5:10000 Geburten der asiatisch-pazifischen Bevölkerungsgruppe und bei 1,9:10000 Geburten der kaukasischen Bevölkerungsgruppe (Anderson et al, 2018). Auch bei einer Untersuchung von Betroffenen in New Zealand zeigten sich ethnische Unterschiede: Die Inzidenzen betragen 1:3790 Geburten bei Neuseeländern kaukasischer Abstammung, 1:6610 bei Māoris, 1:1834 bei Menschen aus dem pazifischen Raum, 1:3847 bei Asiaten und 1:5694 bei Menschen aus dem Mittleren Osten (Taghavi et al, 2018).

2. Ätiologie

Bei Morbus Hirschsprung kommt es aufgrund des Fehlens von Ganglienzellen des ENS zu einer kongenitalen funktionellen Stenose eines Darmabschnittes. ENS Zellen stammen von pluripotenten Vorläuferzellen der Neuralleiste ab, die während der Embryonalperiode in die jeweilige Zielregion wandern. Im Zuge dieser Migration kommt es neben einer ausgeprägten Proliferation der Vorläuferzellen auch zur Differenzierung derselben. Jegliche Störung oder Unterbrechung dieses Prozesses oder Vorgänge, die das Überleben der Zellen beeinträchtigen, können zum Auftreten der Aganglionose führen (Butler Tjaden und Trainor, 2013).

Aufgrund der vielfältigen Formen und Ausprägungen in denen HSCR auftritt, ist davon auszugehen, dass es viele Faktoren gibt, die bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle spielen. HSCR kann sowohl durch Mutationen in einzelnen Genen ausgelöst werden, als auch aufgrund von Kombinationen von Mutationen in unterschiedlichen Genen entstehen. Der übrige genetische Background und das Geschlecht haben ebenso Einfluss auf das Auftreten und die Ausprägung der Erkrankung wie nutritive und epigenetische Faktoren (Tam et al, 2019).

Die Erkrankung findet sich sowohl sporadisch als auch familiär und wird auf verschiedene Arten vererbt. In ca. 70% aller Fälle kommt HSCR als isolierte Erkrankung vor, in ca. 12% der Fälle tritt er im Rahmen von genetischen Syndromen und bei chromosomalen Aberrationen auf und in ca. 18% der Fälle finden sich bei den Betroffenen Begleitfehlbildungen (Puri und Nakamura, 2019).

Isolierte Formen

Isolierte Formen von HSCR können den Darm in unterschiedlichen Ausprägungen betreffen und können sporadisch oder familiär auftreten. Die verschiedenen Typen zeigen dabei eine unterschiedliche Heredität. So finden sich bei S-HSCR hereditäre Formen mit einer Inzidenz von 3,6% bis 7,8% und bei TCA 15%- 21% (Puri und Nakamura, 2019). Die meisten familiär vorkommenden Formen von HSCR werden autosomal-dominant mit unvollständiger, geschlechtsabhängiger Penetranz und variabler Expression vererbt (Arighi et al, 2005, Amiel et al, 2008). Pathogene Veränderungen finden sich dabei in unterschiedlichen Genen, die in die

Embryonalentwicklung des ENS involviert sind, wobei am häufigsten das *RET*-Gen betroffen ist (Nagy und Goldstein, 2017).

Bei sporadischen Fällen konnten unterschiedliche Kandidatengene identifiziert werden, die meist einem der Signalwege der Embryogenese des ENS zugeordnet werden können (Moore, 2019):

1. RET Signalweg mit *RET*, *GDNF*
2. EDNRB Signalweg mit *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*
3. NRG Signalweg mit *NRG1* und *NRG3*
4. SEMA Signalweg mit *SEMA3C* und *SEMA3D*

Fast allen Veränderungen in diesen Genen ist gemein, dass sie eine unvollständige Penetranz aufweisen, also nicht notwendigerweise zum Auftreten der Erkrankung führen. Außerdem findet sich eine variable Expression, d.h. Veränderungen desselben Gens können unterschiedliche Ausprägungen der Erkrankung bedingen. Und es wurde nachgewiesen, dass das Vorhandensein von bestimmten Polymorphismen u. a. des *RET*-Gens mit dem Auftreten von HSCR assoziiert sind (Arighi et al, 2005, Amiel et al, 2008, Emison et al, 2010). McCallion et al konnten im Mäusemodell zeigen, dass Interaktionen des *RET*- und des *EDNRB*-Gens in der Pathogenese von HSCR auch insofern von Bedeutung sind, als dass das Auftreten bzw. die Ausprägung der Erkrankung vom Vorhandensein von Mutationen in einem oder beiden Genen entscheidend beeinflusst wird. Nach Kreuzung von *RET*^{+/+} Mäusen mit einem unauffälligen Phänotyp und *EDNRB*^{-/-} Mäuse mit einer Aganglionose des distalen Kolons zeigten die Nachkommen aufgrund der verringerten Gendosis von *EDNRB* eine langstreckige Aganglionose (McCallion et al, 2003).

Ad 1) RET Signalweg

Der am häufigsten ursächlich betroffene Signalweg bei HSCR ist der RET Signalweg. RET, eine Transmembran Rezeptor Tyrosin Kinase, wird auf ENCC exprimiert. Dieser Rezeptor ist ein wichtiger Faktor in der Entwicklung des Nervensystems und in der Entwicklung von Geweben, die sich aus Zellen der Neuralleiste entwickeln. Er ist auf vielfältige Weise in unterschiedlichste Aspekte der ENS Entwicklung involviert. Seine Expression erfolgt unter Einfluss der

Transkriptionsfaktoren SOX10 und PHOX2B. Ein Verlust eines dieser Faktoren führt zu einer TCA (Nagy und Goldstein, 2017).

RET wird durch GDNF aktiviert. Dieses Sekretprotein, das im Mesenchym des Darms gebildet wird, bildet mit seinem Co- Rezeptor GFR α 1 einen Komplex, durch dessen Bindung an RET die Autophosphorylierung von RET induziert wird. Dies aktiviert weitere Signalwege, die die Proliferation, die Migration, das Überleben und die Apoptose von ENCC regulieren. Mutationen des RET- Signalwegs finden sich bei 15-35% der Patienten mit sporadischem HSCR und bei 50% der familiären Fälle (Butler Tjaden und Trainor, 2013).

RET-Gen:

Das *RET*-Gen ist am langen Arm des Chromosom 10 lokalisiert (10q11.21) und umfasst 20 Exons. Es codiert für den RET-Transmembran Rezeptor, der zur Familie der Rezeptor Tyrosin Kinasen gehört. Das *RET*-Gen ist ein Protoonkogen, in dem sowohl Punktmutationen als auch ein zytogenetisches Rearrangement zu einer onkogenen Aktivierung führen können (NCBI Gene reports, 2019). Keimbahn-Mutationen des *RET*-Gens können unterschiedliche Auswirkungen haben. So führen sog. loss-of-function Mutationen zu HSCR und wurden auch bei PatientInnen mit Nierenagenesie nachgewiesen. Im Gegensatz dazu führen gain-of-function Mutationen zu den unterschiedlichen Typen des MEN2, wobei es hier auch Assoziationen mit HSCR gibt (Arighi et al, 2005).

Loss-of-function Mutationen des *RET*-Gens finden sich bei ca. 50% der familiären Fälle und 15% der sporadischen Fälle von HSCR (Amiel et al, 2008). Sie können im gesamten codierenden Bereich auftreten. Es finden sich Punktmutationen in Form von Missense- oder Nonsense-Mutationen, Insertionen, Deletionen mit oder ohne Frameshift und auch Splice-Mutationen. Der Großteil dieser Mutationen führt zu einer Verringerung der Proteindosis oder zu einem Verlust der Funktion des Proteins (Arighi et al, 2005). Diese Mutationen können sowohl zu S-HSCR als auch zu L-HSCR führen und zeigen eine unvollständige Penetranz von 50- 70% (Butler Tjaden und Trainor, 2013).

Zusätzlich zu eindeutig krankheitsverursachenden Veränderungen im *RET*-Gen wurde mittels Assoziationsstudien eine sog. Risikovariante im nicht-codierenden Bereich identifiziert. Emison et al zeigten in HSCR-Familien einen Zusammenhang

zwischen dem Vorhandensein eines Single Nukleotid Polymorphismus (SNP) eines Enhancer des *RET*-Gens im Intron 1- *RET*+9.7 (rs2435357C>T) und dem Auftreten von Morbus Hirschsprung. Dieser ist mit einer signifikant häufigeren Allelfrequenz (AF) bei Betroffenen (AF 0,66) als in der nicht betroffenen Bevölkerung zu finden. Wobei sich ethnische Unterschiede der Verteilung des Polymorphismus in der Bevölkerung zeigten (europäisch-kaukasisch: AF 0,25, asiatisch: AF 0,46), die sich auch in der unterschiedlichen Inzidenz der Erkrankung in den jeweiligen Bevölkerungsgruppen finden. In der Nähe dieses SNP (rs2435357C>T) befinden sich Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch solche, die mit Retinsäure interagieren (RARE, retinoid acid response elements). Emison et al weisen in ihrer Arbeit daraufhin, dass der Polymorphismus keine dieser Bindungsstellen direkt zerstört, sprechen aber die Möglichkeit an, dass entweder neue Bindungsstellen induziert werden könnten oder der Zugang zu vorhandenen durch den Polymorphismus beeinträchtigt sein könnte (Emison et al, 2005).

GDNF-Gen:

Mutationen im *GDNF*-Gen (5p13.2) sind eine seltene Ursache (<1%) für HSCR und sind häufig in Kombination mit Mutationen in weiteren Kandidatengenen oder bei PatientInnen mit Down Syndrom nachgewiesen worden. Sie folgen dem autosomal-dominanten Erbgang (Amiel et al, 2008).

NRTN-Gen:

Neurturin (NRTN oder NTN) ist ein Ligand der GDNF Familie, der an GFR α 2 bindet und damit RET aktiviert. Mutationen im *NRTN*-Gen (19p13.3) wurden in seltenen Fällen bei HSCR nachgewiesen. In diesen Fällen wurden gelegentlich zusätzlich Mutationen in weiteren Kandidatengenen gefunden, was *NRTN*-Mutationen eventuell eine modulierende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zuschreibt (Amiel et al, 2008, Butler Tjaden und Trainor, 2013).

Ad 2) EDNRB Signalweg

Der EDNRB Signalweg besteht aus dem Endothelin B Rezeptor (EDNRB), einem Oberflächenrezeptor der auf ENCC exprimiert wird, seinem Liganden Endothelin 3 (ET3) der im Mesenchym des Darms exprimiert wird und Endothelin Converting Enzym (ECE1). Der Signalweg fördert die Proliferation der ENCC und hemmt deren

neuronale Differenzierung. Ein Fehlen von EDNRB, ET3 oder ECE1 führt zu einer kolorektalen Aganglionose, da dieser Signalweg die embryonale Entwicklung des ENS ab Besiedelung des Caecum maßgeblich zu beeinflussen scheint (Nagy und Goldstein, 2017). Mutationen in diesem Signalweg konnten in 5% der HSCR Betroffenen nachgewiesen werden (Amiel und Lyonnet, 2001).

Ad 3) NRG Signalweg

Dieser Signalweg ist in die Entwicklung des ENS involviert, indem er die Balance der unterschiedlichen Signalwege moduliert. Es wurde gezeigt, dass *NRG1* die *GDNF*- induzierte neuronale Zell-Differenzierung hemmt, umgekehrt hemmt *GDNF* den *NRG1*-Signalweg über Downregulation seines Rezeptors *ERBB2* (Gui et al, 2013).

NRG1-Gen:

Pathogene Varianten des *NRG1*-Gens (8p12) sind bei weniger als 1% der Betroffenen mit dem Auftreten von HSCR assoziiert. Sie wurden bisher in den meisten Fällen bei PatientInnen mit S-HSCR gefunden, die keine Begleitfehlbildungen hatten. Allerdings wurden sie auch bei mindestens einem Betroffenen mit L-HSCR und einigen wenigen mit Begleitfehlbildungen nachgewiesen. Sie werden autosomal- dominant vererbt (Tang et al, 2012a).

NRG3-Gen:

Mutationen des *NRG3*-Gens, vor allem Kopienzahlveränderungen, wurden ebenfalls mit dem Auftreten von HSCR in Zusammenhang gebracht (Tang et al, 2012b).

Ad 4) SEMA Signalweg

Semaphorine der Klasse 3 sind sezernierte Glykoproteine, die eine Rolle bei der Zellmigration, -Proliferation und dem Überleben der Zellen unterschiedlicher Gewebe spielen. Sie sind für die Ausbildung neuronaler Verbindungen notwendig. Als Co-Rezeptoren der Signalübertragung fungieren Neuropilin- und Plexin-Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass *SEMA3C*- und *SEMA3D*-Signalwege in der Entwicklung des ENS eine regulatorische Funktion innehaben und Veränderungen dieser Gene zum Auftreten einer Aganglionose führen können (Jiang et al, 2015).

Syndromale Formen

HSCR kann auch im Rahmen von genetischen Syndromen vorkommen. Darunter finden sich sowohl Neurokristopathien als auch Syndrome, die nicht mit Neuralleistenzellen in Zusammenhang stehen. Das häufigste Syndrom (>90%), das mit dem Auftreten von Morbus Hirschsprung assoziiert ist, ist die Trisomie 21. Je nach Publikation findet sich bei 4,5% - 16% der HSCR Betroffenen eine Trisomie 21 (Puri und Nakamura, 2019).

Trisomie 21

Trisomie 21 oder Down Syndrom ist eine der häufigsten numerischen Chromosomenaberrationen und tritt mit einer Inzidenz von ca. 1:800 Geburten auf. Betroffene haben neben einer psychomotorischen Retardierung variabler Ausprägung und typischen morphologischen Kennzeichen unter anderem auch ein 40-fach erhöhtes Risiko gegenüber der generellen Bevölkerung, an einem Morbus Hirschsprung zu leiden (Arnold et al, 2009).

Beispiele für Neurokristopathien, die mit HSCR assoziiert sind

Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN 2):

MEN2 tritt in drei unterschiedlichen Typen auf und wird durch gain-of-function Mutationen des *RET*-Protoonkogens verursacht (siehe Tab. 1) (Arighi et al, 2005).

Tabelle 1. Typen, Klinik und Mutationen von MEN2.

Typ	Klinik	Genetische Veränderung
MEN 2a	Medulläres Schilddrüsenkarzinom, Phäochromozytom, Nebenschilddrüsenhyperplasie/ Adenom	Punktmutationen in Hotspots der Exons 10, 11, Duplikationen von 9 oder 12bp in Exons 10, 11
FMTC	Familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom	Punktmutationen in Hotspots der Exons 10, 11, 13, 14, 15,
MEN 2b	Medulläres Schilddrüsenkarzinom, Phäochromozytom, Schleimhautneurome (Lippe, Zunge), intestinale Ganglioneurome, marfanoider Habitus	Punktmutationen Hotspots Exons 14, 15, 16

MEN2a und FMTC können mit HSCR assoziiert auftreten (Arighi et al, 2005). Für diese scheinbare paradoxe Assoziation konnten Arighi et al 2004 eine Erklärung liefern. Sie zeigten, dass bestimmte Mutationen des Exons 10 einerseits via intermolekularer Disulfid- Bindung die Bildung von RET-Homodimeren induzieren und damit zur Aktivierung von RET und rapider Proliferation der Zellen führen, diese Mutationen andererseits die Expression von RET an der Zelloberfläche reduzieren und dass RET-Homodimere nicht auf GDNF reagieren. Diese Mutationen verursachen damit gleichzeitig eine gain-of-function hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit und eine loss-of-function hinsichtlich der GDNF-induzierten Fähigkeit der Zellen zur Migration, Differenzierung und zur Prävention der Apoptose (Arighi et al, 2004).

Haddad Syndrom:

Vom Haddad Syndrom spricht man, wenn PatientInnen mit kongenitalem zentralem Hypoventilationssyndrom (CCHS) an HSCR leiden. Dies betrifft ca. 20% der CCHS PatientInnen und wird durch Mutationen im *PHOX2B*-Gen verursacht. Die Betroffenen haben meist einen L-HSCR oder eine TCA und es gibt keine Geschlechtsunterschiede in der Inzidenz. Bei ca. 10% kann man bei einem Elternteil ein somatisches Mosaik nachweisen, welches zum Auftreten eines late-onset CCHS führen kann (Amiel et al, 2008).

Shah-Waardenburgsyndrom:

Zu den Waardenburg-Syndromen zählt man eine Gruppe von genetischen Syndromen, die mit Pigmentstörungen von Haut, Augen und Haaren sowie Taubheit einhergehen. Beim Shah-Waardenburg-Syndrom (Waardenburg-Syndrom Typ 4) leiden die Betroffenen zusätzlich unter einer Aganglionose des Kolons (Moore, 2019). Mutationen in unterschiedlichen Genen können zu diesem Syndrom führen. Mutationen, die im *EDN3/EDNRB* Signalweg auftreten und zum Shah Waardenburg- Syndrom führen, werden autosomal rezessiv vererbt. Mutationen im *SOX10*-Gen werden autosomal-dominant vererbt (Butler Tjaden und Trainor, 2013).

Beispiele für weitere Syndrome, die mit HSCR assoziiert sind

Mowat Wilson Syndrom

Dieses Syndrom wird durch Mutationen (meist Deletionen) des *ZFHX1B*-Gens verursacht und ist neben dem Auftreten einer Aganglionose durch mentale Retardierung, Microcephalie, Epilepsie und weitere Malformationen wie Hypospadie, Nierenfehlbildungen, cardiale Fehlbildungen und ZNS-Fehlbildungen gekennzeichnet (Amiel et al, 2008).

Goldberg- Shprintzen Syndrom

Dies ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Sie wird durch Mutationen des *KIAA1279*-Gens verursacht und führt zu einer milden mentalen Retardierung, Mikrocephalie, Polymikrogyrie, Dysmorphiezeichen wie Hypertelorismus, prominenter Nase, schütterem Haar, Gaumenspalte und Iris Kolobomen in Verbindung mit HSCR (Amiel et al, 2008).

Chromosomenaberrationen

Chromosomenaberrationen die mit dem Auftreten von HSCR assoziiert sind u.a.: Interstitielle Deletion 13q, interstitielle Deletion 10q11.2, partielle Deletion 2p, DiGeorge Syndrom, Trisomie 8 Mosaik, XXY (Klinefelter Syndrom), partielle Duplikation 2q, Tetrasomie 9p, Deletion 20p und Trisomie 18 Mosaik (Amiel et al, 2008, Puri und Nakamura, 2019).

Assoziierte Fehlbildungen

Es gibt verschiedene kongenitale Fehlbildungen, die mit HSCR assoziiert auftreten können. Moore fasst in seinem Buchbeitrag 18 Publikationen zusammen, die eine Durchschnittsinzidenz von 24,9% (Spannbreite von 5%- 32%) von assoziierten Fehlbildungen zeigen. Am häufigsten finden sich diese im Gastrointestinaltrakt (8,05%). Dazu zählen: Malrotation (die auch zum Volvulus führen kann), Anorektale Malformationen, Dünn- und Dickdarm Atresie. Des Weiteren findet man Fehlbildungen des ZNS, des Urogenitaltraktes (u.a. Nierenagenesie), der Extremitäten sowie muskuloskelettale Fehlbildungen und cardiale Fehlbildungen (Moore, 2019).

Nichtgenetische Faktoren

Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen genetischen Ursachen gibt es noch weitere Aspekte, die mit der Entstehung eines Morbus Hirschsprung in Zusammenhang stehen. Dazu gehören neben nutritiven und medikamentösen Faktoren auch epigenetische Mechanismen, die Einfluss nehmen können (Torroglosa et al, 2016, Heuckeroth und Schäfer, 2016).

Retinsäure:

Fu et al konnten im Mausmodell (*Rbp4*^{-/-})³ zeigen, dass eine Vitamin A freie Ernährung während der Embryonalperiode bei 31/ 33 Mäusen zu einer Aganglionose des distalen Darms führte, während suffizient ernährte Mäuse mit derselben genetischen Prädisposition zum allergrößten Teil (32/34) eine unauffällige ENS Entwicklung zeigten. Um den Einfluss eines Vitamin A Mangels bei entsprechender genetischer Prädisposition nachzuweisen, wurden „Doppelt-knock out“ Mäuse (*Rbp4*^{-/-} und *RET*^{+/-}) verwendet. Dabei zeigte sich, dass 10/20 dieser Mäuse unter Vitamin A effizienter Diät eine distale Aganglionose entwickelten, die unter Vitamin A Mangel Diät in der Ausdehnung ausgeprägter war (Fu et al, 2010). Uribe et al konnten im Zebrafischmodell den Einfluss von Retinsäure auf die Migration der ENCC zeigen und dass ein Retinsäuremangel zur Apoptose von enteralen Neuronen führt (Uribe et al, 2018). Beide Autorengruppen schließen aus ihren Ergebnissen, dass neben genetischer Prädisposition auch alimentäre Faktoren zur Entstehung eines Morbus Hirschsprung beitragen können (Fu et al, 2010, Uribe et al, 2018).

Ibuprofen:

Schill et al konnten im Tiermodell (Zebrafisch) zeigen, dass eine Gabe von Ibuprofen eine Aganglionose des Enddarms verursacht. Auf Hühnerdarmkulturen angewandt konnten sie zeigen, dass ENCC nachdem sie Ibuprofen ausgesetzt worden sind, eine geringere Anzahl an Laminopoden aufwiesen und ihre Migrationsfähigkeit reduziert war. In der *RET*^{+/-} Maus wurde durch Zufuhr von Ibuprofen die ENCC Kolonisierung des Darms gehemmt. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe,

³ *Rbp4*^{-/-} Defizienz von Serum retinol- binding- protein,

dass Ibuprofen in der Pathogenese des Morbus Hirschsprung eine zumindest modulierende Rolle haben könnte (Schill et al, 2016).

3. Pathophysiologie

Morbus Hirschsprung ist eine Erkrankung, bei der es im Bereich eines aganglionären Darmabschnittes zu einer funktionellen Stenose kommt. Im aganglionären, enggestellten Segment sind weder im Plexus submucosus noch im Plexus myentericus Ganglienzellen des ENS vorhanden. Gleichzeitig finden sich in diesem Abschnitt in der Submucosa und zwischen den Muskelschichten der Tunika muscularis hypertrophe cholinerge Nervenfaserbündel, die mit parasymphatischen präganglionären Nervenfasern interagieren (O'Donnell et al, 2019). Von den Axonen dieser parasymphatischen Nervenfasern wird kontinuierlich Acetylcholin abgegeben, was zu einer vermehrten Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität führt, die immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Meier-Ruge et al, 1972). Diese Aktivität nimmt von distal nach proximal ab. Das Ende der Zone der erhöhten AChE-Aktivität muss jedoch nicht dem proximalen Ende des aganglionären Segments entsprechen, welches meist noch etwas weiter nach proximal reicht. Im Anschluss daran findet sich die Transitionszone, ein hypoganglionäres Segment von variabler Länge, dem ein hypertrophierter, dilatierter Darmabschnitt folgt. Die erhöhte cholinerge Aktivität wird als eine der Ursachen für die Spastizität des aganglionären Darmabschnittes genannt. Zusätzlich finden sich nur spärlich vorhandene Cajal-Zellen im aganglionären Bereich (O'Donnell et al, 2019).

Eine weitere Ursache für die Spastizität und Unfähigkeit des aganglionären Darms propulsive Wellen zu erzeugen, könnte neben den zuvor genannten auch das Fehlen von Nervenfasern, die NOS (Stickstoffmonoxid-Synthase)-haltig sind, sein. NO (Stickstoffmonoxid) ist einer der am stärksten relaxativ wirkenden Neurotransmitter des Darms (O'Donnell et al, 2019). Es konnte gezeigt werden, dass im aganglionären Segment des Darms die neurale NOS mRNA nur 1/50- 1/100 der eines ganglionären Darmabschnittes beträgt (Kusafuka und Puri, 1997, Rolle et al, 2002,) und dass die Bereitstellung von S- Nitroso-N-Acetylpenicillamin, einer externen NO Quelle, zu einer Reduktion des Ruhedrucks um 70% in glatten Muskelzellen eines aganglionären Darmabschnittes führen (Bealer et al, 1994).

Zusätzlich finden sich im aganglionären Segment sowohl in der Submucosa als auch in den Muskelschichten der Tunica muscularis vermehrt adrenerge Nervenfasern. Deren Anordnung scheint chaotisch und ihre Rolle in der Pathogenese von HSCR ist noch nicht geklärt. Sie dürften zum erhöhten Tonus des Darmabschnittes allerdings kaum etwas beitragen, da die Stimulation der adrenergen Nervenfasern eine Relaxation der Muskulatur verursacht. Außerdem lässt sich trotz erhöhter Anzahl von adrenergen Fasern keine erhöhte Sensitivität des aganglionären Darmabschnittes auf Epinephrin nachweisen (O'Donnell et al, 2019).

Wie die Ätiologie von HSCR ist auch die Pathophysiologie der Erkrankung noch nicht abschließend erklärt. Es dürfte sich auch hierbei um ein Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren handeln, die schlussendlich die Symptomatik verursachen.

4. Diagnostik

Die meisten Betroffenen präsentieren sich in der Neugeborenenperiode mit der typischen Symptomatik von ausbleibendem oder verzögertem Mekoniumabgang, Obstipation, aufgetriebenem Abdomen und Erbrechen. Bei der rektalen Untersuchung zeigt sich ein erhöhter Sphinktertonus und es kommt nach digital-rektaler Untersuchung oftmals zu einer explosionsartigen Entleerung von Mekonium/Stuhl und Darmgasen. Als Differentialdiagnose müssen u.a. folgende Erkrankungen ins Kalkül gezogen werden: Mekoniumileus bei Cystischer Fibrose, Mekoniumpfropfsyndrom, Ileumatresie oder Kolonatriesie, Anorektale Malformationen, Malrotation, NEC (Nekrotisierende Enterokolitis) sowie internistische Ursachen der chronischen Obstipation wie Hypothyreose, Elektrolytstörungen und medikamentöse Ursachen (Puri und Nakamura, 2019).

In der 2014 veröffentlichten europäischen Prävalenzstudie⁴ konnte bei 803 von 1039 isolierten Fällen von Morbus Hirschsprung der Diagnosezeitpunkt erhoben werden. Es zeigte sich, dass dieser in 64,1% der Fälle innerhalb der ersten Lebenswoche war. Weitere 14,4% wurden in den Lebenswochen 2- 4 diagnostiziert,

⁴ EUROCAT Daten (31 Register aus 20 Ländern) der Geburtsjahrgänge 1980- 2009

weitere 11,8% der Fälle vom 2. Lebensmonat bis zum Ende des ersten Lebensjahres. Lediglich 3,1% der Betroffenen waren bei Diagnosestellung älter als 1 Jahr gewesen (Best et al, 2014). Ähnliches wurde auch in Australien festgestellt. Hier wurden 90,5% der Patienten in der Neugeborenenperiode diagnostiziert (Singh et al, 2003).

Laut den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie erfolgt die Diagnosestellung auf drei Ebenen: Radiologisch, funktionell und histologisch. Allerdings ist lediglich die histologische Untersuchung beweisend für das Vorliegen eines Morbus Hirschsprung. Zusätzlich hat die molekulargenetische Diagnostik an Stellenwert gewonnen. Sie ist zwar kein Bestandteil der Diagnosesicherung, wird allerdings bei PatientInnen mit L-HSCR empfohlen, um eine entsprechende Betreuung und Beratung zu ermöglichen. Der Grund dafür ist der hohe Prozentsatz von Veränderungen des *RET*-Gens in dieser Kohorte (Fitze, 2016).

Radiologisch

Röntgenuntersuchungen des Abdomens untermauern die Verdachtsdiagnose und helfen beim Ausschluss der Differentialdiagnosen. Es werden zuerst Leeraufnahmen (ohne Kontrastmittel) in zwei Ebenen (im anteriorposterioren und seitlichen Strahlengang) gemacht. Damit können Gas- und Flüssigkeitsverteilung der Darmschlingen beurteilt werden. Eventuell lässt sich hier schon ein enggestelltes und ein dilatiertes Segment darstellen und man kann die Lage der Übergangszone vermuten. Genauere Information erhält man mittels einer Defäkographie, einem Kontrastmitteleinlauf unter Durchleuchtung, der bei Säuglingen mit wasserlöslichem Kontrastmittel bei größeren Kindern auch mit verdünntem Barium durchgeführt wird. Hiermit kann die Länge des enggestellten Segmentes, die trichterförmige Übergangszone und der dilatierte proximale Darm dargestellt werden und man kann eventuell auch das Auftreten oder Ausbleiben einer Relaxation des M. sphinkter ani internus beurteilen (Heyes und Kelleher, 2019).

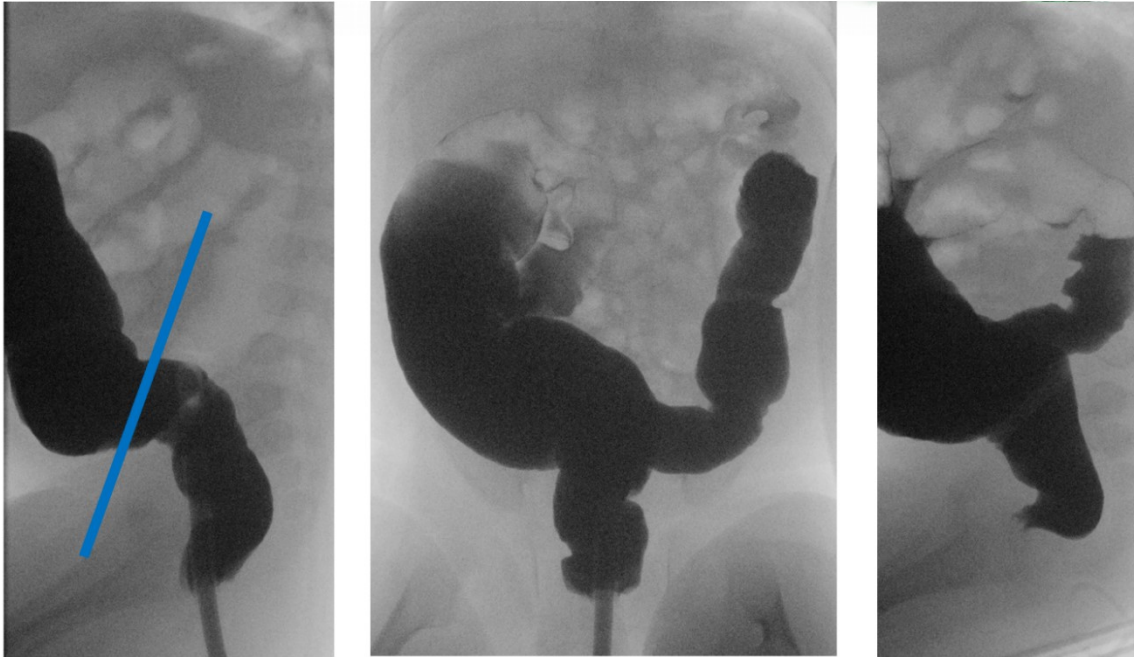


Bild a)

Bild b)

Bild c)

Abbildung 3. Defäkographie Morbus Hirschsprung.

Bild a) Kontrastmittelfüllung via Darmrohr mit Kontrastierung des Dickdarms und Darstellung der rectosigmoidalen Übergangszone. Bild b) Enggestelltes aganglionäres Segment und Dilatation des vorgeschalteten Darmabschnitts. Bild c) Defäkationsversuch

Dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von: E. Sorantin, Klinische Abteilung für Kinderradiologie, Univ.-Klinik für Radiologie, Medizinische Universität Graz/A

Funktionell

Mittels Anorektalmanometrie (Rektummanometrie) kann das anorektale Druckprofil abgeleitet und das Fehlen der reflektorischen Relaxation des inneren analen Sphinkters nachgewiesen werden. Diese Relaxation wird im regelrecht innervierten Darm nach einem Dehnungsreiz (Inflation des Messballons) via Freisetzung von Neurotransmittern (u.a. NO) ausgelöst. Das Fehlen der Relaxation gilt als dringendes Verdachtsmoment für das Vorliegen von HSCR. Die Aussagekraft dieser Untersuchung ist im Neugeborenenalter aufgrund der Unreife der Ganglienzellen geringer (ca. 75%). Es kann sowohl zu falsch positiven als auch falsch negativen Ergebnissen kommen. Bei älteren Säuglingen und Kleinkindern ist die Aussagekraft deutlich höher und die Anorektalmanometrie sollte aufgrund der geringeren Invasivität und dem Vorhandensein einer größeren Anzahl an funktionellen Obstipationen in dieser Altersgruppe im ersten Schritt der beweisenden Rektumbiopsie vorgezogen werden (Athanasakos und Cleeve, 2019).

Abbildung 4. Anorektalmanometrie Kurve

Durch unterschiedliche Farbcodierung (von grün- niedriger Druck zu violett- hoher Druck) wird der mittels flüssigkeitsperfundierte rektale Katheter abgeleitete intraluminale Druck dargestellt. Die Messpunkte sind am Katheter wendeltreppenartig in 1cm Abständen angebracht.

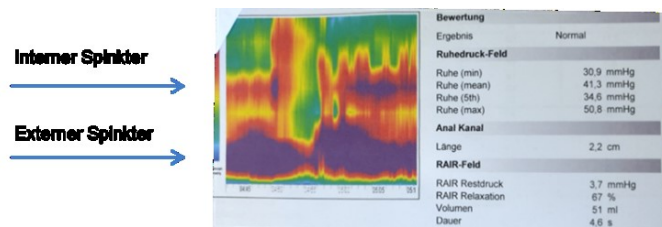


Bild 1 zeigt eine unauffällige Ableitung.

Nach Inflation des Ballons mit 50ml, kommt es zur Relaxation des internen Sphinkters um 67%, während der externe Sphinkterwillentlich kontrahiert bleibt.

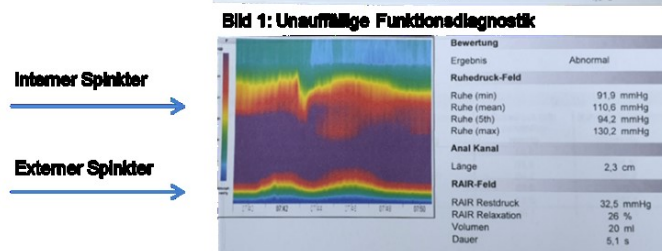


Bild 1: Unauffällige Funktionsdiagnostik

Bild 2 zeigt eine auffällige Ableitung.

Es kommt zu keiner ausreichenden Relaxation des internen Sphinkters, zusätzlich zeigt sich intraluminal ein erhöhter Ruhedruck. Damit ergibt sich der dringende Verdacht auf das Vorliegen eines Morbus Hirschsprungs.

Bild 2: Morbus Hirschsprung

Dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von: A. Huber-Zeyringer, Ambulanz für Funktionsdiagnostik, Univ.-Klinik für Kinder- und Jugendchirurgie, Medizinische Universität Graz/A

Histologisch

Beweisend für das Vorliegen eines Morbus Hirschsprung ist die histologische Diagnostik. Dafür wird mittels Rectumsaugbiopsie und/oder Vollwandbiopsie des Darms aus zumindest drei Etagen⁵ gewonnenes Gewebe untersucht. Das Vorliegen folgender Kriterien ist zur Diagnosestellung nötig: Das Fehlen von Ganglienzellen im Bereich von Plexus submucosus und Plexus myentericus, das Vorkommen hypertropher Nervenbündel zwischen den Muskelschichten der Ring- und Längsmuskulatur, eine Hyperplasie der cholinergen Nervenfasern in der Submukosa und der Nachweis einer erhöhten Acetylcholinesteraseaktivität mittels immunhistochemischer Methoden. Letzteres kann aufgrund der postpartalen Maturation des ENS in den ersten Lebenswochen falsch- negativ ausfallen. Die Biopsie ist daher ab der 6- 8. Lebenswoche aussagekräftig. (Metzger, 2017)

⁵ 2, 3 und 6cm aboral der Linea dentata (Metzger, 2017)

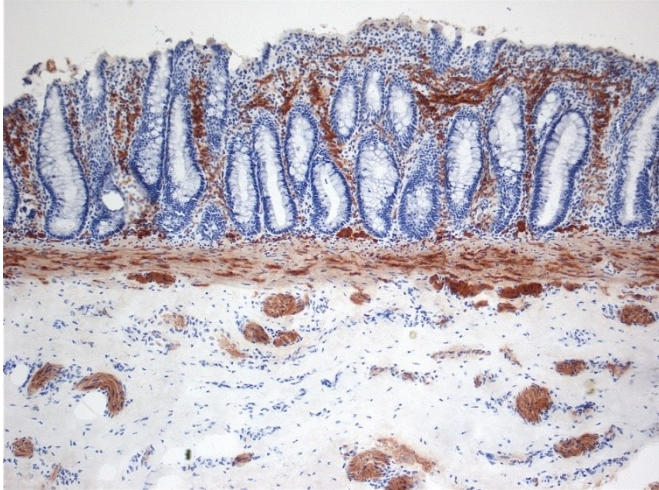


Abbildung 5. Immunhistochemie des Mb. Hirschsprung

Dickdarm-Mucosa mit Krypten und Becherzellen (blau gefärbt), im Bereich der Lamina propria mucosae finden sich immunhistochemisch nachgewiesen vermehrt AChE -pos. Fasern (braun gefärbt).

By Marvin 101 - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4670973>

Molekulargenetisch

Für L-HSCR ist aufgrund der höheren Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer kausalen Mutation im *RET*-Gen eine molekulargenetische Diagnostik der Hotspots dieses Gens seitens der deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie empfohlen. Bestimmte Mutationen des *RET*-Gens können neben dem Auftreten eines Mb. Hirschsprungs auch zu einem MEN2- Syndrom führen (siehe oben). Wird eine dieser Mutationen diagnostiziert, können entsprechende prophylaktische Maßnahmen eingeleitet werden (Fitze, 2016). Mit zunehmender Kenntnis weiterer HSCR assoziierter Gene und den molekulargenetischen Möglichkeiten der Hochdurchsatzsequenzierung haben viele Zentren begonnen, ihren PatientInnen eine umfassendere genetische Diagnostik anzubieten. Dies dient einerseits einer verbesserten Beratung und Betreuung der PatientInnen und verbessert das Verständnis der Ätiopathogenese der Erkrankung.

5. Therapie

Die Therapie des Morbus Hirschsprung besteht in einer operativen Entfernung des aganglionären Segments unter Schonung von Nerven-, Gefäßversorgung und Muskulatur des Beckenbodens und des analen Sphinkterapparats. Bei Betroffenen mit ultrakurzem Segment⁶ erfolgt die operative Versorgung mittels Myotomie (Fitze, 2016). Vor und nach der operativen Versorgung wird ein „bowel management“ implementiert. Dabei werden mittels medikamentöser Therapie - unterstützt durch Irrigationen und/oder Einläufe - regelmäßige Stuhlentleerungen induziert, um das euganglionäre Darmsegment zu tonisieren und Komplikationen wie Enterokolitiden etc. zu verhindern (Metzger, 2017).

Die operativen Verfahren können sowohl einzeitig als auch zweizeitig ausgeführt werden. Beim zweizeitigen Vorgehen ist unter bestimmten Voraussetzungen (Ileus, Enterokolitis, etc.) die passagere Anlage einer Kolostomie/ eines Anus praeter notwendig. Man ist allerdings bestrebt, dies durch frühzeitige Diagnose und entsprechende präoperative Therapie zu vermeiden (Fitze, 2016, Metzger, 2017). Insgesamt haben Studien gezeigt, dass ein einzeitiges Vorgehen einem mehrzeitigen hinsichtlich der Komplikationsrate überlegen ist. Davon ausgenommen sind schwerkranke Säuglinge (Sulkowski et al, 2014).

Die klassischen operativen Methoden sind durch einen transabdominalen chirurgischen Zugang gekennzeichnet. Dazu zählen Resektionsoperationen mit kolorektaler Anastomose (Swenson et al, 1949, Rehbein, 1958) und solche die ein Bypass- Verfahren anwenden (Duhamel, 1956, Soave, 1964).

Seit Einführung der minimal-invasiven Methoden wird der offen-chirurgische Zugang immer seltener praktiziert. Auch für langstreckige Formen von HSCR gibt es laparoskopische Methoden wie z. B. die laparoskopische assistierte Operation nach Soave (Georgeson et al, 1995).

Das bevorzugte Verfahren bei S-HSCR ist derzeit der transanale endorektale Durchzug (TERPT) nach de la Torre (de la Torre- Mondragon und Ortega-Salgado, 1998), der auch schon im frühen Säuglingsalter problemlos durchgeführt werden kann und keine zusätzliche Laparoskopie/ Laparotomie benötigt (Metzger, 2017).

⁶ Betroffenes Segment liegt zwischen Beckenboden und M. sphincter ani, ca. 2-3cm lang

Eine Herausforderung bei allen Verfahren ist die Bestimmung des zu resezierenden Darmabschnittes, da hypoganglionäre Abschnitte von variabler Ausdehnung oral des aganglionären Segmentes vorhanden sein können. Als Hilfestellung dienen dabei intraoperative Schnellschnittuntersuchungen oder separat laparoskopisch entnommene Stufen-Ganzwandbiopsien (Fitze, 2016).

Nach durchgeführter chirurgischer Therapie werden die PatientInnen im Rahmen einer interdisziplinären Nachsorge bestehend aus ÄrztInnen unterschiedlicher Disziplinen, Kontinenz- und StomaberaterInnen, DiätologInnen, PsychologInnen sowie Physio- und ErgotherapeutInnen in regelmäßigen Abständen kontrolliert und betreut. Das Hauptaugenmerk des Teams liegt dabei neben der Prävention von Komplikationen, wie z.B. dem Auftreten einer Enterokolitis, auf dem Verbessern und Erhalten einer zufriedenstellenden Lebensqualität.

Material und Methoden

1. PatientInnen

Die Betreuung der zur Studie eingeladenen PatientInnen mit histologisch verifiziertem Morbus Hirschsprung erfolgt in der Ambulanz für Funktionsdiagnostik der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie Graz. Je nach Alter der PatientInnen finden Routinekontrollen in unterschiedlichen regelmäßigen Abständen statt. Schon bisher wurde PatientInnen mit L-HSCR und PatientInnen mit familiären Formen eine humangenetische Beratung sowie eine Testung auf Hotspot-Mutationen des *RET*-Gens empfohlen. Nun wurde die molekulargenetische Testung von mehreren Kandidatengenens mittels Next Generation Sequencing (NGS) allen an der Ambulanz für Funktionsdiagnostik der UK für Kinder- und Jugendchirurgie Graz in Betreuung stehenden PatientInnen angeboten. PatientInnen, bei denen bisher im Rahmen der Untersuchung des *RET*-Gens keine Mutation nachgewiesen werden konnte, wurde eine entsprechende Erweiterung der Diagnostik angeboten. Außerdem wurde von denjenigen, bei denen Mutationen im *RET*-Gen nachgewiesen worden waren, das Einverständnis zur Auswertung der Ergebnisse eingeholt.

Für die Auswertung der Daten im Rahmen dieser Masterarbeit wurde ein Ethikantrag eingereicht (Votum 31-235 ex 18/19) und eine zusätzliche Einverständniserklärung unterfertigt.

2. Klinische Daten

Nach Vorliegen des Einverständnisses der Betroffenen bzw. deren Erziehungsberechtigten und Genehmigung seitens der Ethikkommission (Votum 31-235 ex 18/19) wurden aus den bestehenden Krankengeschichten folgende klinische Daten erhoben: Geschlecht, Alter bei Symptombeginn/ Diagnose, Länge des aganglionären Segments, Vorhandensein von Begleitfehlbildungen sowie das Vorhandensein einer pos. Familienanamnese hinsichtlich HSCR.

3. Probengewinnung und Aufbereitung

Im Rahmen von Routinekontrollen in der Ambulanz für Funktionsdiagnostik wurde nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch und dem Vorliegen einer schriftlichen Einwilligung eine Blutprobe (EDTA) zur molekulargenetischen Untersuchung entnommen und an das Institut für Humangenetik, Medizinische Universität Graz, versandt. Dort fand die Aufbereitung der Proben statt.

Die DNA der Blutproben, die vor 2019 am Institut eingelangt sind, wurde mittels einer konventionellen Fällung mittels Aussalzen-Methode isoliert. Bei Proben, die im Jahre 2019 analysiert wurden, wurde die DNA automatisiert mit dem QIASymphony SP mittels QIASymphony DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) extrahiert.

4. Molekulargenetische Untersuchungen

Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden im Rahmen der Routinediagnostik am Institut für Humangenetik, Medizinische Universität Graz, durchgeführt. In einem Fall, bei dem eine Untersuchung schon im Rahmen der Routinetestung aufgrund eines L-HSCR initiiert worden war, wurde die Diagnostik des *RET*-Gens (Sanger-Sequenzierung) am Institut für Humangenetik, München durchgeführt, wobei eine Splice-Mutation nachgewiesen wurde. In diesem Fall wurde am Institut für Humangenetik Graz in weiterer Folge eine cDNA-Analyse der Mutation zur besseren Charakterisierung durchgeführt und deren Auswirkung auf ein mögliches verändertes Spliceverhalten untersucht. Dafür wurde eine RNA-Isolierung aus der Blutkultur durchgeführt. Nach Puromycinbehandlung mit anschließender reverser Transkription erfolgte die PCR-Amplifikation sowie die direkte Sequenzierung des codierenden Bereichs des *RET*-Gens. Schlussendlich wurden die Resultate mit den bekannten Sequenzdatenbanken (RefSeq # NM_020975.4) computerunterstützt verglichen, um etwaige Veränderungen festzustellen.

Bei 3 PatientInnen wurden in einem ersten Schritt nur Exons, in denen bekannte Hotspot Mutationen im *RET*-Gen lokalisiert sind (Exons 5, 8-11 und 13-16) mit Sanger-Sequenzierung untersucht. Dazu wurden die spezifischen Regionen mittels PCR amplifiziert und anschließend auf einem ABI 3730xl sequenziert. Die

Auswertung der Daten erfolgte mit der SeqScape™ Software v2.0 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten).

Für eine erweiterbare Paneldiagnostik wurde entweder der TruSight™ One oder der TruSeq DNA Exome Kit (beide Illumina, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) herangezogen. Mittels des TruSight™ One werden 4811 Gene, die mit erblichen Erkrankungen assoziiert sind, angereichert. Im Gegensatz dazu werden beim TruSeq DNA Exome Kit sämtliche codierende Bereiche des Genoms analysiert. Für die molekulargenetische Diagnostik von HSCR wurden allerdings sogenannte virtuelle Panel designt, bei denen nicht alle sequenzierten Gene, sondern nur jene die für die Fragestellung relevant sind, analysiert wurden.

Die Auswahl der Gene und zu untersuchenden Regionen erfolgt dabei nach aktuellen wissenschaftlichen Standards und ist daher ständigen Änderungen unterworfen. Die untersuchten Gene der einzelnen Patienten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2. Untersuchte HSCR-assoziierte Gene pro Betroffenen

Patienten-ID	Untersuchte Gene
01	<i>RET</i>
02	<i>RET</i> Hotspots
03	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, LICAM, NRTN, RET, NRG1, NRG3, ZEB2</i>
04	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, NRG1, NRG3, NRTN, RET, SOX10</i>
05	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, LICAM, NRTN, RET, NRG1, NRG3, SEMA3C, SEMA3D, SOX10</i>
06	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, LICAM, NRTN, RET, NRG1, NRG3, SEMA3C, SEMA3D, SOX10</i>
07	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, NRG1, NRG3, NRTN, RET, SOX10</i>
08	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, LICAM, NRTN, RET, NRG1, NRG3, SEMA3C, SEMA3D, SOX10</i>
09	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, NRG1, NRG3, NRTN, RET, SOX10</i>
10	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, NRG1, NRG3, NRTN, RET, SOX10</i>
11	<i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, NRG1, NRG3, NRTN, RET, SOX10</i>
12	Stufe I: <i>RET</i> Hotspots; Stufe II: <i>ECE1, EDN3, EDNRB, GDNF, NRG1, NRG3, NRTN, RET, SOX10</i>

Nach erfolgter Anreicherung wurden die Proben auf einem Illumina NextSeq (Illumina, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) sequenziert. Anschließend erfolgten ein computerunterstützter Vergleich der Resultate zur Identifizierung von Sequenzveränderungen mittels JSI SeqNext (JSI Medical Systems, Ettenheim, Deutschland) und Abgleich der Resultate mit bekannten Sequenzdatenbanken (Referenzsequenz Nummern siehe Tabelle 3). Die Interpretation der Varianten erfolgte unter Zuhilfenahme von Populations- (dbSNP, GnomAD, ExAC) und Mutationsdatenbanken (HGMD, ClinVar) von MolekulargenetikerInnen des Instituts für Humangenetik.

Tabelle 3. RefSeq Accession Nummern der untersuchten Gene

Gen	RefSeq
<i>ECE1</i>	NM_001397.2
<i>EDN3</i>	NM_207034.2
<i>EDNRB</i>	NM_000115.3
<i>GDNF</i>	NM_000514.3
<i>NRG1</i>	NM_013956.3
<i>NRG3</i>	NM_001010848.3
<i>NRTN</i>	NM_004558.3
<i>RET</i>	NM_020975.4
<i>SEMA3C</i>	NM_006379
<i>SEMA3D</i>	NM_152754
<i>SOX10</i>	NM_006941
<i>ZEB2</i>	NM_014795.3

Ergebnisse

Es haben 13 Betroffene und/oder deren Erziehungsberechtigte zur Teilnahme an dieser Untersuchung eingewilligt. Eine Familie hat diese Einwilligung zu einem späteren Zeitpunkt widerrufen. Von den verbliebenen 12 PatientInnen waren 9 männlich und 3 weiblich (Tabelle 4). Somit beträgt das Geschlechterverhältnis in dem untersuchten Kollektiv ♂:♀ 3:1.

Es haben 6 Betroffene einen S-HSCR (♂ n=5,♀ n=1), 4 einen L-HSCR (♂ n=3, ♀n=1) und zwei Betroffene eine TCA (♂ n=1,♀ n=1).

In zwei Familien findet sich eine positive Familienanamnese, wo jeweils die Väter betroffen sind. Bei Patient 04 mit S-HSCR ist die Länge des aganglionären Segments des Vaters nicht erhebbar, bei Patientin 12 mit L-HSCR hat der Vater eine TCA.

Tabelle 4. Klinische Daten der untersuchten Betroffenen mit HSCR

Pat ID	Sex	Alter bei Symptombeginn	Länge des Segmentes	Begleiterkrankungen	Familienanamnese
01	m	postnatal	L-HSCR	keine	neg.
02	w	postnatal	TCA	keine	neg.
03	m	1 Monat	S-HSCR	keine	neg.
04	m	3 1/2 Jahre	S-HSCR	keine	Vater MH
05	m	postnatal	S-HSCR	keine	neg.
06	w	6 Monate	S-HSCR	Hypermetropie, Astigmatismus	neg.
07	m	postnatal	L-HSCR	keine	neg.
08	m	postnatal	S-HSCR	keine	neg.
09	m	postnatal	L-HSCR	keine	neg.
10	m	postnatal	S- HSCR	keine	neg.
11	m	postnatal	TCA	Caecum mobile (Volvulus)	neg.
12	w	postnatal	L-HSCR	ASD II, FG 34+2	Vater TCA

Der Zeitpunkt der Diagnosestellung war bei den meisten Betroffenen nach postnatalem Auftreten der ersten Symptome. Bei einem Betroffenen setzten die Symptome im Laufe des ersten Lebensmonats ein, bei einer Betroffenen nach Einführung der Beikost im 6. Lebensmonat, woraufhin die Diagnose gestellt wurde. Ein Junge wurde mit entsprechenden Symptomen (Obstipation,

Überlaufenkopresis) im Alter von 3,5 Jahren auffällig und die Diagnose wurde im Alter von 4 Jahren gestellt.

Bei drei der Betroffenen finden sich Begleiterkrankungen (siehe Tabelle 2). So zeigte sich beim Patienten mit TCA ein Caecum mobile, welches zum Auftreten eines Volvulus führte, der chirurgisch behandelt wurde. Eine Betroffene leidet unter Hypermetropie und Astigmatismus. Eine weitere Betroffene, ein ehemaliges Frühgeborenes (FG) der 35. SSW, hatte eine Herzfehlbildung (ASD II).

Bei vier von zwölf Betroffenen unseres Kollektivs sind genetische Veränderungen gefunden worden, die laut derzeitigem Wissensstand mit dem Auftreten der Erkrankung in Zusammenhang stehen (Tabelle 5). Bei zwei Betroffenen waren diese schon im Rahmen der Sanger-Sequenzierung des *RET*-Gens aufgrund des Vorhandenseins eines L-HSCR bzw. einer TCA diagnostiziert worden. Bei zwei Betroffenen konnte mittels NGS die jeweilige Veränderung nachgewiesen werden. Diese fanden sich einerseits im *NRG1*-Gen und andererseits im *RET*-Gen. Alle vier Veränderungen folgen dem autosomal-dominanten Erbgang (AD) und lagen dementsprechend bei den Betroffenen jeweils heterozygot vor.

Tabelle 5. Mutationen, die bei HSCR-Patienten identifiziert wurden.

Pat. ID	Sex	Länge des Segments	Gen	Veränderung	Erbgang	
01	m	L-HSCR	<i>RET</i>	c.2136+1G>A	AD	heterozygot
02	w	TCA	<i>RET</i>	c.2469delG, p.Pro824Leufs*45	AD	heterozygot
03	m	S-HSCR	<i>NRG1</i>	c.1300A>T p.Lys434*	AD	heterozygot
12	W	L-HSCR	<i>RET</i>	c.750_751delCG, p.Glu251Glyfs*102	AD	heterozygot

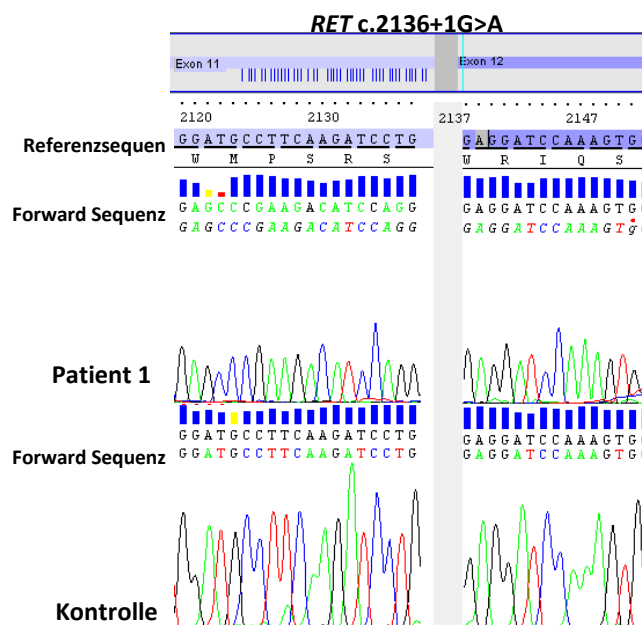
Ad Pat. 01:

Der männliche Patient wurde nach neonatalem Symptombeginn im Neugeborenenalter diagnostiziert. Es zeigte sich das Vorhandensein eines L-HSCR, der operativ versorgt worden ist. Es fanden sich keine Begleitfehlbildungen und in der Familie sind keine weiteren Betroffenen bekannt.

Die molekulargenetische Diagnostik mittels stufenweiser Sanger-Sequenzierung des *RET*-Gens wurde am Institut für Humangenetik der LMU München durchgeführt. Dabei konnte die heterozygote Punktmutation c.2136+1G>A im Intron 11 nachgewiesen werden. Eine vergleichbare Veränderung, c.2136G>C, war schon zuvor als kausale Ursache eines L-HSCR beschrieben worden (Fitze et al, 2002).

Da die Mutation die Donorsplicestelle betrifft, wurde in weiterer Folge am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz eine cDNA-Analyse zur Charakterisierung des Einflusses der Mutation auf das Splice-Verhalten durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Veränderung zu einem aberranten Splice-Verhalten führt und es zu einem Skipping des Exon 11 des *RET*-Gens kommt (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6. cDNA Analyse von Patient 01.



Durch die Mutation c.2136+1G>A im *RET*-Gen wird die Donorsplicestelle zerstört und es kommt zu einem Skipping von Exon 11.

Oben: Im Elektropherogramm ersichtlich ist eine Abweichung der Referenzsequenz im Exon 11, während die generierte Sequenz im Exon 12 übereinstimmt. Der abweichende Bereich konnte dem Exon 10 zugeordnet werden.

Unten: In einer Kontroll cDNA gibt es keine Abweichung zur Referenzsequenz.

Die Veränderung wird autosomal dominant vererbt.

Ad Pat 02:

Die weibliche Patientin wurde nach postnatalem Symptombeginn im Neugeborenenalter diagnostiziert. Es zeigte sich eine TCA, die operativ versorgt wurde. Die Patientin zeigt keine Begleitfehlbildungen und die Familienanamnese ist hinsichtlich Morbus Hirschsprung unauffällig.

Die molekulargenetische Diagnostik des *RET*-Gens wurde aufgrund des Phänotyps einer TCA empfohlen. Bei der Sequenzierung bekannter Hotspots (Exons 5, 8-11 und 13-16) des Gens zeigte sich eine Deletion eines Nukleotids in heterozygoter Ausprägung (siehe Abbildung 7).

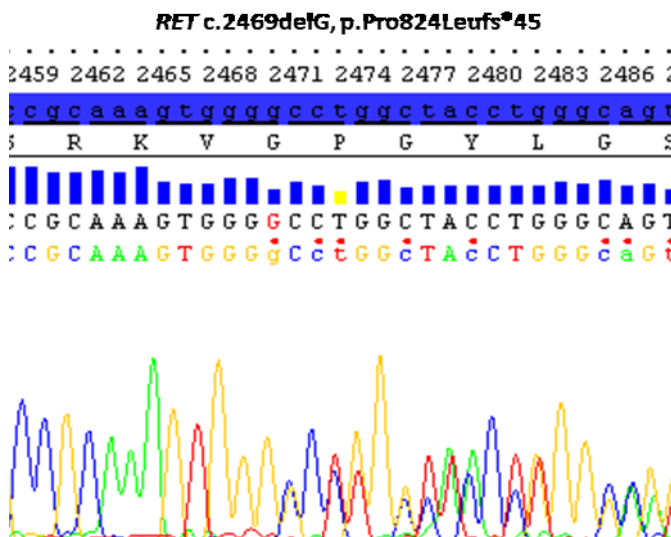


Abbildung 7. *RET* Mutation c.2469delG, p.Pro824Leufs*45.

Dargestellt ist das Elektropherogramm der Sanger Sequenzierung des Exons 14. Die heterozygote Deletion des Guanins an der Position 2469 führt zu einem Frameshift und somit zu einer Überlagerung der Sequenzen.

Diese Deletion c.2469delG; p.Pro824Leufs*45 bedingt eine Verschiebung des Leserasters (frameshift), was zu einem vorzeitigen Auftreten eines Stopp-Codons führt. Aufgrund dessen kann es entweder zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese kommen oder es führt zu einem nonsense-mediated decay der mRNA, bei dem die defekte mRNA vorzeitig abgebaut wird. Diese Veränderung wird daher laut ACMG Guidelines als pathogen klassifiziert.

Die Veränderung wird autosomal- dominant vererbt.

Ad Pat. 03:

Der männliche Patient zeigte erste Symptome in den ersten Lebenswochen und wurde im Alter von einem Monat diagnostiziert. Es zeigte sich ein S-HSCR der operativ versorgt worden ist. Er hat keine Begleitfehlbildungen und die Familienanamnese ist hinsichtlich Morbus Hirschsprung unauffällig.

Im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik wurde eine NGS-Paneldiagnostik mittels TruSight™ One Kit durchgeführt, wo in Form eines virtuellen Panels folgende Gene analysiert worden sind: *ECE1*, *EDN3*, *EDNRB*, *GDNF*, *L1CAM*, *NRTN*, *RET*, *NRG1*, *NRG3*, *ZEB2*.

Es konnte die heterozygote Veränderung c.1300A>T, p.Lys434* im *NRG1*-Gen (RefSeq NM_013956.3) nachgewiesen werden, die als krankheitsverursachend eingestuft wurde (siehe Abbildung 8). Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine Nonsense-Mutation, bei der ein Basenaustausch zur Entstehung eines Stoppcodons führt. Dies bedingt entweder einen vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese oder führt zu einem nonsense-mediated decay der mRNA.

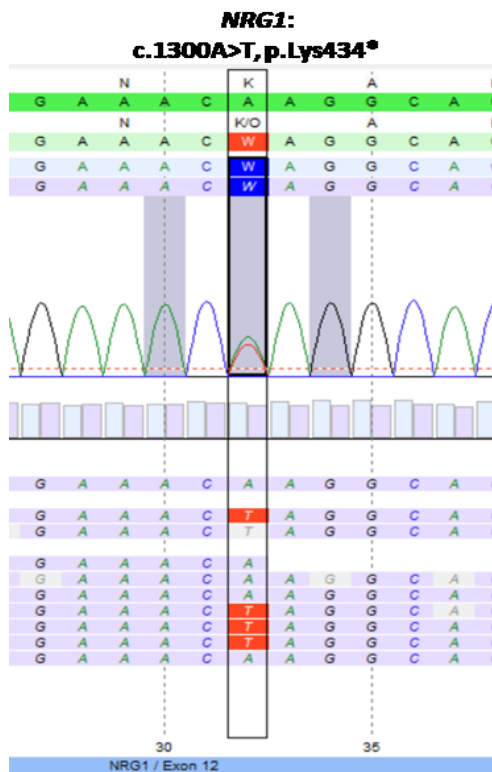


Abbildung 8. *NRG1* Mutation c.1300A>T, p.Lys434*.

Dargestellt sind die Referenzsequenz sowie die Consensussequenzen der mittels NGS generierten Reads (forward und reverse) des betroffenen Bereiches des *NRG1*-Gens. Zudem ist das Alignment der Reads (unten) und das daraus errechnete Elektropherogramm ersichtlich, das die Sequenzabweichung anzeigt.

Diese Mutation wird laut ACMG-Standards als „krankheitsverursachend“ klassifiziert, allerdings wurde von den Befundern angemerkt, dass die Variante nur vier der bekannten Isoformen betrifft und in der am stärksten exprimierten Isoform HRG-beta1 im Intron lokalisiert ist (NM_013956.3: c.1284-499A>T) (siehe Abbildung 9). Aus diesem Grund wurde die Veränderung als wahrscheinlich pathogen klassifiziert.

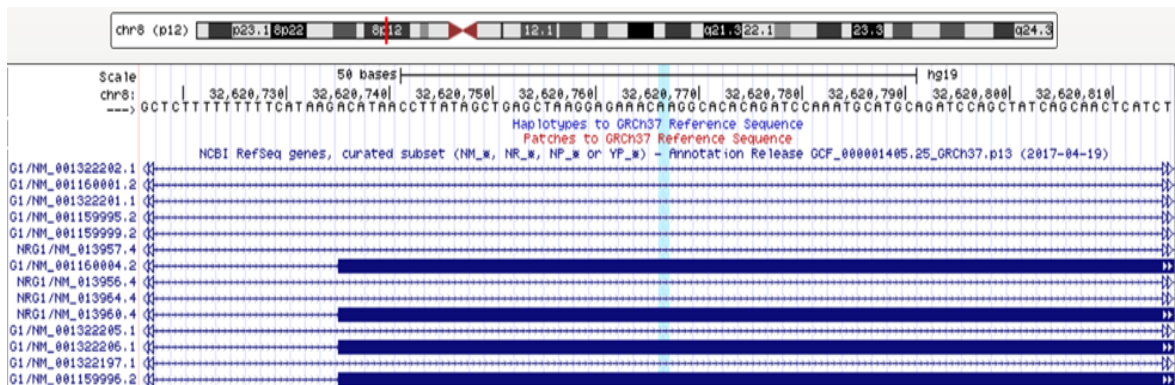


Abbildung 9. USCS Genome Browser Darstellung der mutierten Region in unterschiedlichen *NRG1* Transkripten.

Codierende Regionen (Exons) sind als dunkelblaue Balken dargestellt, die mit Pfeilen besetzten Linien stellen intronische Sequenzen dar. Die mutierte Base (in hellblau markiert) betrifft nur 4 Isoformen des *NRG1*-Gens (NM_001160004.2, NM_013960.4, NM_001322206.1 und NM_1159996.2). In den übrigen Isoformen liegt die Mutation im nicht-codierenden Bereich.

Die Veränderung wird autosomal- dominant vererbt.

Ad Pat. 12:

Die Patientin wurde in der 35. SSW geboren. Postnatal wurde ein ASD II festgestellt und es zeigten sich Symptome eines Morbus Hirschsprung. Dessen Vorhandensein wurde in der Ausprägung eines L-HSCR bestätigt und die Patientin wurde operativ versorgt. Der Vater der Patientin hatte eine TCA.

Aufgrund des L-HSCR und der positiven Familienanamnese wurde eine molekulargenetische Untersuchung von Hotspots (Exons 5, 8-11 und 13-16) des *RET*-Gens veranlasst, die keine kausale pathogene Veränderung nachweisen konnte.

Diskussion

Das Ziel dieser Masterarbeit war es, zusätzlich zu einer Zusammenfassung von Erkenntnissen hinsichtlich Ätiologie und Pathophysiologie des Morbus Hirschsprungs krankheitsverursachende genetische Veränderungen in unserer Kohorte von PatientInnen mit histologisch verifiziertem HSCR zu finden und diese Ergebnisse gemeinsam mit klinischen Charakteristika zu präsentieren.

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, handelt es sich bei HSCR um eine kongenitale Erkrankung des ENS, einer Aganglionose eines distalen Darmabschnitts. Das Besondere dieser Erkrankung ist ihr in vielerlei Hinsicht heterogenes Erscheinungsbild. Dies betrifft sowohl die Heredität und den Genotyp als auch den Phänotyp und das Vorhandensein von Begleitfehlbildungen, die Assoziation mit Syndromen oder das Auftreten im Rahmen von Chromosomenaberrationen (Amiel et al, 2008).

Der Heredität der Erkrankung ist komplex. Unterschiedliche genetische Veränderungen können den gleichen Phänotyp verursachen. Unvollständige geschlechtsabhängige Penetranz und Expression führen dazu, dass dieselben genetischen Veränderungen innerhalb einer Familie zu unterschiedlichen Phänotypen bzw. zum Auftreten oder „Nichtauftreten“ der Erkrankung führen (Svensson et al, 1998, Amiel et al, 2008).

Syndromale Formen oder HSCR, der im Rahmen von Chromosomenaberrationen auftritt, wird entsprechend den jeweiligen Erbgängen weitergegeben. Isolierte Formen werden größtenteils autosomal-dominant mit niedriger geschlechtsabhängiger Penetranz vererbt und können aufgrund von variabler Expression unterschiedlich lange Segmente des Darms betreffen (Amiel et al, 2008).

Die Aganglionose ist Folge einer Migrations- und/oder Entwicklungsstörung von Vorläuferzellen des ENS, die aus der Neuralleiste stammen. Um eine ungestörte Kolonisierung des Darms mit Zellen des ENS zu ermöglichen, müssen sich diese Vorläuferzellen während der Migration und Kolonisierung des Darms, beeinflusst von wechselnden Einflüssen der sich ständig ändernden Umgebung, differenzieren.

Dieser komplexe Vorgang wird durch ein synchronisiertes Zusammenspiel von Signalwegen der Neuralleiste und des sich entwickelnden Darms ermöglicht (Butler Tjaden und Trainor, 2013, Tam et al, 2019). Veränderungen in Genen, die für Moleküle dieser Signalwege codieren, können zum Auftreten der Erkrankung führen. Die Komplexität der Entwicklung des ENS und die vielfachen Möglichkeiten der Interaktionen der Signalwege bedingen, dass es nicht nur eine pathogene Mutation oder ein betroffenes Gen gibt, dass als kausal für das Auftreten von HSCR anzusehen ist. Die Erkrankung kann aufgrund einer pathogenen Mutation in einem Gen oder aufgrund mehrerer Alterationen entweder im selben Gen oder in unterschiedlichen Genen verursacht werden (Tam et al, 2019). Außerdem spielen in diesem Zusammenhang Umweltfaktoren und der übrige genetische Background eine modulierende Rolle (Heuckeroth und Schäfer, 2016). Diese Tatsache bietet einen Erklärungsansatz, warum pathogene Mutationen aufgrund von zusätzlich vorhandenen genetischen Veränderungen oder aufgrund von genetischen Prädispositionen zur Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen führen (Tam et al., 2019).

Wir haben uns im Rahmen dieser Masterarbeit in einem ersten Schritt darauf beschränkt, in unserer Kohorte die am häufigsten betroffenen Gene zu untersuchen. Aufgrund des Phänotyps (TCA, L-HSCR) waren bei drei unserer PatientInnen schon im Vorhinein Sanger-Sequenzierungen von Hotspots des *RET*-Gens durchgeführt worden. Bei zwei Betroffenen konnten mit Hilfe dieser Methodik pathogene Veränderungen diagnostiziert werden. Bei allen übrigen Betroffenen bzw. bei derjenigen, wo mittels Sanger-Sequenzierung keine kausale Veränderung gefunden werden konnte, wurde die molekulargenetische Diagnostik mittels NGS erweitert bzw. eingeleitet. Insgesamt konnten bei 4/12 Betroffenen Veränderungen gefunden werden.

Bei Pat. 01 liegt diese Veränderung - c.2136+1G>A - des *RET*-Gens im Intron im Bereich einer Donorsplicesite. Mittels cDNA-Analyse konnte gezeigt werden, dass diese Punktmutation zu einem aberranten Splice-Verhalten und einem Skipping des Exons 11 führt.

Bei Pat. 02 wurde ebenfalls mittels Sanger-Sequenzierung der Hotspots eine Veränderung im *RET*-Gen (c.2469delG; p.Pro824Leufs*45) nachgewiesen. Diese

Deletion im Exon 14 führt zum vorzeitigen Auftreten eines Stopp-Codons, was zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese oder zu einem nonsense-mediated decay der mRNA führt.

Diese Mutation liegt im Bereich der Tyrosin-Kinase Domäne (Exons 13- 15) des *RET*-Gens. Gain-of-function Mutationen in dieser Domäne können jeglichen Typ von MEN2 verursachen. Loss-of-function Mutationen dieser Region bedingen einen partiellen oder totalen Verlust der *RET*-Kinase Aktivität (Arighi et al, 2005). In unserem Fall bedingt die Deletion einen Funktionsverlust des Proteins der dermaßen ausgeprägt ist, dass es zu einer Aganglionose des gesamten Kolons gekommen ist.

Bei Pat. 03 wurde mittels NGS eine Punktmutation (c.1300A>T, p.Lys434*) im Exon 12 des *NRG1*-Gens identifiziert. Es handelt sich bei dieser Mutation um eine Nonsense-Mutation, da der Basenaustausch zur Entstehung eines Stopp-Codons führt. Dies führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese oder zu einem nonsense-mediated mRNA decay. Diese Mutation wurde als wahrscheinlich pathogen klassifiziert, da sie nur in vier der bekannten Isoformen im Exonbereich liegt.

Keimbahnmutationen im *NRG1*-Gen wurden bis dato bei weniger als 1% der Betroffenen nachgewiesen. Sie sind meist mit einer nicht-syndromalen Form von HSCR und mit S-HSCR assoziiert (Tang et al, 2012a), wie sie auch bei unserem Betroffenen vorliegt.

Bei Pat.04 wurde, nachdem in der Sanger Sequenzierung der Hotspots des *RET*-Gens keine pathogene Veränderung gefunden werden konnte, mittels NGS eine Deletion von zwei Basenpaaren (c.750_751delCG, p.Glu251Glyfs*102) im Exon 4 des *RET*-Gens identifiziert. Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters und zum Auftreten eines vorzeitigen Stopp-Codons, was wiederum einen vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese oder einen nonsense-mediated mRNA decay bedingt.

Mutationen in diesem Bereich des *RET*-Gens führen zur Störung des RET Transports zur Zelloberfläche (Arighi et al, 2005).

Unserer Ergebnisse entsprechen, trotz der geringen Größe der Kohorte, den bisher publizierten Daten:

Table 6. Ergebnisse

Pat ID	Sex	Phänotyp	Begleiterkrankungen	Familienanamnese	Mutation
01	m	L-HSCR	keine	neg.	<i>RET</i>
02	w	TCA	keine	neg.	<i>RET</i>
03	m	S-HSCR	keine	neg.	<i>NRG1</i>
04	m	S-HSCR	keine	Vater HSCR	
05	m	S-HSCR	keine	neg.	
06	w	S-HSCR	Hypermetropie, Astigmatismus	neg.	
07	m	L-HSCR	keine	neg.	
08	m	S-HSCR	Phimose	neg.	
09	m	L-HSCR	keine	neg.	
10	m	S-HSCR	keine	neg.	
11	m	TCA	Caecum mobile (Volvulus)	neg.	
12	w	L-HSCR	ASD II, FG 34+2	Vater TCA	<i>RET</i>

1. Das Geschlechtsverhältnis der Betroffenen unterscheidet sich entsprechend des Phänotyps: S-HSCR (♂ n=5, ♀ n=1), L-HSCR (♂ n=3, ♀ n=1), TCA (♂ n=1, ♀ n=1).
2. Die pathogenen Mutationen (n=4), die wir nachweisen konnten, fanden sich zum Großteil (n=3) im *RET*-Gen.
3. Wir konnten bei zwei von vier Betroffenen mit L-HSCR ursächliche Veränderungen finden.
4. Wir konnten bei einer von zwei Betroffenen mit TCA die ursächliche Veränderung finden.
5. Wir konnten bei einem von sechs Betroffenen mit sporadischem S-HSCR eine pathogene Veränderung finden.

Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass weitere Untersuchungen wünschenswert sind. So ist es sehr wahrscheinlich, dass sowohl bei Pat. 04 als auch Pat. 11 eindeutige pathogene genetische Veränderungen vorhanden sind. Diesbezüglich sollten weitere Kandidatengene, die bei diesen Betroffenen bis dato noch nicht untersucht worden sind, analysiert werden. Gleiches gilt auch für Pat. 07 und Pat. 09, bei denen man aufgrund es ausgeprägten Phänotyps ebenfalls davon ausgehen kann, dass eindeutige genetische Veränderungen vorhanden sind.

In den letzten Jahren wurden viele neue Erkenntnisse hinsichtlich Ätiologie und Pathogenese des Morbus Hirschsprung gewonnen. Einige Aspekte der Erkrankung konnten damit erklärt werden, vieles liegt aber noch im Dunkeln. Weitere wissenschaftliche Untersuchungen müssen folgen, die neben genetischen Faktoren auch epigenetischen Aspekte und Umweltfaktoren untersuchen, die regulierend und modulierend in das komplexe System der ENS-Entwicklung eingreifen. Dies kann in Zukunft nicht nur eine bessere Diagnostik, genetische Beratung und eventuell auch Therapie der Betroffenen ermöglichen, sondern könnte auch Faktoren identifizieren, die zur Prävention der Erkrankung beitragen können.

Literaturverzeichnis

- Amiel, J., & Lyonnet, S. (2001). Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: A review. *Journal of Medical Genetics*, 38(11), 729-739.
- Amiel, J., Sproat-Emison, E., Garcia-Barcelo, M., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., et al. (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: A review. *Journal of Medical Genetics*, 45(1), 1-14. doi:10.1136/jmg.2007.053959
- Anderson, J. E., Vanover, M. A., Saadai, P., Stark, R. A., Stephenson, J. T., & Hirose, S. (2018). Epidemiology of hirschsprung disease in california from 1995 to 2013. *Pediatric Surgery International*, 34(12), 1299-1303.
- Arighi, E., Popsueva, A., Degl'Innocenti, D., Borrello, M. G., Carniti, C., Perala, N. M., et al. (2004). Biological effects of the dual phenotypic janus mutation of ret cosegregating with both multiple endocrine neoplasia type 2 and hirschsprung's disease. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(4), 1004-1017.
- Arighi, E., Borrello, M. G., & Sariola, H. (2005). *RET tyrosine kinase signaling in development and cancer* doi:<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.05.010>
- Arnold, S., Pelet, A., Amiel, J., Borrego, S., Hofstra, R., Tam, P., et al. (2009). Interaction between a chromosome 10 RET enhancer and chromosome 21 in the down syndrome-Hirschsprung disease association. *Human Mutation*, 30(5), 771-775.
- Athanasakos, E., & Cleeve, S. (2019). Hirschsprung 's disease and anorectal manometry. In: Puri P. (Hrsg) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp. 233-248). Springer, Cham: Springer International Publishing
- Bayliss, W., & Starling, E. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *The Journal of Physiology*, 24(2), 99-143.
- Bayliss, W., & Starling, E. (1900). The movements and the innervation of the large intestine. *The Journal of Physiology*, 26(1-2), 107-118.

- Baynash, A. G., Hosoda, K., Giaid, A., Richardson, J. A., Emoto, N., Hammer, R. E., et al. (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*, 79(7), 1277-1285.
- Bealer, J.F., Natuzzi E.S., Flake A.W., Adzick N.S., Harrison M.R. (1994). Effect of nitric oxide on the colonic smooth muscle of patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.*, 29(8), 1025-9.
- Best, K. E., Addor, M., Arriola, L., Balku, E., Barisic, I., Bianchi, F., et al. (2014). Hirschsprung's disease prevalence in europe: A register based study. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 100(9), 695-702.
- Bolande, R. P. (1974). *The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment* doi:[https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(74\)80021-3](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(74)80021-3)
- Butler Tjaden, N.,E., & Trainor, P. A. (2013). The developmental etiology and pathogenesis of hirschsprung disease. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 162(1), 1-15.
- Chia, S., Chen, S. C., Lu, C., Sheu, S., & Kuo, H. (2016). Epidemiology of hirschsprung's disease in taiwanese children: A 13-year nationwide population-based study. *Pediatrics & Neonatology*, 57(3), 201-206.
- Dalla Valle, A. (1920). Ricerche istologiche su di un caso di megacolon congenito. *Pediatria*, 28, 740-752.
- De la Torre-Mondragon, L., & Ortega-Salgado, J. A. (1998). Transanal endorectal pull-through for hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 33(8), 1283-1286.
- Duhamel, B. (1956). New operation for congenital megacolon: Retrorectal and transanal lowering of the colon, and its possible application to the treatment of various other malformations. [Une nouvelle operation pour le megacolon congenital: l'abaissement retro-rectal et trans-anal du colon et son application possible au traitement de quelques autres malformations] *La Presse Medicale*, 64(95), 2249-2250.

- Ehrenpreis, T. (1945). Megacolon in the newborn. A clinical and röntgenological study with special regard to the pathogenesis.(A preliminary report.). *Acta Paediatrica*, 32(3-4), 358-370.
- Emison, E. S., Garcia-Barcelo, M., Grice, E. A., Lantieri, F., Amiel, J., Burzynski, G., et al. (2010). Differential contributions of rare and common, coding and noncoding ret mutations to multifactorial hirschsprung disease liability. *The American Journal of Human Genetics*, 87(1), 60-74.
- Emison, E. S., McCallion, A. S., Kashuk, C. S., Bush, R. T., Grice, E., Lin, S., et al. (2005). A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies hirschsprung disease risk. *Nature*, 434(7035), 857.
- Fewtrell, M. S., Tam, P. K., Thomson, A. H., Fitchett, M., Currie, J., Huson, S. M., et al. (1994). Hirschsprung's disease associated with a deletion of chromosome 10 (q11.2q21.2): A further link with the neurocristopathies? *Journal of Medical Genetics*, 31(4), 325-327.
- Fiori, M. G. (1998). Domenico battini and his description of congenital megacolon: A detailed case report one century before hirschsprung. *Journal of the Peripheral Nervous System : JPNS*, 3(3), 197-206.
- Fitze, G., Cramer, J., Ziegler, A., Schierz, M., Schreiber, M., Kuhlisch, E., et al. (2002). Association between c135G/A genotype and RET proto-oncogene germline mutations and phenotype of hirschsprung's disease. *Lancet (London, England)*, 359(9313), 1200-1205.
- Fitze G. (2016) S1-Leitlinie 006/001: Aganglionose (Morbus Hirschsprung). AWMF Online Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie. Erstellungsdatum 03/1999, Überarbeitung vom 04/2016. [online] Available at: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/006-001l_S1_Aganglionose_Morbus_Hirschsprung_2016-05.pdf [Zugriff am 22.07.2019]
- Freys S.M. (1997) Anorektale Manometrie. In: Fuchs KH., Stein H.J., Thiede A. (Hrsg.) *Gastrointestinale Funktionsstörungen*. Springer, Berlin, Heidelberg

- Friedmacher F., Puri P. (2019) Variants of Hirschsprung's Disease. In: Puri P. (Hrsg) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp. 305-322) Springer, Cham: Springer International Publishing
- Fu, M., Sato, Y., Lyons-Warren, A., Zhang, B., Kane, M. A., Napoli, J. L., et al. (2010). Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing pten accumulation. *Development (Cambridge, England)*, 137(4), 631-640.
- Georgeson, K. E., Fuenfer, M. M., & Hardin, W. D. (1995). Primary laparoscopic pull-through for hirschsprung's disease in infants and children. *Journal of Pediatric Surgery*, 30(7), 1017-21; discussion 1021-2.
- Gershon, M. D. (1999). The enteric nervous system: A second brain. *Hospital Practice*, 34(7), 31-52.
- Gershon M.D., Nakamura H. (2019) Functional Anatomy of the Enteric Nervous System. In: Puri P. (Hrsg.) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp.31-76). Springer, Cham: Springer International Publishing.
- Gherardi, G. J. (1960). Pathology of the ganglionic-aganglionic junction in congenital megacolon. *Archives of Pathology*, 69, 520-523.
- Gui H, Tang WK, So MT, Proitsi P, Sham PC, Tam PK, Ngan ES-W, Cherny SS, Garcia-Barcelo M-M.(2013) RET and NRG1 interplay in Hirschsprung disease. *Hum Genet.*, 132:591–600
- Hayes, R., & Kelleher, J. (2019). Diagnosis of hirschsprung disease and allied disorders. In: Puri P. (Hrsg.) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp. 225-231) Springer, Cham: Springer International Publishing.
- Heuckeroth, R. O., & Schäfer, K. (2016). Gene-environment interactions and the enteric nervous system: Neural plasticity and hirschsprung disease prevention. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.03.017>
- Hiatt, R. B. (1951). The pathologic physiology of congenital megacolon. *Annals of Surgery*, 133(3), 313-320.

- Hirschsprung H. (1890) Die angeborene Erweiterung und Hypertrophie des Dickdarms. In: Baginsky A. (Hrsg.) Pädiatrische Arbeiten. Festschrift Herrn Eduard Henoch ... zum 70sten Geburtstage, gewidmet von deutschen und auslaendischen Fachgenossen. Verlag von August Hirschwald. Berlin
- Höllwarth, M. E., & Grosfeld, J. L. (2019). Hirschsprung´s disease: A historical perspective 1691-2018. In P. Puri (Ed.), *Hirschsprung's disease and allied disorders* (pp. 1-17). Cham: Springer International Publishing.
- Jiang, Q., Arnold, S., Heanue, T., Kilambi, K. P., Doan, B., Kapoor, A., et al. (2015). Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with ret are critical to hirschsprung disease liability. *American Journal of Human Genetics*, 96(4), 581-596.
- Kobayashi, H., O'Briain, D. S., Hirakawa, H., Wang, Y., & Puri, P. (1994). A rapid technique of acetylcholinesterase staining. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 118(11), 1127-1129.
- Kusafuka T, Wang Y, Puri P. (1997) Mutation analysis of the RET, the endothelin-B receptor, and the endothelin 3 genes in sporadic cases of Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 32:501-4.
- Kusafuka, T., & Puri, P. (1997). Altered mRNA expression of the neuronal nitric oxide synthase gene in hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 32(7), 1054-1058.
- Luo, Y., Ceccherini, I., Pasini, B., Matera, I., Biccocchi, M. P., Barone, V., et al. (1993). Close linkage with the RET protooncogene and boundaries of deletion mutations in autosomal dominant hirschsprung disease. *Human Molecular Genetics*, 2(11), 1803-1808.
- Lyonnet, S., Bolino, A., Pelet, A., Abel, L., Nihoul-Fekete, C., Briard, M. L., et al. (1993). A gene for hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nature Genetics*, 4(4), 346-350.

- Marquard J, Eng C. (2015) Multiple Endocrine Neoplasia Typ 2. In Gene Reviews [online]
 Erstellungsdatum: 27.09.1999, Last update: 25.06.2015. Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1257/> [Zugriff am 15.08.2019]
 In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (Hrsg). Gene Reviews [online] Seattle
 (WA):University of Washington, Seattle; 1993-2019.
- Martucciello G, Biocchi M, Doderio P, et al. (1992) Total colonic aganglionosis associated with
 interstitial deletion of the long arm of chromosome 10. *Pediatr Surg Int.* 1992;7:308-10.
- McCallion, A. S., Stames, E., Conlon, R. A., & Chakravarti, A. (2003). Phenotype variation in
 two-locus mouse models of hirschsprung disease: Tissue-specific interaction between ret
 and ednrb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
 America*, 100(4), 1826-1831.
- Meier-Ruge, W., Lutterbeck, P. M., Herzog, B., Morger, R., Moser, R., & Scharli, A. (1972).
 Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of
 hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 7(1), 11-17.
- Metzger, R. (2017). Morbus Hirschsprung. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 165(4), 347-362.
- Montgomery, R. K., Mulberg, A. E., & Grand, R. J. (1999). Development of the human
 gastrointestinal tract: Twenty years of progress. *Gastroenterology*, 116(3), 702-731.
- Moore S.W. (2019) Congenital Anomalies and Genetic Associations in Hirschsprung's Disease.
 In: Puri P. (Hrsg) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp 175-199) Springer,
 Cham: Springer International Publishing
- NCBI Gene (2019) RET ret proto-oncogen, Gen ID:5979 , last update: 06.08.2019 [online].
 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5979#reference-sequences> [Zugriff am
 15.08.2019]
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey
 from neural tube to colon. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 66, 94-106.

- O'Donnell A.M., Montedonico S., Puri P. (2019) Pathophysiology of Hirschsprung's Disease. In: Puri P. (Hrsg.) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp.153-166). Springer, Cham: Springer International Publishing.
- Passarge, E. (1967). The genetics of hirschsprung's disease. evidence for heterogeneous etiology and a study of sixty-three families. *The New England Journal of Medicine*, 276(3), 138-143.
- Puffenberger, E. G., Hosoda, K., Washington, S. S., Nakao, K., deWit, D., Yanagisawa, M., et al. (1994). A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic hirschsprung's disease. *Cell*, 79(7), 1257-1266.
- Puri P., Nakamura H. (2019) Epidemiology and Clinical Characteristics of Hirschsprung's Disease. In: Puri P. (Hrsg.) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp. 177-184). Springer, Cham: Springer International Publishing.
- Raveenthiran, V. (2011). Knowledge of ancient hindu surgeons on hirschsprung disease: Evidence from sushruta samhita of circa 1200-600 BC. *Journal of Pediatric Surgery*, 46(11), 2204-2208.
- Rehbein, F. (1958). Intraabdominal resection or rectosigmoidectomy (swenson's technic) in hirschsprung's disease. [Intraabdominelle Resektion oder Recto-Sigmoidektomie (Swenson) bei der Hirschsprung'schen Krankheit?] *Der Chirurg; Zeitschrift Fur Alle Gebiete Der Operativen Medizin*, 29(8), 366-369.
- Rolle, U., Nemeth, L., & Puri, P. (2002). Nitroergic innervation of the normal gut and in motility disorders of childhood. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(4), 551-567.
- Rolle U., Puri P. (2019) Development of the Enteric Nervous System. In: Puri P. (Hrsg.) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp.19-29). Springer, Cham: Springer International Publishing.
- Romeo, G., Ronchetto, P., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., et al. (1994). Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in hirschsprung's disease. *Nature*, 367(6461), 377-378.

- Sadler TW (2014) Taschenlehrbuch Embryologie. 12. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Schill, E. M., Lake, J. I., Tusheva, O. A., Nagy, N., Bery, S. K., Foster, L., et al. (2016). *Ibuprofen slows migration and inhibits bowel colonization by enteric nervous system precursors in zebrafish, chick and mouse* doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.09.023>
- Sergi, C. (2015). Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of the 100(th) anniversary of dr. harald hirschsprung's death. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 4(4), 120-125.
- Singh, S. J., Croaker, G. D. H., Manglick, P., Wong, C. L., Athanasakos, H., Elliott, E., et al. (2003). Hirschsprung's disease: The australian paediatric surveillance unit's experience. *Pediatric Surgery International*, 19(4), 247-250.
- So, H. B., Schwartz, D. L., Becker, J. M., Daum, F., & Schneider, K. M. (1980). Endorectal "pull-through" without preliminary colostomy in neonates with hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 15(4), 470-471.
- Soave, F. (1964). A new surgical technique for treatment of hirschsprung's disease. *Surgery*, 56, 1007-1014.
- Sulkowski, J. P., Cooper, J. N., Congeni, A., Pearson, E. G., Nwomeh, B. C., Doolin, E. J., et al. (2014). Single-stage versus multi-stage pull-through for hirschsprung's disease: Practice trends and outcomes in infants. *Journal of Pediatric Surgery*, 49(11), 1619-1625.
- Svensson, P., Anvret, M., Molander, M., & Nordenskjöld, A. (1998). Phenotypic variation in a family with mutations in two hirschsprung-related genes (RET and endothelin receptor B). *Human Genetics*, 103(2), 145-148.
- Swenson, O., & Bill, A. H., Jr. (1948). Resection of rectum and rectosigmoid with preservation of the sphincter for benign spastic lesions producing megacolon; an experimental study. *Surgery*, 24(2), 212-220.
- Swenson, O., Fisher, J. H., & Macmahon, H. E. (1955). Rectal biopsy as an aid in the diagnosis of hirschsprung's disease. *The New England Journal of Medicine*, 253(15), 632-635.

- Swenson, O., Neuhauser, E. B., & Pickett, L. K. (1949). New concepts of the etiology, diagnosis and treatment of congenital megacolon (hirschsprung's disease). *Pediatrics*, 4(2), 201-209.
- Taghavi, K., Goddard, L., Evans, S. M., Hobson, A., Beasley, S. W., Sankaran, S., et al. (2018). Ethnic variations in the childhood prevalence of hirschsprung disease in new zealand. *ANZ Journal of Surgery*, 0(0)
- Tam P.K.H., Tang C.S.M., Garcia-Barceló MM. (2019) Genetics of Hirschsprung's Disease. In: Puri P. (Hrsg) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. (pp. 121-131) Springer, Cham: Springer International Publishing
- Tamate, S., Shiokawa, C., Yamada, C., Takeuchi, S., Nakahira, M., & Kadowaki, H. (1984). Manometric diagnosis of hirschsprung's disease in the neonatal period. *Journal of Pediatric Surgery*, 19(3), 285-288.
- Tang, C. S., Cheng, G., So, M. T., Yip, B. H., Miao, X. P., Wong, E. H., et al. (2012b). Genome-wide copy number analysis uncovers a new HSCR gene: NRG3. *PLoS Genetics*, 8(5), e1002687.
- Tang, C. S., Ngan, E. S., Tang, W. K., So, M. T., Cheng, G., Miao, X. P., et al. (2012a). Mutations in the NRG1 gene are associated with hirschsprung disease. *Human Genetics*, 131(1), 67-76.
- Torroglosa, A., Alves, M. M., Fernandez, R. M., Antinolo, G., Hofstra, R. M., & Borrego, S. (2016). Epigenetics in ENS development and hirschsprung disease. *Developmental Biology*, 417(2), 209-216.
- Ulfig N (2015) Der gemeinsame Aufbau des Verdauungskanal. In: Ulfig N (Hrsg.) *Kurzlehrbuch Histologie*. 4. korrigierte Auflage. Thieme. Stuttgart
- Uribe, R. A., Hong, S. S., & Bronner, M. E. (2018). Retinoic acid temporally orchestrates colonization of the gut by vagal neural crest cells. *Developmental Biology*, 433(1), 17-32.
- Wilk, M. (2013) Anatomie und Physiologie des Gastrointestinaltraktes. In: Luescher T., Steffel J. (Hrsg.) *Magen-Darm-Trakt*. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg

Whitehouse, F.R., Kernohan, J. W. (1948). Myenteric plexus in congenital megacolon; study of 11 cases. *Arch Intern Med (Chi)*, Jul;82(1):75-111.