

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. E. Schwinger

Albinismus:
Mutationssuche im OCA4-Gen

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Uta Rundshagen
aus Neustadt in Holstein

Lübeck 2004

1. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

2. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Olaf Hiort

Tag der mündlichen Prüfung:

09.06.2005

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 09.06.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
– Dekan der Medizinischen Fakultät –

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Albinismus	9
1.2	Melaninsynthese	10
1.3	Formen des Okulokutanen Albinismus (OCA)	11
1.3.1	Okulokutaner Albinismus Typ 1 (OCA1)	11
1.3.2	Okulokutaner Albinismus Typ 2 (OCA2)	12
1.3.3	Okulokutaner Albinismus Typ 3 (OCA3)	13
1.3.4	Albinismus-assoziierte Syndrome	13
1.3.5	Okulokutaner Albinismus Typ 4 (OCA4)	14
1.4	Aufgabenstellung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Primer	21
2.1.3	Geräte und Gebrauchsartikel	22
2.1.4	Stammlösungen	24
2.2	Methoden	27
2.2.1	Patienten	27
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.3	Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR)	28
2.2.4	SSCP("single-strand conformation polymorphism")-Analyse	30

2.2.5	DNA-Sequenzierung mit der Dideoxymethode.....	33
3	Ergebnisse	37
3.1	Vorgehensweise	37
3.2	Ergebnisse der SSCP-Analysen	37
3.3	Ergebnisse der Sequenzierung	42
3.3.1	Mutationen	42
3.3.2	Polymorphismen	51
3.3.3	Veränderungen im Intronbereich	52
4	Diskussion	54
4.1	OCA4-Patienten: Mutationen und klinische Befunde	54
4.2	Phänotyp der OCA4-Patienten.....	61
4.3	Patienten mit nur einer Mutation im OCA4-Gen.....	63
4.4	Heterozygote Patienten: Erklärungsansätze.....	66
4.5	Polymorphismen: Analyse der Ergebnisse	71
4.5.1	Polymorphismus T329T	71
4.5.2	Polymorphismus F374L.....	72
4.6	Mutationshäufigkeiten in verschiedenen Genabschnitten	75
5	Zusammenfassung	77
6	Anhang	78
6.1	Sequenzen	78

6.1.1	MATP-Gen: cDNA.....	78
6.1.2	MATP-Gen: Intron 3	81
6.2	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	83
6.3	Literatur	84
6.3.1	Bücher und Zeitschriften	84
6.3.2	Elektronische Datenbank-Information.....	88
6.4	Danksagung	89
6.5	Lebenslauf.....	90

Abkürzungen

A	Adenin
aim	absent in melanoma
AIM	altered in melanoma
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	copy-Desoxyribonucleinsäure
CHS	Chediak-Higashi-Syndrom
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
et al.	et alteri
Ex.	Exon
F	forward (vorwärts)

G	Guanin
HPS	Hermansky-Pudlak-Syndrom
K	Konzentration
kb	Kilobasen
Matp	membran-assoziiertes Transportprotein (Maus)
MATP	membran-assoziiertes Transportprotein (Mensch)
mut	verändertes Allel
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OA	Okulärer Albinismus
OCA	Okulokutaner Albinismus
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pos.	Position
R	reverse (rückwärts)
rev	reverse
SSCP	single-strand conformation polymorphism
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TYR	Tyrosinase
TYRP-1	Tyrosinase-related Protein 1
uni	universal
uw	underwhite
wt	Wildtyp-Allel
XC	Xylencyanol

Buchstabencode für Aminosäuren

Aminosäuren	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Cystein	C	Cys
Asparaginsäure	D	Asp
Glutaminsäure	E	Glu
Phenylalanin	F	Phe
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Lysin	K	Lys
Leucin	L	Leu
Methionin	M	Met
Asparagin	N	Asn
Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln
Arginin	R	Arg
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Valin	V	Val
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr

1 Einleitung

1.1 Albinismus

Schon immer sind Menschen mit Albinismus (lat. albus = weiß) durch ungewöhnlich helle Haut und Haare aufgefallen, eine Erklärung für dieses bereits seit Jahrhunderten bekannte und rätselhafte Phänomen stand jedoch lange Zeit nicht zur Verfügung. Erst im Jahre 1908 wurde der Albinismus von A. E. Garrod als genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung erkannt und wissenschaftlich beschrieben.

Der auffällige Phänotyp wird verursacht durch einen Mangel des Farbpigmentes Melanin, das bei Mensch und Tier für die Farbe von Haut, Haar und Augen verantwortlich ist. Die Melaninsynthese kann auf verschiedensten Ebenen gestört sein, so daß es sich beim Albinismus folglich um eine höchst heterogene Gruppe hereditärer Erkrankungen handelt. Die Krankheitshäufigkeit weltweit beträgt ca. 1:20.000 (Passmore et al., 1999) mit deutlichen Häufungen in einzelnen Populationen, z. B. in einigen Regionen Afrikas. Generell kann unterschieden werden zwischen Okulokutanem Albinismus (OCA), der Haut, Haar und Augen betrifft, und Okulärem Albinismus (OA), der auf die Augen beschränkt ist. Letzterer sei an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

Das Erscheinungsbild der von Okulokutanem Albinismus Betroffenen, das hoch variabel ist, besteht im allgemeinen in einer generalisierten Hypopigmentation: Hautpigment fehlt oft vollständig, die Haare sind weiß oder gelblich und die Iriden präsentieren sich hell und durchscheinend. Durch ihr auffälliges Aussehen haben diese Erkrankten schon von jeher eine gewisse Faszination auf ihre Umwelt ausgeübt. Teils wurden sie als göttliche Wesen verehrt, teils begegnete man ihnen mit unverhohlener Neugier, was in der Vergangenheit sogar dazu führte, daß Erkrankte in der Öffentlichkeit zur Schau gestellt wurden. Ein Beispiel dafür ist der Fall einer australischen Familie mit Albinismus im 19. Jahrhundert, die im Zirkus bestaunt werden konnte. Im schlimmsten Fall jedoch sahen und sehen sich die Betroffenen von Diskriminierung und Ausgrenzung aufgrund ihres andersartigen Erscheinungsbildes bedroht, besonders in Regionen, wo die Menschen normalerweise eher dunkel pigmentiert sind (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999).

Zusätzlich zu ihrem auffälligen Aussehen und einem durch die Hypopigmentation bedingten erhöhten Hautmalignomrisiko (Oetting und King, 1999) leiden die Patienten außerdem unter teils gravierenden Problemen des visuellen Systems. Zum einen verläuft die Entwicklung der retinalen Strukturen sowie der zentralen visuellen Bahnen melaninabhängig: Ein Melaninmangel während dieser Entwicklung führt zu einer oft drastischen Reduktion der Sehschärfe und zum Auftreten eines Ruhenystagmus. Zusätzlich kommt es zu einer atypischen chiasmalen Faserkreuzung, die oft eine Störung des binokulären Sehens bedingt (Creel et al., 1990). Zum anderen bewirkt die Hypopigmentierung der Strukturen des optischen Apparates selbst eine Beeinträchtigung des Sehvermögens: Die Verminderung des Melaningehalts der Iris führt zu einer gesteigerten Blendungsempfindlichkeit, während der Melaninmangel im retinalen Pigmentepithel die Entstehung von Streulicht begünstigt und dadurch die Bildauflösung beeinträchtigt. Auch Refraktionsanomalien und Strabismus treten gehäuft auf (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999).

1.2 Melaninsynthese

Die Bildung des Farbpigments Melanin erfolgt in den Melanosomen der Melanozyten, die sich in Haut, Haarfollikeln, Iris und retinalem Pigmentepithel befinden (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999). Die Melaninsynthese ist ein komplexer Vorgang, der das Zusammenspiel einer Vielzahl von Genen erfordert (Oetting und King, 1999): Bei der Maus beispielsweise sind mehr als 100 Gene bekannt, die einen Einfluß auf die Pigmentierung ausüben. Bisher konnte durch gezielte Untersuchungen klonierter Mausgene stets eine Entsprechung für diese im menschlichen Genom gefunden werden (Jackson, 1997).

In der Pigmentzelle werden zwei verschiedene Typen von Melanin produziert: Das braunschwarze Eumelanin und das rotgelbe Phäomelanin. Zur Erzeugung des Melanins wird die Aminosäure L-Tyrosin über das Zwischenprodukt Dihydroxyphenylalanin (Dopa) zu Dopachinon umgewandelt. Katalysiert wird diese Reaktion, die den limitierenden Schritt der Melaninsynthese darstellt, durch das kupferhaltige Enzym Tyrosinase.

Im weiteren Verlauf kommt es im wesentlichen zur Polymerisation des Dopachinons, wobei entweder Eumelanin oder – in Gegenwart von Sulfhydrylkomponenten – Phäomelanin entsteht (Jimbow et al., 1976).

1.3 Formen des Okulokutanen Albinismus (OCA)

Die in diesem Zusammenhang beschriebenen Albinismustypen folgen einem autosomal-rezessiven Vererbungsmodus.

1.3.1 Okulokutaner Albinismus Typ 1 (OCA1)

Der Okulokutane Albinismus Typ 1 wird hervorgerufen durch Mutationen im Tyrosinase-Gen (TYR), dessen Genprodukt – das Enzym Tyrosinase – den entscheidenden Schritt der Melaninsynthese katalysiert (s.o.). Dieses Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert (11q14-21) und hat eine Größe von circa 65 kb, wobei die codierende Region aus 5 Exons besteht (Kwon et al., 1987; Giebel et al., 1991).

Von Okulokutanem Albinismus Typ 1 betroffene Individuen zeigen bei der Geburt einen komplett depigmentierten Phänotyp. Haare und Haut sind weiß, die Iriden sind durchscheinend und von blauer Farbe.

Ist das Enzym Tyrosinase durch die zugrundeliegende Mutation inaktiviert oder nicht vorhanden, so bleibt dieser Phänotyp das ganze Leben hindurch erhalten und geht bei den Betroffenen mit einer starken Visusreduktion einher. Man spricht in diesem Fall von einem Tyrosinase-negativen Albinismus oder OCA1A. Erlaubt die Mutation jedoch eine gewisse Restaktivität des Enzyms, kommt es bei den Betroffenen in der ersten Lebensdekade zu einem sehr variablen Maß an Melaninbildung, so daß der Phänotyp eine große Variationsbreite zeigen und von sehr geringer bis zu annähernd normaler Pigmentation reichen kann. In den ersten Lebensjahren ist darüber hinaus eine erhebliche Visusverbesserung möglich. Diese Form des Albinismus wird OCA1B oder – wegen der häufigen Ausbildung einer gelbblonden Haarfarbe – auch „yellow“ OCA genannt.

Weitere Formen sind OCA1MP („minimal pigment“-OCA) mit Ähnlichkeiten zu OCA1B und der sog. Temperatursensitive Albinismus OCA1TS, bei dem es zu einer temperaturabhängig stärkeren Pigmentation kühlerer Körperregionen, vor allem der Akren, kommt (Oetting und King, 1994; 1999).

OCA1 ist die bestuntersuchte Albinismusform mit den meisten bekannten Mutationen (Oetting und King, 1999). In ca. 40 % aller Fälle liegen dem Okulokutanen Albinismus Veränderungen im Tyrosinase-Gen zugrunde (Newton et al., 2001).

1.3.2 Okulokutaner Albinismus Typ 2 (OCA2)

Diese Form des Albinismus hat seine Ursache in Veränderungen des P-Gens, das dem murinen „pink-eyed dilution“-Gen entspricht (Gardner et al., 1992; Lee et al., 1995).

Das P-Gen befindet sich auf Chromosom 15 (15q11-13) und umfaßt 24 Exons, das Genprodukt besteht aus 831 Aminosäuren. Es handelt sich dabei um ein Transmembranprotein, dessen genaue Funktion noch immer ungeklärt ist. Nahm man noch bis vor kurzem eine Beteiligung an Tyrosintransportprozessen im Melanosom an (Rinchik et al., 1993), so legen neue Untersuchungen eher eine Funktion im Zusammenhang mit der Regulation des melanosomalen pH-Werts nahe (Puri et al., 2000).

Individuen mit OCA2 weisen im Gegensatz zu solchen mit OCA1 bei der Geburt eine Pigmentierung der Kopfbehaarung auf, die Haut dagegen ist auch hier völlig unpigmentiert. Mit steigendem Lebensalter nimmt die Pigmentierung von Haut, Haar und Augen normalerweise zu, erreicht aber praktisch nie ein normales Maß. Der erreichbare Visus ist in der Regel niedrig, kann aber interindividuell erheblich variieren. Das Erscheinungsbild ist geprägt durch einen gelben Farbton der Haare, blaue bis hellbraune Iriden und die Entwicklung von Pigmentnävi in sonnenexponierten Hautarealen, es entsteht aber keine Sonnenbräune. Der ethnische Hintergrund hat einen bedeutenden Einfluß auf das Pigmentierungsmaß der Patienten (Oetting und King, 1994). Bei Afrikanern ist für den OCA2-Phänotyp neben der gelben Haare eine grünbraune Augenfarbe besonders typisch (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999).

Der P-Gen-bezogene Okulokutane Albinismus ist die häufigste Albinismusform weltweit und verantwortlich für ca. 50 % aller OCA-Fälle (Newton et al., 2001).

1.3.3 Okulokutaner Albinismus Typ 3 (OCA3)

In diesem Fall liegt eine Veränderung im TYRP1-Gen zugrunde, das für das „tyrosinase-related protein-1“ (TYRP1) kodiert. Der Genort befindet sich auf Chromosom 9p23 und umfaßt 8 Exons (Murty et al., 1992; Sturm et al., 1995). TYRP1 zeigt eine Oxidaseaktivität und spielt eine Rolle im Eumelaninsyntheseweg distal der Tyrosinase (Jiménez-Cervantes et al., 1994).

Von OCA3 betroffene Personen zeigen in der Regel eine weniger schwere Form der Hypopigmentierung als Individuen mit OCA1 oder OCA2, da eine Veränderung im TYRP1-Gen nicht zu einem völligen Ausfall der Melaninproduktion, sondern zu einer Veränderung der synthetisierten Menge und biochemischen Qualität des Eumelanins führt (Oetting und King, 1999). Die Synthese des rotgelben Phäomelanins hingegen bleibt von der Störung unbeeinträchtigt. Die Patienten zeigen eine rote oder rotbraune Hautfarbe, rötliche Haare und bräunlich pigmentierte Iriden. Aufgrund dieser typischen rötlichen Tönung bezeichnet man dieses Krankheitsbild, das vor allem bei der südafrikanischen Bevölkerung beschrieben wurde, auch als roten Albinismus („rufous/red albinism“). Die Augenbefunde sind meist weniger schwerwiegend als bei den anderen Okulokutanen Albinismusformen (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999). Diese relativ seltene Albinismusform ist bisher kaum untersucht worden, so daß sich die Daten zum klinischen Erscheinungsbild auf nur wenige Forschungsergebnisse stützen können (Oetting und King, 1999).

1.3.4 Albinismus-assoziierte Syndrome

Neben den „klassischen“ Formen des Okulokutanen Albinismus sind außerdem einige Syndrome bekannt, die mit OCA einhergehen. Für die vorliegende Arbeit besitzen sie keine Relevanz und sollen deshalb nur aus Gründen der Vollständigkeit kurz erwähnt werden.

Zum einen handelt es sich dabei um das Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS), das durch Mutationen des HPS-Gens auf Chromosom 10q verursacht wird (Fukai et al., 1995; Wildenberg et al., 1995). Es resultiert ein Okulokutaner Albinismus in Kombination mit einer erhöhten Blutungsneigung durch thrombozytäre Fehlfunktion und einer Ablagerung von Zeroiden vor allem in der Lunge (Witkop et al., 1990; Gahl et al., 1998).

Ein weiteres Syndrom, in dessen Rahmen ein Okulokutaner Albinismus auftritt, ist das Chediak-Higashi-Syndrom (CHS). Hier liegt die Krankheitsursache in Veränderungen des CHS1-Gens auf Chromosom 1. Betroffene weisen außerdem fortschreitende neurologische Auffälligkeiten und gravierende Defizite der Immunabwehr auf (Zhao et al., 1994).

1.3.5 Okulokutaner Albinismus Typ 4 (OCA4)

Aufgrund der großen Vielfalt bekannter Mausgene, die Einfluß auf die Pigmentierung nehmen, sind weitere Formen von Okulokutanem Albinismus beim Menschen vorhergesagt worden, die auf Mutationen in anderen Genen beruhen als die bisher bekannten OCA-Typen (Passmore et al., 1999).

So gelang Newton und Mitarbeitern 2001 der Nachweis einer neuen Form von Okulokutanem Albinismus beim Menschen, die analog zu den klassischen Albinismustypen OCA1-3 als OCA4 bezeichnet wurde. Diese neubeschriebene Albinismusform wird verursacht durch Mutationen in der humanen Entsprechung des „underwhite“(uw)-Gen der Maus, das auch Matp(„Membrane-associated transporter protein“)-Gen genannt wird. Das Produkt dieses Gens war bereits zuvor als ein Antigen in humanen Melanomzellen identifiziert und als AIM(„Altered In Melanoma“)1-Protein bezeichnet worden (Harada et al., 2001).

Newton et al. (2001) gelang die Identifizierung des humanen AIM1-Gens durch Untersuchung des Chromosoms 5p, einer Genomregion, die Homologien zu dem Gebiet des murinen Chromosoms 15 zeigt, in dem sich der „underwhite“- bzw. Matp-Lokus befindet. Um Verwechslungen mit dem sogenannten aim(„absent in melanoma“)1-Gen der Maus, das mit AIM1 nichts zu tun hat, zu vermeiden, entschloß man sich zu einer Umbenennung: Analog zum Matp-Gen der Maus bezeichnet man das entsprechende Gen beim Menschen jetzt als MATP. Auch bei japanischen Medaka-Fischen ist ein Homologon dieses Gens bekannt, das im Mutationsfall eine Hypopigmentierung der Tiere zur Folge hat (Fukamachi et al., 2001).

Untersuchungen klonierter humaner und muriner MATP- bzw. Matp-cDNA zeigten eine 82 %ige Übereinstimmung der Genprodukte der beiden verschiedenen Spezies. Das humane MATP-Gen besteht aus 7 Exons, der translatierte Bereich umfaßt 1593 Basenpaare (einschließlich Stopcodon) und kodiert für insgesamt 530 Aminosäuren.

Das MATP-Protein hat eine Größe von ungefähr 58 kD. Anhand computergestützter Analysen konnte vorausgesagt werden, daß es eine zelluläre Membran in Form von Schleifen durchspannen und dabei 12 Transmembrandomänen bilden würde (s. Abb. 1).

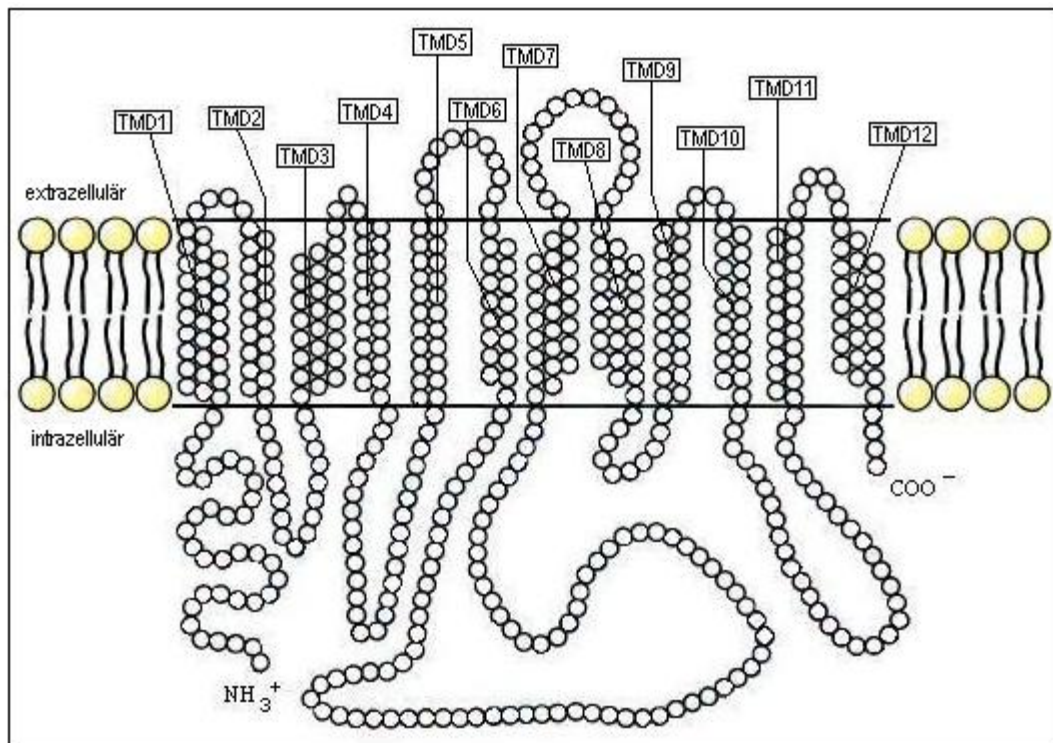


Abbildung 1: Das MATP-Protein mit seinen 12 Transmembrandomänen (TMD)
(modifiziert nach Newton et al., 2001)

Das MATP-Protein weist eine große Ähnlichkeit zu anderen Proteinen auf, die als Transporter fungieren. Der höchste Grad an Übereinstimmung zeigt sich jedoch im Vergleich von MATP-Protein und einigen Saccharose-Protonen-Symportern, wie sie in der Pflanzenwelt auftreten. Eine kennzeichnende Sequenz dieser speziellen Transportproteine findet sich in unveränderter Form auch im MATP-Protein wieder, und zwar in einer den pflanzlichen Verwandten entsprechenden Lokalisation (Newton et al., 2001). Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß auch das humane MATP-Protein die Funktion eines Transporters besitzt. Über das Substrat und die genaue Funktion dieses Transportproteins konnte bisher allerdings nur spekuliert werden.

Newton und Mitarbeiter hielten es für möglich, daß das MATP-Protein – ebenso wie die bekannten Saccharosetransporter der Pflanzen – dem Co-Transport eines Zuckermoleküls und eines Protons dienen und eine Rolle im Rahmen der zellulären Osmoregulation spielen könnte. Sie nahmen an, daß ein derartig großes und damit osmotisch aktives Protein wie das

Melaninmolekül in besonderem Maße differenzierte Vorgänge zur Osmoregulation erforderlich machen könnte. Einen Hinweis darauf lieferten auch Untersuchungen an Melanosomen muriner Matp-Mutanten: Die von einer Mutation betroffenen Mäuse besaßen kleine und faltige Organellen, während sich die Melanosomen gesunder Mäuse für gewöhnlich rundlich und prall präsentierten (Sweet et al., 1998; Lehman et al., 2000).

Eine andere Theorie, die ebenfalls einen Protonentransportmechanismus postuliert, brachte das MATP-Protein in einen möglichen Zusammenhang mit der intrazellulären pH-Regulation, da eine direkte Abhängigkeit zwischen intrazellulärem pH-Wert und Protonenkonzentration besteht. Diese Vorstellung entstammt Untersuchungen am Produkt des P-Gens, die dessen Beteiligung an intrazellulären pH-Regulationsprozessen nachweisen konnten (Puri et al., 2000). Da gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zwischen MATP- und P-Protein bestehen – beide besitzen 12 Transmembrandomänen und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Transporter – hielt man eine ähnliche Funktion der beiden Proteine für möglich (Newton et al., 2001).

Nachdem geraume Zeit keine gesicherten Erkenntnisse über das Produkt des MATP-Proteins vorlagen, konnte eine neue Untersuchung kürzlich erstmals konkretere Hinweise auf die Aufgabe des Proteins im Melanozyten liefern (Costin et al., 2003): Die Tyrosinaseaktivität muriner Melanozyten mit Veränderungen im „underwhite“-Gen wurde mit der muriner Wildtyp-Melanozyten verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikant niedrigere Tyrosinaseaktivität bei den uw-Mutanten (ca. 20 % des Normalwertes). Die Tyrosinasesynthese war nachweislich nicht beeinträchtigt, wohl aber war die Stabilität dieses Schlüsselenzyms der Melaninsynthese in gravierendem Maße herabgesetzt: Nach bereits 24 Stunden war praktisch keine Tyrosinase mehr in den veränderten Melanozyten nachweisbar. Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, daß im Falle von Mutationen im MATP-Gen die intrazelluläre Prozessierung der Tyrosinase beeinträchtigt ist. Der daraus resultierende Aktivitätsverlust des Enzyms verursacht in der Folge den hypopigmentierten Phänotyp der uw-Mutanten (Costin et al., 2003).

Das MATP-Protein spielt also offensichtlich eine elementare Rolle für das posttranskriptionelle Schicksal der Tyrosinase und damit eine Schlüsselfunktion für die Ausbildung der Pigmentierung beim Menschen. Kommt es zu Mutationen des Gens, resultiert im betroffenen Individuum das Bild des Okulokutanen Albinismus. Auf welche Art und Weise genau das geschieht – ob durch einen defekten Zucker- oder Protonentransportmechanismus oder aber auf ganz anderem Wege – muß an dieser Stelle unbeantwortet bleiben und kann nur durch weiterführende Analysen geklärt werden.

Die Zuordnung zu einem bestimmten Phänotyp stützt sich bisher nur auf einen einzigen gesicherten OCA4-Fall bei einem Patienten türkischer Abstammung (Newton et al., 2001). Dieser

Patient zeigt eine generalisierte Hypopigmentation und okuläre Beeinträchtigungen, wie sie für gewöhnlich mit dem Okulokutanen Albinismus Typ 2 assoziiert werden. Diese Ähnlichkeit im klinischen Erscheinungsbild zwischen OCA2- und OCA4-Patienten zeigt sich auch im Mausmodell (Lehman et al., 2000): Mäuse mit Mutationen im p-Gen (p/p) sind äußerlich nicht von solchen mit Mutationen im „underwhite“-Gen (uw/uw) zu unterscheiden. Murine „underwhite“-Mutanten werden ohne Pigmentierung von Fell und Augen geboren, es kommt aber zu einer altersabhängigen Zunahme von Melaninpigment in den Augen, während die Fellfarbe unverändert hell bleibt (Du und Fisher, 2002). Eine ganz ähnliche Entwicklung zeigt sich bekanntlich – bei Menschen ebenso wie bei Mäusen – im Falle von Mutationen im P-Gen (s. o.). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte möglicherweise in der hypothetisch ähnlichen Funktion von MATP- und P-Protein als Transporter innerhalb der Melanozyten gesucht werden: Ein Ausfall von Proteinen mit vergleichbarem Aufgabenbereich könnte schließlich zu sehr ähnlichen Problemen und Erscheinungsbildern führen.

Aufgrund der wenigen vorhandenen Quellen sind gesicherte Aussagen über die phänotypische Variationsbreite beim Menschen bisher allerdings kaum möglich, so daß weitere intensive Untersuchungen zur Klärung dieser Frage notwendig sind.

1.4 Aufgabenstellung

Mit Ausnahme der Arbeit von Newton et al. (2001) sind bisher keine gezielten Untersuchungen zum Okulokutanen Albinismus Typ 4 durchgeführt worden, die Aussagen über die Häufigkeit dieser Erkrankung, Mutationstypen oder das Spektrum des möglichen Erscheinungsbildes erlauben würden. Daher besteht zur Zeit noch ein erheblicher Forschungsbedarf auf diesem Gebiet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv von 176 an Okulokutanem Albinismus erkrankten Personen vorwiegend deutscher Herkunft mit deren Einverständnis auf Veränderungen im OCA4-Gen untersucht. Dabei waren verschiedene Aspekte zu berücksichtigen:

- Die Art der eventuell nachzuweisenden Mutationen im MATP-Gen sollte mit der bisher einzigen bekannten OCA4-Mutation verglichen werden, wobei es sich um eine Veränderung der Spleiß-Akzeptor-Stelle von Exon 2 handelt.

-
- Die Häufigkeit des Okulokutanen Albinismus Typ 4 sollte anhand der Anzahl nachgewiesener Mutationen abgeschätzt und mit der anderer bekannter Albinismusformen verglichen werden.
 - Eventuell nachweisbare Polymorphismen sollten mit bereits publizierten Ergebnissen verglichen werden.
 - Bisher standen nur sehr wenige Informationen zum klinischen Erscheinungsbild von OCA4-Patienten zur Verfügung, die sich auf einen einzigen dokumentierten Erkrankungsfall stützen konnten (s. o.). Daher sollte eine Beschreibung des Phänotyps aller im Rahmen dieser Arbeit nachzuweisenden OCA4-Patienten unter Berücksichtigung eventueller Gemeinsamkeiten und Unterschiede erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

100 bp DNA Ladder	Gibco BRL
Acrylease	Stratagene
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva
Aqua ad iniectabilia	Braun
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
DMSO (Dimethylsulfoxid) 100 %	Merck
d-NTPs Set	Q-Biogene
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Titriplex III)	Merck
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol 100 %	Merck
Ethanol 70 %	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ficoll 400	Pharmacia
Formaldehyd 37 %	Sigma
Formamid 100 %	Fluka
Glycerin (wasserfrei)	Fluka

Natriumcarbonat	Merck
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
pBR322 DNA-Msp I Digest	Biolabs
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid)	Roth
Salpetersäure 65 %	Merck
SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC	Epicentre
Silbernitrat	Caelo
Standard-Agarose	BMA
Taq DNA Polymerase	Eppendorf
Temed (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Sigma
Tris	ICN Biomedicals
Urea	Merck
Xylencyanol	Sigma

2.1.2 Primer

Die in Tabelle 1 aufgeführten Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

Exon	Größe	Zahl der Primerpaare	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
1	385 bp	2	AIM1-F1-uni AIM1-R1-rev AIM1-F2-uni AIM1-R2-rev	uni – AAC ACA GAC CCT AGG ACC AC rev – CAC ACA ATG CTG TAC AGG CTG uni – TAT GTG ACC CCA GTC CTG CT rev – CTC CTG CAG AGG TAC ACA CTA
2	177 bp	1	AIM2-F-uni AIM2-R-rev	uni – CAG GAT TTA GGA GAC CAA TGT rev – CTG AAG GAG AGA CTT TCT GGA
3	326 bp	2	AIM3-F1-uni AIM3-R1-rev AIM3-F2-uni AIM3-R2-rev	uni – GGG AGT GTC TAT GCA TGA GG rev – GAA TGC CCT TTG CAA CCT CTG uni – TCT GTG CAG TAT CTC TGA AGC rev – CCC ATG AAA CTC TTC TCG TC
4	144 bp	1	AIM4-F-uni AIM4-R-rev	uni – GGC TGA GTT TCT GCA GTG AAG rev – ACA GTG ATT GTG TGC ACA GAC
5	124 bp	1	AIM5-F1-uni AIM5-R1-rev	uni – GTA CCT CAA CAG CCT CCA ATC rev – TCC AAG TTG TGC TAG ACC AGA
6	212 bp	1	AIM6-F-uni AIM6-R-rev	uni – GAG GCA CTG CCA GCT GTA ATT rev – GTT ACC CAA GGC AGA GGT TCA
7	225 bp	2	AIM7-F1-uni AIM7-R1-rev AIM7-F2-uni AIM7-R2-rev	uni – CTG ACC TGT GCC CTA AAT GAC rev – CTG TGA TCA CCA CGA CGA CAA uni – CCT GGG CTT TCT GGT CAA CAC rev – TCC TGC CAT GTG CTT CAC TGT

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer

2.1.3 Geräte und Gebrauchsartikel

Computerprogramme	Biometra BioDocAnalyze V1.0 LI-COR e-Seq V2.0 SeqWorks! V1.01 beta (Sven Opitz, Institut für Humangenetik, Universität Lübeck)
Eismaschine	Ziegra ZBE 30-10
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, GB 002, 460 x 570 mm
Gelträger für Agarose-Gelelektrophorese	Serva BlueMarine 100
Glasflaschen	Schott Duran 500 ml/1000 ml
Kammer für Agarose-Gelelektrophorese	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership BM 100
Kämme	Labtech International GmbH 48er Haifischzahnkamm, mylar, 0,2 mm dick Life Technologies Gibco BRL 62er Haifischzahnkamm, mylar, 0,35 mm dick Serva 12er/14er Kämme, 1,0/1,5 mm dick
Magnetrührer	Heidolph MR 2002 Ika-Combimag RCT
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand MZ 2 C
Mikrowelle	Hitachi Micro 700
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt Tubes 0,5 ml/1,5 ml Sarstedt 96er PCR-Mikrotiterplatte + Deckelkette
Pipetten	Gilson Pipetman Pipetten P2, P20, P200, P1000 Thermo Labsystems Multikanal-Finnpipette 4510 (0,5-10 µl)

Pipettenspitzen	Finntip Micro 0,2-10 µl
	Fischer #3510 0,1-10 µl
	Sarstedt Blaue Spitzen
	Sarstedt Gelbe Spitzen
Rüttler	Heidolph REAX 2000
Sequenziergeräte	LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200
Spacer	LI-COR Spacer, 0,2 mm dick
	Life Technologies Gibco BRL Spacer Model S2, mylar, 0,35 mm dick
Spannungsgeber	Life Technologies Gibco BRL PS 9009
	Life Technologies Gibco BRL PS 9009 TC
	Pharmacia Gene Power Supply GPS 200
	Pharmacia Gene Power Supply GPS 400
SSCP-Elektrophorese-Kammer	Life Technologies Gibco BRL Sequencing System Model S2
SSCP-Gel-Trockner	Fröbel Labortechnik G 2000
System zur Auswertung der Agarosegele	Biometra BioDocAnalyse System
	Vetter GmbH UV-Kontaktlampe Chroma 43
Thermocycler	Biometra T Gradient
	Biometra UNO II
	Hybaid OmniGene
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Waage	Sartorius Laboratory L 420 P
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415 C

2.1.4 Stammlösungen

100 bp DNA Ladder (K der Gebrauchsverdünnung: 50 ng/μl)	5 % (w/v) 100 bp DNA Ladder 33 % (v/v) 6x-Ficoll Lösung
10x-TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	20 mM EDTA 890 mM Tris 890 mM Borsäure
3x-Ficoll-Lösung	150 μM Bromphenolblau 190 μM Xylencyanol 7,5 % (w/v) Ficoll 400
6x-Ficoll-Lösung	290 μM Bromphenolblau 370 μM Xylencyanol 15 % (w/v) Ficoll 400
Agarose-Gellösung	0,63 μM Ethidiumbromid 2 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,8 % bzw. 1,5 % (w/v) Standard- Agarose

Formamid-Ladepuffer	290 μ M Bromphenolblau
	370 μ M Xylencyanol
	20 mM EDTA
	95 % (v/v) Formamid
Glycerin-Gellösung für SSCP	6 % (v/v) Acrylamid
	0,16 % (v/v) Bisacrylamid
	10 % (v/v) wasserfreies Glycerin
	2 mM EDTA
	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	0,067 % (v/v) Temed
Harnstoff-Gellösung für SSCP	8 % (v/v) Acrylamid
	0,21 % Bisacrylamid
	1,7 M Urea
	2 mM EDTA
	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	0,035 % (v/v) Temed
pBR322 DNA-Msp I Digest	5 % (w/v) pBR322 DNA-Msp I Digest
(K der Gebrauchsverdünnung: 50 ng/ μ l)	33 % (v/v) 6x-Ficoll-Lösung

Sequenzier-Gellösung	5,5 % (v/v) Acrylamid
	0,15 % Bisacrylamid
	7 M Urea
	2 mM EDTA
	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	0,067 % (v/v) Temed

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten

Durch Kooperation mit Frau PD Dr. Käsmann-Kellner aus der Augenklinik der Universität des Saarlandes wurden Blutproben von 176 Personen mit Albinismus ungeklärter Ursache im Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität zu Lübeck gesammelt. Die aus den Proben isolierte DNA stand für das hier dargestellte Projekt bereits zur Verfügung.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und schnelle Methode, PCR-Produkte aufzutrennen und darzustellen und so den Erfolg einer Reaktion zu kontrollieren.

Ihr liegt folgendes Prinzip zugrunde: DNA bewegt sich aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld auf die Anode zu. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei u. a. abhängig von ihrer Molekülgröße, der Viskosität der Trägersubstanz (d. h. der Agarose-Konzentration des verwendeten Gels) sowie der angelegten Spannung. Mit Hilfe von Ethidiumbromid, einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, kann die DNA markiert und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Seyffert et al., 1998; Knippers, 2001).

Verwendet wurde in diesem Falle ein 1,5 %iges Agarosegel. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 200 ml 1xTBE-Lösung aufgeköcht, auf ca. 60 °C abgekühlt und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Die noch flüssige Lösung wurde in 7 x 10 cm große Gelformen gegossen. Zur Erzeugung von 12 bzw. 14 Aussparungen im Gel („slots“) für die aufzutragenden Produkte wurden Käbme von 1,5 mm Stärke benutzt. Nach Erstarren des Gels wurden je 3,5 µl PCR-Produkt und 3x-Ficoll-Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert, zur Abschätzung der ungefähren Produktgröße wurden zusätzlich 5 µl 100bp-Leiter auf das Gel aufgetragen. Bei einer Spannung von 80 V wurden die Produkte 30 min lang in einer mit 1x-TBE-Pufferlösung gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt und dann mittels einer UV-Kontaktlampe sichtbar gemacht. Die fluoreszierenden DNA-Banden wurden anschließend mit einer Kamera aufgenommen und mit Hilfe des Programmes BioDocAnalyse V 1.0 der Firma Biometra ausgewertet.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz zwischen zwei Oligonucleotidmolekülen (Primer), die gegenläufig an die einander komplementären DNA-Einzelstränge gebunden sind. Benötigt werden dazu jeweils ein sog. Vorwärts(F)- und ein Rückwärts(R)-Primer. Die Sequenz des Vorwärts-Primers entspricht dem Beginn der zu amplifizierenden Region im codierenden Strang, während der Rückwärts-Primer den Endpunkt dieser Region im Komplementärstrang markiert.

Dazu wird die ds-DNA zunächst denaturiert, damit sich die Primer in einem zweiten Schritt an die einzelsträngige DNA binden können (Hybridisierung oder Annealing). Die thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) heftet nun Nucleotide an die 3'-OH-Enden der Primer und synthetisiert auf diese Weise komplementäre DNA-Sequenzen (Neusynthese oder Extension) (Knippers, 2001). Diese Schritte (Denaturierung, Hybridisierung, Extension) werden zyklisch wiederholt, wobei sich die Zahl der DNA-Kopien mit jedem Zyklus verdoppelt (Singer und Berg, 1992)

1. PCR für SSCP-Analysen

Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Volumen von 25 µl 50 ng Patienten-DNA, 0,25 U Taq-Polymerase, 10 % (v/v) Taq-Puffer, jeweils 5 nmol der Nucleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP sowie 10 pmol von jedem der beiden Primer. Eine einzige Abweichung in der PCR-Durchführung ergab sich bei der zweiten Hälfte von Exon 7: Hier mußte je Ansatz die doppelte Menge an Taq-Polymerase (0,5 U) verwendet werden.

Bei den hier verwendeten Vorwärts-Primern handelte es sich um sog. uni-Primer, d. h. sie enthielten an ihrem 5'-Ende eine zusätzliche M13-uni-Sequenz (5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3' = uni), während die Rückwärts-Primer sog. rev-Primer mit zusätzlicher M13-rev-Sequenz (5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3' = rev) waren.

Diese speziellen M13-Sequenzen waren für die der SSCP vorausgehende PCR bedeutungslos, spielten aber für die spätere Sequenzierung eine wichtige Rolle (Anheftung Fluoreszenzfarbstoff-markierter Sequenzierprimer, s. Kap. 2.2.5). Für die Exons 1, 3 und 7 wurden aufgrund ihrer Größe je zwei Primerpaare benutzt. Eine genaue Aufstellung der verwendeten Primer findet sich im Abschnitt 2.1.2.

Bei einer Heizdeckeltemperatur von 104 °C wurde die DNA zunächst für 5 min bei einer Blocktemperatur von 95 °C denaturiert, anschließend erfolgten 30 PCR-Zyklen bestehend aus 1 min Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 55 °C und 30 s Extension bei 72 °C. Abgeschlossen wurde die Reaktion mit einer weiteren Extensionsphase von 5 min bei ebenfalls 72 °C ("final extension"). Nach erfolgreicher Reaktion wurden die Produkte mit jeweils 12 µl Formamidladepuffer versetzt.

2. Primär-PCR für die Sequenzierung

Zur Herstellung von Ausgangsmaterial für die Sequenzanalyse wurde erneut eine PCR zur DNA-Amplifikation durchgeführt. Um die Entstehung von unspezifischen PCR-Produkten zu verhindern und die Sequenzierung zu erleichtern, wurden die Reaktionsbedingungen wie folgt modifiziert:

- a) Die Annealing-Temperatur wurde so hoch wie möglich gewählt, um die Spezifität der Primerbindung an die DNA zu erhöhen (Fartmann et al., 1999). Zu diesem Zweck wurden zunächst PCRs mit einem Temperaturgradienten von 55-65 °C durchgeführt (BiometraTGradient). Die erhaltenen Produkte wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anhand der Stärke des erhaltenen Signals beurteilt. Für die eigentliche Primär-PCR wurde dann die Annealing-Temperatur gewählt, bei der sich noch keine nennenswerte Abschwächung der Elektrophoresebande feststellen ließ. In Tabelle 2 sind die auf diese Weise ermittelten Annealing-Temperaturen aufgeführt (in nicht aufgeführten Exons bzw. Exonabschnitten fielen keine Sequenzierungen an).
- b) Dem 25-µl-Ansatz wurde 1 µl DMSO hinzugefügt, um eine Dimerbildung der Primer zu verhindern und die Denaturierung der DNA zu erleichtern (Fartmann et al., 1999).

Ansonsten entsprachen alle Bedingungen den unter 1. beschriebenen. Die Produkte der Primär-PCR wurden nicht mit Formamidlösung versetzt.

Exon	Temperatur
AIM1-F1/R1	63 °C
AIM3-F1/R1	61 °C
AIM3-F2/R2	61 °C
AIM4-F/R	60 °C
AIM5-F/R	61 °C
AIM6-F/R	60 °C
AIM7-F1/R1	63 °C
AIM7-F2/R2	65 °C

Tabelle 2: Annealing-Temperaturen der verschiedenen Exons

2.2.4 SSCP(„single-strand conformation polymorphism“)-Analyse

Prinzip:

Unter SSCP(„single-strand conformation polymorphism“-Darstellung versteht man eine Elektrophoresemethode, die im Gegensatz zur Agarose-Gelelektrophorese eine extrem differenzierte Auftrennung der PCR-Produkte erlaubt. Das fertige Gel zeigt nach Abschluß der Elektrophorese im oberen Bereich in der Regel zwei relativ zarte Banden, die den DNA-Einzelsträngen entsprechen, sowie eine kräftigere Bande im unteren Gelbereich, die den Doppelstrang repräsentiert.

Das Verfahren ermöglicht die Detektion von Veränderungen der DNA-Sequenz, da sich Wildtyp-DNA und solche mit abweichender Basensequenz bezüglich ihres Migrationsverhaltens im elektrischen Feld unterscheiden. Die Ursache für dieses Phänomen liegt in der komplexen Faltung und Schleifenbildung einzelsträngiger DNA zu dreidimensionalen Strukturen: Schon der Austausch einer einzigen Base genügt, um diese Struktur und damit das Laufverhalten des DNA-Fragments nachhaltig zu verändern (Sambrook und Russell, 2001).

Die SSCP-Sensitivität variiert in Abhängigkeit vom verwendeten Geltyp, optimale Ergebnisse werden in aller Regel mit Acrylamidgelen erzielt, die auch in diesem Fall verwendet wurden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Elektrophoresebedingungen durch Gelzusätze wie Glycerin (nicht-denaturierend) oder Harnstoff (denaturierend) zu modifizieren, wobei man davon

ausgeht, daß die Auftrennung bei Glyceringelen eher nach dem Gesichtspunkt der Konformation und bei Harnstoffgelen eher nach dem Kriterium der Größe des DNA-Abschnitts erfolgt (Sambrook und Russell, 2001).

Da man Gelen mit Glycerinzusatz im allgemeinen eine größere Sensitivität bei der Mutationsdetektion zuschreibt als Harnstoffgelen (Sambrook und Russell, 2001), wurden in dieser Arbeit zunächst bei allen Exons SSCPs mit Glyceringelen versucht. Wiesen diese eine zu große Unschärfe auf, wurden zusätzlich noch Harnstoffgele angefertigt, um eine bessere Beurteilbarkeit zu erreichen.

Durchführung:

Es wurde mit zwei Gellösungen unterschiedlicher Zusammensetzung gearbeitet, nämlich Glycerin- und Harnstoff-Gellösung (genaue Zusammensetzung s. Abschnitt 2.1.4).

Durch Zugabe von 220 µmol Ammoniumpersulfat zu jeweils 75 ml Lösung wurde der Polymerisationsvorgang gestartet, dann wurde das Gel zwischen zwei Glasplatten von 39 cm x 33 cm bzw. 42 cm x 33 cm Größe gegossen, die mit Hilfe von Abstandhaltern („spacer“) 0,35 mm auseinander gehalten wurden. Die kleinere der beiden Platten besaß eine Silanbeschichtung. Zur Herstellung von Geltaschen zum Einpipettieren der Proben wurden 62-zählige Haifischzahnkämme zunächst mit dem zinkenlosen Ende ins Gel geschoben. Nach Abschluß des Polymerisationsvorganges wurde der Kamm gedreht, so daß 62 Aussparungen im Gel entstanden. Der zu untersuchende DNA-Abschnitt wurde mittels PCR amplifiziert (s. Kapitel 2.2.3). Da die ideale Fragmentlänge mit maximaler Effizienz der Mutationsdetektion ca. 150-200 bp beträgt (Sambrook und Russell, 2001), wurden einige der besonders großen Exons mit zwei Primerpaaren untersucht. Auf diese Weise konnte die tatsächliche Fragmentgröße der idealen angenähert werden. Unmittelbar vor der Elektrophorese wurden die Produkte durch eine Kombination aus Formamid und Hitze (5 min bei 95 °C) zu Einzelsträngen denaturiert, auf Eisblöcken gekühlt und dann auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden auf jedes Acrylamidgel 2,5 µl der pBR322 DNA-Msp I-Gebrauchslösung als Längenstandard aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei Glyceringelen generell mit einer Leistung von 20 W, bei Harnstoffgelen mit 30 W durchgeführt, die Laufzeit variierte in Abhängigkeit von der Größe des DNA-Fragments. Als Anhaltspunkt für die Elektrophoresedauer wurde der Abstand der Xylenocyanol-Farbstoffbande von der Unterkante der Glasplatte herangezogen, der ca. zwischen 17 und 23 cm liegen sollte (genaue Angaben s. Tabelle 3).

Bezeichnung des DNA-Abschnitts	ausgewerteter Geltyp	Laufzeit	Abstand der XC-Farbstoffbande von Gelunterkante (Laufende)
AIM1-F1/R1	Glycerin	7 h 15 min	17 cm
AIM1-F2/R2	Harnstoff	2 h	20 cm
AIM2-F/R	Harnstoff	2 h	22 cm
AIM3-F1/R1	Glycerin	6 h 30 min	19 cm
AIM3-F2/R2	Glycerin	6 h 30 min	19 cm
AIM4-F/R	Glycerin	6 h 30 min	20 cm
AIM5-F/R	Glycerin	6 h 30 min	18 cm
AIM6-F/R	Glycerin	6 h 30 min	19 cm
AIM7-F1/R1	Harnstoff	2 h	22 cm
AIM7-F2/R2	Glycerin	5 h	23 cm

Tabelle 3: Geltypen und Laufzeiten bei der SSCP-Analyse

Nach Ende der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, wobei das Acrylamidgel an der nicht-silanisierten Platte haften blieb. Diese Platte wurde dann mit einem hölzernen Färberahmen von 32 x 38 cm Größe versehen, und zur Darstellung der Elektrophoresebanden wurde eine Silberfärbung durchgeführt (nach Seyffert et al., 1998). Zunächst erfolgte die Fixierung der DNA mit 10 % (v/v) Ethanol (10 min), dann mit 1 % (v/v) Salpetersäure (5 min), anschließend wurde mit entionisiertem Wasser dreimal gründlich gespült. Dann wurde das Gel für 20 min mit 11,9 mM Silbernitrat inkubiert, um die Anlagerung von Silberionen an die Nucleinsäureseitenketten zu bewirken. Nach nochmaligem Spülen mit Wasser erfolgte schließlich der Reduktionsvorgang durch Aufbringen einer Reduktionslösung (280 mM Natriumcarbonat, 0,024 % (v/v) Formaldehyd), wodurch die DNA-Banden sichtbar wurden. Durch Zugabe von 10 % (v/v) Essigsäure (3 min) wurde der Färbeprozess gestoppt. Das Gel wurde anschließend noch für 5 min im Wasserbad belassen, bevor es auf Papier übertragen („blotting“) und mit Hilfe einer Vakuumpumpe bei einer Temperatur von 70 °C getrocknet wurde.

2.2.5 DNA-Sequenzierung mit der Dideoxymethode

Prinzip:

Die Dideoxymethode (Sanger et al., 1977) wird genutzt, um die Nucleotidsequenz von DNA-Strängen zu ermitteln.

Dazu müssen zunächst sogenannte M13-Sequenzen in das zu untersuchende DNA-Fragment eingeführt werden: Das erreicht man in der Primär-PCR mit Hilfe von Primern, die mit der entsprechenden Sequenz an ihrem 5'-Ende markiert sind, so daß die entstehenden DNA-Kopien ebenfalls diese M13-Sequenz an ihrem 5'-Ende tragen (s. Kapitel 2.2.3). In der Sequenzierungsreaktion werden dann unter Verwendung von farbstoffmarkierten M13-Standard-Primern, die sich zu den angehefteten Sequenzen komplementär verhalten, wiederum Kopien der Ausgangs-DNA angefertigt.

Dabei wird die eigentliche Sequenzierungsreaktion in vier separaten Ansätzen durchgeführt, welche jeweils die Deoxynucleotide (dNTPs) dATP, dTTP, dGTP, dCTP sowie eines der Dideoxynucleotide (ddNTPs) – nämlich ddATP, ddTTP, ddGTP oder ddCTP – enthalten. Den Dideoxynucleotiden fehlt im Gegensatz zu den Deoxynucleotiden die freie 3'-OH-Gruppe, an die durch die DNA-Polymerase neue Nucleotide angeheftet werden können. Wird also anstelle eines "normalen" Nucleotids ein solches Dideoxynucleotid eingebaut, so führt dieses Ereignis unweigerlich zum Kettenabbruch. Da die ddNTPs nach dem Zufallsprinzip in die Kopie eingebaut werden, erhält man am Ende der Reaktion DNA-Ketten aller möglichen Längen, die – abhängig vom Reaktionsansatz – mit Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin enden (Singer und Berg, 1992).

Die Reaktionsprodukte der vier Ansätze werden anschließend auf benachbarte Bahnen eines Acrylamidgels aufgetragen und aufgetrennt.

Bei ihrer Wanderung durch das Gel passieren die mit farbstoffmarkierten Primern versehenen DNA-Fragmente abhängig von ihrer Länge nacheinander eine Laserlichtquelle, die den Farbstoff zur Fluoreszenz anregt. Diese Fluoreszenzsignale werden von einem Computer mit geeigneter Software registriert, der in der Lage ist, daraus die Sequenz der untersuchten DNA zu rekonstruieren (Knippers, 2001).

Durchführung:**1. Primär-PCR:**

Die Methode der Primär-PCR ist bereits im Abschnitt 2.2.3 erläutert worden.

2. Aufreinigung:

Auch unter optimierten PCR-Bedingungen wie bei der Primär-PCR kann die Entstehung von unspezifischen Produkten nie vollkommen vermieden werden: "A PCR product is never clean" (Fartmann et al., 1999).

Um bei der Sequenzierung störende und die Interpretation der Ergebnisse erschwerende Hintergrundsignale zu reduzieren, wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des NucleoSpin Extract 2 in 1-Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt. Dafür wurden 20 µl PCR-Produkt mit 80 µl Aqua dest und 400 µl NT2-Puffer vermischt, auf die Aufreinigungssäule gegeben und 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Während dabei das DNA-Material an die Membran der Säule gebunden blieb, wurde das erhaltene Eluat verworfen. Diese Prozedur wurde mit 600 µl NT3-Puffer wiederholt, und in einem letzten Waschschrift mit 200 µl NT3 wurde die Zentrifugationsdauer auf 2 min erhöht, um eventuelle Ethanolrückstände aus der Pufferlösung möglichst vollständig von der Membran zu entfernen. Anschließend wurde die nun gereinigte DNA selbst mittels 25 µl NE-Puffer und einminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm aus der Säulenmembran ausgewaschen und das Eluat in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Um sicherzustellen, daß nach der Aufreinigung noch genügend DNA-Material für eine Sequenzierung vorhanden war, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

3. Sequenzierungsreaktion:

Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing-Kit-LC der Firma Epicentre. Für jeden zu sequenzierenden DNA-Einzelstrang wurden vier separate Reaktionsgefäße vorbereitet, in die je 2 µl SequiTherm EXCEL II-LC Termination-Mix A, T, G oder C vorgelegt wurden. Der Termination-Mix enthielt jeweils dATP, dTTP, dGTP und dCTP in einer Konzentration von 45 µM. Zusätzlich befanden sich darin entweder ddATP (Mix A) oder ddTTP (Mix T) in einer Konzentration von 450 µM oder ddGTP (Mix G) in einer Konzentration von 30 µM oder ddCTP (Mix C) in einer Konzentration von 300 µM. Da jede Patienten-DNA-Probe zur Erhöhung der Aussagekraft des Ergebnisses sowohl im

Vorwärts- als auch im Rückwärtsstrang sequenziert wurde, waren pro Patient also insgesamt $2 \cdot 4 = 8$ Ansätze nötig. Auf jeden der vier Ansätze für einen Einzelstrang wurden dann 4 μl aus folgendem Gemisch pipettiert, das mit Aqua ad iniectabilia zu einem Gesamtvolumen von 17 μl aufgefüllt wurde:

- 7,2 μl 3,5x SequiTherm EXCEL II Sequencing Buffer
- 0,3 μl 100 % DMSO
- 3 μl PCR-Produkt
- 0,7 pmol IRD-800-markierter uni- oder rev-Primer (1 pmol/ μl)
- 5 U SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase

Nach kurzem Zentrifugieren der fertig vorbereiteten PCR-Ansätze wurde dann die eigentliche Sequenzierungsreaktion auf dem Biometra UNO II-Thermocycler gestartet, die aus den folgenden Programmschritten bestand: Bei einer Heizdeckeltemperatur von 104 °C zunächst 5 min Prä-Denaturierung bei 94 °C, dann 30 Zyklen bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 60 °C und 1 min Extension bei 72 °C. Abschließend erfolgte eine Abkühlung auf 4 °C bis zur Entnahme aus dem Cycler. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Reaktionsgefäße sofort mit je 3 μl Stop-Solution aus dem Sequenzier-Kit versetzt, lichtgeschützt verpackt und bis zur Durchführung der Acrylamid-Gelelektrophorese bei -20 °C eingefroren.

4. Acrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung der Produkte aus der Sequenzierungsreaktion:

Die Auftrennung der erhaltenen Produkte aus der Sequenzierungsreaktion wurde in allen Fällen mit dem LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200 durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden LI-COR-Glasplatten von 41 cm Länge mit 0,2 mm starken Abstandhaltern zusammengesetzt und mit den dazugehörigen Schienen („rails“) fixiert. Es wurden 45 ml 5,5 % Sequenzier-Gellösung abgemessen, mit 130 μmol APS versetzt und in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten gegossen. Anschließend wurde ein ebenfalls 0,2 mm starker 48-zähliger Haifischzahnkamm mit der zinktragenden Seite vom Gel abgewandt eingelegt und mit einer Gußplatte („casting plate“) gesichert. Nach erfolgter Polymerisation des Gels wurde die Gußplatte entfernt und durch eine Pufferkammer ersetzt, der Kamm wurde gedreht, so daß nun die Zinken ins Gel ragten. Die Glasplatten wurden unter Verwendung von Wasser und Ethanol 100 % sorgfältig gereinigt und in das LI-COR-Sequenziergerät gehängt, die Pufferkammer wurde mit 1x-TBE-Puffer gefüllt. Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert

und in die 48 Geltaschen pipettiert, wobei die Reihenfolge ATGC (benannt nach Termination-Mix, s. o.) stets eingehalten wurde. Bei einer Spannung von 2000 V wurde dann die Elektrophorese durchgeführt, die Registrierung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte bei einer Wellenlänge von 800 nm. Nach Ende des Laufes wurde das Ergebnis der Auftrennung mit Unterstützung des e-Seq-Programmes ausgewertet und abschließend mit Hilfe des Programmes SeqWorks (Dr. med. Sven Opitz, Universität Lübeck) weiter bearbeitet. Im weiteren Verlauf wurden die auf diese Weise erhaltenen Sequenzen mit der bereits bekannten aus der Datenbank verglichen (humane MATP- cDNA: NCBI, Zugangsnummer AF172849).

3 Ergebnisse

3.1 Vorgehensweise

Zunächst wurden bei 176 DNA-Proben von Personen mit Okulokutanem Albinismus alle Exons des OCA4-Gens mittels PCR amplifiziert, wozu 10 spezifische Ansätze nötig waren (s. Kapitel 2.1.2). Anschließend wurden zur Erfolgskontrolle stichprobenartig Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. War die PCR erfolgreich, wurden alle Produkte im weiteren Verlauf auf Acrylamidgelen analysiert.

3.2 Ergebnisse der SSCP-Analysen

SSCP-Analysen stellen ein sensitives Verfahren der Mutationsdetektion dar, mit dessen Hilfe im Idealfall nahezu 100 % aller DNA-Veränderungen nachgewiesen werden können (Sambrook und Russell, 2001).

Bei der Untersuchung der PCR-Produkte des OCA4-Gens wurden zunächst SSCP-Analysen mit Glycingelen durchgeführt, denen eine größere Sensitivität zugeschrieben wird. War das Ergebnis unbefriedigend im Sinne einer zu großen Bandenunschärfe, wurde die Elektrophorese mit Harnstoffgelen wiederholt (s. Kapitel 2.2.4), wodurch in allen Fällen ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden konnte. Die auffälligen Proben sind in Tabelle 4 auf S. 40 zusammengefaßt.

Beschreibung der Auffälligkeiten:

- **1. Hälfte von Exon 1 (AIM1-F1/R1¹):**

Die Untersuchung konnte unter Verwendung von Glycingel mit gutem Ergebnis bezüglich der Bandenschärfe durchgeführt werden. Es zeigte sich bei Probe 7560 eine Auffälligkeit in einem Einzelstrang.

- **2. Hälfte von Exon 1 (AIM1-F2/R2):**

Da Glycingele sich in diesem Exonabschnitt als nicht beurteilbar erwiesen, wurden die Analysen mit Harnstoffgelen wiederholt. Alle Proben blieben unauffällig.

- **Exon 2 (AIM2-F/R):**

Auch in diesem Exon mußte wegen großer Bandenunschärfe bei Verwendung von Glycingelen auf harnstoffhaltige Gele zurückgegriffen werden. Es zeigten sich keine Auffälligkeiten.

- **1. Hälfte von Exon 3 (AIM3-F1/R1):**

Im Glycingel zeigte sich bei Probe 7577 ein komplexes Bandenmuster im Bereich zwischen den Einzel- und Doppelsträngen (s. Abb. 2).

Im Fall von Probe 7665 zeigte der Doppelstrang ein auffälliges Laufverhalten.

¹ Diese Bezeichnung bezieht sich auf die für die Sequenzierung verwendeten Primer (s. Tabelle 1).

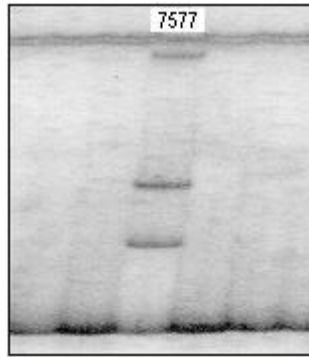


Abbildung 2: Auffälligkeit der Probe 7577 in Exon 3 bei der SSCP-Analyse

- **2. Hälfte von Exon 3 (AIM3-F2/R2):**

Das Glyceringel zeigte bei den Proben 7424, 7433, 7476 und 7499 gleichartig in Erscheinung tretende Auffälligkeiten komplexer Natur im Bereich zwischen einzel- und doppelsträngiger DNA.

Des weiteren fielen bei Probe 7558, 7632 und 7633 sehr diskrete Veränderungen im Bereich eines der beiden Einzelstränge auf.

Eine sehr ähnliche Auffälligkeit zeigte sich auch bei Probe 7563.

- **Exon 4 (AIM4-F/R):**

Auch bei diesem Exon konnten mit Glyceringel gute Ergebnisse erzielt werden. Es fanden sich drei Arten von Auffälligkeiten:

Bei den Proben 7431, 7541, 7567, 7577 und 7593 zeigten sich kombinierte Veränderungen im Einzel- sowie im Doppelstrang.

Die Proben 7433, 7476, 7499 und 7630 wiesen eine zusätzliche Bande im Bereich des unteren Einzelstranges auf.

Bei Probe Nr. 7451 zeigte sich eine zusätzliche Bande kurz unterhalb des oberen Einzelstranges.

Beispiele für Auffälligkeiten in Exon 4 zeigt Abbildung 3.

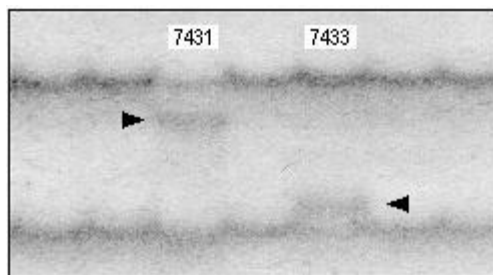


Abbildung 3: Beispiele für Auffälligkeiten der SSCP-Analyse in Exon 4 (Einzelstrangbereich)

- **Exon 5 (AIM5-F1/R1):**

Die Beurteilung konnte auch hier auf der Grundlage von Glycerringeln erfolgen.

In diesem DNA-Abschnitt fanden sich 15 optisch identische Auffälligkeiten im Bereich beider Einzelstränge. Davon betroffen waren die Proben mit den Nummern 7424, 7431, 7433, 7448, 7451, 7471, 7476, 7499, 7511, 7529, 7541, 7563, 7567, 7577 und 7593 (s. Abb. 4).

Des Weiteren zeigte sich bei Probe 7418 eine diskrete Veränderung ebenfalls im Bereich der Einzelstränge.

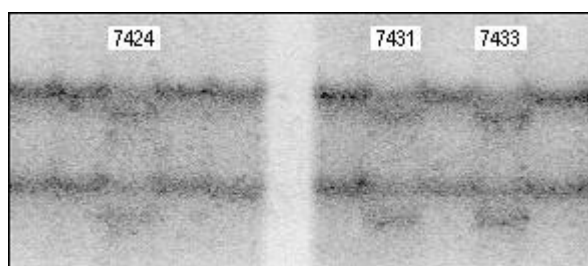


Abbildung 4: Beispiele für Auffälligkeiten der SSCP-Analyse in Exon 5

- **Exon 6 (AIM6-F/R):**

Auf dem Glycerringel zeigte sich eine komplexe Auffälligkeit bei Probe 7560 mit Veränderungen des Gelbereiches zwischen Einzel- und Doppelbanden.

- **1. Hälfte von Exon 7 (AIM7-F1/R1):**

Da die Bandenunschärfe bei den Glycingelen sehr stark ausgeprägt war, wurde ein Versuch mit Harnstoffzusatz unternommen, was zu einem sehr guten Ergebnis führte.

Es trat eine diskrete Verdoppelung eines Einzelstranges bei Probe 7451 in Erscheinung.

Ein recht komplexes Bandenmuster zeigte sich dagegen im Einzelstrangbereich von Probe 7567.

- **2. Hälfte von Exon 7 (AIM7-F2/R2):**

Das Glycingel zeigte eine deutliche Auffälligkeit von Probe 7658 mit komplexem Bandenmuster auf der gesamten Länge zwischen Einzel- und Doppelstrang.

Exon	Auffällige Proben
1-1	7560
1-2	-
2	-
3-1	7577, 7665
3-2	7424, 7433, 7476, 7499, 7558, 7563, 7632, 7633
4	7431, 7433, 7451, 7476, 7499, 7541, 7567, 7577, 7593, 7630
5	7418, 7424, 7431, 7433, 7448, 7451, 7471, 7476, 7499, 7511, 7529, 7541, 7563, 7567, 7577, 7593.
6	7560
7-1	7451, 7567
7-2	7658

Tabelle 4: In der SSCP-Analyse auffällige Proben

3.3 Ergebnisse der Sequenzierung

Alle Proben, die bei der SSCP-Analyse auffällig waren, wurden anschließend im entsprechenden Exon sequenziert. Die Sequenzierung wurde grundsätzlich in Vorwärts- und Rückwärts-Richtung durchgeführt, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. Die ermittelte Sequenz wurde dann mit der bekannten cDNA-Sequenz aus einer Internet-Datenbank (NCBI Nucleotide, Zugangsnummer AF172849) verglichen. Zeigte sich bei der Auswertung sowohl im Vorwärts- als auch im Rückwärtsstrang an identischer Position der Sequenz eine Überlagerung zweier Signale bzw. ein Signal, das an dieser Stelle nicht zu erwarten war, so konnte von einer Veränderung in der DNA-Sequenz des Patienten ausgegangen werden. Zusätzlich zu den auffälligen Proben wurden jeweils noch ein bis zwei unauffällige Kontrollen mitsequenziert.

Die im folgenden aufgeführten Sequenzvariationen² sind in Tabelle 5 auf Seite 46 nochmals zusammengefaßt. Des weiteren befinden sich im Anhang Auszüge von cDNA-Sequenzen sowie Sequenzausschnitte genomischer DNA (s. Kap. 6.1), welche die Originalsequenz des MATP-Gens zeigen.

3.3.1 Mutationen

Der Begriff der Mutation wird in der Genetik nicht immer einheitlich verwendet. In dieser Arbeit bezieht er sich nur auf DNA-Veränderungen mit zu erwartender Krankheitsrelevanz („disease-causing change“ (Dunnen und Antonarakis, 2001)), d. h. auf Sequenzvariationen mit Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Genprodukts.

² Die Benennung der gefundenen DNA-Veränderungen folgt den Nomenklaturempfehlungen von Antonarakis et al. (1998) sowie Dunnen und Antonarakis (2001).

1. Punktmutationen (Substitutionen):

Unter diesem Oberbegriff sind Veränderungen aufgeführt, die auf DNA-Ebene zum Ersatz eines Nucleotids durch ein anderes führen. Dadurch kann es zum Austausch einer Aminosäure im Protein kommen, was als Missense-Mutation bezeichnet wird. Sofern nicht anders erwähnt, sind alle Veränderungen auf eines der beiden Allele beschränkt und die betroffenen Patienten somit heterozygot für die entsprechende Mutation.

Bei Probe 7560 ergab die Sequenzierung der Auffälligkeit in Exon 1 einen Austausch von Cytosin gegen Guanin an Position 172 des einen Allels (c.172C>G). Durch diesen Basenaustausch kommt es im Protein an Position 58 der Aminosäurekette zum Ersatz der ursprünglichen Aminosäure Prolin durch Alanin (P58A).

Probe 7665 zeigte einen Basenaustausch in Exon 3 an Position 606 der cDNA, und zwar ist an dieser Stelle die Base Guanin durch Cytosin ersetzt worden (c.606G>C). Daraus resultiert ein Austausch der Aminosäure Tryptophan durch Cystein im Protein an Position 202 (W202C).

Bei Probe 7563 fand sich ebenfalls in Exon 3 eine Punktmutation. Dort ist an Position 814 Guanin durch Adenin ersetzt worden (c.814G>A), was auf Proteinebene an Position 272 zu einer Änderung der Aminosäure Glutaminsäure in Lysin entspricht (E272K).

Die Sequenzierung der in Exon 4 auffälligen Probe Nr. 7451 offenbarte an Position 950 einen Austausch von Adenin gegen Guanin (c.950A>G), wodurch im Genprodukt an Position 317 die Aminosäure Tyrosin durch Cystein ersetzt wird (Y317C).

Die SSCP hatte bei Probe 7418 eine Auffälligkeit in Exon 5 gezeigt. Bei der daraufhin vorgenommenen Sequenzierung fand sich an Position 1082 anstelle der zu erwartenden Base Thymin ein reines Cytosin-Signal ohne jeglichen Hintergrund. Es gab somit keinen Hinweis auf das Vorliegen von Thymin in einem der beiden Allele, so daß dieser Patient für einen Austausch von Thymin gegen Cytosin an der fraglichen Stelle homozygot sein muß (c.[1082T>C]+[1082T>C]). Diese Mutation führt zu einem Ersatz der Aminosäure Leucin durch Prolin an Position 361 des MATP-Proteins (L361P).

Probe 7451, die bereits in Exon 4 eine Punktmutation aufwies (s. o.), zeigte einen weiteren Basenaustausch an Position 1429 in Exon 7. Dort ist Guanin durch Adenin ersetzt worden (c.1429G>A; s. Abb. 5), was im Protein zu einer Veränderung der Aminosäure Nr. 477 führt: Aus Alanin wird Threonin (A477T).

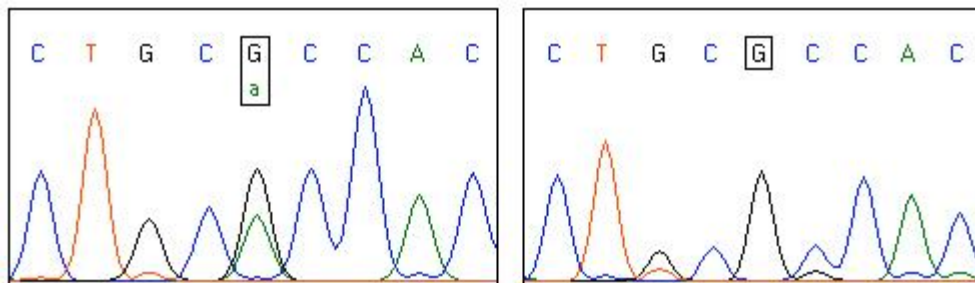


Abbildung 5: Probe 7451 (links im Bild) zeigt an Pos. 1429 eine Überlagerung eines G- und A- Signals, was einem Vorliegen der heterozygoten Punktmutation c.1429G>A entspricht. Eine Kontrollprobe (rechts im Bild) zeigt dagegen ein unauffälliges Sequenzmuster.

Die Sequenzierung der ebenfalls in Exon 7 befindlichen Auffälligkeit der Probe 7567 ergab einen Austausch von Cytosin durch Thymin an Position 1457 (c.1457C>T). Auf der Ebene des Genprodukts ergibt sich hieraus an Position 486 ein Ersatz der Aminosäure Alanin durch Valin (A486V).

2. Deletionen:

Deletionen sind durch den Verlust eines oder mehrerer DNA-Nucleotide gekennzeichnet. Diese Art von Veränderung besitzt oft Krankheitsrelevanz, da sie häufig zur einer Verschiebung des Leserasters beginnend am Mutationsort führt, eventuell verbunden mit der Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren. Daraus resultiert eine völlige Veränderung der Aminosäuresequenz auf Proteinebene. Alle Mutationen, die zu einer Veränderung des ursprünglichen Leserasters führen, werden unter dem Begriff Frameshift-Mutationen zusammengefaßt. Im Falle von Deletionen kompletter Tripletts dagegen bleibt das Leseraster unverändert.

Die Sequenzanalyse zeigt im Falle einer heterozygoten Deletion mit Leserasterveränderung ein sehr typisches Bild: Beginnend mit dem Ort der Mutation stimmt die Basensequenz der beiden Allele nicht mehr überein, so daß sich bis zum Ende der Sequenzierung stets zwei Signale überlagern.

Im untersuchten Patientenkollektiv fanden sich zwei verschiedene Deletionen:

Die erste betraf nur die Probe 7577. Dort ergab die Sequenzierung in Exon 3 eine Deletion des Basentripletts TTC, das sich im Normalfall an Position 661-663 der cDNA befindet (c.661_663delTTC) und für die Aminosäure Nr. 221 Phenylalanin codiert, die durch diese

Mutation ebenfalls deletiert wird (F221del). Da ein komplettes Triplet deletiert worden ist, bleibt das Leseraster erhalten (s. Abb. 6).

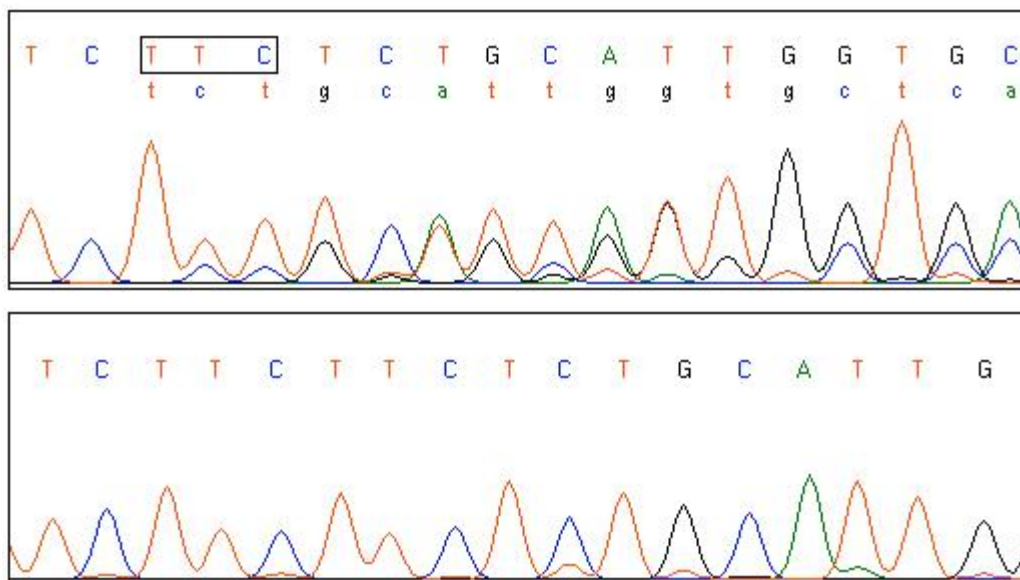


Abbildung 6: Heterozygote Deletion eines Basentriplets (TTT) bei Probe 7577 (oben im Bild) mit typischem Überlagerungsmuster: Die großen Buchstaben bezeichnen die Originalsequenz, die kleinen die Sequenz des mutierten Allels. Im Vergleich dazu eine unauffällige Kontrolle (unten im Bild).

Die zweite Deletion betraf die Proben 7431, 7541, 7567, 7577 und 7593. Es handelt sich somit um die einzige Mutation, die mehr als einen der untersuchten Patienten betrifft. In diesem Fall zeigte die Sequenzierung in Exon 4 den Verlust nur eines einzigen, die Base Cytosin tragenden Nucleotids an Position 986 (c.986delC). Dadurch kommt es zu einer Leserasterveränderung mit konsekutiver Entstehung eines Stopcodons in Exon 6 (TAA an Pos. 1189-1191 der durch die Deletion veränderten cDNA), wo der Translationsvorgang abbricht. Die Aminosäuresequenz des Proteins ändert sich beginnend am Deletionsort.

3. Insertionen:

Diese Art von Mutation bezeichnet die Einfügung eines oder mehrerer Nucleotide in die ursprüngliche DNA-Sequenz. Wie auch die Deletionen besitzen diese Veränderungen aus ähnlichen Gründen oft tiefgreifende Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Genprodukts.

Wie bei der Deletion zeigt auch hier die Sequenzierung heterozygoter Veränderungen vom Insertionsort an das typische Bild sich überlagernder Signale.

Insgesamt fanden sich im untersuchten Patientengut zwei verschiedene Insertionen.

Bei Probe 7560 zeigte die Untersuchung des auffälligen Exons 6 den Einschub eines 25 bp großen DNA-Fragments der Sequenz ACTACATTGGATTAAAGGGTCTTTA zwischen den Nucleotiden 1202 und 1203 (c.1202_1203insACTACATTGGATTAAAGGGTCTTTA). Bei genauerer Betrachtung entspricht die eingefügte Sequenz exakt dem unmittelbar vorausgegangenem DNA-Abschnitt von Position 1179-1202, so daß von einer Duplikation und von einer anschließenden Insertion ausgegangen werden kann. Es findet sich jedoch eine Abweichung: Der Einschub beginnt mit einem zusätzlichen adenintragenden Nucleotid, das am Beginn des vorausgegangenem DNA-Stückes dagegen nicht auftaucht. Die Erklärung für dieses Phänomen könnte in noch unbekanntem Vorgängen auf molekularer Ebene zu finden sein. Als Folge dieser Mutation kommt es zur Entstehung eines neuen Stopcodons TAA, das sich aus den letzten beiden Nucleotiden vor der Insertion (Pos. 1201 und 1202) und dem ersten Nucleotid der eingefügten Sequenz zusammensetzt. Die veränderte DNA kann also nur bis zu dieser Stelle translatiert werden, danach kommt es zum Kettenabbruch.

Probe 7658 wies in Exon 7 eine Insertion der Sequenz TGCTCTCT zwischen den Nucleotiden 1573 und 1574 auf (c.1573_1574insTGCTCTCT). Auch in diesem Fall entspricht das eingefügte DNA-Fragment dem unmittelbar vorausgegangenem Abschnitt von Position 1567-1573, wieder mit einem zusätzlichen, diesmal thymintragenden Nucleotid davor. Auch bei dieser Mutation liegt also eine Duplikation und nachfolgende Insertion des vorhergehenden DNA-Abschnitts vor, allerdings mit einer überraschenden Folge: Es kommt zur Translation über das ursprüngliche Stopcodon TAG am Ende von Exon 7 hinaus, da sich das Leseraster verschiebt und ein neues Stopcodon TGA (Pos. 1618-1620) entsteht. Das Genprodukt erhält dadurch einige zusätzliche Aminosäuren, so daß es statt wie im Normalfall aus 530 nun aus 539 Aminosäuren besteht.

DNA	Exon	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Protein- ebene	hetero- zygot	homo- zygot	Übertra- gender Elternteil
7560	1	c.172C>G	P58A	x		Mutter
	6	c.1202_1203insACTACATT GGATTAAAGGGTCTTTA	Ketten- abbruch	x		Vater
7577	3	c.661_663delTTC	F221del	x		?
	4	c.986delC	Frameshift	x		?
7451	4	c.950A>G	Y317C	x		Vater
	7	c.1429G>A	A477T	x		Mutter
7567	4	c.986delC	Frameshift	x		Mutter
	7	c.1457C>T	A486V	x		Vater
7418	5	c.[1082T>C]+[1082T>C]	L361P		x	ein Allel von jedem Elternteil
7665	3	c.606G>C	W202C	x		?
7563	3	c.814G>A	E272K	x		?
7431	4	c.986delC	Frameshift	x		?
7541	4	c.986delC	Frameshift	x		?
7593	4	c.986delC	Frameshift	x		?
7658	7	c.1573_1574insTGCTCTCT	Frameshift	x		?

Tabelle 5: Übersicht über gefundene Mutationen

Zusammenfassung:

Bei der vorgenommenen Sequenzanalyse, deren Ergebnisse in Tabelle 5 zusammengefaßt sind, konnten vier Patienten mit Mutationen in zwei verschiedenen Exons des MTP-Gens ermittelt werden (Proben 7560, 7577, 7451 und 7567). Bei einem weiteren Patienten gelang der Nachweis einer homozygoten Punktmutation (Probe 7418). In einem weiteren Schritt wurden – sofern möglich – DNA-Proben der zugehörigen Eltern untersucht, um die Herkunft der beiden Allele zu klären.

1. Patientin 7560:

Bei dieser Patientin konnten eine Punktmutation in Exon 1 sowie eine komplexe Insertion in Exon 6 nachgewiesen werden. Durch die molekulargenetische Untersuchung der Familie gelang der Nachweis der Punktmutation bei der Mutter, der Vater konnte als Überträger der Insertion identifiziert werden. Damit ist die Lokalisation der Mutationen auf verschiedenen Allelen nachgewiesen. Ein ebenfalls untersuchtes Geschwisterkind dagegen zeigte weder die eine noch die andere Veränderung.

2. Patientin 7577:

Diese Patientin besitzt zwei unterschiedliche Deletionen in Exon 3 bzw. 4. Da kein DNA-Material der Familienangehörigen beschafft werden konnte, ist die Herkunft der beiden Allele nicht geklärt.

3. Patient 7451:

In diesem Fall gelang der Nachweis zweier Punktmutationen in Exon 4 und 7. Durch die Untersuchung der Familie zeigte sich, daß die erste der beschriebenen Punktmutationen vom Vater stammen mußte (s. Abb. 7), während die letztere von der Mutter vererbt wurde (s. Abb. 8). Ein Geschwisterkind ist ebenfalls heterozygoter Träger für diese von der Mutter stammende Veränderung.

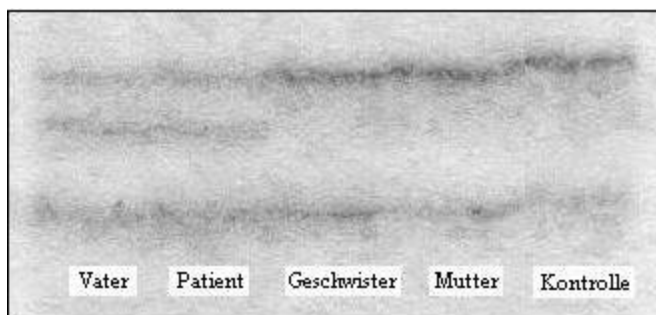


Abbildung 7: SSCP-Analyse der Familie von Patient 7451 in Exon 4. Der Patient und sein Vater sind Träger der Punktmutation, Geschwisterkind und Mutter sind unauffällig. Rechts im Bild eine ebenfalls unauffällige Kontrolle.

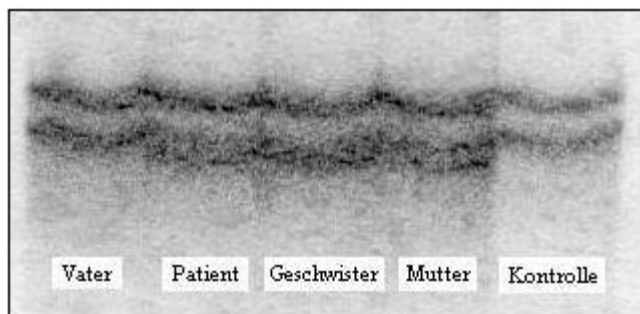


Abbildung 8: SSCP-Analyse der Familie von Patient 7451 in Exon 7. Das Geschwisterkind und die Mutter weisen die gleiche Punktmutation auf wie der Patient, der Vater ist unauffällig. Rechts im Bild eine unauffällige Kontrolle.

4. Patient 7567:

Bei diesem Patienten konnten eine Deletion in Exon 4 sowie eine Punktmutation in Exon 7 nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall konnte die Herkunft der beiden veränderten Allele durch Untersuchung der Familienangehörigen geklärt werden: Die Deletion stammt nachweislich von der Mutter des Patienten, der Vater ist Überträger der Punktmutation und hat diese auch dem Geschwisterkind vererbt (s. Abb. 9).

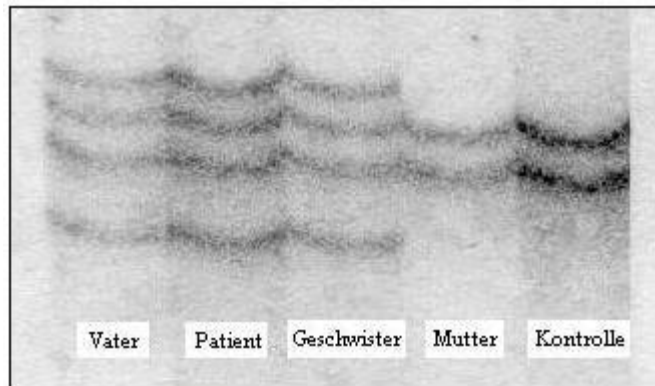


Abbildung 9: SSCP-Analyse der Familie von Patient 7567 in Exon 7. Vater und Geschwisterkind tragen dieselbe Punktmutation wie der Patient, die Mutter ist unauffällig. Rechts im Bild eine unauffällige Kontrolle.

5. Patientin 7418:

In diesem Fall zeigte sich eine homozygote Punktmutation in Exon 5 in beiden Allelen. Die Untersuchung der phänotypisch gesunden Eltern dieser Patientin ergab ein heterozygotes Vorliegen der Mutation bei beiden Elternteilen (s. Abb.10; Abb. 11 zeigt eine unauffällige Kontrolle).

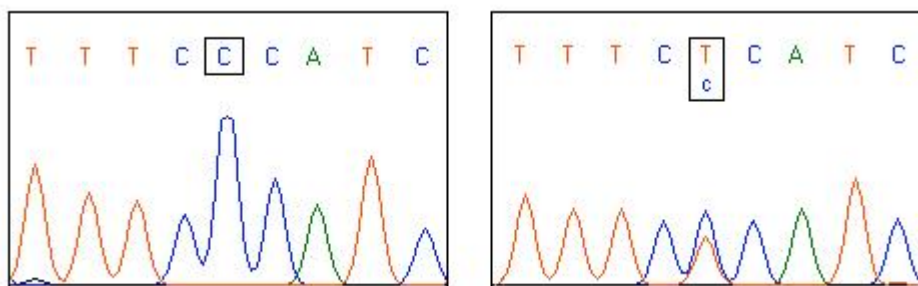


Abbildung 10: Die für die Punktmutation homozygote Patientin 7418 (linkes Bild) zeigt an Pos. 1082 ein reines C-Signal. Die Eltern (rechtes Bild) sind heterozygot für die Veränderung und zeigen die Überlagerung eines C- und T-Signals.

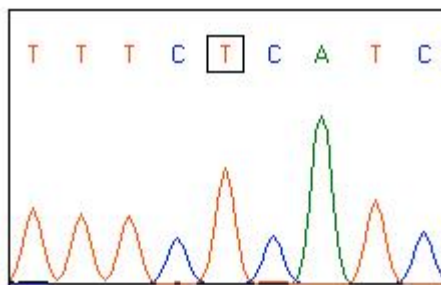


Abbildung 11: Eine unauffällige Kontrolle zeigt an entsprechender Stelle ein reines T-Signal.

Bei sechs anderen Patientenproben (7665, 7563, 7431, 7541, 7593, 7658; s. Tabelle 5) konnte nur jeweils eine – also heterozygote – Mutation in einem der sieben Exons festgestellt werden.

3.3.2 Polymorphismen

Der Ausdruck Polymorphismus bezieht sich hier im engeren Sinne auf DNA-Veränderungen ohne Relevanz für die Aminosäuresequenz des Genprodukts und im weiteren Sinne auf alle Sequenzvariationen, die in keinem Zusammenhang mit der Krankheitsauslösung stehen („non-disease-causing change“ (Dunnen und Antonarakis, 2001)). Diese etwas weiter gefasste Definition schließt auch solche Veränderungen ein, die zwar zu einer Abweichung in der Aminosäuresequenz führen, aber keinerlei Krankheitswert besitzen. Ein weiteres Kriterium, das ein Polymorphismus erfüllen muß, ist eine Allelfrequenz von mindestens 1 % in einer Population (Buselmaier und Tariverdian, 1999).

Im untersuchten Patientenkollektiv fanden sich zwei derartige Polymorphismen (s. Tab. 6):

Der erste befindet sich in Exon 4 und betrifft die Proben 7433, 7476, 7499 und 7630. An Position 987 der cDNA ist bei diesen Proben Guanin durch Adenin ersetzt worden (c.987G>A), was jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins hat, da sowohl das Triplet ACG als auch das Triplet ACA für die Aminosäure Threonin kodieren (T329T).

Der zweite Polymorphismus befindet sich in Exon 5 und betrifft 15 der 176 untersuchten DNA-Proben (7424, 7431, 7433, 7448, 7451, 7471, 7476, 7499, 7511, 7529, 7541, 7563, 7567, 7577, 7593).

Es handelt sich hierbei um einen Basenaustausch von Cytosin gegen Guanin an Position 1122 (c.1122C>G), der auch zu einem Aminosäureaustausch führt: Während das ursprüngliche Triplet TTT für die Aminosäure Phenylalanin kodiert, wird das neuentstandene Triplet TTG in die Aminosäure Leucin translatiert (F374L).

Exon	Veränderung	DNA
4	c.987G>A (T329T)	7433, 7476, 7499, 7630
5	c.1122C>G (F374L)	7424, 7431, 7433, 7448, 7451, 7471, 7476, 7499, 7511, 7529, 7541, 7563, 7567, 7577, 7593

Tabelle 6: Übersicht über gefundene Polymorphismen

3.3.3 Veränderungen im Intronbereich

Die in Tabelle 7 zusammengefaßten Veränderungen wurden bei der SSCP-Analyse nur aus dem Grund detektiert, daß einer der für Exon 3 verwendeten Primer (AIM3-F2/R2) in einem etwas größeren Abstand zum Exon ins angrenzende Intron hineingelegt worden war.

Bei den Proben 7424, 7433, 7476 und 7499 fand sich im zwischen Exon 3 und 4 befindlichen Intron (Nummer des Introns = IVS-Nr. = 3) 60 bp hinter dem Ende von Exon 3 eine Insertion der drei Basenpaare TGT (g.IVS3+60_+61insTGT). Da vor der Insertionsstelle im Normalfall eben dieses Triplet TGT viermal hintereinander auftritt, kann wahrscheinlich von einer Duplikation ausgegangen werden.

Probe 7558, 7632 und 7633 dagegen wiesen – ebenfalls in Intron 3 – einen Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin auf, und zwar im Abstand von 46 Basenpaaren zu Exon 3 (g.IVS3+46C>T).

Intron	Veränderung	DNA
3	g.IVS3+60_+61insTGT	7424, 7433, 7476, 7499
3	g.IVS3+46C>T	7558, 7632, 7633

Tabelle 7: Veränderungen im Intronbereich

4 Diskussion

4.1 OCA4-Patienten: Mutationen und klinische Befunde

Bei der molekulargenetischen Untersuchung des Kollektivs von 176 Albinismuspatienten konnten bei 4 Personen jeweils zwei unterschiedliche Mutationen im MATP-Gen nachgewiesen werden (Proben 7560, 7577, 7451, 7567). Sind die beiden Veränderungen auf unterschiedlichen Allelen lokalisiert, liegt eine sog. Compound-Heterozygotie vor. Der Beweis für eine Mutationslokalisierung auf separaten Allelen kann durch den Nachweis je eines der zwei veränderten Allele bei beiden Elternteilen erfolgen. Diese zusätzliche molekulargenetische Untersuchung der Eltern wurde im Rahmen dieser Arbeit – sofern DNA-Proben verfügbar waren – stets vorgenommen (s. Kapitel 3.3.1). Bei Vorliegen einer Compound-Heterozygotie können die Betroffenen als OCA4-Patienten angesehen werden.

Eine weitere Patientin (Probe 7418) zeigte im Unterschied zu den vier anderen Patienten auf beiden Allelen eine identische Mutation, war also homozygot für die entsprechende Veränderung.

Die Veränderungen im OCA4-Gen sind bei diesen fünf Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ursache ihrer Erkrankung anzusehen, so daß in diesen Fällen also von einem Okulokutanen Albinismus Typ 4 ausgegangen werden kann.

Genmutationen haben oft Auswirkungen auf Struktur und Funktion des Genprodukts, die abhängig von der Art der Veränderung mehr oder weniger schwerwiegend sein können. Eine Missense-Mutation, die zum Austausch nur einer einzigen Aminosäure im Protein führt, kann tiefgreifende Folgen haben, wenn sich die neue Aminosäure von der ursprünglichen im Aufbau ihrer Seitenkette unterscheidet. Die Seitenkette einer Aminosäure bestimmt nämlich deren chemisches Verhalten und hat daher auch maßgeblichen Einfluß auf das Protein, dessen Tertiärstruktur letztlich vor allem auf der spezifischen Interaktion der Aminosäureseitenketten beruht. So kann ein Aminosäureaustausch beispielsweise eine komplette Neuorientierung der Proteinabschnitte zueinander zur Folge haben. Im konkreten Fall des MATP-Proteins könnten Lage und Ausrichtung der 12 Transmembrandomänen durch eine solche Mutation völlig verändert

werden. Deletionen oder Insertionen, die häufig das komplette Leseraster eines Gens verändern, haben meist noch gravierendere Strukturveränderungen zur Folge als Punktmutationen.

Im Falle der bei dieser Arbeit ermittelten OCA4-Patienten liegen sehr unterschiedliche Veränderungen auf DNA-Ebene vor, die für das Genprodukt, also das MATP-Protein, auch verschiedene Konsequenzen bedeuten dürften.

1. Patientin 7560:

In der DNA dieser Patientin konnten zwei vom Mutationstyp sehr unterschiedliche Veränderungen nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation auf dem einen Allel und eine Insertion auf dem anderen.

Die Punktmutation c.172C>G bewirkt im Protein an Position 58 den Austausch der Aminosäure Prolin gegen Alanin (P58A), wovon die Transmembrandomäne 1 des MATP-Proteins betroffen ist. Wie bereits erwähnt, können durch eine derartige Veränderung aber auch alle der Aminosäuresubstitution in Richtung C-Terminus folgenden Proteinabschnitte in Mitleidenschaft gezogen werden.

Prolin ist die einzige proteinogene Aminosäure, die eine alicyclische unpolare Seitenkette besitzt. Unter einer alicyclischen Verbindung versteht man eine nichtaromatische Ringstruktur innerhalb eines organischen Moleküls (s. Lehrbücher der organischen Chemie). Alanin dagegen ist zwar ebenfalls unpolar, trägt aber eine unverzweigte aliphatische, d. h. offene Seitenkette, die nur aus einer Methylgruppe besteht. Zwischen den beiden Aminosäuren besteht also bezüglich ihrer chemischen Struktur ein deutlicher Unterschied, der für das Protein vermutlich nicht folgenlos bleibt.

Das zweite Allel dieser Patientin weist die Insertion eines 25 bp großen und wahrscheinlich duplizierten (s. Kap. 3.3.1) DNA-Fragments zwischen Position 1202 und 1203 auf (c.1202_1203ins ACTACATTGGATTAAAGGGTCTTTA), was direkt am Beginn des Einschubs an Position 1201-1203 zur Entstehung eines Stopcodons (TAA) führt. Die Translation bricht durch diese Mutation bereits im ersten Drittel von Exon 6 ab, das entstehende Protein enthält statt 530 nur 400 Aminosäuren. Daraus resultiert das völlige Fehlen der Transmembrandomänen 9-12 im Protein, was aufgrund der Schwere der Veränderung zu einem Funktionsverlust des Genprodukts führen könnte.

Die Familienanamnese für Okulokutanen Albinismus ist negativ.

Klinik³:

Die 4-jährige Patientin zeigt eine generalisierte Hypopigmentierung. Die Haut ist weiß, es ist jedoch in den ersten Lebensjahren eine mäßige Nachpigmentierung aufgetreten. Die Haare sind silbrigweiß, eine Tendenz zur Veränderung ist bisher nicht feststellbar. Eine eventuelle weitere Entwicklung bleibt aufgrund des geringen Lebensalters abzuwarten. Die Farbe der Iriden ist hellblau mit Grauanteilen, es besteht eine hochgradige Durchleuchtbarkeit sowie eine erhöhte Blendungsempfindlichkeit.

Weiterhin liegt eine hochgradige Hypopigmentation von Fundus und Makula vor, die Papillae nervi optici präsentieren sich dysplastisch. Bei einem beidseits stark reduzierten Visus von 0,1 besteht ein Nystagmus. Ein Strabismus ist nicht nachweisbar.

2. Patientin 7577:

Diese Patientin weist auf beiden Allelen unterschiedliche Deletionen auf.

Der Verlust des Triplets TTC an Pos. 661-663 der DNA (c.661_663delTTC) verändert zwar das Leseraster nicht, führt aber zur Deletion der aromatischen Aminosäure Phenylalanin an Position 221 im Genprodukt (F221del), die sich in der Transmembrandomäne 6 des Proteins befindet.

Die zweite Deletion betrifft nur ein einzelnes cytosintragendes Nucleotid (c.986delC), hat jedoch schwerwiegende Folgen, da sich das Leseraster durch diese Mutation verschiebt. Die Aminosäuresequenz des Genprodukts ist nur bis zur Aminosäure Nr. 328 (Tryptophan) in Transmembrandomäne 7 korrekt, alle in Richtung C-Terminus folgenden Abschnitte sind komplett verändert. Weiterhin kommt es zur Entstehung eines neuen Stopcodons (TAA) in Exon 6, wodurch die Translation nach der Verknüpfung von nur 396 Aminosäuren endet.

Es sind keine weiteren Fälle von Albinismus in dieser Familie bekannt.

Klinik:

Die Haut der Patientin (Alter: 10 Jahre) ist weiß, es ist keinerlei Nachpigmentierung aufgetreten. Auch die Haare sind silbrigweiß ohne Tendenz zur Veränderung. Die Iriden sind hellblau

³ Die klinischen Befunde wurden von Frau PD Dr. Käsmann-Kellner aus der Augenklinik der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

mit gering- bis mittelgradiger Durchleuchtbarkeit. Eine erhöhte Blendungsempfindlichkeit ist ebenfalls nachweisbar.

Es konnte eine hochgradige Hypopigmentation von Fundus und Makula festgestellt werden. Die Sehnervenpapillen werden als hell und klein beschrieben. Der Visus beträgt beidseits 0,1. Ein Nystagmus sowie ein Strabismus convergens sind vorhanden.

3. Patient 7451:

In diesem Fall liegen zwei unterschiedliche Punktmutationen vor.

Auf einem der beiden Allele bewirkt die Punktmutation c.950A>C im MATP-Protein an Position 317 einen Ersatz der Aminosäure Tyrosin durch Cystein (Y317C). Während Tyrosin eine aromatische Benzolringstruktur in seiner Seitenkette aufweist, ist die polare Seitenkette des Cysteins aliphatisch, unverzweigt und schwefelhaltig, unterscheidet sich also erheblich von der ersteren. Die Mutation ist in keiner Transmembrandomäne lokalisiert, sondern befindet sich im intrazellulären Proteinanteil zwischen Domäne 6 und 7.

Das zweite Allel trägt die Punktmutation c.1429G>A, die auf Proteinebene an Position 477 in Transmembrandomäne 11 zum Austausch der Aminosäure Alanin gegen Threonin führt (A477T). Alanin mit seinem Methylrest ist ein eher einfach gebautes Molekül mit unpolarer und unverzweigter aliphatischer Seitenkette, Threonin dagegen ist ebenfalls unverzweigt, besitzt aber schon ein zweigliedriges Kohlenstoffgerüst als Seitenkette und trägt eine polare Hydroxylgruppe. Derartige Gruppen spielen eine wichtige Rolle für die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücken, die unter anderem der Stabilisierung der Tertiärstruktur eines Proteins dienen. Die Einführung einer solchen zusätzlichen OH-Gruppe könnte also durch alternative Brückenbindungen die Faltung des Proteins verändern.

Die Familienanamnese bezüglich Albinismus ist auch in diesem Fall negativ.

Klinik:

Der 9 Jahre alte Patient besitzt eine zwar immer noch helle Hautfarbe, es ist aber zu einer eindeutigen Nachpigmentierung gekommen. Die Haare des Patienten sind ebenfalls deutlich nachgedunkelt und werden aktuell als dunkelblond beschrieben. Die Irisfarbe ist tiefblau, es liegt eine mittel- bis hochgradige Durchleuchtbarkeit vor, die Blendungsempfindlichkeit ist erhöht.

Makula und Fundus sind von einer mittel- bis hochgradigen Hypopigmentation betroffen, die Papille ist morphologisch hell und klein. Der Visus ist mit 0,4 (rechts) und 0,65 (links) erstaunlich gut. Der Patient weist einen Nystagmus sowie einen Strabismus convergens auf.

4. Patient 7567:

Auf einem Allel liegt die Deletion einer DNA-Base vor (986delC). Die identische Mutation ist bereits bei Patientin 7577 beschrieben worden (s. o.).

Das andere Allel zeigt eine Punktmutation (c.1429G>A), die zum Ersatz von Alanin durch Valin an Position 486 der Aminosäurekette entsprechend der Transmembrandomäne 11 führt (A486V). Beide Aminosäuren sind unpolar, aliphatisch und sich somit recht ähnlich, weisen aber trotz aller Parallelen einen bedeutsamen Unterschied auf: Während Alanin mit seiner Methylgruppe unverzweigt ist, besitzt Valin eine verzweigte Seitenkette und dadurch auch veränderte chemische Eigenschaften.

In der Familie sind keine anderen Fälle von Albinismus bekannt.

Klinik:

Der 8-jährige Patient zeigt eine bleibend weiße Haut. Die Haare sind schlohweiß und zeigen ebenfalls keinerlei Hinweis auf eine Nachpigmentierung. Die Iriden sind hellblau und von hochgradiger Durchleuchtbarkeit. Eine erhöhte Blendungsempfindlichkeit liegt vor.

Fundus und Makula sind mittel- bis hochgradig hypopigmentiert, die Papille wird als dysplastisch beschrieben. Der Visus ist beidseits mit 0,1 sehr niedrig, ein Nystagmus ist nachweisbar. Weiterhin liegt ein Strabismus divergens vor.

5. Patientin 7418:

Im Unterschied zu allen anderen Patienten zeigte sich in diesem Fall eine identische, also homozygote Punktmutation auf beiden Allelen (c.[1082T>C]+[1082T>C]), die im Genprodukt an Position 361 einen Austausch der Aminosäure Leucin gegen Prolin zur Folge hat. Leucin besitzt eine unpolare, verzweigte aliphatische Seitenkette, Prolin dagegen ist mit seiner Ringstruktur in der Seitenkette eine sog. alicyclische Verbindung. Die Mutation ist nicht im Bereich einer

Transmembrandomäne lokalisiert, sondern befindet sich in der extrazellulären Proteinschleife zwischen den Domänen 7 und 8.

Das heterozygote Vorliegen dieser Punktmutation bei beiden Elternteilen könnte möglicherweise auf ein entferntes Verwandtschaftsverhältnis zwischen ihnen hindeuten.

In diesem Fall liegt eine positive Familienanamnese für Okulokutanen Albinismus vor, da eine ebenfalls betroffene Schwester der Patientin bekannt ist.

Klinik:

Die 41-jährige Patientin besitzt eine weiße Haut, eine generelle Nachpigmentierung ist nicht aufgetreten. Allerdings sind einige lokalisierte Pigmentnävi nachweisbar. Dagegen ist es zu einer mäßigen Nachpigmentierung der Haare gekommen, die als weiß mit einem Gelbstich beschrieben werden. Die Irisfarbe ist hellblau mit einem Grauanteil, es besteht eine mittel- bis hochgradige Durchleuchtbarkeit mit einer erhöhten Blendungsempfindlichkeit.

Die Hypopigmentation von Makula und Fundus ist ebenfalls mittel- bis hochgradig, die Sehnervenpapillen sind dysplastisch. Der Visus beträgt beidseitig 0,1 und ist damit sehr niedrig. Auch bei dieser Patientin liegt ein Nystagmus vor, ein Strabismus divergens ist ebenfalls nachweisbar.

Zusammenfassende Beurteilung:

Unter 176 Patienten mit Okulokutanem Albinismus unbekannter Genese konnten also bei insgesamt fünf Personen jeweils zwei Mutationen im OCA4-Gen nachgewiesen werden, die mit sehr großer Wahrscheinlichkeit die Krankheitsursache darstellen. Das entspricht einem Anteil von 2,84 % OCA4-Patienten an der Gesamtheit der in diesem Zusammenhang untersuchten Personen.

Newton et al. dagegen hatten 2001 bei der Untersuchung eines Kollektivs von 102 Albinismuspatienten lediglich einen einzigen Fall von OCA4 aufdecken können. Das entspricht einem Anteil von 0,98 % und hatte zu der Annahme geführt, daß etwa jeder hundertste Fall von Okulokutanem Albinismus auf Mutationen im OCA4-Gen zurückzuführen sei und diese Albinismusform – bezogen auf ihre Häufigkeit – nur eine sehr untergeordnete Bedeutung besitzen könne.

Sicherlich ist die Relevanz von OCA4 verglichen mit sehr häufigen Formen wie OCA1 oder OCA2 gering, aber mit einem in dieser Untersuchung ermittelten Anteil von fast 3 % offenbar doch erheblich größer als bisher angenommen. Das Ergebnis der von Newton et al. vorgenommenen Untersuchung ist auch insofern überraschend klein ausgefallen, als das Patientengut teilweise vorselektiert war: Bei 31 der 102 Patienten waren Mutationen im Tyrosinase-Gen bereits ausgeschlossen worden, und 13 Personen litten nachweislich auch nicht an OCA2. Man hätte also rein statistisch mit einer größeren Zahl von OCA4-Patienten in dem Kollektiv rechnen können. Eine mögliche Ursache hierfür könnte allerdings in der mit 102 Personen relativ geringen Kollektivgröße liegen und somit zufallsbedingt sein. Zuverlässige Aussagen über die Häufigkeit einer bestimmten Erkrankung lassen sich bekanntlich nur auf der Grundlage einer sehr großen Zahl untersuchter Patienten treffen, da solche zufälligen Schwankungen erst mit zunehmender Kollektivgröße verringert werden.

Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß der Okulokutane Albinismus Typ 4 in der deutschen Bevölkerung häufiger auftritt als in dem von Newton untersuchten Patientenkollektiv: Die Verteilung von Mutationen kann in verschiedenen Populationen unter Umständen stark voneinander abweichen.

Vergleicht man die Art der Mutationen der oben beschriebenen OCA4-Patienten mit der von Newton et al. entdeckten Mutation, so zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede. Der damals beschriebene Patient war homozygot für einen Austausch von Guanin gegen Adenin in der intronischen Spleiß-Akzeptor-Stelle von Exon 2, von den hier beschriebenen Patienten dagegen weist keiner eine derartige Veränderung auf, alle Mutationen sind innerhalb der Exons lokalisiert. Weiterhin scheinen homozygote Mutationen im allgemeinen eher die Ausnahme als die Regel darzustellen: Nur einer der hier entdeckten Patienten trägt auf beiden Allelen die gleiche Veränderung, das Verhältnis von homozygoten zu compound-heterozygoten Personen beträgt somit 1 : 4.

4.2 Phänotyp der OCA4-Patienten

Außer Patient 7451 zeigen alle Betroffenen eine schwere generalisierte Hypopigmentierung und gravierende Beeinträchtigungen des Sehvermögens: Die Patienten 7418, 7567, 7577 und 7560 weisen einen Visus von nur 0,1 auf. Innerhalb dieser Gruppe am schwersten betroffen sind die Patienten 7567 und 7577, die keinerlei Nachpigmentierung von Haut oder Haaren zeigen. Bei Patientin 7560 dagegen ist es bisher zu einer Nachpigmentierung der Haut gekommen, und Patientin 7418 weist sowohl Veränderungen der Haut (Entwicklung von Nävi) als auch der Haare (Gelbstich) auf.

Während diese vier Patienten insgesamt einen sehr ähnlichen Phänotyp präsentieren, bietet sich bei Patient 7451 ein ganz anderes Bild: Es ist eine deutliche Nachpigmentierung der Haare und eine mäßige der Haut feststellbar, auffällig ist weiterhin der überraschend gute Visus von 0,4 (rechts) bzw. 0,65 (links). Der Schweregrad der Erkrankung ist also bei diesem Betroffenen weitaus geringer ausgeprägt als bei den übrigen OCA4-Patienten.

Bisher wurde angenommen, der OCA4-Phänotyp entspreche weitgehend dem der OCA2-Patienten. Diese Annahme stütze sich einerseits auf die Beschreibung eines türkischen OCA4-Patienten mit einem OCA2-ähnlichen Bild durch Newton et al. 2001, andererseits auf Erkenntnisse, die man aus dem Vergleich von uw/uw-Mausmutanten mit p/p-Mutanten gewonnen hatte: Mäuse mit Veränderungen im „underwhite“-Gen sind von solchen mit Mutationen im p-Gen phänotypisch nicht zu unterscheiden (Lehman et al., 2000).

Unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen OCA4-Patienten präsentiert sich besonders Patientin 7418 mit einem Phänotyp, der als geradezu pathognomonisch für OCA2 zu bezeichnen ist: Wie auch Personen mit Mutationen im P-Gen zeigt diese Patientin eine altersabhängige Zunahme der Pigmentierung im Sinne einer Entwicklung von Pigmentnävi und der Herausbildung eines gelblichen Farbtons der Haare. Beide Befunde gelten als besonders typisch für OCA2-Patienten (s. Kapitel 1.3.2).

Auch Patientin 7560 zeigt bereits eine geringfügige Nachpigmentierung der Haut, aufgrund ihres geringen Lebensalters sind jedoch weitere Modifikationen des phänotypischen Bildes durchaus möglich.

Das Erscheinungsbild der Patienten 7567 und 7577 erinnert in der Schwere der Depigmentierung eher an den Phänotyp des Tyrosinase-negativen Okulokutanen Albinismus 1A als an OCA2.

Das Erscheinungsbild von Patient 7451 läßt sich ebenfalls schlecht mit dem klinischen Bild von OCA2-Betroffenen vereinbaren: Es fehlt der typischerweise gelbliche Aspekt der Kopfhaare, und die Nachpigmentierung der Haut präsentiert sich – anders als bei OCA2-Patienten üblich – nicht in Form von Pigmentnävi. Dabei muß natürlich berücksichtigt werden, daß längst nicht alle OCA2-Patienten auch einen OCA2-typischen Phänotyp aufweisen, es sind erhebliche interindividuelle Schwankungen möglich.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß OCA4-Patienten zwar offenbar ein OCA2-ähnliches Erscheinungsbild aufweisen können, dieser Fall jedoch keinesfalls die Regel darstellt. Besonders das Beispiel von Patient 7451 zeigt auf sehr eindrückliche Weise, daß eine erhebliche Variationsbreite bezüglich des Phänotyps vorhanden ist. Offenbar können verschiedene Mutationen im MATP-Gen unterschiedlich schwerwiegende Störungen des Proteins zur Folge haben und auf dieser Grundlage auch verschiedene Symptomausprägungen bewirken.

Es zeichnet sich die Tendenz ab, daß Mutationen mit Leserasterveränderung oft eine hochgradige Hypopigmentierung nach sich ziehen, wie es beispielsweise bei Patient 7567 (eine Deletion mit Leserasteränderung auf einem Allel, eine Punktmutation auf dem anderen) und bei Patientin 7577 (zwei verschiedene Deletionen auf beiden Allelen, von denen eine das Leseraster verändert) der Fall ist.

Ähnliches gilt auch für Patientin 7560, die eine Insertion mit der Folge eines Kettenabbruchs und eine Punktmutation aufweist, allerdings – im Gegensatz zu den beiden eben genannten Personen – eine geringfügige Nachpigmentierung zeigt.

Punktmutationen dagegen, die bekanntlich zum Austausch nur einer Aminosäure führen, könnten eventuell eher zu leichteren Verläufen mit stärkerer Pigmentierung wie bei Patient 7451 prädisponieren.

Patientin 7418 weist zwar ebenfalls eine Punktmutation – allerdings in homozygoter Form – auf, ist aber erheblich schwerer betroffen als Patient 7451. Das deutet darauf hin, daß auch die Auswirkungen verschiedener Punktmutationen erheblich variieren können, Verallgemeinerungen also offenbar nicht möglich sind.

4.3 Patienten mit nur einer Mutation im OCA4-Gen

Zusätzlich zu den fünf oben beschriebenen OCA4-Patienten fanden sich bei den Sequenzanalysen sechs weitere Personen, die Mutationen nur eines ihrer beiden Allele aufwiesen. Diese Personen sind somit heterozygote Träger einer Mutation im M ATP-Gen, was jedoch keine hinreichende Erklärung für ihre Erkrankung darstellt: Von einem okulokutanen Albinismus Typ 4 kann nur dann ausgegangen werden, wenn beide Allele verändert sind. In diesen sechs Fällen fand sich jedoch kein Hinweis auf eine zweite Mutation im OCA4-Gen.

1. Patient 7665:

Bei diesem Albinismuspatienten konnte in der DNA die Punktmutation c.606G>C festgestellt werden. Sie zieht den Austausch der aromatischen Aminosäure Tryptophan an Position 202 der Aminosäurekette des M ATP-Proteins durch Cystein nach sich (W202C). Cystein besitzt zwar ebenfalls eine ungeladene Seitenkette, die jedoch im Unterschied zu der des Tryptophans schwefelhaltig und polar ist. Beide Aminosäuren unterscheiden sich also deutlich in ihrem chemischen Aufbau. Diese Mutation ist im Bereich der Transmembrandomäne 5 des Proteins lokalisiert.

2. Patient 7563:

Auch bei dieser Person konnte eine Punktmutation festgestellt werden (c.814G>A), die in diesem Fall auf Proteinebene an Position 272 zum Ersatz der Aminosäure Glutamat durch Lysin führt (E272K). Die Veränderung befindet sich in einer intrazellulären Proteinschleife zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7.

Glutamat enthält mit seinem Carboxylrest eine Säuregruppe in der Seitenkette, die bei physiologischem pH in deprotoniertem Zustand, also in Form eines Anions vorliegt. Im Unterschied dazu trägt Lysin eine Aminogruppe, die unter physiologischen Bedingungen protoniert wird und dann als Kation vorliegt. Durch diese Mutation wird also eine negativ geladene Aminosäure

durch eine positiv geladene ersetzt, wodurch natürlich auch im Protein die Ladungsverhältnisse verändert werden.

In einem aktuellen japanischen Forschungsbericht (Nakayama et al., 2002) wird diese Veränderung als Polymorphismus klassifiziert. Im Rahmen des hier untersuchten deutschen Patientenkollektivs wird allerdings das für einen Polymorphismus geforderte Kriterium der Häufigkeit nicht erfüllt, demzufolge die Allelfrequenz größer als 1 % sein muß. Nur bei einem einzigen Individuum konnte die Veränderung in heterozygoter Form nachgewiesen werden, was einer Allelfrequenz von 0,284 % entspricht.

3. Patient 7431

4. Patient 7541

5. Patient 7593

Diese drei Personen weisen die Deletion eines DNA-Nucleotids (c.986delC) auf, die schon bei zweien der OCA4-Patienten beschrieben wurde (s. Kap. 4.1) und die zu einer Leserasterveränderung führt.

Insgesamt sind von dieser Mutation mit 5 von 176 Personen knapp 3 % der untersuchten Albinismuspatienten betroffen, es handelt sich also um eine verhältnismäßig häufige Mutation des OCA4-Gens.

Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes, das ein stabiles Verhältnis der Allelhäufigkeiten innerhalb einer Population postuliert (Strachan und Read, 1996), kann die theoretische Verteilung der verschiedenen Allelkombinationen berechnet und mit der tatsächlichen verglichen werden.

Es gilt:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p = Häufigkeit des Wildtypallels (wt)

q = Häufigkeit des veränderten Allels (mut)

Gesamtzahl der Proben = 176

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 171

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 5

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

1. Berechnung der Allelhäufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $176 \cdot 2 = 352$

$$p(wt) = (171 \cdot 2 + 5) \div 352 = 347 \div 352 = 0,986 = 98,6\%$$

$$q(mut) = 5 \div 352 = 0,0142 = 1,42\%$$

2. Berechnung der theoretischen Verteilung:

$$\text{theoretische Anzahl von wt/wt} = p^2 \cdot 176 = 0,986^2 \cdot 176 = 171$$

$$\text{theoretische Anzahl von wt/mut} = 2pq \cdot 176 = 2 \cdot 0,986 \cdot 0,0142 \cdot 176 = 4,93$$

$$\text{theoretische Anzahl von mut/mut} = q^2 \cdot 176 = 0,0142^2 \cdot 176 = 0,0355$$

3. Ergebnis:

Das theoretische Ergebnis stimmt mit dem tatsächlichen sehr gut überein.

Im untersuchten Patientenkollektiv konnte keine andere DNA-Veränderung bei mehr als einer Person nachgewiesen werden. Es stellt sich also die Frage, warum ausgerechnet eine Mutation mit derart tiefgreifenden Auswirkungen wie eine Deletion mit nachfolgender Leserasterverschiebung offenbar mit größerer Häufigkeit auftritt als eine beliebige andere Veränderung. Eine genauere Betrachtung der cDNA an der fraglichen Stelle zeigt keine repetitiven Sequenzen oder andere Auffälligkeiten, die eventuell zu einem Ablesefehler prädisponieren könnten. Möglicherweise stammen die untersuchten Proben aus einer Population, in der sich dieses Allel –

eventuell durch Eheschließungen unter verwandten Personen – in der Vergangenheit stärker verbreiten konnte, so daß dort heute eine größere Anzahl von Menschen dieses Allel tragen könnte, als es andernorts der Fall ist. Dieses Phänomen wird in der Genetik auch als Gründer(„founder“-)Effekt bezeichnet.

Mit Hilfe der geschilderten Überlegungen allein kann das gehäufte Auftreten dieser Mutation jedoch nicht befriedigend erklärt werden, so daß diese Frage wohl letztlich unbeantwortet bleiben muß.

6. Patient 7658:

Hier liegt am Ende von Exon 7 die Insertion eines 8 bp großen DNA-Fragments vor (1573_1574insTGCTCTCT), die eine interessante Auswirkung hat. Durch den Einschub des wahrscheinlich duplizierten DNA-Abschnitts (s. Kapitel 3.3.1) kommt es zu einer Änderung des Leserasters. Das ursprüngliche Stopcodon entfällt, stattdessen wird ein zusätzliches nicht kodierendes DNA-Stück translatiert, bis die Translation schließlich an einem neuen Stopcodon (TGA) abbricht. Das entstandene Protein enthält also nicht nur veränderte Aminosäuren, sondern ist mit insgesamt 539 Positionen auch um 9 Aminosäuren größer als das korrekte MATP-Protein. Welche Konsequenzen diese Veränderung auf die Funktion des Proteins haben könnte, liegt im Bereich der Spekulation.

4.4 Heterozygote Patienten: Erklärungsansätze

Wie bereits eingangs erwähnt, ist das Krankheitsbild des Okulokutanen Albinismus bei diesen sechs Personen durch ihre heterozygoten Mutationen im OCA4-Gen allein nicht erklärbar.

Möglicherweise hat die Erkrankung bei diesen Patienten eine andere Ursache, denkbar wäre beispielsweise eine Mutation beider Allele in einem anderen mit Albinismus assoziierten Gen, so daß diese Patienten in Wirklichkeit vielleicht an OCA1, 2, 3 oder an einer bisher noch nicht beschriebenen Albinismusform leiden könnten. Zur Zeit wird das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv im Rahmen anderer Dissertationen auf Veränderungen im Tyrosinase-, P- und TYRP-Gen überprüft, so daß nach Abschluß dieser weiteren Untersuchungen differenzierte

Erkenntnisse zur Krankheitsursache der meisten Patienten vorliegen dürften. Erst dann lassen sich Aussagen darüber treffen, an welcher Form des Okulokutanen Albinismus die oben beschriebenen sechs Personen leiden.

Sollte sich der Verdacht auf das Vorliegen einer anderen Albinismusform bestätigen, drängt sich allerdings die Frage auf, warum immerhin 3,51 % (6 von 171) der nicht an OCA4 erkrankten Personen dennoch eine Mutation im MATP-Gen aufweisen. Dieser Anteil erscheint relativ groß, aber ohne die Untersuchung eines gesunden Kontrollpersonenkollektivs sind im Augenblick keine Aussagen darüber möglich, ob diese Zahl der Frequenz von OCA4-Mutationen in der Normalbevölkerung entspricht oder ob sie im Vergleich dazu erhöht ist. Zur Klärung dieser Frage wäre es sinnvoll, eine ausreichend große Zahl nicht an Albinismus leidender Personen auf OCA4-Mutationen zu untersuchen.

Es wäre natürlich auch denkbar, daß sich in keinem der anderen Gene Mutationen beider Allele nachweisen lassen und die Albinismusursache weiterhin unklar bleibt. In diesem Fall könnten verschiedene Erklärungsansätze herangezogen werden:

- **Unvollständige Mutationsdetektion**

Möglicherweise ist in einem der untersuchten Gene eine Mutation des zweiten Allels übersehen worden. Die SSCP-Methode, die zur Mutationsdetektion benutzt wird, ist zwar sehr zuverlässig, eine Detektionsquote von 100 % kann aber nur durch die Anwendung eines ganzen Spektrums verschiedener Elektrophoresebedingungen erreicht werden (Sambrook und Russell, 2001): Der Erfolg der Methode ist von zahlreichen Faktoren wie beispielsweise der Gelzusammensetzung und der Beschaffenheit des untersuchten DNA-Fragments in kaum vorhersehbarer Weise abhängig. In der Praxis erweist sich eine vielfältige Variation der Elektrophoresebedingungen aufgrund des enormen Aufwandes in der Regel als kaum durchführbar, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit ein gewisser Anteil der DNA-Veränderungen bei der Gelelektrophorese überhaupt nicht in Erscheinung tritt.

Weiterhin gibt es Mutationen, die trotz optimierter Bedingungen mit Hilfe der SSCP-Technik nicht detektiert werden können: Die Deletion eines ganzen Exons oder sogar des kompletten Gens würde unentdeckt bleiben, da sich das unveränderte zweite Allel mit unauffälligem Bandenmuster auf dem Acrylamidgel abbildet.

- **Mutationen in nicht untersuchten Genabschnitten**

Es ist zu berücksichtigen, daß bei der hier durchgeführten Mutationssuche sowie bei anderen vergleichbaren Arbeiten stets nur die codierenden Abschnitte eines Gens, also die Exons, untersucht werden. Es wäre allerdings durchaus möglich, daß auch die unbeachteten intronischen Bereiche relevante Mutationen enthalten, die etwa zur Veränderung von Promotorregion oder Spleißstellen führen könnten (Oetting und King, 1999). Das Wissen über die Bedeutung der Introns eines Gens für seine Transkription ist bisher nur sehr lückenhaft. Auch andere Bereiche als die Promotoren und Spleißorte könnten den Ablauf der Transkription auf noch unbekannte Weise beeinflussen und durch ihre Integrität den korrekten Ablauf dieser komplexen Vorgänge gewährleisten.

Veränderungen der Intronbereiche sind keineswegs selten, auch der von Newton beschriebene OCA4-Fall geht auf eine homozygote Mutation im Randbereich eines Introns zurück (Newton et al., 2001).

Einen weiteren Hinweis auf die Häufigkeit intronischer Mutationen lieferte auch die vorliegende Arbeit:

Zur Analyse der zweiten Hälfte von Exon 3 wurde ein Primer verwendet, dessen Bindungsstelle ungefähr 100 bp hinter dem Exonende im Intron lag (AIM3-R2-rev). Dadurch wurde ein kleiner Anteil des Introns Nr. 3 (IVS3) mituntersucht. Allein in diesem kurzen Abschnitt fanden sich zwei unterschiedliche Sequenzvariationen, von denen die eine (g.IVS3+60_+61insTGT) vier Proben betraf (7424, 7433, 7476, 7499), während die andere (g.IVS3+46C>T) bei immerhin drei Patienten (7558, 7632, 7633) nachgewiesen werden konnte. Es besteht also Grund zu der Annahme, daß solche Sequenzabweichungen im Intron weit verbreitet sind. Inwiefern diese Veränderungen eine Krankheitsrelevanz besitzen könnten, läßt sich mit dem heutigen Kenntnisstand jedoch nicht klären.

- **Zusammenwirken von Mutationen in verschiedenen Albinismus-assoziierten Genen**

Eine einzige heterozygote Mutation auf einem Allel führt bei einer autosomal-rezessiven Erkrankung im Normalfall nicht zum Krankheitsbild, der Träger ist phänotypisch gesund. Was geschieht aber, wenn gleichzeitig heterozygote Veränderungen in verschiedenen mit einer Krankheit assoziierten Genen auftreten? Es erscheint denkbar, daß sich die Auswirkungen der

einzelnen Mutationen addieren und auch auf diese Weise zu einem – möglicherweise weniger schwerwiegenden – Krankheitsbild führen könnten.

Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, daß bei einigen rezessiv vererbten Enzymdefekten auch im heterozygoten Zustand eine meßbare Reduktion der normalen Enzymaktivität vorhanden ist (Vogel, 1984). Im Normalfall wird ein solcher heterozygoter Gendefekt durch das normale Allel kompensiert, so daß der Betroffene gesund erscheint. Es sind allerdings auch Fälle bekannt, in denen heterozygote Mutationsträger phänotypisch subtile Krankheitsmerkmale aufweisen, wie zum Beispiel bei der gut untersuchten Phenylketonurie: Studien konnten dort bei heterozygoten Individuen im Vergleich zu nicht betroffenen Kontrollpersonen eine geringfügige Intelligenzminderung sowie Zeichen einer erhöhten zerebralen Irritabilität nachweisen (Vogel, 1984). Wenn aber eine heterozygote Genveränderung bereits gewisse Auswirkungen auf den Phänotyp besitzt, so erscheint es wahrscheinlich, daß mehrere heterozygote Veränderungen verschiedener Gene, die miteinander interagieren, sich addieren könnten.

Tatsächlich ergeben neue Untersuchungen zunehmend Hinweise darauf, daß viele erblich bedingte Krankheiten keineswegs immer konsequent dem klassischen monogenetischen, also „Mendelschen“ Vererbungsmodus folgen müssen. Zahlreiche Erbkrankheiten zeigen – ebenso wie der Okulokutane Albinismus – teils gravierende Unterschiede bezüglich ihrer phänotypischen Ausprägung, was auf die Einflußnahme anderer Faktoren als nur des einzelnen Gens hindeutet (Ming und Muenke, 2002). Gerade der Okulokutane Albinismus liefert ein eindrückliches Beispiel dafür, daß Mutationen unterschiedlicher Gene zu einem praktisch identischen Phänotyp führen können. Ming und Muenke sehen darin einen Hinweis auf eine funktionelle Interaktion der beteiligten Genprodukte und leiten daraus folgende These ab: Zwei Proteine, die entweder in demselben oder in miteinander verknüpften Stoffwechselwegen agieren, könnten im Falle eines Funktionsverlustes additive Effekte auf den Stoffwechseldefekt besitzen. In der Tat sind bereits etliche Erkrankungen bekannt, die nicht mono-, sondern digenisch vererbt werden. Darunter sind neben der erblich bedingten Taubheit und der Holoprosenzephalie auch das Waardenburg-Syndrom, das u. a. variable Ausprägungen von Hypopigmentierung einschließt, sowie einige Formen von okulärem Albinismus.

Auch eine Anfang der fünfziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts veröffentlichte Arbeit, in der die Beschreibung eines an Albinismus leidenden Elternpaares mit unauffällig pigmentierten Kindern erfolgte (Trevor-Roper, 1952), stellt nur bei oberflächlicher Betrachtung ein Argument gegen ein Vorliegen di- bzw. polygener Effekte dar. Die Erklärung für dieses seinerzeit erstaunliche Phänomen ist aus heutiger Sicht einfach: Beide Elternteile müssen an unterschiedlichen Formen des Okulokutanen Albinismus gelitten und ihren Kindern je eines ihrer beiden

Allele vererbt haben. Die Kinder müssen folglich in zwei verschiedenen Albinismus-assoziierten Genen jeweils ein mutiertes Allel getragen haben, konnten aber in keinem der Gene zwei defekte Allele aufweisen. Es lag also ein Fall von klassischer Komplementation vor: Durch Rekombination nicht-alleler Gene war es zum Ausgleich zweier Defektmutanten gekommen (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999). Auf den ersten Blick scheint diese Fallgeschichte einen Widerspruch zu der oben beschriebenen Theorie darzustellen: Im Falle ihrer uneingeschränkten Gültigkeit hätte man eine Hypopigmentierung der Kinder erwarten können, und zwar unabhängig von den unterschiedlichen OCA-Formen ihrer Eltern. Bei genauer Überlegung läßt sich dieses Argument jedoch in dieser Form nicht aufrechterhalten: Schließlich ist es heute nicht mehr möglich festzustellen, ob die Kinder tatsächlich vollkommen normal pigmentiert waren oder ob sie nur im Vergleich zu ihren Eltern eine stärkere Pigmentierung aufwiesen. Da sie auf zwei Genloci heterozygote Albinismusanlagen trugen, wäre eine reduzierte Pigmentierung verglichen mit dem Bevölkerungsdurchschnitt durchaus denkbar. Somit schließt dieser historische Fallbericht ein Zusammenwirken von Mutationen in verschiedenen Genen also keineswegs aus, zumal man auch den unterschiedlichen Schweregrad verschiedener Mutationen berücksichtigen muß. Es ist vorstellbar, daß eine Mutation, die selbst im homozygoten Zustand noch eine Restfunktion des Genprodukts erlaubt, im heterozygoten Zustand wahrscheinlich kaum oder überhaupt nicht ins Gewicht fallen wird. Eine Mutation dagegen, die im Falle einer Homozygotie zum vollständigen Funktionsverlust des Proteins führt, könnte auch bei heterozygotem Vorliegen eine relevante Beeinträchtigung seiner Funktion zur Folge haben.

Bisher ist noch wenig über das Zusammenspiel verschiedener Gene und Mutationen bekannt, doch es läßt sich bereits erahnen, daß die Vorstellung einer strikten Trennung von mono- und polygenischer Vererbung wohl nicht aufrechterhalten werden kann. Auch im Falle des Okulokutanen Albinismus sollte ein Zusammenspiel mehrerer Gene ernsthaft in Erwägung gezogen und gezielt untersucht werden.

4.5 Polymorphismen: Analyse der Ergebnisse

Bei der Untersuchung dieses Patientenkollektivs konnten zwei verschiedene Polymorphismen festgestellt werden.

4.5.1 Polymorphismus T329T

Im Falle des einen Polymorphismus handelt es sich um einen Austausch von Guanin gegen Adenin an Position 987 der cDNA (c.987G>A), der keine Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins zur Folge hat (T329T). Diese Veränderung konnte bei 4 von 176 untersuchten Patienten in heterozygoter Form nachgewiesen werden, was einem Anteil von 2,27 % entspricht.

Anwendung des Hardy-Weinberg-Gesetzes (s. Kap. 4.3):

Gesamtzahl der Proben = 176

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 172

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 4

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

1. Berechnung der Allelhäufigkeiten:

Gesamtzahl der Allele = $176 \cdot 2 = 352$

$p(wt) = (172 \cdot 2 + 4) \div 352 = 348 \div 352 = 0,989 = 98,9\%$

$q(mut) = 4 \div 352 = 0,0114 = 1,14\%$

2. Berechnung der theoretischen Verteilung:

$$\text{theoretische Anzahl von wt/wt} = p^2 \cdot 176 = 0,989^2 \cdot 176 = 172$$

$$\text{theoretische Anzahl von wt/mut} = 2pq \cdot 176 = 2 \cdot 0,989 \cdot 0,0114 \cdot 176 = 3,97$$

$$\text{theoretische Anzahl von mut/mut} = q^2 \cdot 176 = 0,0114^2 \cdot 176 = 0,0229$$

3. Ergebnis:

Das theoretische Ergebnis stimmt mit dem tatsächlichen sehr gut überein.

Dieser Polymorphismus war bereits in dem von Newton et al. (2001) untersuchten Patientenkollektiv ($n = 102$) beschrieben worden. Dort wurden 17 für diese Veränderung heterozygote Patienten gefunden sowie ein weiterer, der diesen Polymorphismus in homozygoter Ausprägung aufwies. Das bedeutet, daß in dem damaligen Kollektiv 17,6 % der Patienten (inklusive des homozygoten Individuums, das sogar zwei Polymorphismus-Allele besaß) Träger dieser Veränderung waren. Diese Zahl ist verglichen mit den in dieser Untersuchung ermittelten 2,27 % sehr hoch. Eine mögliche Erklärung für diese große Differenz könnte in regionalen Unterschieden bezüglich der Verbreitung dieses Polymorphismus bestehen. Newtons Patienten stammten aus diversen Populationen, das hier untersuchte Kollektiv setzte sich dagegen überwiegend aus Personen deutscher Herkunft zusammen. Es wäre denkbar, daß in diesen Bevölkerungsgruppen der untersuchte Polymorphismus weniger häufig auftritt als es in anderen Populationen der Fall ist.

4.5.2 Polymorphismus F374L

Bei dem zweiten Polymorphismus handelt es sich um einen Ersatz von Cytosin durch Guanin an Position 1122 der cDNA (c.1122C>G). Dadurch kommt es auf Proteinebene zum Austausch der Aminosäure Nr. 374 Phenylalanin gegen Leucin (F374L). Diese Veränderung konnte im heterozygoten Zustand bei insgesamt 15 der 176 Patienten nachgewiesen werden, das entspricht einem

Anteil von 8,52 %. Es fand sich kein für diesen Polymorphismus homozygotes Individuum im untersuchten Patientengut.

Anwendung des Hardy-Weinberg-Gesetzes:

Häufigkeit des Genotyps wt/wt = 161

Häufigkeit des Genotyps wt/mut = 15

Häufigkeit des Genotyps mut/mut = 0

1. Berechnung der Allelhäufigkeiten:

$$p(wt) = (161 \cdot 2 + 15) \div 352 = 337 \div 352 = 0,957 = 95,7$$

$$q(mut) = 15 \div 352 = 0,0426 = 4,26\%$$

2. Berechnung der theoretischen Verteilung:

$$\text{theoretische Anzahl von wt/wt} = p^2 \cdot 176 = 0,957^2 \cdot 176 = 161$$

$$\text{theoretische Anzahl von wt/mut} = 2pq \cdot 176 = 2 \cdot 0,957 \cdot 0,0426 \cdot 176 = 14,4$$

$$\text{theoretische Anzahl von mut/mut} = q^2 \cdot 176 = 0,0426^2 \cdot 176 = 0,319$$

3. Ergebnis:

Auch in diesem Fall zeigt sich ein sehr hohes Maß an Übereinstimmung zwischen theoretisch errechnetem Wert und tatsächlich vorliegendem Ergebnis. Auch die Frage, warum kein für diesen Polymorphismus homozygotes Individuum gefunden wurde, ist nun geklärt, denn bei dieser Kollektivgröße war rein statistisch gesehen auch keine Person mit diesem Genotyps zu erwarten.

Im Patientenkollektiv von Newton et al. stellte diese Veränderung den weitaus häufigsten Polymorphismus dar. Leider können die damaligen Ergebnisse nicht mit den hier erhobenen Daten verglichen werden, da Newton et al. widersprüchliche Angaben zur Kollektivgröße machten. Sie sprachen von 67 zum Teil homozygoten Personen mit diesem Polymorphismus, erwähnten aber, daß neben den untersuchten Albinismuspatienten auch etliche gesunde Kontrollpersonen in diese Zahl eingeflossen wären. Das analysierte Kollektiv muß in diesem Fall also größer gewesen sein als die Zahl der 102 Albinismuspatienten, so daß Aussagen über die tatsächliche Häufigkeit der Veränderung unter den an Albinismus leidenden Personen nicht möglich sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte der Basenaustausch c.1122C>G bzw. der Aminosäureaustausch F374L bei 8,52 % der untersuchten Personen nachgewiesen werden (s. o.), so daß diese Veränderung auch im hiesigen Patientenkollektiv den mit Abstand häufigsten Polymorphismus darstellt.

Dieser Polymorphismus ist bei Menschen verschiedener Hautfarbe sehr unterschiedlich verteilt: Während sich bei Kaukasiern an fraglicher Position überwiegend Leucin befindet (Allelfrequenz: 89 %), weisen Angehörige dunkel pigmentierter Populationen dort offenbar stets Phenylalanin auf (Nakayama et al., 2002). Allerdings beträgt auch bei der hellhäutigen japanischen Bevölkerung die Allelfrequenz für Phenylalanin 100 %, und eine Untersuchung bezüglich dieses Polymorphismus ist bisher nur an zwei dunkel pigmentierten Populationen durchgeführt worden (Einwohner Ghanas und Neu-Guineas).

Nakayama et al. halten es für möglich, daß der Polymorphismus F374L eine Rolle für die Ausprägung unterschiedlicher Pigmentierungsgrade bei Angehörigen verschiedener Populationen spielen könnte. Der Verlust von Phenylalanin an Position 374 der Aminosäurekette könnte – möglicherweise gemeinsam mit anderen Polymorphismen an diversen Genloci – die Hautfarbe determinieren und eine Ursache für die generalisierte Hypopigmentation bei Kaukasiern darstellen.

Inwieweit sich diese These mit der Realität vereinbaren läßt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.6 Mutationshäufigkeiten in verschiedenen Genabschnitten

Vergleicht man die Zahl der verschiedenen Mutationen, die in den einzelnen Exons nachgewiesen werden konnten, so zeigt sich, daß offenbar nicht in allen Genabschnitten mit gleicher Häufigkeit Veränderungen auftreten.

Abbildung 12 zeigt, daß sich 10 der insgesamt 11 verschiedenen Mutationen (Aufschlüsselung s. Tab. 8) in den letzten beiden Dritteln des MATP-Gens befinden, auf die sie relativ gleichmäßig verteilt sind (5 Mutationen im 2. Drittel, 5 im letzten Drittel), wohingegen nur eine einzige Mutation im ersten Gendrittel lokalisiert ist. Das bedeutet, daß über 90 % aller Mutationen in den hinteren beiden Dritteln liegen, während der vordere Abschnitt des Gens kaum betroffen ist.

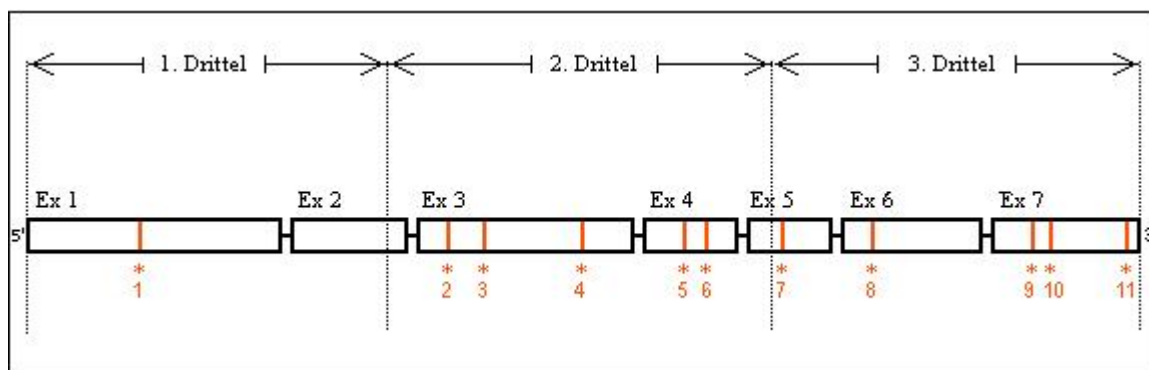


Abbildung 12: Lokalisation der Mutationen in den einzelnen Genabschnitten. Im Rahmen dieser Arbeit gefundene Mutationen sind mit roten Sternen gekennzeichnet und durchnummeriert. Die Aufschlüsselung befindet sich in Tabelle 7.

Rein statistisch gesehen müßten Neumutationen aber in allen Genabschnitten mit gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten, man hätte daher eine gleichmäßige Verteilung erwarten können. Man könnte die Vermutung aufstellen, das 5'-Ende des Proteins habe möglicherweise für dessen Funktion eine essentiellere Bedeutung als die hinteren Abschnitte, die an das 3'-Ende angrenzen. Veränderungen in diesem vorderen Bereich könnten sich fataler auf das betroffene Individuum auswirken und einen schwereren Krankheitsverlauf provozieren als Mutationen der anderen Abschnitte. Dadurch könnte eine Weitergabe des Erbguts eventuell erschwert werden. Wahrscheinlicher allerdings erscheint die Möglichkeit, daß Mutationen im vorderen Abschnitt des Gens einen besonders milden Phänotyp zur Folge haben könnten, Betroffene also überhaupt nicht als Albinismuspatienten identifizierbar wären. Um derart spezielle Fragen beantworten zu

können, müßte allerdings zunächst die genaue Funktion des MATP-Proteins geklärt werden. Augenblicklich sind obige Überlegungen noch als rein spekulativ zu betrachten.

Nr.	Mutation	Exon
*1	c.172C>G	1
*2	c.606G>C	3
*3	c.661_663delTTC	
*4	c.814G>A	
*5	c.950A>G	4
*6	c.986delC	
*7	c.[1082T>C]+[1082T>C]	5
*8	c.1202_1203ins...	6
*9	c.1429G>A	7
*10	c.1457C>T	
*11	c.1573_1574ins...	

Tabelle 8: Bezeichnung und Position der gefundenen Mutationen

5 Zusammenfassung

Okulokutaner Albinismus (OCA) bezeichnet eine Gruppe genetisch heterogener erblicher Störungen der Melaninsynthese. Die Erkrankung führt zu einer Hypopigmentierung von Haut, Haaren und Augen. Der Mangel von Melanin während der Entwicklungsperiode hat oft schwerwiegende Störungen des visuellen Systems zur Folge, weshalb die Patienten nur in seltenen Fällen einen normalen Visus erreichen.

Man unterscheidet mehrere Formen von Okulokutanem Albinismus, denen Veränderungen in verschiedenen Genen zugrunde liegen: OCA1 wird verursacht durch Mutationen im Tyrosinase-Gen. OCA2, die häufigste Albinismusform, ist assoziiert mit Mutationen des P-Gens. OCA3 wird durch Mutationen im TYRP-1-Gen hervorgerufen.

OCA4 wurde 2001 als neue Form des Okulokutanen Albinismus bei einem einzigen Betroffenen beschrieben und ist mit Mutationen im MATP-Gen assoziiert. Dieses Gen stellt die humane Entsprechung des bekannten murinen „underwhite“-Gens dar und codiert höchstwahrscheinlich für ein Transportprotein, dessen Substrat allerdings bisher unbekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv von 176 OCA-Patienten vornehmlich deutscher Herkunft auf Veränderungen im MATP-Gen untersucht. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurden zunächst alle Exons amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels SSCP-Analysen elektrophoretisch untersucht, auffällige Proben wurden in den entsprechenden Exons sequenziert.

Auf diese Weise konnten fünf Personen mit großer Sicherheit als OCA4-Patienten identifiziert werden, darunter ein Individuum mit einer homozygoten Mutation auf beiden Allelen sowie vier compound-heterozygote Personen. Zusätzlich konnten bei sechs weiteren Individuen zum Teil identische heterozygote Mutationen auf einem der beiden Allele nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Mutationsverteilung in den einzelnen Genabschnitten ergab eine deutliche Häufung in den hinteren beiden Gendritteln, in denen sich ca. 90 % der Veränderungen befinden. Der Anteil von OCA4-Patienten im hier untersuchten Kollektiv beträgt beinahe 3 % und ist damit um ein Dreifaches höher, als frühere Untersuchungen es erwarten ließen.

Ferner zeigte eine Betrachtung des klinischen Erscheinungsbildes der fünf OCA4-Patienten, daß der Phänotyp abhängig von der Art der genetischen Veränderung offenbar erheblich variabler ist als bisher angenommen und von leichtgradiger bis hin zu schwerster Hypopigmentation reichen kann.

6 Anhang

6.1 Sequenzen

Legende:

große Buchstaben	→	Einbuchstabencode für Aminosäuren
kleine Buchstaben	→	DNA-Nucleotide
<u>atg</u>	→	Startcodon
<u>tag</u>	→	Stopcodon

6.1.1 MATP-Gen: cDNA

(Quelle: NCBI Nucleotide, Zugangsnummer AF172849: Homo sapiens AIM-1 protein mRNA, complete cds)

→ Exon 1

```
1   atg ggt agc aac agt ggg cag gct ggc cgc cac atc tat aaa tcc
    M  G  S  N  S  G  Q  A  G  R  H  I  Y  K  S

46  cta gct gat gat ggc ccc ttt gac tct gtg gag ccg cct aaa aga
    L  A  D  D  G  P  F  D  S  V  E  P  P  K  R

91  ccc acc agc aga ctc atc atg cac agc atg gcc atg ttc gga aga
    P  T  S  R  L  I  M  H  S  M  A  M  F  G  R

136 gag ttc tgc tac gcg gtg gag gca gcg tat gtg acc cca gtc ctg
    E  F  C  Y  A  V  E  A  A  Y  V  T  P  V  L
```

181 ctc agc gta ggt ctg ccc agc agc ctg tac agc att gtg tgg ttc
L S V G L P S S L Y S I V W F

226 ctc agc ccc atc ctg gga ttc ctg ctg cag ccc gtg gtc gga tcg
L S P I L G F L L Q P V V G S

271 gcc agc gac cac tgc cgg tcc agg tgg ggc cgc cgg aga ccc tac
A S D H C R S R W G R R R P Y

316 atc ctc acc ctg gga gtc atg atg ctc gtg ggc atg gct ctg tac
I L T L G V M M L V G M A L Y

→ Exon 2

361 ctc aat ggg gct act gtt gta gca gct ttg att gct aac cca agg
L N G A T V V A A L I A N P R

406 agg aag ctg gtt tgg gcc ata agt gtc acc atg ata ggt gtc gtt
R K L V W A I S V T M I G V V

451 ctc ttt gat ttt gct gcc gac ttc att gat ggg ccc atc aaa gcc
L F D F A A D F I D G P I K A

496 tac tta ttt gat gtc tgc tcc cat cag gac aag gag aag ggc ctc
Y L F D V C S H Q D K E K G L

→ Exon 3

541 cac tac cat gcc ctc ttc aca ggt ttt gga ggt gcc ctg ggt tac
H Y H A L F T G F G G A L G Y

586 ctt ttg ggt gct ata gac tgg gcc cat ctg gag ctg gga aga ctg
L L G A I D W A H L E L G R L

631 ttg ggt aca gaa ttc cag gtc atg ttc ttc ttc tct gca ttg gtg
L G T E F Q V M F F F S A L V

676 ctc act ttg tgt ttt act gtt cat ctg tgc agt atc tct gaa gcc
L T L C F T V H L C S I S E A

721 cca ctt aca gag gtt gca aag ggc att ccc cca cag caa acc cct
P L T E V A K G I P P Q Q T P

766 cag gac cct cca ttg tca tca gat gga atg tac gag tat ggt tct
Q D P P L S S D G M Y E Y G S

811 atc gag aaa gtt aaa aat ggt tac gta aat cca gag ctg gca atg
I E K V K N G Y V N P E L A M
→ Exon 4

856 cag gga gca aaa aac aaa aat cat gct gaa cag act cgc agg gca
Q G A K N K N H A E Q T R R A

901 atg aca tta aag tca ctg ctg aga gca ctg gtg aac atg cct cct
M T L K S L L R A L V N M P P

946 cac tac cgc tac ctt tgc atc agc cac ctc att gga tgg acg gcc
H Y R Y L C I S H L I G W T A
→

991 ttc ctg tcc aac atg ctg ttc ttc aca gat ttc atg ggc cag att
F L S N M L F F T D F M G Q I
Exon 5

1036 gtg tac cgc ggg gat ccc tat agt gca cac aac tcc aca gag ttt
V Y R G D P Y S A H N S T E F

1081 ctc atc tac gaa aga gga gtc gag gtt gga tgt tgg ggc ttc tgc
L I Y E R G V E V G C W G F C
→ Exon 6

1126 atc aac tcc gtg ttt tcc tca ctt tat tct tac ttt cag aaa gtt
I N S V F S S L Y S Y F Q K V

1171 ttg gta tcc tac att gga tta aag ggt ctt tac ttc acg gga tat
L V S Y I G L K G L Y F T G Y

1216 ttg ctg ttt ggc ctg ggg acg gga ttt att ggg ctc ttc ccg aat
L L F G L G T G F I G L F P N

1261 gtc tac tcc acc ctg gtc ctg tgc agc ctg ttt ggt gta atg tcc
V Y S T L V L C S L F G V M S

1306 agc acc ctg tac act gtg ccc ttt aac ctc att act gag tac cac
S T L Y T V P F N L I T E Y H

→ Exon 7

1351 **cgc gag gaa gaa aag gag** agg cag cag gcc cca gga ggg gac cca
 R E E E K E R Q Q A P G G D P

1396 gac aac agc gtg aga ggg aag ggc atg gac tgc gcc acc ctc aca
 D N S V R G K G M D C A T L T

1441 tgc atg gtg cag ctg gct cag atc ctg gtc gga ggt ggc ctg ggc
 C M V Q L A Q I L V G G G L G

1486 ttt ctg gtc aac aca gcc ggg acc gtt gtc gtc gtg gtg atc aca
 F L V N T A G T V V V V V I T

1531 gcg tct gcg gtg gca ctg ata ggc tgt tgc ttt gtc gct ctc ttt
 A S A V A L I G C C F V A L F

1576 gtt aga tat gtg gat tag
 V R Y V D !

6.1.2 MATP-Gen: Intron 3

(Quelle: NCBI Nucleotide, Zugangsnummer AC008954: Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2340N2, complete sequence)

...

1 ggt tac gta aat cca gag ctg gca atg cag gga gca aaa aac aaa
 G Y V N P E L A M Q G A K N K

→ Beginn von Intron 3

46 aat cat gct gaa cag **gta aag atg caa cat ttt ttc ttt aca agg**
 N H A E Q **V K M Q H F F F T R**

91 **gaa aat att ctt gct ctt tgt tgt tgt tgt ttt ttt aat tgt ttg**
E N I L A L C C C C F F N C L

136 ttt tgt ctg ttt gac gag aag agt ttc atg ggg tct aac tga att
F C L F D E K S F M G S N ! I

181 ccc aaa tcc ccc gta gct atc atc cct tgg aat taa aat ttt ata
P K S P V A I I P W N ! N F I ...

6.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer.....	21
Tabelle 2: Annealing-Temperaturen der verschiedenen Exons	30
Tabelle 3: Geltypen und Laufzeiten bei der SSCP-Analyse	32
Tabelle 4: In der SSCP-Analyse auffällige Proben.....	41
Tabelle 5: Übersicht über gefundene Mutationen.....	47
Tabelle 6: Übersicht über gefundene Polymorphismen	52
Tabelle 7: Veränderungen im Intronbereich	53
Tabelle 8: Bezeichnung und Position der gefundenen Mutationen.....	76
Abbildung 1: MATP-Protein	15
Abbildung 2: SSCP-Analyse der Probe 7577 in Exon 3.....	39
Abbildung 3: Beispiele für Auffälligkeiten der SSCP-Analyse in Exon 4	40
Abbildung 4: Beispiele für Auffälligkeiten der SSCP-Analyse in Exon 5	40
Abbildung 5: Sequenzierung von Probe 7451 in Exon 7	44
Abbildung 6: Sequenzierung von Probe 7577 in Exon 3	45
Abbildung 7: SSCP-Analyse der Familie von Patient 7451 in Exon 4.....	49
Abbildung 8: SSCP-Analyse der Familie von Patient 7451 in Exon 7	49
Abbildung 9: SSCP-Analyse der Familie von Patient 7567 in Exon 7	50
Abbildung 10: Sequenzierung der Probe 7418 in Exon 5	50
Abbildung 11: Sequenzierung einer Kontrolle in Exon 5	51
Abbildung 12: Lokalisation der Mutationen	75

6.3 Literatur

6.3.1 Bücher und Zeitschriften

- 1 Antonarakis SE and the Nomenclature Working Group (Ashburner M, Auerbach AD, Beaudet AL, Beckmann JS, Beutler E, Cooper DN, Cotton RGH, Dunnen JT, Desnick RJ, Eng C, Fasman KH, Goldman D, Hayashi K, Hutchinson F, Kazazian HH, Keen J, King MC, Lehvaslaiho H, McAlpine PJ, McKusick V, Motulski AG, Povey S, Schorderet DF, Shows TB, Superti-Furga A, Tay AHN, Valle D, Vihinen M): Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Hum Mutat* 11: 1-3 (1998)
- 2 Buselmaier W, Tariverdian G: *Humangenetik*. 2. Aufl., Kap. 1, S.20, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1999)
- 3 Costin GE, Valencia JC, Vieira WD, Lamoreux ML, Hearing VJ: Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J Cell Sci* 116: 3203-3212 (2003)
- 4 Creel DJ, Summer CG, King RA: Visual anomalies associated with albinism. *Ophthalmic Pediatr Genet* 11: 193-200 (1990)
- 5 Du J, Fisher EF: Identification of *Aim-1* as the *underwhite* mouse mutant and its transcriptional regulation by MITF. *J Biol Chem* 277: 402-406 (2002)
- 6 Dunnen JT, Antonarakis SE: Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109: 121-124 (2001)
- 7 Fartmann B, Nikoleit K, Rehfeldt K: *Sequencing Brochure: Instructions for DNA template preparation, primer design and sequencing with the LI-COR DNA sequencer 4000 and 4200 series*. Version 4, MWG-Biotech AG (1999)
- 8 Fukai K, Oh J, Frenk E, Almodóvar C, Spritz RA: Linkage disequilibrium mapping of the gene for Hermansky-Pudlak syndrome to chromosome 10q23.1-q23.3. *Hum Mol Genet* 4: 1665-1669 (1995)

- 9 Fukamachi S, Shimada A, Shima A: Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nat Genet* 28: 381-385 (2001)
- 10 Gahl WA, Brantly M, Kaiser-Kupfer MI, Iwata F, Hazelwood S, Shotelersuk V, Duffy LF, Kuehl EM, Troendle J, Bernardini I: Genetic defects and clinical characteristics of patients with a form of oculocutaneous albinism (Hermansky-Pudlak syndrome). *N Engl J Med* 338: 1258-1264 (1998)
- 11 Gardner JM, Nakatsu Y, Gondo Y, Lee S, Lyon MF, King RA, Brilliant MH: The mouse pink-eyed dilution gene: Association with human Prader-Willi and Angelman syndromes. *Science* 257: 1121-1124 (1992)
- 12 Garrod AE: Inborn errors of metabolism. Lecture II. *Lancet* 2: 73-79 (1908)
- 13 Giebel LB, Tripathi RK, Strunk KM, Hanifin JM, Jackson CE, King RA, Spritz RA: Tyrosinase gene mutations associated with type 1B („yellow“) oculocutaneous albinism. *Am J Hum Genet* 48: 1159-1167 (1991)
- 14 Harada M, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA, Robbins PF: Use of an in vitro immunoselected tumor line to identify shared melanoma antigens recognized by HLA*0201-restricted T cells. *Cancer Res* 61: 1089-1094 (2001)
- 15 Jackson IJ: Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Hum Mol Genet* 6: 1613-1624 (1997)
- 16 Jimbow K, Quevedo WC, Fitzpatrick TB, Szabo G: Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J Invest Dermatol* 67: 72-89 (1976)
- 17 Jiménez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano JA, García-Borrón JC: A new enzymatic function in the melanogenic pathway: the DHICA oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1). *J Biol Chem* 269: 17993-18001 (1994)
- 18 Käsman-Kellner B, Ruprecht KW: Albinismus – Klassifikation und klinisches Spektrum. *Z Prakt Augenheilkd* 20: 189-203 (1999)
- 19 Knippers R: *Molekulare Genetik*. 8. Aufl., Kap. 2, S. 23f, Kap. 10, S. 307f, Kap. 17, S. 476, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2001)
- 20 Kwon BS, Haq AK, Pomerantz SH, Halaban R: Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7437-7477 (1987)

- 21 Lee ST, Nicholls RD, Jong MTC, Fukai K, Spritz RA: Organization and sequence of the human *P* gene and identification of a new family of transport proteins. *Genomics* 26: 345-363 (1995)
- 22 Lehman AL, Silvers WK, Puri N, Wakamatsu K, Ito S, Brilliant MH: The underwhite locus acts autonomously and reduces the production of melanin. *J Invest Dermatol* 115: 601-606 (2000)
- 23 Ming JE, Muenke M: Multiple hits during embryonic development: Digenic diseases and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 71: 1017-1032 (2002)
- 24 Murty VVVS, Bouchard B, Mathew S, Vijayasaradhi S, Houghton AN: Assignment of the human TYRP (*brown*) locus to chromosome region 9p23 by nonradioactive *in situ* hybridization. *Genomics* 13: 227-229 (1992)
- 25 Nakayama K, Fukamachi S, Kimura H, Koda Y, Soemantri A, Ishida T: Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color. *J Hum Genet* 47: 92-94 (2002)
- 26 Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, Brilliant MH: Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet* 69: 981-988 (2001)
- 27 Oetting WS, King RA: Molecular basis of albinism: Mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat* 13: 99-115 (1999)
- 28 Oetting WS, King RA: Molecular basis of oculocutaneous albinism. *J Invest Dermatol* 103: 131S-136S (1994)
- 29 Passmore LA, Käsmann-Kellner B, Weber BHF: Novel and recurrent mutations in the tyrosinase gene and the *P* gene in the german albino population. *Hum Genet* 105: 200-210 (1999)
- 30 Puri N, Gardner JM, Brilliant MH (2000): Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (*p*) mutant melanocytes. *J Invest Dermatol* 115: 607-613 (2000)
- 31 Rinchik EM, Bultman SJ, Horsthemke B, Lee ST, Strunk KM, Spritz RA, Avidano KM, Jong MTC, Nicholls RD: A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature* 361: 72-76 (1993)

- 32 Sambrook J, Russell DW: Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition, Volume 2, chapter 12.74, 13.49-51, 13.90, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)
- 33 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467 (1977)
- 34 Seyffert W (Hrsg.), Balling R, Couet HG, Fischbach KF, Frey A, Gassen HG, Glätzer KH, Hagemann R, Hess O, Hofbauer M, Hollenberg CP, Jäckle H, Jäger R, Jürgens G, Krawinkel U, Lachmund A, Melchers I, Minol K, Neiss G, Nordheim A, Sachse E, Schaefer U, Schartl M, Tautz D, Weber P: *Lehrbuch der Genetik*. 1. Aufl., Kap. B, S. 975, 978f, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1998)
- 35 Singer M, Berg P: *Gene und Genome*. 1. Aufl., Kap. 7, S. 368f, 408, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1992)
- 36 Strachan T, Read AP: *Molekulare Humangenetik*. 1. Aufl., Kap. 3, S.89ff, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1996)
- 37 Sturm RA, O'Sullivan BJ, Box NF, Smith AG, Smit SE, Puttick ERJ, Parsons PG, Dunn IS: Chromosomal structure of the human TYRP1 and TYRP2 loci and comparison of the tyrosinase-related protein gene family. *Genomics* 29: 24-34 (1995)
- 38 Sweet HO, Brilliant MH, Cook SA, Johnson KR, Davisson MT: A new allelic series for the underwhite gene on mouse chromosome 15. *J Hered* 89: 546-551 (1998)
- 39 Trevor-Roper PD: Marriage of two complete albinos with normally pigmented children. *Br J Ophthalmol* 36: 107-109 (1952)
- 40 Vogel F: Clinical consequences of heterozygosity for autosomal-recessive diseases. *Clin Genet* 25: 381-415 (1984)
- 41 Wildenberg SC, Oetting WS, Almodóvar C, Krumwiede M, White JG, King RA: A gene causing Hermansky-Pudlak syndrome in a Puerto Rican population maps to chromosome 10q2. *Am J Hum Genet* 57: 755-765 (1995)
- 42 Witkop CJ, Babcock MN, Rao GHR, Gaudier F, Summers CG, Shanahan F, Harmon KR, Townsend D, Sedano HO, King RA, Cal SX, White JG: Albinism and Hermansky-Pudlak syndrome in Puerto Rico. *Puerto Rico Bol Asoc Med PR* 82: 333-339 (1990)

- 43 Zhao H, Boissy YL, Abdel-Malek Z, King RA, Nordlund JJ, Boissy RE: On the analysis of the pathophysiology of Chediak-Higashi Syndrome: Defects expressed by cultured melanocytes. *Lab Invest* 71: 25-34 (1994)

6.3.2 Elektronische Datenbank-Information

Nucleotide, National Center for Biotechnology Information (NCBI). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, humane MATP-cDNA (Zugangsnummer AF172849), humane genomische DNA Chromosom 5 clone CTD-2340N2 (Zugangsnummer AC008954). Zuletzt aufgerufen: 22.12.2003.

6.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. Schwinger danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und seine stetige Freundlichkeit.

Frau Prof. Dr. C. Zühlke danke ich für die Überlassung des interessanten Themas. Ganz besonders herzlich möchte ich mich für die tolle Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken: Sie hatte stets ein offenes Ohr und hat mir bei Fragen und Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Auch für die gewissenhafte und gründliche Korrektur meiner Arbeit danke ich ihr herzlich.

Herrn Dr. S. Opitz danke ich ebenfalls ganz herzlich für die Betreuung und die geduldige Beantwortung meiner vielen Fragen. Sein SeqWorks-Programm hat mich bei der Auswertung meiner Daten vermutlich vor etlichen Nervenzusammenbrüchen bewahrt!

Frau Priv. Doz. Dr. B. Käsmann-Kellner danke ich für die Bereitstellung der Blutproben und für ihre Berichte über die klinischen Befunde der Patienten.

Frau U. Gehlken danke ich für die geduldige und gewissenhafte Einarbeitung in die Labortechniken sowie für ihre Hilfe bei vielen großen und kleinen alltäglichen Problemen bei der Arbeit.

Frau H. Pawlack, Frau M. Albrecht, Frau J. Atici, Dr. Y. Hellenbroich und Dr. A. Dalski möchte ich für die tägliche, mitunter auch moralische Unterstützung bei der Arbeit danken.

Des weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die nette Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima, was ganz erheblich dazu beigetragen hat, daß ich mich dort immer wohl gefühlt habe.

Meinen Eltern danke ich dafür, daß sie mir dieses Studium und damit auch die Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Meinem Freund danke ich für seine unendliche Geduld an all den Tagen, an denen ich ganz furchtbar gestreßt und ungenießbar war, und seine moralische Unterstützung.

6.5 Lebenslauf

Name	<u>Uta</u> Ella Helene Rundshagen
Geburtsdatum	23.06.1979
Geburtsort	Neustadt in Holstein
Eltern	Armin Rundshagen, Technischer Angestellter Edith Rundshagen, Arzthelferin
Schullaufbahn	
08/1985 – 06/1998	Hochtor-Grundschule und Kreisgymnasium in Neustadt in Holstein
06/1998	Abitur
Universitäre Laufbahn	
10/1998 – 06/2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Lübeck
27.09.2000	Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2001 – 03/2002	Auslandssemester an der Università degli Studi di Parma (Italien)
09/2002 – 05/2003	Experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Humangenetik der Universität Lübeck
23.03.2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004 – 03/2005	Praktisches Jahr
06.06.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung