

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

Albinismus:
Mutationssuche im TRP-1-Gen

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- AUS DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT -

vorgelegt von
Aleksandra Lipka
aus Zebrzydowice (Polen)

Lübeck 2004

-
1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Grabbe

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2005

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 02.12.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	6
1.1 Albinismus: Definition und Klinik.....	6
1.2 Melaninsynthese.....	8
1.3 Molekulargenetische Klassifizierung des Albinismus.....	11
1.3.1 Okulokutaner Albinismus Typ 1.....	13
1.3.2 Okulokutaner Albinismus Typ 2.....	14
1.3.3 Okulokutaner Albinismus Typ 3.....	16
1.3.4 Okulokutaner Albinismus Typ 4.....	19
1.3.5 Mit okulokutanem Albinismus assoziierte Syndrome.....	20
1.3.6 Okulärer Albinismus Typ 1.....	21
1.4 Zielsetzungen der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	23
2.1.2 Stammlösungen.....	24
2.1.3 Oligonukleotide.....	26
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 DNA-Isolierung aus Vollblut.....	28
2.2.2 Polymerase Kettenreaktion.....	28
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.4 Analyse von DNA-Einzelsträngen mittels SSCP.....	33
2.2.5 DNA-Sequenzierung mit der Dideoxymethode.....	35

3. Ergebnisse **40**

3.1 Untersuchung der Exons 2 bis 8 des TRP-1-Gens.....	40
3.2 Ergebnisse der SSCP-Analysen.....	40
3.2.1 Exon 2.....	41
3.2.2 Exon 3.....	42
3.2.3 Exon 4.....	42
3.2.4 Exon 5.....	43
3.2.5 Exon 6.....	44
3.2.6 Exon 7.....	45
3.2.7 Exon 8.....	45
3.3 Ergebnisse der DNA-Sequenzierung.....	46
3.3.1 Exon 2.....	47
3.3.2 Exon 3.....	48
3.3.3 Exon 4.....	49
3.3.4 Exon 5.....	49
3.3.5 Exon 6.....	49
3.3.6 Exon 7.....	50
3.3.7 Exon 8.....	50
3.3.8 Tabellarische Übersicht.....	50

4. Diskussion **52**

4.1 Mutationen im TRP-1-Gen.....	52
4.1.1 Mögliche Auswirkungen der TRP-1-Gen-Mutationen..... auf das Protein	52
4.1.2 Personen mit Mutationen in zwei OCA-Genen.....	56
4.1.3 Personen mit einer Mutation im TRP-1-Gen.....	57
4.2 Phänotyp der Mutationsträger im TRP-1-Gen.....	60
4.3 Polymorphismus 259 C>A.....	60

4.4 DNA-Variationen in Intronbereichen des TRP-1-Gens.....	62
4.4.1 Intron 6.....	63
4.4.2 Intron 7.....	64
5. Zusammenfassung	66

6. Literatur	67
---------------------	-----------

6.1 Zeitschriften und Bücher.....	67
6.2 Elektronische Datenbanken.....	74

7. Anhang	75
------------------	-----------

7.1 Abkürzungen.....	75
7.1.1 Allgemein.....	75
7.1.2 Einheiten.....	77
7.1.3 Vorsätze.....	77
7.1.4 Abkürzungen der Aminosäuren.....	78
7.2 mRNA- und cDNA-Sequenzen.....	79
7.2.1 mRNA-Sequenz des TRP-1-Gens.....	79
7.2.2 cDNA-Sequenzen der untersuchten Intronbereiche.....	83
7.3 Danksagung.....	85
7.4 Lebenslauf.....	86

1. EINLEITUNG

1.1 Albinismus: Definition und Klinik

Der Begriff Albinismus (lat. albus >weiß<) wird als Oberbegriff für eine heterogene Gruppe von erblichen Krankheiten verwendet, bei denen die Bildung des Farbpigmentes Melanin (griech. mēlas >schwarz<) gestört ist.

Da Melanin u.a. für die Färbung von Haut, Haaren und Iris verantwortlich ist, äußert sich der Mangel an Melanin klassischerweise durch weißblonde Kopf- und Körperbehaarung, hellblaue im Gegenlicht rötlich schimmernde Iris und hellrosafarbene Haut. Diese augenfälligen körperlichen Merkmale kommen sowohl bei Menschen vieler Rassen als auch bei zahlreichen Tierarten vor (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999).

Seit Jahrhunderten ruft diese Andersartigkeit der Menschen mit Albinismus gleichermaßen Faszination und Abneigung beim Betrachter hervor. Dies führte dazu, dass man betroffene Personen als Kuriositäten im Zirkus vorführte oder ihnen sogar übernatürliche Kräfte zusprach (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999). Und obwohl schon 1908 der Albinismus von A. E. Garrod als Stoffwechselerkrankung beschrieben und definiert wurde (Garrod, 1908), ist das Verhältnis zu Menschen mit Albinismus bis heute nicht frei von Vorurteilen. Vor allem in dunkelhäutigen Rassen gibt die dort besonders auffällige Erscheinung Betroffener immer noch Anlass zur Diskriminierung und Ausgrenzung.

Die Erkrankung folgt einem rezessiven Erbgang und kommt weltweit mit einer Häufigkeit von 1:20000 vor (Passmore *et al.*, 1999). Häufungen finden sich vor allem in Afrika mit einer Inzidenz von 1:10000 und höher (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999).

Je nachdem welche Organe betroffen sind, wird generell zwischen dem okulokutanem Albinismus (OCA) und dem okulären Albinismus (OA) unterschieden. Dabei zeigen Menschen mit OCA Melaninmangel sowohl im Auge als auch in der Haut, während bei den Menschen mit OA nur die Augen vom Melaninmangel betroffen sind.

Da die Melaninsynthese ein mehrstufiger Vorgang ist (Kap. 1.2, S. 10-11), dessen Erfolg von zahlreichen Proteinen abhängt, kann sie an verschiedenen Stellen gestört

werden. Das erklärt die Heterogenität dieser Erkrankung sowohl auf der molekulargenetischen als auch auf der phänotypischen Ebene.

Ein Individuum mit Albinismus muss nicht zwangsläufig weißhaarig, hellhäutig sein und rötlich schimmernde Iriden haben. Das Spektrum der Phänotypen reicht von diesem klassischen Typ ohne Pigmentierung bis zu Individuen mit fast normaler Pigmentierung von Haut, Haaren und Iris. Bei diesen Personen, die auf den ersten Blick durch ihre Erscheinung nicht mit Albinismus in Zusammenhang gebracht werden, helfen andere für den Albinismus charakteristische Veränderungen, wie die im optischen Apparat, bei der Diagnosefindung (Creel *et al.*, 1990).

Der Mangel an Melanin hat für die Betroffenen neben den rein äußerlichen auch funktionelle Folgen. So ist die Haut ohne die schützende UV-Licht absorbierende Wirkung von Melanin einer höheren Dosis von UV-Strahlung ausgeliefert, was zur Bildung von Malignomen prädisponiert. Besonders deutlich wird der Funktionsausfall des Melanins durch seinen Mangel am optischen Apparat. Die Iris ist durch das Fehlen von Farbpigment durchleuchtbar und kann ihre Funktion als regulierbare Blende, die das Auge vor übermäßigem Lichteinfall schützt, nicht mehr wahrnehmen. Auch die Aderhaut (Choroidea) des Auges enthält normalerweise Melanin und absorbiert einen Teil des auf die Netzhaut einfallenden Lichts, womit sie ebenfalls vor zu viel Lichtwahrnehmung schützt. Ohne den Farbstoff leiden die Patienten an Blendungsempfindlichkeit (Photophobie).

Die Entwicklung der Fovea (Fleck des schärfsten Sehens) und die prä- und postnatale Differenzierung der visuellen Nervenbahnen ist von Melanin abhängig. Daher zeigen von Albinismus Betroffene eine unterschiedlich stark ausgeprägte Foveadysplasie, die eine Sehbehinderung bedingt. Durch atypische Nervenkreuzungen im Nervus Optikus werden vermutlich die Entwicklung von Strabismus (Schielen) und von Störungen des Binokularsehens bedingt. Weitere häufige Befunde bei Albinismus sind der Nystagmus (ruckartige unwillkürliche Bewegungen der Bulbi) und hohe Refraktionsanomalien. Dabei treten Myopie (Kurzsichtigkeit) und Hyperopie (Weitsichtigkeit) häufig zusammen mit Astigmatismus (Brennpunktlosigkeit) auf (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999).

Die geistige Entwicklung von Menschen mit Albinismus ist normal und sie können in der Regel, auch wenn der Stoffwechseldefekt nicht therapiert werden kann, durch

unterstützende Therapie in Form von z. B. Sehhilfen, getönten Kontaktlinsen oder entsprechendem Hautschutz ein ganz normales Leben führen (Cameron, 1979; Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999).

1.2 Melaninsynthese

Der Farbstoff Melanin wird von Melanozyten produziert. Die Vorstufen der Melanozyten, die Melanoblasten, wandern in der frühen Fetalperiode aus der Neuralleiste in die Epidermis der Haut, in die Haarfollikel und verschiedene andere Organe aus (Abb. 1) (Moore und Persaud, 1996).

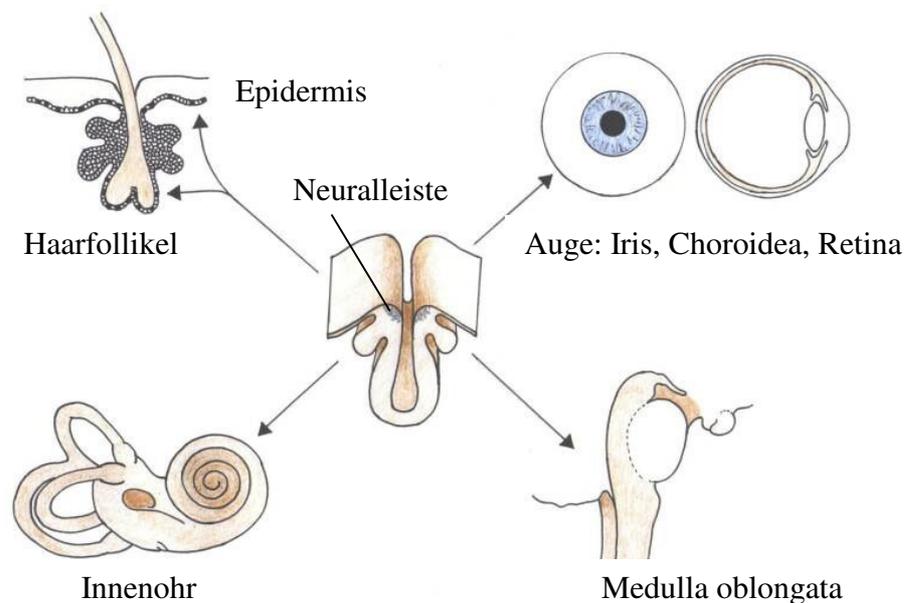


Abb. 1: Migration der Melanoblasten aus der Neuralleiste.

(Umgezeichnet nach Bologna und Orlow, 2003, Abb. 65.1)

In der Haut angelangt, differenzieren sich die Melanoblasten zu Melanozyten und bilden zahlreiche Zellfortsätze (Dendriten) aus, über die sie das Melanin an die Keratinozyten weitergeben (Abb. 2, S. 9) (Moore und Persaud, 1996).

Dabei unterscheidet sich die Dichte der Melanozyten in der Haut von Region zu Region u. U. erheblich: in der Genitalregion findet man ca. 1500 Melanozyten pro mm^2 ,

während es auf dem Rücken ca. $900/\text{mm}^2$ sind. Dafür sind die Unterschiede der Melanozytendichte in der Haut verschiedener Menschen nur sehr gering. Das bedeutet, dass ein Afrikaner die gleiche Anzahl von Melanozyten in seiner Haut trägt, wie z. B. ein an OCA erkrankter Weißer. Der Faktor, der die Hautfarbe bestimmt ist die Aktivität der Melanozyten, d. h. die Qualität und Quantität des gebildeten Farbstoffs Melanin, und nicht die Anzahl dieser Zellen (Bologna und Orlow, 2003).

Innerhalb der Melanozyten findet die Produktion und Speicherung von Melanin in speziellen dafür vorgesehenen Organellen statt (Abb. 2). Diese als Melanosomen bezeichneten Organellen sind in ihrer Funktion den Lysosomen sehr ähnlich. Beide Organellen schützen die restliche Zelle durch die Schaffung abgeschlossener Kompartimente. Die Lysosomen beinhalten proteolytische Enzyme und die Melanosomen Zwischenprodukte der Melaninsynthese wie z. B. Quinone und Phenole, die Lipidmembranen oxidieren können (Bologna und Orlow, 2003).

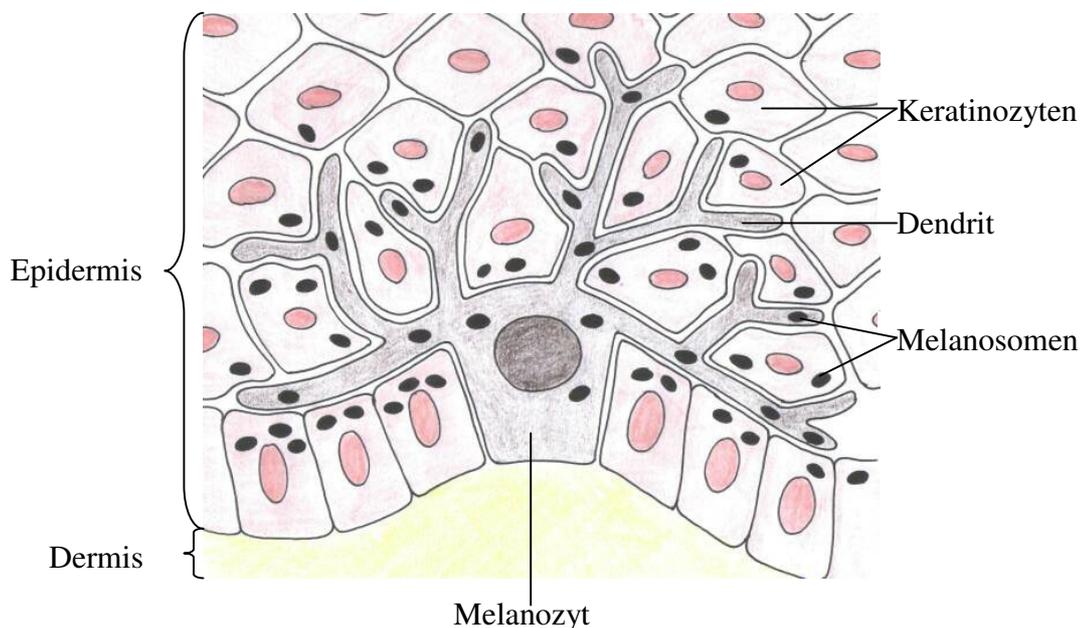


Abb. 2: Ein Melanozyt in der Epidermis.

Erläuterungen siehe Text S. 8-9. (Umgezeichnet nach Bologna und Orlow, 2003, Abb. 65.4.)

Es werden zwei Arten von Melanin synthetisiert. Innerhalb der sog. Eumelanosomen wird das braunschwarze Eumelanin hergestellt, während in den sog. Phäomelanosomen das gelbrote Phäomelanin synthetisiert wird. Individuen mit roten Haaren produzieren hauptsächlich Phäomelanin während sie Eumelanin nur in geringen Mengen herstellen können. Bei Menschen mit braunen bzw. schwarzen Haaren ist das Verhältnis zu Gunsten des Eumelanins verschoben (Orlow, 1998).

In Säugetieren erfolgt die Regulation der Melaninproduktion durch das Melanozytenstimulierende-Hormon (MSH) und das ASP (*agouti signaling protein*). Die Bindung von MSH an seinen Rezeptor (MC1R) auf den Melanozyten steigert die Synthese von Eumelanin. Das ASP antagonisiert die Wirkung des MSH und senkt damit die Syntheserate des Eumelanins (Abdel-Malek, 1998).

Eumelanin schützt die Haut vor schädlicher UV-Strahlung. Über die Funktion des Phäomelanins in der Haut wird noch spekuliert. Es wird ihm sogar eine hautschädigende Wirkung zugeschrieben, da es unter dem Einfluss von UV-Strahlen freie Radikale ausbildet (Valverde *et al.*, 1995).

Die ersten beiden Schritte in der Melaninsynthese sind in den Eumelanosomen und in den Phäomelanosomen gleich (Abb. 3, S. 11). Die Aminosäure Tyrosin ist die chemische Grundsubstanz der Melaninsynthese und wird zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) hydrolysiert, welches anschließend zu DOPAquinon oxidiert wird. Beide Reaktionen werden von der Tyrosinase (TYR) katalysiert. Dieses kupferhaltige Protein in der Membran der Melanosomen ist damit das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der gesamten Melaninproduktion.

In weiteren Schritten werden durch die unterschiedlichen Enzyme der Eu- und Phäomelanosomen die beiden Melanintypen katalysiert. In den Eumelanosomen sind zahlreiche Proteine bekannt wie z. B. das TRP-1 und -2 (*Tyrosinase related protein-1* und -2), das P-Protein, das MATP-Protein (*Membran associated transporter protein*) oder das OA1-Protein (Okulärer Albinismus 1 -Protein), die für die weitere Synthese des Eumelanins aus DOPAquinon entscheidend sind. Das Produkt Eumelanin ist ein lineares Polymer des Indol-5,6-chinons und seiner Derivate.

Phäomelanin entsteht wenn DOPAquinon mit der Aminosäure Cystein zu CysteinylDOPA reagiert. Die daraus entstehenden Phäomelaninpolymere sind

schwefelhaltig. Der Grad der Oxidation und Polymerisation bestimmt schließlich die Farbintensität des Melanins (Jimbow *et al.*, 1976).

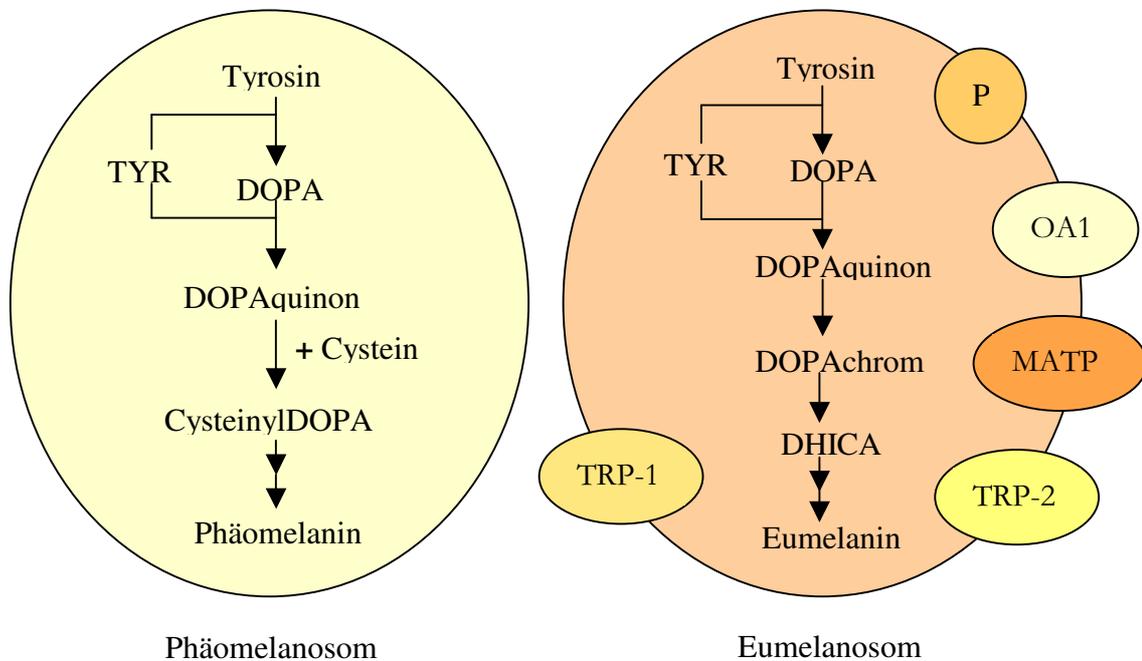


Abb. 3: Melaninsynthese im Phäomelanosom und Eumelanosom.

Erläuterungen und Abkürzungen siehe Text S. 9-10.

(Umgestaltet nach Opitz und Zühlke, 2002, Abb. 1.)

1.3 Molekulargenetische Klassifizierung des Albinismus

Auch wenn die Variationen in den phänotypischen Merkmalen des Albinismus schon früh beschrieben wurden, ging man davon aus, dass Albinismus auf die Veränderungen in einem einzigen Gen zurückzuführen ist.

Erst die von Trevor-Roper im Jahre 1952 beschriebene Familie, bei der beide Eltern von Albinismus betroffen waren und dennoch normal pigmentierte Kinder hatten, gab einen ersten Hinweis auf die genetische Heterogenität dieser Erkrankung. Beide Eltern waren in diesem Fall homozygot für Genmutationen, die zum Albinismus führten. Diese befanden sich jedoch auf unterschiedlichen Loci, so dass die Kinder für jede der beiden

Mutationen heterozygot und somit klinisch nicht von Albinismus betroffen waren (Trevor-Roper, 1952).

Man bemühte sich um eine Klassifikation des Albinismus, die zunächst auf der Beschreibung der phänotypischen Merkmale beruhte. Sie wurde später ergänzt durch den von R. King und C. Witkop entwickelten Tyrosinase-Haarwurzelttest (King und Witkop, 1977). Damit konnte die Melaninbildung in den Haarwurzeln und somit die Funktion der Tyrosinase nachgewiesen werden. Man konnte zwischen dem „Tyrosinase-positivem“ OCA und dem „Tyrosinase-negativem“ OCA unterscheiden. Basierend auf diesem Test wurden anhand von biochemischen und phänotypischen Merkmalen weitere Albinismustypen beschrieben wie z. B. der Platinum OCA, die „Gelbmutante“ (*yellow OCA*) oder der *Minimal Pigment OCA*. Man vermutete, dass jeder dieser Typen auf Veränderungen in einem spezifischen Gen beruht (Oetting *et al.*, 2003).

Mit der Möglichkeit der Identifizierung einiger verantwortlicher Gene für den OCA etablierte sich schließlich eine molekulargenetische Klassifikation. Man stellte fest, dass die unterschiedlichen Phänotypen nicht immer auf Mutationen in unterschiedlichen Genen zurückzuführen sind, sondern oft unterschiedliche Ausprägungen diverser Mutationen in einem Gen darstellen (Oetting *et al.*, 2003).

Die klinische Differenzierung bleibt schwierig, da nicht vom Phänotyp auf den Genotyp geschlossen werden kann. Verschiedene phänotypische Merkmale mutierter Gene können sich überlappen, wenn mehrere unterschiedliche Gene in einem Individuum verändert sind. Die phänotypische Einordnung ist auch deswegen nicht einfach, weil viele Gene in einen gemeinsamen Stoffwechselweg involviert sind und sicherlich nicht zuletzt deswegen, weil noch nicht bei allen phänotypisch auffälligen Menschen ein Defekt in einem der bekannten Gene gefunden werden konnte. Das lässt weitere bisher unbekannte Gene vermuten, die ebenfalls zur Entstehung von Albinismus führen.

Es wurden bisher insgesamt zwölf Gene gefunden, deren Mutationen beim Menschen mit Albinismus assoziiert sind (Oetting *et al.*, 2003) (Tabelle 1, S. 13). Sie werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

Erkrankung	Abk.	Gen	Protein	Chromosom
okulokutaner Albinismus Typ 1	OCA1	TYR-Gen	Tyrosinase	11q14-21
okulokutaner Albinismus Typ 2	OCA2	P-Gen	unbekannt	15q11-q13
okulokutaner Albinismus Typ 3	OCA3	TRP1-Gen	Tyrosinase related protein	9p23
okulokutaner Albinismus Typ 4	OCA4	MATP-Gen	Membranassoziiertes Transporterprotein	5p
Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 1	HPS1	HPS1-Gen	Membranprotein	10q23
Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2	HPS2	AP3B1-Gen	β 3 Untereinheit des Adaptor Protein 3 (AP-3)	15q14
Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 3	HPS3	HPS3-Gen	unbekannt	3q24
Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 4	HPS4	HPS4-Gen	unbekannt	22q11.2-q12.2
Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 5	HPS5	HPS5-Gen	unbekannt	11p15-p13
Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 6	HPS6	HPS6-Gen	unbekannt	10q24.31
Chediak-Higashi Syndrom	CHS	CHS1-Gen	Membranprotein	1q42
X-gekoppelter okulärer Albinismus	OA	OA1-Gen	G-Protein gekoppelter Rezeptor	Xp22.3

Tabelle 1: Mit Albinismus assoziierte Erkrankungen und die zugehörigen Gene beim Menschen mit ihren Genprodukten und ihrer Lokalisation.

Abk.=Abkürzung (Umgestaltet nach Oetting *et al.*, 2003, Tabelle 1)

1.3.1 Okulokutaner Albinismus Typ 1

Der okulokutane Albinismus Typ 1 (OCA 1) wird durch Mutationen im Tyrosinase-Gen verursacht. OCA 1 liegt bei 40 % aller von OCA Betroffenen vor und ist damit die zweithäufigste Albinismusform. Das Tyrosinase-Gen befindet sich auf Chromosom 11 (11q14-21), beinhaltet fünf Exons und codiert für das Protein Tyrosinase mit einer Länge von 529 Aminosäuren. Tyrosinase hat eine Schlüsselfunktion bei der Melaninsynthese (Kap. 1.2, S. 10). Mutationen im Tyrosinase-Gen können einen vollständigen oder einen partiellen Verlust der katalytischen Funktion von Tyrosinase verursachen. Dies führt zu der Beschreibung von zwei Untergruppen des OCA 1. Der Tyrosinase-negative OCA 1 (OCA 1A) zeichnet sich durch das vollständige Fehlen der Tyrosinasefunktion und damit durch das vollständige Fehlen der Melaninproduktion aus. Betroffene kommen mit weißen Haaren, heller Haut und blauen, durchscheinenden Iriden zur Welt. Sie entwickeln kein Melanin im Laufe des Lebens. Dieser Phänotyp

von OCA 1A kann bei allen Rassen des Menschen und bei zahlreichen Tierarten beobachtet werden. Weiterhin sind die Veränderungen im optischen Apparat typisch (Kap. 1.1, S. 7). Sie sind für eine starke Sehbehinderung mit ausgeprägter Photophobie und Nystagmus verantwortlich.

Ist eine Restfunktion der Tyrosinase erhalten, spricht man von dem Tyrosinase-positivem OCA 1 (OCA 1B). Die Betroffenen kommen wie bei OCA 1A ohne Pigmentierung der Haut, der Haare und der Iris zur Welt. Durch die erhaltene restliche Aktivität von Tyrosinase bilden sie in unterschiedlichem Ausmaß in den ersten Dekaden ihres Lebens Melanin. Dabei ist das entstehende phänotypische Spektrum bei OCA 1B sehr breit, da es von dem Ausmaß der verbliebenen Tyrosinaseaktivität abhängt und zusätzlich durch ethnische Zugehörigkeit modifiziert wird. Die typischen Veränderungen am optischen Apparat sind ebenso wie bei OCA 1A vorhanden. Ihre Ausprägung korreliert ebenfalls mit der erhaltenen Tyrosinaseaktivität. Der OCA 1B wird auch *yellow OCA* genannt, da das Nachdunkeln bei Betroffenen oft in gelber Haarfarbe resultiert. Dies wird auf die Synthese von Phäomelanin zurückgeführt.

Bisher sind über 100 verschiedene Mutationen im Tyrosinase-Gen identifiziert worden (Albinismus Datenbank unter www.cbc.umn.edu/tad/). Dazu gehören Fehlsinnmutationen (*missense mutations*), Unsinnmutationen (*nonsense mutations*), Rastermutationen (*frameshift mutations*), Insertionen und Deletionen. Die meisten betroffenen Individuen tragen die Mutation nicht homozygot, sondern weisen zwei unterschiedliche Mutationen auf den beiden Allelen des betroffenen Gens auf. Sie sind damit *compound* heterozygot (King, 1998).

Einige dieser Mutationen führen nicht zum Verlust der Tyrosinaseaktivität, sondern zu einer Störung der Reifung des Proteins Tyrosinase im endoplasmatischem Retikulum oder zur Störung des Transports von Tyrosinase in die Melanosomen (Toyofuku *et al.*, 2001).

1.3.2 Okulokutaner Albinismus Typ 2

Mit 50 % Anteil an OCA ist der OCA 2 die häufigste Albinismusform weltweit. Der OCA 2 entsteht durch Mutationen im P-Gen, welches nach dem homologen *pink-eye-dilution* Gen der Maus benannt wurde.

Das P-Gen besteht aus 25 Exons, wobei das erste nicht für das Protein codiert und befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 15 (15q11-13). Die Exons 2 bis 25 codieren für ein aus 838 Aminosäuren bestehendes Protein, das in der Membran der Eumelanosomen lokalisiert ist und vermutlich zwölf transmembrane Domänen beinhaltet. Aufgrund der Ähnlichkeit der P-Protein-Struktur mit bekannten Ionen-transportern wird ihm eine Funktion bei der Erhaltung eines niedrigen pH-Wertes innerhalb des Melanosoms zugeschrieben. Da die Funktion des Enzyms Tyrosinase stark von dem niedrigem pH-Wert abhängt, könnte die Funktion der Tyrosinase eingeschränkt werden, wenn ein fehlerhaftes P-Protein den niedrigen pH-Wert nicht mehr aufrechterhalten kann (Rinchik *et al.*, 1993).

Die Phäomelanosomen sind von Mutationen im P-Gen weniger betroffen als die Eumelanosomen. Daher zeigen Betroffene von Geburt an eine Pigmentierung, die den Haaren eine gelbliche, blonde oder sogar braune Färbung verleiht. Generell nimmt die Pigmentierung im Verlauf des Lebens zu. Wie beim OCA 1 ist das phänotypische Spektrum sehr breit, da man auch hier verschiedene Auswirkungen der vielen bekannten Mutationen im P-Gen auf die Funktion des P-Proteins vermutet. Analog zur Tyrosinase kann vermutlich auch die Funktion des P-Proteins komplett ausfallen oder nur partiell eingeschränkt sein. Nicht zuletzt beeinflusst der ethnische Hintergrund, wie bei OCA 1, den Phänotyp. Individuen mit OCA 2 aus dunkler pigmentierten Populationen bleiben klinisch im Vergleich mit gesunden Individuen der Population immer hypopigmentiert. Dagegen können Betroffene aus heller pigmentierten Populationen, wie z. B. aus Skandinavien, klinisch unauffällig bleiben. Dann können nur noch die typischen Veränderungen des optischen Apparates zur Diagnose führen (Oetting und King, 1994).

Ein weiterer Phänotyp von OCA 2 ist auch unter dem Namen brauner OCA bekannt. Dieser wurde bisher nur bei Afrikanern und Afroamerikanern beschrieben. Die Betroffenen haben braune Haare, braune oder blau-grüne Iriden und eine hellbraune Haut, die leicht bräunt. Eine Sehbehinderung, Nystagmus und Strabismus werden ebenfalls gefunden (Manga *et al.*, 2001).

Zwei mit OCA 2 assoziierte Syndrome sind bekannt: das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom. Das PWS ist eine Entwicklungsstörung, welche durch neonatale Hypotonie, kleine Hände und Füße, Adipositas, Hypogonadismus und

mentale Retardierung charakterisiert ist. 50 % der Individuen mit PWS zeigen eine Hypopigmentierung, aber nur einige davon zeigen auch die anderen typischen Veränderungen am optischen Apparat und haben OCA 2.

Das Angelman-Syndrom ist ebenfalls eine Entwicklungsstörung. Die mentale Retardierung ist schwerer als beim PWS. Es werden eine muskuläre Hypotonie, Ataxie, Mikrozephalie, ein charakteristisches unmotiviertes Lachen und eine Hypopigmentierung von Haut und Haaren beobachtet. Der Anteil von hypopigmentierten Individuen mit Angelman-Syndrom unter allen von Angelman-Syndrom Betroffenen ist nicht bekannt.

Beide Syndrome beruhen auf einer Mikrodeletion auf dem langen Arm von Chromosom 15 (15q11-13), also in der gleichen Region, in der das P-Gen liegt. Daher werden auch bei Personen mit Angelman-Syndrom die Beschreibungen von gleichzeitig auftretendem OCA 2 erwartet (King, 1998).

1.3.3 Okulokutaner Albinismus Typ 3

Der okulokutane Albinismus Typ 3 (OCA 3) wurde erstmals 1996 beschrieben. Bei einem neugeborenen afroamerikanischen Zwillingspärchen fiel einer der Jungen durch hellbraune Haut, hellbraune Haare und blau-graue Iriden mit rotem Reflex auf. Der andere Zwilling zeigte eine typische Pigmentierung für ein afroamerikanisches Neugeborenes mit dunkler Haar- und Hautfarbe. Der heller pigmentierte Junge entwickelte mit einem Jahr einen bilateralen Nystagmus. In der Familie der Zwillinge waren ähnliche Fälle von Hypopigmentierung bei einem der Geschwister und bei der Großmutter mütterlicherseits bereits bekannt. Der Phänotyp des Jungen wurde als der Phänotyp des braunen OCA beschrieben. Weitere Untersuchungen des Genotyps zeigten eine homozygote 1 bp-Deletion eines Adenosins an der Stelle 368 im TRP-1-Gen. Damit wurde ein neuer Typ des OCA postuliert: der OCA 3 (Boissy *et al.*, 1996).

Ein Jahr später wurde bei mehreren Individuen einer südafrikanischen Population mit dem Phänotyp des sog. roten OCA (*rufous* OCA oder ROCA) die gleiche Deletion c.368delA im TRP-1-Gen nachgewiesen. Zusätzlich fand man die *Nonsense*-Mutation

S166X (c.498 C>G). Beide Mutationen führen zu vorzeitigen STOP-Kodons (Manga *et al.*, 1997).

Der Phänotyp des ROCA in Südafrika zeigt eine rote oder rotbraune Haut, ingwerfarbene oder rote Haare und eine haselnussfarbene Iris. Die Veränderungen am optischen Apparat sind oft weniger stark und seltener ausgeprägt als bei den anderen OCA Typen. In der Studie von Manga und Mitarbeitern konnten bei 95 % der untersuchten Individuen mit ROCA Mutationen im TRP-1-Gen gefunden werden. Daher geht man davon aus, dass Mutationen im TRP-1-Gen bei Afrikanern ROCA bzw. OCA 3 auslösen (Manga *et al.*, 1997).

Im Gegensatz dazu wurde beim zuerst beschriebenen Zwilling der Phänotyp brauner OCA gefunden. Da eine weitere Untersuchung des Zwillings in seinem späteren Leben nicht erfolgte, kann man spekulieren, dass sich sein Phänotyp von dem eher braunen OCA in den roten OCA weiterentwickelt haben könnte. Auch der genetische Hintergrund wird als mögliche Ursache für eine solche Modifikation des Phänotyps angeführt (Manga *et al.*, 1997). Schließlich sprechen andere Untersuchungen nicht für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem braunem OCA und Veränderungen im TRP-1-Gen (Manga *et al.*, 1994; Manga *et al.*, 2001).

In einer weiteren Untersuchung von 100 verschiedenen pigmentierten Kaukasiern auf Veränderungen im TRP-1-Gen konnten lediglich zwei Polymorphismen gefunden werden. Ein C zu A Austausch im Codon 87 für Arginin (c.374 C>A) in Exon 2 und eine A-Deletion in Intron 7 (IVS7-18delA) (Box *et al.*, 1998).

Das TRP-1-Gen ist auf Chromosom 9p23 lokalisiert. Es entspricht dem sog. *braunen* Gen der Maus auf Chromosom 4, da Mutationen in diesem Gen bei der Maus zur braunen Fellfarbe führen. Beide Gene haben 93 % ihrer cDNA-Sequenz gemeinsam. Das TRP-1-Gen umfasst acht Exons, wobei nur die Exons 2 - 8 für das aus 537 Aminosäuren bestehende TRP-1 codieren. Das erste Exon scheint eine wichtige Rolle bei der effizienten TRP-1-Genexpression zu haben (Sarangerajan und Boissy, 2001).

Das Genprodukt TRP-1 ist in seiner Aminosäuresequenz und seinem Aufbau der Tyrosinase sehr ähnlich, daher wurde es bei seiner Erstbeschreibung als *tyrosinase-related protein* (TRP oder TYRP) bezeichnet. Der Name TRP wurde mit der Ziffer „1“

ergänzt als man ein weiteres ähnliches in die Melaninsynthese der Melanosomen involviertes Protein entdeckte und es TRP-2 nannte (Sarangarajan und Boissy, 2001).

Die Gene der drei Proteine (Tyrosinase, TRP-1 und TRP-2) werden unter dem Namen „Tyrosinase-Gen-Familie“ zusammengefasst, da sie sich in ihrem Aufbau sehr ähnlich sind und alle im Melanosom an dem gleichen Stoffwechselweg der Melaninsynthese beteiligt sind (Sarangarajan und Boissy, 2001).

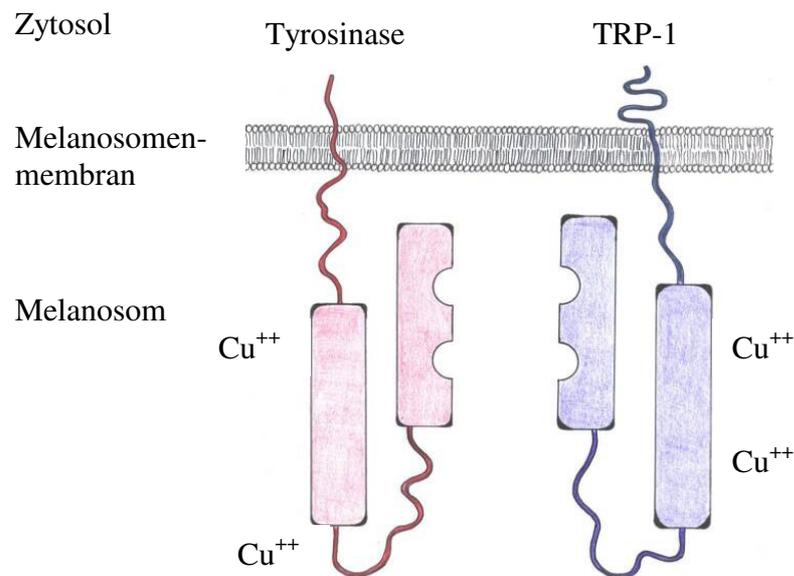


Abb. 4: Modell der Proteine Tyrosinase und TRP-1.

Beide Proteine sind in der Melanosomenmembran lokalisiert. Mit Cu^{++} sind die Kupferbindungsstellen der Proteine gekennzeichnet. Analog zur Homologie der Aminosäure-Sequenz zwischen beiden Proteinen wird auch in ihrem Aufbau ein großes Maß an Ähnlichkeit vermutet. (Umgezeichnet nach Bologna und Orlow, 2003, Abb. 65.11)

Die Ähnlichkeiten von Tyrosinase und TPR-1 zeigen sich vor allem im Aufbau der Proteine. Beide Genprodukte sind in der Membran der Melanosomen lokalisiert (Abb. 4). Sie haben zwei Kupferbindungsstellen, zwei cysteinreiche Domänen, eine Transmembrandomäne, eine Signalsequenz und sechs glykosylierte Stellen gemeinsam. Trotz der Ähnlichkeiten im Aufbau, haben beide Proteine anscheinend unterschiedliche katalytische Funktionen in der Melaninsynthese beim Menschen. Keine der bekannten

Funktionen der Tyrosinase im Melaninstoffwechsel konnte für das TRP-1 nachgewiesen werden. Die Funktion des TRP-1 bei der Maus als DHICAoxidase und andere angenommene katalytische Funktionen konnten für das TRP-1 des Menschen nicht verifiziert werden, so dass die Aufgabe des TRP-1 innerhalb der Melaninsynthese beim Menschen immer noch unklar ist (Sarangerajan und Boissy, 2001).

Nachgewiesen wurde eine stabilisierende Funktion von TRP-1 auf die Tyrosinase und darüber hinaus sogar eine aktive Beteiligung von TRP-1 an der katalytischen Funktion der Tyrosinase (Sarangerajan und Boissy, 2001).

Von Untersuchungen an Melanozyten der Maus ist bekannt, dass Tyrosinase, TRP-1 und TRP-2 in einem hochmolekularen Proteinkomplex miteinander interagieren, was ihre physiologische Lebensdauer verlängert (Winder *et al.*, 1994).

Diese Beobachtungen verdeutlichen die nur ansatzweise verstandene Komplexität der Melaninsynthese mit vielfältigen Aufgaben der beteiligten Proteine und Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen.

Es wird vermutet, dass TRP-1 Funktionen zur Aufrechterhaltung der Melanosomenstruktur besitzt und an der Regulierung der Melanozytenproliferation und des Zelltods der Melanozyten beteiligt sein könnte (Sarangerajan und Boissy, 2001).

1.3.4 Okulokutaner Albinismus Typ 4

Der okulokutane Albinismus Typ 4 (OCA 4) wurde erst kürzlich als eine neue Form des OCA beschrieben (Newton *et al.*, 2001). Ausgehend von der Beobachtung, dass es bei der Maus durch Mutationen im *underwhite* Gen bzw. im *Matp*-Gen auf Chromosom 15 zur Hypopigmentierung kommt, vermutete man einen Zusammenhang des entsprechenden Gens beim Menschen mit OCA. Das *MATP*-Gen beim Menschen wurde auf Chromosom 5 gefunden. Das Protein war bereits unter dem Namen *AIM-1* (*antigen in melanoma*) bekannt, da es als Bestandteil von menschlichen Melanomzellen identifiziert wurde. Um Verwechslungen zwischen dem *AIM-1* des Menschen und einem anderen Protein mit dem Namen *AIM-1* (*absent in melanoma*) bei der Maus zu vermeiden, wurde *AIM-1* des Menschen in *MATP* (*membran associated transporter protein*) umbenannt (Newton *et al.*, 2001).

Das MATP-Gen besteht aus sieben Exons und codiert für ein Protein mit 530 Aminosäuren. Man vermutet aufgrund von computergestützten Analysen, dass das MATP zwölf transmembrane Domänen besitzt und damit den Saccharose-Protonen-Symportern in Pflanzen sehr ähnlich ist.

Die Funktion des MATP wird auch in Zusammenhang mit dem P-Protein in der Melanosomenmembran gesehen. Für das P-Protein wird ein Protonentransport angenommen und dadurch die Aufrechterhaltung des sauren pH-Werts innerhalb der Melanosomen. Da das MATP Ähnlichkeiten mit dem P-Protein aufweist, genau wie dieses in der Melanosomenmembran lokalisiert ist und als Symporter wahrscheinlich ebenfalls Protonen transportiert, könnten beide Proteine für die Regulation des pH-Werts in den Melanosomen verantwortlich sein (Newton *et al.*, 2001).

Bei der Untersuchung von 102 Individuen verschiedener Herkunft mit den phänotypischen Merkmalen des OCA fand man einen Betroffenen aus der Türkei mit einer homozygoten Punktmutation in Exon 2 des MATP-Gens. Weitere Fälle von OCA 4 wurden für die deutsche sowie die japanische Bevölkerung beschrieben (Rundshagen *et al.*, 2004; Inagaki *et al.*, 2004). Innerhalb der 176 untersuchten Individuen mit OCA aus Deutschland konnten fünf mit OCA 4 identifiziert werden. Das bedeutet, dass OCA 4 in der deutschen Bevölkerung mit OCA einen Anteil von 2,84 % ausmachte (Rundshagen *et al.*, 2004). In der japanischen Bevölkerung konnte bei 18 von 75 untersuchten OCA-Fällen ein OCA 4 nachgewiesen werden, also in 24 % der OCA-Fälle. In dieser Untersuchung war OCA 4 sogar häufiger als OCA 2 (8 %) und ist damit nach OCA 1 die zweithäufigste Albinismusform in Japan (Inagaki *et al.*, 2004).

1.3.5 Mit okulokutanem Albinismus assoziierte Syndrome

Das Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) und das Chédiak-Higashi-Syndrom (CHS) sind mit dem okulokutanem Albinismus assoziiert.

Das HPS zeigt klinisch einen OCA, eine Thrombozytenaggregationsstörung mit einer Blutungsneigung und die Akkumulation von Zeroid vor allem in den Zellen der Lunge und des Darms, was zu einer Lungenfibrose und einer granulomatösen Colitis führen kann. Das Syndrom ist weltweit beschrieben worden mit einer ungewöhnlichen Häufung in der Bevölkerung von Puerto Rico, die dort 1:1800 beträgt.

Der OCA kann sich klinisch in allen Facetten der OCA-Phänotypen präsentieren (King, 1998).

Beim Menschen sind mittlerweile sechs verschiedene HPS-Gene identifiziert worden, deren Genprodukte in den meisten Fällen noch unbekannt sind (Tabelle 1, S. 13) (Oetting *et al.*, 2003).

Das CHS ist sehr selten und ist charakterisiert durch eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, eine Hypopigmentation und den Nachweis von Riesengranula in Granulozyten im peripheren Blut. Die Pigmentierung von Haut, Haaren und Iriden ist herabgesetzt. Die Betroffenen zeigen oft keinen eindeutigen OCA-Phänotyp, so dass nur durch den Vergleich innerhalb der Familie eine Hypopigmentierung auffällt. Veränderungen des optischen Apparates sind nicht immer nachweisbar.

Das CHS1-Gen befindet sich auf Chromosom 1 (1q42). Das kodierte Membranprotein scheint beim Vesikeltransport eine Rolle zu spielen (King, 1998).

1.3.6 Okulärer Albinismus Typ 1

Der okuläre Albinismus Typ-1 (OA 1) wird X-chromosomal rezessiv vererbt. Die männlichen Betroffenen zeigen klinisch alle typischen Veränderungen des optischen Apparates beim Albinismus (Kapitel 1.1, S. 7). Die weiblichen Konduktorinnen haben einen normalen Visus und sind nur an der stellenweisen Hypopigmentierung ihrer Netzhaut zu erkennen. Alle Melanozyten, sowohl in den Augen als auch in der Haut, weisen Makromelanosomen auf, wodurch die Differenzierung zwischen OCA und OA morphologisch gelingt. Man vermutet, dass das betroffene Protein ein intrazellulärer G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist und eine Funktion bei späten Stadien der Melanosomentwicklung hat (Shen *et al.*, 2001).

1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Diese Arbeit ist Teil eines Projektes, dessen Ziel die molekulargenetische Charakterisierung von Mutationen bei Albinismus ist.

Dazu wurden in einem geschlossenem Probenkollektiv von 163 nicht verwandten Personen (insgesamt 176 Personen) vorwiegend deutscher Herkunft mit okulokutanem Albinismus die genotypischen Veränderungen in vier Genen untersucht. Es ist bekannt, dass Veränderungen innerhalb dieser Gene zu verschiedenen Typen des okulokutanen Albinismus führen. Die Mutationssuche erstreckte sich auf das Tyrosinase-Gen (OCA 1), das P-Gen (OCA 2), das TRP-1-Gen (OCA 3) und auf das MATP-Gen (OCA 4) (Zühlke *et al.*, 2004).

Bisher gibt es in der Literatur nur zwei Beschreibungen von OCA 3 (Boissy *et al.*, 1996; Manga *et al.*, 1997). Dabei ist OCA 3 nur bei der schwarzen Bevölkerung nachgewiesen worden. Daher sollte in dieser Arbeit das TRP-1-Gen bei dem aus 176 Personen der weißen Bevölkerung bestehendem Kollektiv auf Veränderungen in seiner Nukleotidsequenz untersucht werden.

Die Ziele dieser Arbeit waren:

- die sieben codierenden Exons des TRP-1-Gens (Exon 2 – 8) bei 176 Personen mit okulokutanem Albinismus auf Veränderungen in ihrer Nukleotidsequenz zu untersuchen,
- mögliche Veränderungen gemäß der internationalen Nomenklatur zu benennen und ihre Auswirkungen auf der Proteinebene abzuleiten,
- die gefundenen Mutationen und Polymorphismen mit den aus der Literatur bekannten zu vergleichen,
- die Häufigkeiten für die gefundenen Veränderungen innerhalb des Probenkollektivs zu bestimmen und
- durch den Vergleich mit den anderen Arbeiten innerhalb des Projektes herauszufinden, in wie fern Personen mit Veränderungen im TRP-1-Gen zusätzliche Veränderungen in den anderen drei untersuchten Genen zeigen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Bezeichnung	Hersteller
100 bp DNA Leiter	Gibco BRL
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Aqua ad iniectabilia	Braun
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
Dimethyldichlorsilan (Repel Silan)	Pharmacia
DMSO (Dimethylsulfoxid) 100 %	Merck
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Triplex III)	Merck
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol 100 %	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ficoll 400	Pharmacia
Formaldehyd 37 %	Sigma
Formamid 100 %	Fluka
Glycerin (wasserfrei)	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
NucleoSpin [®] Extract-Kit	Macherey-Nagel
Nukleotide	Q-Biogene
2'Desoxyadenosin 5'- Phosphat	
2'Desoxycytidin 5'- Phosphat	
2'Desoxyguanin 5'- Phosphat	
2'Desoxythymidin 5'- Phosphat	

Rotiophorese Gel 30 (30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid)	Roth
Salpetersäure 65 %	Merck
SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequenzing Kit – LC	Epicentre
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fluka
Silbernitrat	Caelo
Standard Agarose	BMA
Taq DNA-Polymerase	Eppendorf
Taq Puffer mit Mg ²⁺ (10x)	Eppendorf
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Sigma
Tris (hydroxymethyl) –aminomethan	ICN Biomedicals
Urea	Merck
Xylencyanol	Sigma

2.1.2 Stammlösungen

Stammlösung:	Rezept:
100 bp DNA Leiter	5 % (w/v) 100 bp DNA Leiter 33 % (v/v) 6x Ficoll-Lösung
10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) (pH der Gebrauchslösung: 8,3)	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 μ M Ethidiumbromid 2 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 1,5 % (w/v) Standard-Agarose
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dTTP 10 mM dGTP
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
Sequenz-Gellösung	5,5 % (v/v) Acrylamid 0,15 % (v/v) Bisacrylamid 7 M Urea 2 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 0,067 % (v/v) TEMED

2.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide der Tabellen 2 und 3 wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

Exon	Exon-Länge	Oligonukleotide	Sequenz (5'→ 3')
2	385 bp	TRP-1 - 2 F	GTG CTT CAG TCT TCT CTA CA
		TRP-1 - 2 R	TAT GAG AAC CCT CTG GTC AC
3	323 bp	TRP-1 - 3 F	TCA GGA GAA ATC TTC TGG ACT
		TRP-1 - 3 R	TGC ATG TCT TTC TCC AGA CG
4	205 bp	TRP-1 - 4 F	GAA ATG TTG CAA GAG CCT TCT T
		TRP-1 - 4 R	GTT ACA AAG TGT TCC CAG GG
5	168 bp	TRP-1 - 5 F	GCA CCG AGG ATG GGC CAA TT
		TRP-1 - 5 R	CTT CCA CTG TGT TTC GGA AAC
6	180 bp	TRP-1 - 6 F	CCT CCT TAC CAT GTG TCT AG
		TRP-1 - 6 R	ATG CCA TCT AAA CAA TCC GC
7	147 bp	TRP-1 - 7 F	GGA TGC CTT TAG AAC TCA ATA A
		TRP-1 - 7 R	CAG AAT ACC GTG ATT ACT CTA C
8	206 bp	TRP-1 - 8 F	TGG CTT CAA GGC CAT TGT GGC
		TRP-1 - 8 R	TAA TGC ATA AGA GAG TAG GG

Tabelle 2: Oligonukleotide der Exons 2 bis 8 für die PCR zur SSCP-Analyse.

Die Längenangaben der Exons entstammen der mRNA des TRP-1-Gens in Kap. 7.2.1 auf S. 79-82.

Exon	Oligonukleotide	Sequenz (5'→3')
2	TRP1 - 2 F - UNI	UNI - TGA AAG TGG TTT GGG AAG GGG
	TRP1 - 2 R - REV	REV - CCT TGA GTC TCA TGC AGG ACT
2	TRP1 - MID 2 F - UNI	UNI - CAA TTC CCA AGA CAG TGT GCC
	TRP1 - MID 2 R - REV	REV - CTC CCT GAT GAT GAG CCA CA
3	TRP1 - 3 F - UNI	UNI - GGA TAA ATG GGT CGT GGT GTG
	TRP1 - 3 R - REV	REV - GGC ATC TTG TCT GTA AAG AGT C
4	TRP1 - 4 F - UNI	UNI - AGA CTG TCA GAG AGT AGA CCA
	TRP1 - 4 R - REV	REV - TGA AGG CCT TTC AGG CAA CAT
5	TRP1 - 5 F - UNI	UNI - GAG CGA CAA TAA GAA CTC CAA AC
	TRP1 - 5 R - REV	REV - GAG CTT CAT GGT TGA CTC TTC
6	TRP1 - 6 F - UNI	UNI - CCT CCT TAC CAT GTG TCT AG
	TRP1 - 6 R - REV	REV - ATG CCA TCT AAA CAA TCC GC
7	TRP1 - 7 F - UNI	UNI - GGA TGC CTT TAG AAC TCA ATA A
	TRP1 - 7 R - REV	REV - CAG AAT ACC GTG ATT ACT CTA C
8	TRP1 - 8 F - UNI	UNI - TTC AAG GCC ATG TGG CCA ATG
	TRP1 - 8 R - REV	REV - CCA GGT GGT TTT GTG ATA CTA ATG

Tabelle 3: Oligonukleotide der Exons 2 bis 8 für die Primär-PCR.

UNI-Sequenz: TGT AAA ACG ACG GCC AGT

REV-Sequenz: CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Die Oligonukleotide der Tabelle 4 wurden von der Firma MWG hergestellt.

Oligonukleotide	Sequenz 5'→3'
M13-REV (IRD 800)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT-(IRD 800)
M13-UNI (IRD 800)	CAG GAA ACA GCT ATG ACC-(IRD 800)

Tabelle 4: Oligonukleotide für die Sequenz-Reaktion.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung aus Vollblut

In Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Barbara Käsmann-Kellner an der Universitäts-Augenklinik in Homburg an der Saar wurden Blutproben von 176 Personen mit den phänotypischen Merkmalen des okulokutanen Albinismus gesammelt. Die aus diesen Proben isolierte genomische DNA stand mir für die dargestellten Untersuchungen zur Verfügung. Die DNA-Konzentration lag bei 10 ng/µl.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion) ist eine seit 1985 (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986) häufig verwendete Methode, die den Nachweis auch kleinster Mengen spezifischer DNA-Abschnitte und ihre Vervielfältigung ermöglicht. Zur Durchführung der PCR werden, neben der DNA, zwei Oligonukleotide (Primer), die Taq-Polymerase und die Nukleotide dATP, dTTP, dGTP, dCTP benötigt. Die Sequenz der synthetisch hergestellten Primer entspricht beim Vorwärts-(F)-Primer einer Region „vor“ (stromaufwärts, *upstream*) dem untersuchten Abschnitt auf dem codierenden DNA-Strang und beim Rückwärts-(R)-Primer einer Region am Ende des untersuchten Abschnitts (stromabwärts, *downstream*) auf dem nicht codierenden DNA-Strang. Nach der Denaturierung der DNA bei 95°C lagern sich die Primer an die entsprechenden Stellen beider DNA-Stränge an und der Abschnitt zwischen den Primern wird mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase und unter Verwendung der oben erwähnten Nukleotide amplifiziert. Dieser Zyklus aus Denaturierung (95°C), Hybridisierung (Anlagerung, *annealing*) bei 52°C-66°C und Synthese (Amplifikation) bei 72°C wird 25-40 mal durchgeführt. Das Produkt enthält eine große Anzahl von Kopien des untersuchten Abschnitts, da die Anzahl der Kopien exponentiell wächst. Für jede PCR muß bezüglich des Temperaturablaufs, der Zyklenzahl und der Konzentration der Bestandteile eine Optimierung erfolgen.

PCR für die SSCP-Analysen

Bei dem Reaktionsansatz der PCR für die SSCP-Analysen wurden auf insgesamt 25 µl Ansatz 50 ng DNA, je 10 pmol Primer, 0,25 U Taq-Polymerase, 10x Taq-Polymerase-Puffer und je 5 pmol von den Nukleotiden dATP, dTTP, dGTP, dCTP verwendet. Mit Aqua dest. wurde auf 25 µl aufgefüllt.

Bei allen sieben Exons verlief die PCR im Thermocycler Biometra T Gradient bei einer Heizdeckeltemperatur von 104°C und einer Annealing-Temperatur von 55°C mit 30 Zyklen.

Reagenzien		Konzentration	Volumen	Menge
genomische DNA		10 ng/l	5,00 µl	50 ng
Oligonukleotide	TRP-1-x F	10 pmol/l	1,00 µl	10 pmol
	TRP-1-x R	10 pmol/µl	1,00 µl	10 pmol
Taq-Polymerase		5 U/µl	0,05 µl	0,25 U
Taq-Polymerase- Puffer		10x	2,50 µl	
dNTP-Mix		je dNTP 10 pmol/µl	0,50 µl	5 pmol je dNTP
Aqua dest.			14,95 µl	
gesamt:			25,00 µl	

Tabelle 5: PCR-Ansatz für die PCR zur SSCP-Analyse.

Das x bei den Oligonukleotiden steht stellvertretend für die jeweilige Exon Nr. 2 bis 8 (Tabelle 2, S. 26).

Schritt Nr.	Temperatur	Dauer	
0	95°C	Pause	Schritte 2 - 4: 30 mal wiederholen
1	94°C	5 min	
2	94°C	30 s	
3	55 bzw. 57°C	30 s	
4	72°C	30 s	
5	72°C	5 min	
6	4°C	Pause	

Tabelle 6: Programm der PCR für die SSCP-Analyse.

Schritt 0: Vorheizen des Gerätes.

Primär-PCR

Die Primär-PCR ist der erste Schritt bei der Sequenzierung eines DNA-Abschnitts. Ihr Ziel ist es, eine große Anzahl gleichartiger Kopien des DNA-Abschnitts herzustellen, von dem in weiteren Schritten die Sequenz bestimmt werden soll. Die bei dieser PCR verwendeten Primer sind mit einer speziellen Sequenz markiert, die aus 18 Basen besteht. Dabei ist an die Vorwärts-(F)-Primer eine sog. UNI-Sequenz (TGT AAA ACG ACG GCC AGT -Primer) und an die Rückwärts-(R)-Primer eine sog. REV-Sequenz (CAG GAA ACA GCT ATG ACC -Primer) angehängt. Diese Sequenzen bilden bei der späteren Sequenz-PCR den Startpunkt für die DNA-Synthese entlang des markierten DNA-Abschnitts aus der Primär-PCR. Außerdem können die neu synthetisierten DNA-Abschnitte, denen dank der Markierung ein M13-Primer angeschlossen ist, im späteren Sequenz-Gel durch den Laser sichtbar gemacht werden.

Für einen Reaktionsansatz von insgesamt 25 µl wurden 50 ng DNA, je 10 pmol vom Vorwärts-(F)-UNI-Primer und Rückwärts-(R)-REV-Primer, 0,25 U Taq-Polymerase, 10x Taq-Polymerase-Puffer, je 5 pmol von den Nukleotiden dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 1 µl 100 %iges Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet und auf ein Gesamtvolumen von 25 µl mit Aqua dest. aufgefüllt (Tabelle 8, S. 31). Dieser Ansatz wurde für alle Exons mit Ausnahme von Exon 6 verwendet, welches einen Reaktionsansatz ohne Zusatz von DMSO hatte. Aufgrund der Länge von Exon 2 wurde dieses Exon für die Sequenzierung in zwei Abschnitte geteilt (Teil I und Teil II) und jeder Abschnitt mit eigenen Primern weiter untersucht. Die Primer sind in der Tabelle 3 auf Seite 27 aufgeführt. Die Annealing-Temperaturen der einzelnen Exons sind der Tabelle 7 auf Seite 31 zu entnehmen. Die Primär-PCR wurde im Thermocycler Biometra T Gradient bei einer Heizdeckeltemperatur von 104°C durchgeführt. Tabelle 9 auf Seite 31 zeigt das Programm dieser PCR.

Exon Nr.	Annealing-Temperatur (°C)
2 (Teil I)	57
2 (Teil II)	57
3	57
4	57
5	57
6	55
7	55
8	57

Tabelle 7: Annealing-Temperaturen der Exons 2 bis 8 bei der Primär-PCR.

Reagenzien	Konzentration	Volumen	Menge
genomische DNA	10 ng/l	5,00 µl	50 ng
Oligonukleotide	TRP-1-x-F-UNI	10 pmol/l	1,00 µl
	TRP-1-x-R-REV	10 pmol/µl	1,00 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,05 µl	0,25 U
Taq-Polymerase- Puffer	10x	2,50 µl	
dNTP-Mix	je dNTP 10 pmol/µl	0,50 µl	5 pmol je dNTP
DMSO	100%	1,00 µl	
Aqua dest.		13,95 µl	
gesamt:		25,00 µl	

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Primär-PCR für die Exons 2, 3, 4, 5, 7 und 8.

Für das Exon 6 wurde der Reaktionsansatz ohne DMSO und mit 14,95 µl Aqua dest. verwendet. Das x bei den Oligonukleotiden steht stellvertretend für die jeweilige Exon Nr. 2 bis 8 (Tabelle 3, S.27).

Schritt Nr.	Temperatur	Dauer	
0	95°C	Pause	Schritte 2 - 4: 30 mal wiederholen
1	94°C	5 min	
2	94°C	30 s	
3	55 bzw. 57°C	30 s	
4	72°C	30 s	
5	72°C	5 min	
6	4°C	Pause	

Tabelle 9: Programm für die Primär-PCR.

Schritt 0: Vorheizen des Gerätes. Die Annealing-Temperaturen der einzelnen Exons bei Schritt Nr. 3 sind der Tabelle 7 auf Seite 31 zu entnehmen.

2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten nach ihrer Ladung und ihrer Größe, d.h. der Anzahl ihrer Basenpaare.

Daher wurde sie in dieser Arbeit zur Überprüfung von PCR-Produkten angewendet. Dabei wurden die PCR-Produkte zur SSCP-Analyse genauso getestet wie die Produkte der Primär-PCR.

Bei dieser Methode nutzt man die Eigenschaft geladener Moleküle aus, zu dem Pol zu wandern, der ihrer Ladung entgegengesetzt geladen ist. Da in einer Umgebung mit neutralem pH-Wert auch DNA-Stränge aufgrund ihres hohen Gehaltes an negativ geladenen Phosphatgruppen negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zum positiv geladenem Pol (Anode) (Seyffert *et al.*, 1998). Durch die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe kann man bei gleichzeitiger Auftrennung einer zugesetzten 100-Basenpaar-Leiter die Größe der untersuchten DNA-Stränge abschätzen.

Durchführung

Zur Herstellung eines 1,5 %igen Agarose-Gels werden 3 g Standard-Agarose in 200 ml 1x TBE aufgekocht. Nach Zugabe von 7 µl Ethidiumbromid wird die Gel-Lösung im Eisbad auf ca. 50-60°C abgekühlt und anschließend in den Gelträger der Gelkammer gegossen. Durch den vorher eingesetzten Kamm entstehen im erstarrtem Gel sog. Geltaschen. Das fertige erstarrte Gel wird in der Gelkammer mit dem Laufpuffer 1x TBE überschichtet. In die Geltaschen werden die DNA-Stränge und die oben erwähnte 100-Basenpaar-Leiter pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei einer gleichmäßigen Spannung von 90 V in ca. 30 min. Zur Auswertung werden die Gele unter UV-Licht gelegt, wodurch der zugesetzte interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid die DNA-Stränge sichtbar macht (Seyffert *et al.*, 1998). Die anschließende Fotografie mit einem schwarz-weißem Polaroid-Film dokumentiert das Ergebnis.

2.2.4 Analyse von DNA-Einzelsträngen mittels SSCP

Mit Hilfe der SSCP-Analyse (*single strand conformation polymorphism* oder Einzelstangkonnformationspolymorphismus) können in DNA-Einzelsträngen Sequenzveränderungen sichtbar gemacht werden (Orita *et al.*, 1989; Hayashi, 1991).

Durch Denaturieren der doppelsträngigen DNA erhält man Einzelstränge. Diese haben die Eigenschaft, sich unter nicht denaturierenden Bedingungen zu falten, d.h. eine bestimmte Form (Konformation) einzunehmen, die letztlich von ihrer DNA-Sequenz bestimmt wird. Werden diese gefalteten DNA-Einzelstränge einer Elektrophorese im nicht denaturierendem Gel unterworfen, dann wird ihr Laufverhalten wesentlich durch ihre spezifische Form bestimmt. Bereits der Austausch einer Base innerhalb der Sequenz eines DNA-Einzelstranges wirkt sich auf ihr Laufverhalten in der Gelmatrix aus und kann damit nachgewiesen werden. Eine genaue Bestimmung der Veränderung in der DNA-Sequenz ist erst anschließend mit einer Sequenzierung dieses DNA-Abschnittes möglich.

Durchführung

Zur Durchführung der SSCP-Analysen wird zunächst eine Stammlösung für die Gele vorbereitet. Sie setzt sich zusammen aus 150 ml 30 %iger Polyacrylamid-Lösung, 150 ml 5x TBE, 75 ml Glycerol anhydrosus, 500 µl TEMED und Aqua dest., mit welchem auf ein Volumen von 750 ml aufgefüllt wird. Man erhält damit 750 ml einer Gellösung mit 6 % Polyacrylamid und 10 % Glycerin, die bei 4°C gelagert wird.

Von dieser Stammlösung werden pro Gel 75 ml entnommen, entgast und kurz vor dem Gießen des Gels mit 500 µl 10 %iger Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) vermischt. Damit startet der Vorgang der Polymerisation. Das Gel wird zügig zwischen zwei vorher gründlich mit 100 %igem Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen. Als Abstandhalter dienen zwei *Spacer* mit einer Dicke von 0,35 mm und bestimmen damit die Dicke des gegossenen Gels. Insgesamt sechs Klammern fixieren die beiden Glasplatten mit den dazwischen liegenden *Spacern* bis das Gel polymerisiert ist. In das noch flüssige Gel wird die glatte Seite eines 0,35 mm dicken Haifischzahnkammes zwischen die Platten geschoben. Damit entsteht ein Hohlraum für die späteren Einfülltaschen.

Nach ca. einer Stunde ist die Polymerisation des Gels abgeschlossen. Die Klammern werden entfernt und auch der Kamm wird vorerst herausgenommen. Die beiden Glasplatten mit dem dazwischen liegendem Gel werden in die Gelkammer eingebaut. Als Laufpuffer wird 1x TBE verwendet. Der Kamm wird mit seiner gezähnten Seite in den Hohlraum zwischen den Glasplatten bis in die Gelkante vorgeschoben. Für die Befüllung der auf diese Weise entstandenen Taschen werden die PCR-Produkte (je 25 µl) mit je 12 µl Formamid-Farbe vermischt. Durch die Verwendung der Formamid-Farbe und anschließende Hitze von 95°C für die Dauer von 5 min wird die DNA denaturiert. Von den so vorbereiteten Proben kommen je 4 µl in jede Tasche.

Bei 20 Watt wird, je nach Länge des untersuchten Exons, eine Laufzeit von 4 bis 6 Stunden benötigt.

Danach werden die Glasplatten aus der Gelkammer herausgenommen und mit einem Keil voneinander getrennt. Durch die Beschichtung der kleineren Glasplatte mit Repel-Silan[®] bleibt das gesamte Gel auf der größeren Glasplatte haften. Die Spacer und der Kamm werden entfernt und über das Gel wird ein spezieller Holzrahmen mit Klemmen befestigt.

Die nun folgende Silbernitratfärbung umfasst folgende Schritte:

1. Überschichten des Gels mit 10 %igem Ethanol für 10 min.
2. Überschichten des Gels mit 1 %iger Salpetersäure für 5 min.
3. Dreimalige Spülung des Gels mit Aqua dest..
4. Färbung des Gels durch 20 minütiges Überschichten mit einer Silbernitrat-Lösung (2,02 g AgNO₃/l).
5. Zweimalige Spülung des Gels mit Aqua dest..
6. Entwicklung nach Sicht durch Überschichten des Gels mit einer Entwicklungs-Lösung (*Reducer*-Lösung). Diese besteht pro Liter aus 29,6 g wasserfreiem Natriumcarbonat und 540 µl 37 %iger Formaldehyd-Lösung.
7. Sind klare Banden erkennbar wird die Entwicklung mit einer 10 %igen Essigsäure-Lösung gestoppt und 3 min auf dem Gel belassen.
8. Zuletzt wird das Gel 5 min lang mit Aqua dest. überschichtet.

Nach der Silbernitratfärbung wird der Holzrahmen entfernt und das Gel zurechtgeschnitten. Ein entsprechend großes Stück Whatman-Papier wird auf das Gel aufgelegt und kann anschließend zusammen mit dem Gel von der Glasplatte abgelöst werden.

Der letzte Schritt ist die Trocknung des Gels auf einem Trockner mit Vakuumpumpe bei 70°C, was etwa 2 h in Anspruch nimmt. Das fertige, trockene Gel kann mit einer selbstklebenden, durchsichtigen Folie beklebt werden, um es beständiger zu machen.

2.2.5 DNA-Sequenzierung mit der Didesoxymethode

Die Didesoxymethode, die auch Kettenabbruchmethode genannt wird, geht auf Sanger zurück (Sanger *et al.*, 1977). Mit dieser Methode kann die Basenabfolge eines DNA-Abschnitts bestimmt werden. Sie basiert auf der Neusynthese eines komplementären DNA-Einzelstranges entlang einer DNA-Matrize. Diese DNA-Neusynthese erfolgt unter anderem unter Verwendung der vier Nukleotidtriphosphate dATP, dTTP, dGTP und dCTP. Allerdings werden diesen Nukleotiden zusätzlich in geringer Menge Didesoxynukleotide beigemischt. Den Didesoxynukleotiden fehlt an der 3'-Stelle der Desoxyribose eine OH-Gruppe, wodurch kein weiteres Nukleotid angelagert werden kann. Immer wenn ein Didesoxynukleotid eingebaut wird, kommt es zum Kettenabbruch bei der DNA-Neusynthese. Da der Einbau eines Didesoxynukleotids zufällig erfolgt, entsteht ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Strängen (Seyffert *et al.*, 1998).

Die beschriebene Synthese wird auf vier Ansätze aufgeteilt, wobei in jedem Ansatz alle vier Nukleotidtriphosphate vorhanden sind aber jeweils nur ein Didesoxynukleotid (ddATP oder ddTTP oder ddGTP oder ddCTP). Das bedeutet, dass es in einem Ansatz immer an einem bestimmten Nukleotid zum Kettenabbruch kommt (entweder nur an einem Adenin, einem Thymin, einem Guanin oder einem Cytosin) (Seyffert *et al.*, 1998).

Die vier Ansätze werden anschließend auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel nebeneinander aufgetragen und die unterschiedlich langen DNA-Stränge werden elektrophoretisch ihrer Länge nach aufgetrennt (Seyffert *et al.*, 1998). Die DNA-Stränge

passieren bei ihrer Wanderung durch das Polyacrylamid-Gel einen Laserstrahl, der ihre Farbstoffmarkierung zur Fluoreszenz anregt und sie als Banden sichtbar macht. Die aufeinander folgenden Banden der vier benachbarten Ansätze unterscheiden sich nur durch jeweils ein Nukleotid, so dass die Sequenz direkt abgelesen werden kann.

Durchführung:

1. Primär-PCR

Vor der Sequenzierung wird eine PCR durchgeführt, die die DNA-Matrizen für die Sequenz-Reaktion liefert (Kap. 2.2.2, S. 30-31).

2. DNA-Aufreinigung

Die Produkte der Primär-PCR werden mit der Nukleo-Spin-Säule des NucleoSpin[®]Extract-Kits der Firma Macherey-Nagel gereinigt, bevor sie als DNA-Matrizen verwendet werden.

Zur DNA-Aufreinigung wird jedes Primär-PCR-Produkt (20 µl) zusammen mit 80 µl Aqua dest. und 400 µl NT2-Puffer auf eine Säule gegeben und bei 14000 rpm 1 min lang zentrifugiert. Die DNA bleibt in der Membran der Säule und das entstandene Eluat wird verworfen. Nach Zugabe von 600 µl NT3-Puffer wird wieder bei 14000 rpm 1 min lang zentrifugiert. Auch dieses Eluat wird verworfen. In einem letzten Reinigungsschritt werden 200 µl NT3-Puffer auf die Säule gegeben und diesmal 2 min lang bei 14000 rpm zentrifugiert. Dadurch soll möglichst wenig vom NT3-Puffer in der Membran zurückbleiben. Die DNA wird schließlich mit 25 µl NE-Puffer durch 1 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm aus der Säulenmembran herausgelöst und in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Die gereinigte DNA wird bei -20°C gelagert.

3. Sequenz-Reaktion

Die Sequenz-Reaktion wird mit Hilfe des SequiTherm EXCELTM II DNA Sequenzing Kits - LC der Firma Epicentre durchgeführt. Da man von jedem untersuchten

DNA-Abschnitt die Sequenz beider komplementärer DNA-Stränge bestimmen möchte, werden für jeden DNA-Strang vier Ansätze für die vier Basen A, T, G, C benötigt, also insgesamt acht Ansätze.

Zuerst werden für jede Base 2 µl aus einem entsprechenden EXCEL II – LC Termination – Mix (Mix A, Mix T, Mix G oder Mix C) vorgegeben. In jedem Mix sind die vier dNTPs mit einer jeweiligen Konzentration von 45 µM vorhanden. Außerdem enthalten Mix A ddATP und Mix T ddTTP mit einer Konzentration von 450 µM, Mix G ddGTP mit einer Konzentration von 30 µM und Mix C ddCTP mit einer Konzentration von 300 µM.

Für jeden der beiden Stränge wird nun ein Reaktionsansatz von insgesamt 17 µl vorbereitet und dann auf die vier Reaktionsgefäße mit je 4 µl aufgeteilt.

Dieser Reaktionsansatz besteht aus:

- 3 µl des gereinigten Primär-PCR-Produktes,
- 7,2 µl 3,5x SequiTherm EXCEL II Sequenzing Buffer,
- 0,3 µl 100 %igem DMSO,
- 5 U SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase,
- 0,7 µl M13-UNI-Primer oder M13-REV-Primer (1 pmol/µl),
- 4,8 µl Aqua dest..

Beide Reaktionsansätze unterscheiden sich nur durch die Verwendung zwei unterschiedlicher Standard-Primer. Es wird entweder ein M13-UNI-Primer oder ein M13-REV-Primer verwendet. Die Sequenz des M13-UNI-Primers entspricht der UNI-Sequenz der Primär-PCR-Produkte, wobei die Sequenz des M13-REV-Primers der REV-Sequenz der Primär-PCR-Produkte entspricht (Kap. 2.2.2, S. 30ff). Außerdem besitzen beide Primer ein Farbstoffmolekül (IRD 800), das durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Dadurch können bei der Gelelektrophorese die Produkte der Sequenz-Reaktion, während sie bei ihrer Wanderung durch die Gelmatrix den Laserstrahl passieren, zur Fluoreszenz angeregt werden. Ein Detektor erkennt diese Signale und macht die Produkte als Banden sichtbar.

Die Sequenz-Reaktion wird im BIOMETRA UNO II – Thermocycler durchgeführt. Bei einer Heizdeckeltemperatur von 104°C wird bei 95°C für 5 min zunächst denaturiert.

Dann folgen 30 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 95°C für 30 s, dem Anlagern der Primer bei 60°C für 30 s und der 1 minütigen DNA-Synthese-Phase bei 72°C (Tabelle 10, S. 37). Zu den Produkten werden 3 µl der Stop-Lösung aus dem Kit hinzugefügt. Anschließend werden sie bei –20°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Schritt Nr.	Temperatur	Dauer	
0	95°C	Pause	
1	94°C	5 min	
2	94°C	30 s	Schritte 2 - 4: 30 mal wiederholen
3	60°C	30 s	
4	72°C	1 min	
5	4°C	Pause	

Tabelle 10: PCR-Programm der Sequenz-Reaktion.

4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Sequenz-Gele wird eine 5,5 %ige Polyacrylamid-Gellösung hergestellt. Dazu vermischt man 92 ml 30 %iger Polyacrylamid-Lösung mit 50 ml 10x TBE-Puffer und 333 µl TEMED. Darin wird unter Zugabe von ca. 300 ml Aqua dest. 212,1 g Urea aufgelöst und zuletzt mit Aqua dest. auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt.

Vor dem Gießen des Gels werden die beiden 41cm langen Glasscheiben gründlich mit Aqua dest., danach mit einer 20 %igen SDS-Reinigungslösung und schließlich mit 100 %igem Ethanol gereinigt und mit zwei Abstandshaltern (*Spacern*) mit einer Dicke von 0,2 mm zusammengesetzt. Für ein Gel werden von der vorgefertigten Gebrauchslösung 45 ml entnommen und mit 300 µl einer 10 %igen Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) versetzt. Damit wird zwischen die zwei Glasscheiben ein Gel gegossen. In das noch flüssige Gel wird ein Haifischzahnkamm von 0,2 mm Dicke mit seiner glatten Seite hineingeschoben. Damit entsteht ein Hohlraum für die später benötigten Taschen zum Einbringen der Proben. Nach der einstündigen Polymerisation werden die Außenseiten der Glasscheiben in gleicher Weise wie zuvor ihre Innenseiten in drei Schritten gründlich gereinigt. Diese Reinigung entfernt störende Schmutzpartikel, die vom Laserstrahl wie die Farbstoffmoleküle der Proben zur Fluoreszenz angeregt werden können und damit zusätzliche falsche Signale liefern können.

Der Kamm wird herausgenommen und die Glasscheiben mit dem Gel werden in den LICOR DNA Sequenzer Long ReadIR 4200 eingebaut. Als Laufpuffer wird 1x TBE-Puffer verwendet. Die gezähnte Seite des zuvor herausgenommenen Haifischzahnkammes wird nun bis in die Gelkante vorgeschoben.

Vor dem Laden der Proben wird ein 20 minütiger Vorlauf (*Pre-Run*) gestartet und die Sequenz-Ansätze werden bei 95°C 5 min lang denaturiert und anschließend abgekühlt. Dann werden die Proben in die 48 Taschen pipettiert, die zwischen den Zähnen des Kammes an der Gelkante entstanden sind. Bei der Befüllung der Taschen wird immer die Reihenfolge ATGC beibehalten.

Der Lauf wird bei einer Spannung von 2000 V durchgeführt. Die Dauer des Laufes hängt von der Länge des sequenzierten DNA-Abschnitts ab. Der Laser regt das Farbstoffmolekül IRD 800 der Proben zur Fluoreszenz an. Diese wird dann von einem Detektor bei 800 nm registriert und vom Computer in sichtbare Banden umgewandelt. Die Bestimmung der Sequenz aus der Bandenabfolge erfolgt mit dem Programm LICOR e-SeqV2.0. Die Auswertung und Visualisierung der erhaltenen Sequenz erfolgt mit dem Programm SeqWorks!V1.01 beta von Dr. med. Sven Opitz (Universität zu Lübeck). Durch den Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der cDNA-Wildtypsequenz* können Veränderungen in der Basenabfolge des sequenzierten DNA-Abschnittes festgestellt werden.

*Es wurde die elektronische ncbi Datenbank benutzt unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Nr. der humanen c-DNA-Sequenz des TRP-1-Gens: AF001295 (Kap. 6.2, S. 74).

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Exons 2 bis 8 des TRP-1-Gens

Die sieben codierenden Exons des TRP-1-Gens (Exon 2 – Exon 8) wurden einzeln mittels PCR amplifiziert. Da Exon 1 nicht codierend ist, wurde es bei dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Nach Kontrolle der PCR-Produkte auf Agarose-Gelen konnten Mutationen und Polymorphismen mit der SSCP-Analyse auf Polyacrylamid-Gelen und anschließender Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Von den auffälligen Proben in der SSCP-Analyse wurde mit der Didesoxymethode die Nukleotid-Sequenz bestimmt und durch den Vergleich mit der Wildtyp-Nukleotid-Sequenz auf Veränderungen in der Sequenz untersucht.

3.2 Ergebnisse der SSCP-Analysen

Die SSCP-Gele können sowohl im Bereich der einzelsträngigen DNA-Banden (ss = single stranded, einzelsträngig) als auch im Bereich der doppelsträngigen DNA-Banden (ds = double stranded, doppelsträngig) unterschiedliche Bandenmuster (M) aufweisen. Die Unterschiede in den Bandenmustern weisen auf Konformationsunterschiede und damit letztlich auf Veränderungen in der Nukleotid-Sequenz hin. In den folgenden Abbildungen 5 bis 9 befinden sich die ss-DNA-Banden jeweils oben, die ds-DNA-Banden jeweils unten im Bild.

3.2.1 Exon 2

In Exon 2 zeigten insgesamt 24 der 176 Proben eine Abweichung im Bandenmuster gegenüber dem Wildtyp. Davon zeichneten sich 23 Proben durch eine gleichartige Veränderung der ds-DNA-Bande im Sinne einer Doppelbande aus. Eine Probe mit der Nr. 7533 wies sowohl im ss-DNA-Bereich als auch im ds-DNA-Bereich mit Mehrfachbanden ein eigenständiges Bandenmuster auf (Abb. 5).

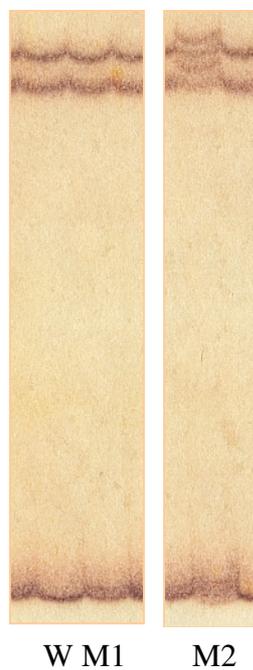


Abb. 5: Ausschnitte aus SSCP-Gelen des Exons 2

W $\hat{=}$ Wildtyp

M1 $\hat{=}$ Beispiel einer der 23 gleichartig auffälligen Proben

M2 $\hat{=}$ Probe Nr. 7533

3.2.2 Exon 3

In Exon 3 konnte in der SSCP-Analyse nur eine auffällige Probe entdeckt werden: Probe 7533 (Abb. 6).



W M1

Abb. 6: Ausschnitt aus einem SSCP-Gel des Exons 3

W $\hat{=}$ Wildtyp

M1 $\hat{=}$ Probe Nr. 7533

3.2.3 Exon 4

In Exon 4 wiesen alle 176 Proben das gleiche Bandenmuster in der SSCP-Analyse auf.

3.2.4 Exon 5

Für Exon 5 waren zwei von 176 Proben auffällig: 7419 und 7468. Die Bandenmuster der beiden Proben waren nicht identisch (Abb. 7).

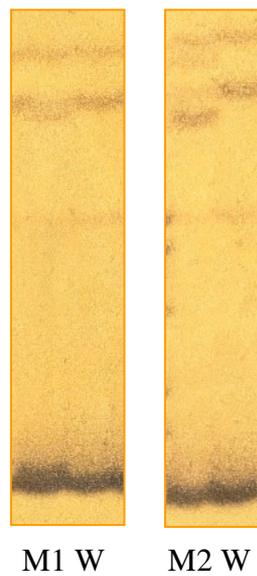


Abb. 7: Ausschnitte aus SSCP-Gelen des Exons 5

W $\hat{=}$ Wildtyp

M1 $\hat{=}$ Probe Nr. 7419

M2 $\hat{=}$ Probe Nr. 7468

3.2.5 Exon 6

In Exon 6 traten bei insgesamt 176 Proben fünf verschiedene Bandenmuster auf (Abb. 8). Dabei fand sich folgende Verteilung: das Bandenmuster M1 zeigten 61 Proben, das Bandenmuster M2 82 Proben und M3 32 Proben. Weiterhin zeigte Probe Nr. 7450 das Bandenmuster M4, Probe Nr. 7512 Bandenmuster M5.

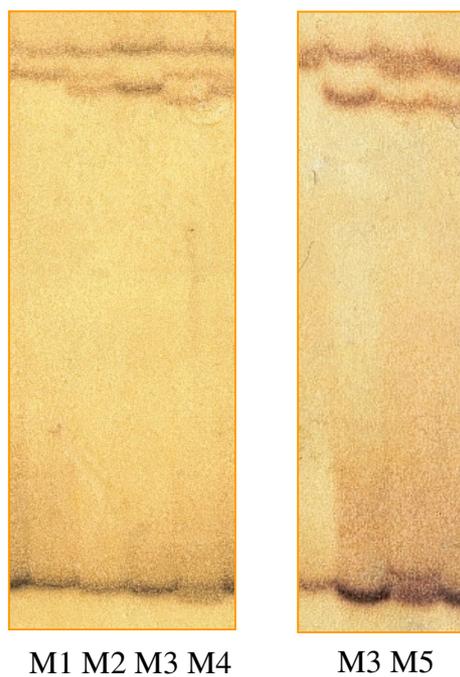


Abb. 8: Ausschnitte aus SSCP-Gelen des Exons 6

M1 $\hat{=}$ Beispiel für 61 gleichartig auffällige Proben

M2 $\hat{=}$ Beispiel für 82 gleichartig auffällige Proben

M3 $\hat{=}$ Beispiel für 32 gleichartig auffällige Proben

M4 $\hat{=}$ Probe Nr. 7450

M5 $\hat{=}$ Probe Nr. 7512

3.2.6 Exon 7

In Exon 7 konnten in keiner der 176 Proben Abweichungen im Bandenmuster nachgewiesen werden.

3.2.7 Exon 8

In Exon 8 traten bei insgesamt 176 Proben drei verschiedene Bandenmuster auf, die jeweils andere Änderungen in den ds-DNA-Banden zeigten.

Das Bandenmuster M1 trat nur bei Probe Nr. 7519 auf, das Bandenmuster M2 bei 103 Proben und das Bandenmuster M3 bei 72 Proben (Abb. 9).

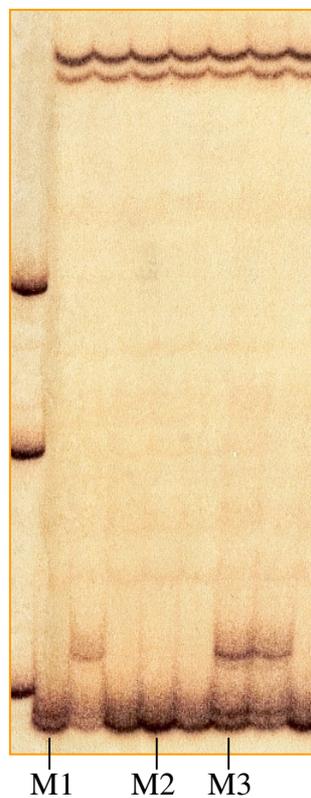


Abb. 9: Ausschnitt aus einem SSCP-Gel des Exons 8

M1 $\hat{=}$ Probe Nr. 7519

M2 $\hat{=}$ Beispiel für 103 gleichartig auffällige Proben

M3 $\hat{=}$ Beispiel für 72 gleichartig auffällige Proben

3.3 Ergebnisse der DNA-Sequenzierung

Alle Proben, die in der SSCP-Analyse ein einmalig auffälliges Bandenmuster zeigten, wurden sequenziert. Außerdem wurde die Sequenz von ein bis drei per Zufall ausgewählten Proben pro Exon bestimmt, die mehrheitlich das gleiche Bandenmuster zeigten. Man konnte bei diesen Proben die Wildtypsequenz vermuten. Sie werden nachfolgend als Kontrollen bezeichnet. War es nicht ersichtlich, welches der aufgetretenen Bandenmuster dem Wildtyp entsprach (wie bei Exon 6 und Exon 8), so wurden von jeder Art zwei Proben zufällig ausgesucht und sequenziert.

Damit wurden insgesamt 51 Proben sequenziert. Da aufgrund der Länge von Exon 2 alle 25 Proben in zwei Abschnitte geteilt werden mussten und jeder Abschnitt separat sequenziert wurde, ergaben sich damit insgesamt 76 Sequenzierungen.

Die Sequenz der untersuchten Proben wurde mit der Wildtypsequenz (Zugangsnummer: AF001295) aus der elektronischen NCBI-Datenbank (Kap.6.2, S. 74) verglichen. Um das Auffinden und die Beurteilung von Veränderungen in der Sequenz einfacher und sicherer zu machen, wurden beide DNA-Stränge eines PCR-Produktes sequenziert. Dabei konnten heterozygote sowie homozygote Veränderungen im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz identifiziert werden. Aus Veränderungen in der Basenabfolge wurden die Auswirkungen auf Protein-Ebene abgeleitet.

Die Sequenz-Veränderungen wurden entsprechend der internationalen Nomenklatur benannt (Antonarakis *et al.*, 1998; Dunnen und Antonarakis, 2001). Die Zählung der Nukleotide des TRP-1-Gens beginnt mit dem „A“ des Startcodons ATG, welches für Methionin codiert (A $\hat{=}$ 1. Nukleotid).

Bei allen gefundenen Veränderungen handelt es sich um Punktmutationen in Form von Basenaustauschen. Die gefundenen Mutationen im TRP-1-Gen werden nachfolgend für die einzelnen Exons dargestellt und abschließend in zwei Übersichtstabellen zusammengefasst.

3.3.1 Exon 2

Die Sequenz des Exons 2 wurde bei insgesamt 25 Proben bestimmt. Die Probe Nr. 7484 diente als Kontrolle und ihre Sequenz entsprach der Wildtypsequenz. Von den 23 in der SSCP-Analyse gleichartig auffällig gewordenen Proben zeigten 22 Proben (Nr.: 7426, 7431, 7433, 7485, 7455, 7501, 7478, 7498, 7557, 7522, 7586, 7665, 7585, 7524, 7530, 7571, 7570, 7556, 7503, 7420, 7535, 7411) die Punktmutation c.259 C>A (Abb. 10 und 11). Das bedeutet, dass an Position 259 die Base Cytosin durch Adenosin ersetzt ist. In allen 22 Proben war diese Mutation heterozygot. Sie führte auf Protein-Ebene zu keiner Veränderung in der Aminosäureabfolge (p.87 Arg). Eine solche Mutation wird auch als stille Mutation (*silent mutation*) bezeichnet.

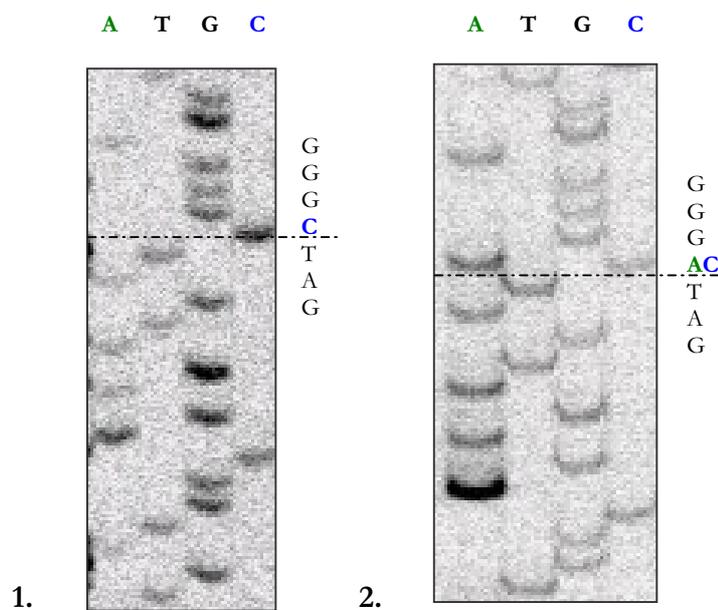


Abb. 10: Ausschnitte aus den Sequenzanalysen von Exon 2.

1.: Wildtypsequenz. Man erkennt an der Position 259 (gestrichelte Linie) eine Bande, die einem C entspricht. Die Sequenz lautet dementsprechend GAT**C**GGG.

2.: Ausschnitt aus der Sequenz einer der 22 Proben mit der Mutation c.259 C>A in Exon 2 entsprechend der Stelle beim Wildtyp. An der Position 259 (gestrichelte Linie) sieht man zwei Banden, von denen eine einem **A** die andere einem **C** entspricht. Der Austausch **C>A** liegt heterozygot vor.

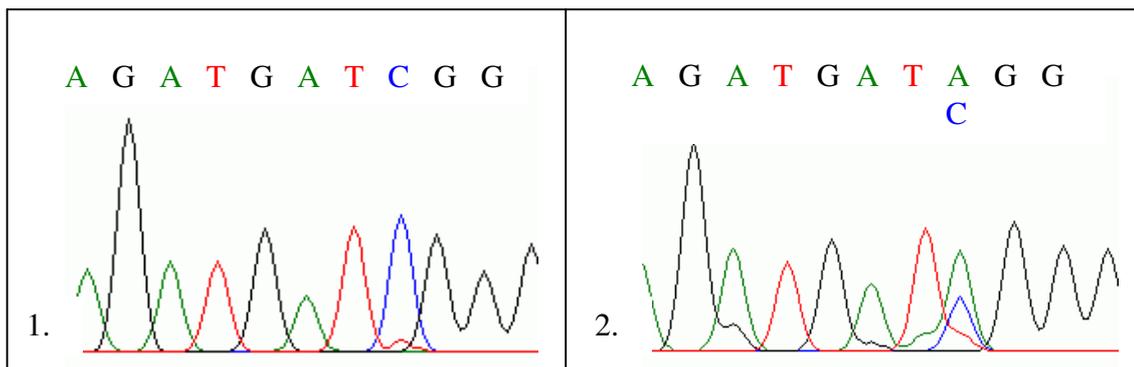


Abb. 11: Ausschnitte aus Sequenz-Diagrammen von Exon 2.

- 1.: Ausschnitt aus der Wildtypsequenz von Exon 2. Die Base C an der Position 259 ist blau markiert.
- 2.: Die gleiche Stelle in der Sequenz von Exon 2 bei einer der 22 Proben mit der Mutation c.259 C>A. An der Position 259 sieht man zwei sich überlagernde Kurven. Dies deutet auf den Austausch der Base C gegen A in einem der Allele hin, d.h. auf eine heterozygote Mutation an der Position 259.

Eine der 23 gleichartig auffälligen Proben (Nr. 7558) zeigte die heterozygote Mutation: c.208 G>A. Hier fand der Austausch der Base Guanin an Position 208 gegen Adenosin statt. Die Folge dieser Mutation auf Proteinebene ist der Austausch der Aminosäure Alanin gegen Tyrosin an Position 40 (p.40 Ala>Thr).

Probe Nr. 7533 zeigte, obwohl sie ein eigenständig verändertes Bandenmuster in der SSCP-Analyse aufwies, heterozygot die Mutation c.259 C>A, wie sie bei den 22 gleichartig veränderten Proben gefunden wurde.

3.3.2 Exon 3

Es wurden insgesamt drei Proben sequenziert. Zwei Proben (Nr. 7410 und Nr. 7441) dienten dabei als Kontrolle. Ihre Sequenzen entsprachen der Wildtypsequenz. Die auffällige Probe Nr. 7533 wies in ihrer Sequenz eine heterozygote Punktmutation auf. An Position 457 wurde die Base Cytosin gegen Thymin ausgetauscht (c.457 C>T). Im Protein führte diese Veränderung zu einem Austausch der Aminosäure Arginin gegen Cystein (p.153 Arg>Cys).

3.3.3 Exon 4

Da alle untersuchten Proben in der SSCP-Analyse das gleiche Bandenmuster zeigten, wurden lediglich drei Kontrollen untersucht (Proben Nr. 7634, 7481, 7484). Alle drei Proben wiesen die Wildtypsequenz auf.

3.3.4 Exon 5

In diesem Exon wurden in zwei auffälligen Proben zwei verschiedene heterozygote Mutationen gefunden. Bei Probe Nr. 7419 ergab die Sequenzierung die Punktmutation c.936 G>C. Die Konsequenz im Protein ist eine Veränderung an der Position 312 von Arginin zu Serin (p.312 Arg>Ser). Bei Probe 7468 fand sich an Position 1037 ein Austausch von Cytosin gegen Guanin (c.1037 C>G), was auf Protein-Ebene zu einem Austausch von Prolin gegen Arginin (p.346 Pro>Arg) führt.

Die beiden untersuchten Kontrollen (Probe Nr. 7575 und Probe Nr. 7582) zeigten keine Veränderungen im Vergleich zur Wildtypsequenz.

3.3.5 Exon 6

Bei Exon 6 wurden in der SSCP-Analyse fünf verschiedene Bandenmuster identifiziert (Abb. 8, S. 44). Vom Bandenmuster M1 wurden die Proben Nr. 7504 und 7511 sequenziert. Sie zeigten die Wildtypsequenz. Für die Bandenmuster M2 und M3 wurden auch jeweils zwei Proben untersucht. Es zeigte sich, dass die beiden ausgewählten Proben vom Typ M2 (Proben Nr. 7440 und 7520) heterozygot und die beiden Proben vom Typ M3 (Proben Nr. 7412 und 7420) homozygot für die gleiche DNA-Variation waren. Diese befand sich im Intron und wies den Ersatz der Base Thymin gegen Cytosin auf (c.1261+20 T>C). Da die Introns eines Gens nicht für die Herstellung des Proteins verwendet werden, ergibt sich bei einer Sequenzänderung im Intron keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.

Probe 7450 fiel in der SSCP-Analyse durch das eigenständige Bandenmuster M4 auf. Ihre Sequenzierung ergab keine Veränderungen im Exon-Bereich.

Das einmalige Bandenmuster M5 gehörte zur Probe Nr. 7512. Ihre Sequenz war an der Position 1226 durch einen Austausch eines Cytosins gegen ein Thymin verändert (c.1226 C>T). Diese heterozygote Mutation führt im Protein zum Austausch der Aminosäure Alanin gegen Valin (p.409 Ala>Val). Eine zweite heterozygote

Veränderung in der Basenabfolge ließ sich im Intron-Bereich nachweisen (c.1261+20 T>C). Diese DNA-Variation wiesen bereits die beiden Proben mit dem Bandenmuster M2 auf.

3.3.6 Exon 7

Da keine Probe in der SSCP-Analyse in diesem Exon Auffälligkeiten zeigte, wurden drei Kontrollen sequenziert. Die Sequenzen der Proben Nr. 7497, 7492 und 7577 waren mit der Wildtypsequenz identisch.

3.3.7 Exon 8

Die SSCP-Analyse für Exon 8 zeigte drei verschiedene Bandenmuster (Abb. 9, S. 45). Probe Nr.7519 hatte das Bandenmuster M1. Ihre Sequenz entsprach jedoch der Wildtypsequenz. Zwei Proben (Nr. 7542 und 7505) mit dem Bandenmuster M2 wurden untersucht. Davon fand sich in Probe Nr. 7542 keine Veränderung in der Basenabfolge (=Wildtyp) und in der Probe Nr. 7505 eine homozygote DNA-Variation im Intron-Bereich (c.1409-68 G>C). Die gleiche DNA-Variation im Intron zeigte auch eine der untersuchten Proben mit dem Bandenmuster M3. Allerdings war diese DNA-Variation bei der Probe Nr. 7715 heterozygot. Eine weitere Probe (Nr. 7471), die in der SSCP-Analyse das Bandenmuster M3 aufwies, zeichnete sich durch eine Mutation im Exon-Bereich aus. Der Austausch von Thymin gegen Cystein an Position 1410 (c.1410 T>C) wirkt sich nicht auf die Aminosäurenabfolge im Protein aus (p.470 Ser).

3.3.8 Tabellarische Übersicht

Intron Nr.	Probe Nr.	Veränderung auf DNA-Ebene	homozygot	heterozygot
6	7512	c.1261+20 T>C		X
6	7420	c.1261+20 T>C	X	
6	7412	c.1261+20 T>C	X	
6	7520	c.1261+20 T>C		X
6	7440	c.1261+20 T>C		X
7	7505	c.1409-68 G>C	X	
7	7715	c.1409-68 G>C		X

Tabelle 11: Übersicht über die gefundenen DNA-Variationen im Intronbereich.

Exon Nr.	Probe Nr.	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Protein-Ebene	homozygot	heterozygot
2	7558	c.208 G>A	p.70 Ala>Thr		X
2	7533	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7426	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7431	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7433	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7485	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7455	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7501	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7478	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7498	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7557	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7522	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7586	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7665	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7585	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7524	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7530	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7571	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7570	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7556	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7503	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7420	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7535	c.259 C>A	p.87 Arg		X
2	7411	c.259 C>A	p.87 Arg		X
3	7533	c.457 C>T	p.153 Arg>Cys		X
5	7419	c.936 G>C	p.312 Arg>Ser		X
5	7468	c.1037 C>G	p.346 Pro>Arg		X
6	7512	c.1226 C>T	p.409 Ala>Val		X
8	7471	c.1410 T>C	p.470 Ser		X

Tabelle 12: Übersicht über die gefundenen Veränderungen im Exonbereich.

4. DISKUSSION

4.1 Mutationen im TRP-1-Gen

Im untersuchten Kollektiv von 176 Individuen mit phänotypischen OCA wurden fünf Personen mit jeweils einer heterozygoten *Missense*-Mutation im TRP-1-Gen identifiziert. Da der OCA autosomal rezessiv vererbt wird, können nur Mutationen, die beide Allele betreffen, zur genetischen Absicherung dienen: es können dabei homozygote Mutationen oder *compound* heterozygote Mutationen vorliegen.

Die in dieser Arbeit gefundenen einzelnen heterozygoten Mutationen im TRP-1-Gen können allein demnach nicht die Ursache eines OCA 3 sein. Daher ist bei keinem der fünf Mutationsträger ein OCA 3 molekulargenetisch gesichert.

4.1.1 Mögliche Auswirkungen der TRP-1-Gen-Mutationen auf das Protein

Welche Auswirkungen eine *Missense*-Mutation auf die Funktion des Genproduktes hat, hängt davon ab, welche Aminosäuren ausgetauscht werden und an welcher Stelle im Protein dieser Austausch stattfindet. Die Aminosäuren unterscheiden sich durch ihre Seitenketten, die ihre chemischen Eigenschaften bestimmen und werden in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Es wird z. B. zwischen hydrophoben und hydrophilen, basischen und sauren oder polaren und unpolaren Aminosäuren unterschieden. Letztlich bestimmt die Aminosäuresequenz (Primärstruktur des Proteins) die räumliche Struktur des Proteins (Sekundär- und Tertiärstruktur) und seine Funktion. Bei heterozygoten Trägern einer Mutation im Tyrosinase-Gen, die klinisch der normal pigmentierten Kontrollgruppe entsprachen, konnten signifikant erniedrigte Werte der Tyrosinase-Aktivität nachgewiesen werden (King und Witkop, 1977). Ähnliche Beobachtungen hat man bei der autosomal rezessiv vererbten Phenylketonurie gemacht. Bei den heterozygoten Mutationsträgern dieser Erkrankung konnten ebenfalls messbare phänotypische Veränderungen in Form von erniedrigter Enzymaktivität nachgewiesen werden (Vogel, 1984). Daher werden nachfolgend bei den fünf gefundenen heterozygoten *Missense*-Mutationen mögliche Veränderungen des Proteins diskutiert.

Person 7558

Bei Person 7558 wurde in Exon 2 heterozygot die Mutation c.208 G>A gefunden. Damit findet im Protein an der Stelle 70 der Austausch von Alanin gegen Threonin statt. Alanin ist eine apolare und hydrophobe Aminosäure. Ihre Seitenkette ist eine nichtreaktive aliphatische (unverzweigte) Methylgruppe. Threonin ist dagegen polar, hydrophil und kann durch die Hydroxyl-Gruppe in der Seitenkette an Wasserstoffbrückenbindungen teilnehmen. Dieser Austausch führt zu dem Einbau einer Aminosäure mit anderen chemischen Eigenschaften. Durch die neue Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Faltung des Proteins könnte sich dieser Austausch bemerkbar machen.

Innerhalb des Proteins findet dieser Austausch in keiner wichtigen bekannten Domäne statt (Abb. 10, S. 54).

Person 7533

Diese Person ist heterozygot für die Mutation c.457 C>T in Exon 3 des TRP-1-Gens. Im Protein findet der Austausch der Aminosäure Arginin gegen Cystein an der Stelle 153 statt. Arginin gehört zu den „basischen“ Aminosäuren, da ihre endständigen Amino-Gruppen beim neutralem pH-Wert positiv geladen sind. Die Seitengruppe von Arginin kann durch Methylierung „modifiziert“ werden. Die Aminosäure Cystein ist, im Gegensatz zu Arginin, hydrophob und hat in ihrer Seitenkette eine sehr reaktionsfreudige Thiol-Gruppe. Durch die Reaktionen mehrerer Thiol-Gruppen in mehreren Cysteinen entstehen Disulfid-Gruppen, die eine wichtige Grundlage für eine stabile Faltung des Proteins darstellen. Der Einbau eines Cysteins an Stelle von Arginin könnte sich daher auf die Faltung des Proteins auswirken, da eine neue Möglichkeit zur Bildung einer Disulfid-Gruppe entsteht.

Die Lokalisation der veränderten Aminosäure im Protein ist in Abb. 10, S. 54 zu sehen.

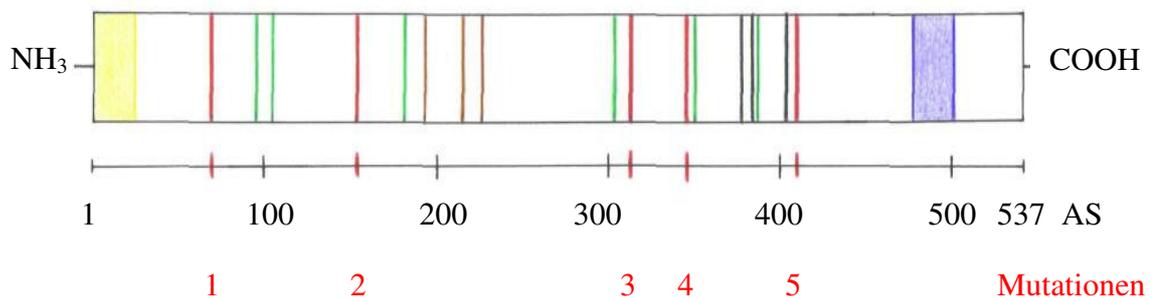


Abb. 10: Lokalisation wichtiger bekannter Domänen im TRP-1 und der fünf in dieser Arbeit gefundenen Mutationen anhand einer Aminosäure-Skala unter der Proteinabbildung. (AS = Aminosäure)

(Gezeichnet nach Informationen aus der NCBI-Datenbank (Kap. 6.2, S. 74):
Zugangsnummer P17643 für TRP-1 in der Rubrik *protein*.)

Legende: ■ = Signalpeptid

■ = Glykosilierte Aminosäuren

■ = Aminosäuren der Kupferbindungsstelle A

■ = Aminosäuren der Kupferbindungsstelle B

■ = Aminosäuren der Transmembrandomäne

■ = Mutationen: **1** = p.70 Ala>Thr (**Person 7558**);

2 = p.153 Arg>Cys (**Person 7533**);

3 = p.312 Arg>Ser (**Person 7419**);

4 = p.346 Pro>Arg (**Person 7468**);

5 = p.409 Ala>Val (**Person 7512**).

Bei Person 7419 fand ein Austausch der Aminosäure Arginin gegen Serin an der Stelle 312 im Protein statt. Auf der cDNA-Ebene war dafür die heterozygote Mutation c.938 G>C in Exon 5 verantwortlich. Die Stelle 312 im Protein ist in keiner wichtigen bekannten Domäne des TRP-1 lokalisiert (Abb. 10).

Die ausgetauschten Aminosäuren sind beide hydrophil. Sie unterscheiden sich jedoch durch ihre Seitenketten in ihren chemischen Eigenschaften. Arginin besitzt als „basische“ Aminosäure endständig positiv geladene Amino-Gruppen. Die Seitenkette

von Serin ist polar und enthält Hydroxy-Gruppen, die an Wasserstoffbrückenbindungen teilnehmen.

Daher kann auch in diesem Fall über mögliche Auswirkungen auf die Faltung des Proteins durch neue Möglichkeiten der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen spekuliert werden.

Person 7468

In diesem Fall hat die Mutation c.1037 C>G in Exon 5 den Austausch von Prolin gegen Arginin zur Folge. Dieser Austausch findet im Protein innerhalb der cysteinreichen Domäne statt. Die Aminosäure Cystein ist zwar nicht in den Austausch involviert, aber durch die besondere Struktur der ausgetauschten Aminosäure Prolin könnten sich Konsequenzen für die Proteinstruktur ergeben. Prolin ist hydrophob und hat als einzige Aminosäure einen zyklischen Aufbau, wodurch nach der Peptid-Bindung kein Wasserstoffatom für eine Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung steht. Die hydrophile Aminosäure Arginin weist dagegen in ihren Seitenketten endständige Amino-Gruppen auf, die beim neutralem pH-Wert positiv geladen sind und Arginin „basische“ Eigenschaften verleihen.

Person 7512

Der Austausch der Aminosäure Alanin gegen Valin an der Stelle 409 kommt bei der Person 7512 durch die Mutation c.1226 C>T in Exon 6 zustande. Die veränderte Aminosäure befindet sich innerhalb des Proteins in der Nähe der Kupferbindungs-Domäne B (Abb. 10, S. 54).

Alanin und Valin sind sich sehr ähnlich. Beide Aminosäuren sind apolar, hydrophob und ihre aliphatischen Seitenketten unterscheiden sich nur durch ihre Länge. Durch diese Ähnlichkeit könnte man die Vermutung äußern, dass sich diese Mutation, im Vergleich zu den anderen vier beschriebenen Mutationen, nicht so gravierend auf die Struktur des Proteins auswirkt.

4.1.2 Personen mit Mutationen in zwei OCA-Genen

Bei der zusammenfassenden Betrachtung aller Ergebnisse des Albinismus-Projektes wurden insgesamt 17 Personen identifiziert, die in zwei oder mehr der vier untersuchten OCA-Gene Mutationen aufwiesen (Zühlke *et al.*, 2004).

Von den fünf Personen mit einer Mutation im TRP-1-Gen haben zwei Personen (7419 und 7512) je eine weitere Mutation im Tyrosinase-Gen und eine Person (7468) eine weitere Mutation im P-Gen. Alle Mutationen sind in diesen Fällen heterozygot, d. h. sie betreffen nur eines der beiden Allele eines OCA-Gens.

Daher können sie einzeln betrachtet keinen hinreichenden Beweis für einen OCA 1, OCA 2 oder OCA 3 liefern.

Kann jedoch ein phänotypischer OCA aus der Kombination von zwei heterozygoten Mutationen in zwei unterschiedlichen OCA-Genen resultieren? Eine solche nicht monosom sondern digenische Vererbung ist bereits bei anderen Krankheiten beschrieben worden. Dazu gehören z. B. die Holoprosenzephalie oder das Waardenburg-Syndrom, das in vielen Fällen zusammen mit Pigmentierungsanomalien oder mit autosomal rezessiven okulären Albinismus auftritt (Morell *et al.*, 1997, Ming und Muenke, 2002). Es erscheint möglich, dass sich die Effekte von zwei heterozygoten Mutationen in zwei Genen innerhalb eines Stoffwechselweges addieren könnten und so zu einem verändertem Phänotyp führen könnten (Ming und Muenke, 2002).

Für heterozygote Mutationsträger der rezessiv vererbten Erkrankungen OCA 1 und Phenylketonurie wurden erniedrigte Werte der normalen Enzymaktivitäten gemessen (King und Witkop, 1977; Vogel, 1984). Diese Beobachtungen zeigen, dass bereits eine heterozygote Mutation zu gewissen phänotypischen Veränderungen führen kann. Das legt die Vermutung nahe, dass sich die phänotypischen Wirkungen von mehreren heterozygoten Mutationen addieren könnten. Diese Vermutung erscheint um so wahrscheinlicher, da es sich bei den hier beschriebenen Fällen um Veränderungen in Genen handelt, deren Produkte in den gleichen Stoffwechselweg involviert sind.

4.1.3 Personen mit einer Mutation im TRP-1-Gen

Bei zwei Personen (7558 und 7533) konnten außer den einzelnen heterozygoten Mutationen im TRP-1-Gen keine weiteren Mutationen im untersuchten Tyrosinase-Gen, P-Gen und MATP-Gen gefunden werden. Daher sind bei diesen beiden Individuen der OCA 1, OCA 2 und OCA 4 ausgeschlossen und ein OCA 3 nicht hinreichend bewiesen. Zu der Frage, warum beide dennoch phänotypisch den OCA aufweisen, lassen sich mehrere Erklärungsansätze formulieren.

Mutationen in nicht untersuchten Genbereichen:

Bei der Mutationssuche wurden in dieser Arbeit nur die codierenden Abschnitte des TRP-1-Gens untersucht. Ähnlich wurde auch bei den anderen Arbeiten dieses Projektes verfahren (Opitz *et al.*, 2004; Rundshagen *et al.*, 2004).

Es wurden nur die sieben codierenden Exons 2 – 8 untersucht. Das nicht codierende Exon 1, die Promotor-Region und die Introns wurden nicht untersucht. Dabei könnten sich Mutationen in diesen Bereichen auch auf die Genexpression oder auf die Funktion des codierten Proteins auswirken.

Man vermutet, dass Exon 1 und die Promotor-Region für eine effiziente Transkription des TRP-1 gebraucht werden (Shibata *et al.*, 1992). Mutationen in diesen Bereichen könnten sich also auf die Gen-Transkription negativ auswirken.

Die Bedeutung der Introns für ein Gen ist noch immer nicht bekannt. Hinweise darauf, dass auch Mutationen in den Introns eine Erkrankung auslösen können, finden sich zum Beispiel bei der β -Thalassämie. Hier führt eine Mutation im Intron zum Einbau einer neuen Spleiß-Akzeptor-Stelle. Dadurch kommt es zu einem vorzeitigen STOP-Kodon und das Protein Hämoglobin ist verkürzt und funktionslos (Knippers, 2001). Ein weiteres Beispiel ist der von Newton und Mitarbeitern beschriebene OCA 4-Fall. Hier wird die Erkrankung auf eine Mutation im Randbereich eines Introns zurückgeführt (Newton *et al.*, 2001).

Auch in dieser Arbeit wurden Veränderungen in den Intronbereichen gefunden (Kap. 4.4, S. 62ff), da die gewählten Primer innerhalb der Introns lagen. Daher wurden einige Basenpaare der an die Exons angrenzenden Intronbereiche in das PCR-Produkt mit eingeschlossen.

Durch die SSCP nicht gefundene Mutationen

Die SSCP-Methode erkennt je nach der untersuchten Fragmentlänge mehr als 80 % der Mutationen in einem Genabschnitt. Um eine nahezu 100 %ige Detektionsrate zu erreichen, müssten zahlreiche Versuche mit jeweils veränderten Variablen durchgeführt werden. Denn die Genauigkeit der SSCP-Methode hängt von Variablen wie der Zusammensetzung des Gels, der Temperatur und nicht zuletzt auch von dem untersuchten DNA-Fragment ab (Hayashi, 1991).

Hinzu kommt, dass in der SSCP eine Deletion oder Duplikation des gesamten Gens oder seiner einzelnen Exons nicht sichtbar gemacht werden kann.

Mutationen in bisher unbekanntem OCA-Genen

Bei der Maus sind bisher über 100 Gene bekannt, die die Fell- und Augenfarbe beeinflussen (Bennett und Lamoreux, 2003). Daher ist davon auszugehen, dass es auch im menschlichen Genom noch einige bisher unbekannte Gene gibt, die die Pigmentierung beeinflussen.

Im Rahmen dieses Projektes konnten von 163 nicht verwandten Personen mit OCA bei 73 % Mutationen in den bisher bekannten vier OCA-Genen gefunden werden (Zühlke *et al.*, 2004). Bei 27 % der Betroffenen konnte der Phänotyp nicht mit Mutationen in den bisher bekannten OCA-Genen erklärt werden.

Man könnte sich vorstellen, dass die beiden Personen mit nur einer heterozygoten Mutation im TRP-1-Gen noch in anderen unbekanntem OCA-Genen weitere Mutationen aufweisen könnten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im untersuchten Kollektiv von 176 Individuen mit OCA kein Fall von OCA 3 hinreichend bewiesen werden konnte. Ich nehme an, dass OCA 3 bei der weißen europäischen Bevölkerung keine häufige Ursache eines OCA ist.

In fünf von 176 Fällen konnten einzelne heterozygote Mutationen im TRP-1-Gen nachgewiesen werden, was einer Häufigkeit von 2,84 % entspricht.

Mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz können die erwarteten theoretischen Genotyphäufigkeiten in Abhängigkeit von den gefundenen Allelhäufigkeiten beschrieben werden (Strachan und Read, 1996).

Es gilt:

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

Dabei entspricht p der Häufigkeit des Wildtypallels (wt), q der Häufigkeit des mutierten Allels (mut).

Gesamtzahl der Proben	=	176	≐	100 %
Häufigkeit des Genotyps wt/wt	=	171	≐	97,2 %
Häufigkeit des Genotyps mut/wt	=	5	≐	<u>2,8 %</u>
Häufigkeit des Genotyps mut/mut	=	0	≐	0 %

Berechnung der Allelhäufigkeiten:

$$\text{Gesamtzahl der Allele} = 176 \cdot 2 = 352$$

$$p(\text{wt}) = (2 \cdot 171 + 5) / 352 = 0,986$$

$$q(\text{mut}) = 5 / 352 = 0,014$$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

$$\text{theoretische Häufigkeit des Genotyps wt/wt} = p^2 = 0,972 \hat{=} 97,2 \%$$

$$\text{theoretische Häufigkeit des Genotyps mut/wt} = 2pq = 0,028 \hat{=} \underline{2,8 \%}$$

$$\text{theoretische Häufigkeit des Genotyps mut/mut} = q^2 = 0,0002 \hat{=} 0,02 \%$$

Ergebnis:

Die beobachtete Genotyphäufigkeit stimmt mit der erwarteten theoretischen sehr gut überein.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die gefundene Mutationsrate des TRP-1 Gens von 2,8 % innerhalb des Kollektivs von 176 Individuen mit OCA signifikant höher ist als die Mutationsrate des TRP-1-Gens in einem Kollektiv von 100 unterschiedlich pigmentierten Kaukasiern ohne OCA (Box *et al.*, 1998). Dieses Kollektiv, in dem keine Mutationen im TRP-1-Gen gefunden wurden, kann als Kontrollkollektiv für diese Arbeit angesehen werden. Daher kann man feststellen, dass Mutationen im TRP-1-Gen nur bei Personen mit einem phänotypischen OCA beobachtet wurden und nicht einer zufälligen Mutationsrate innerhalb der „normalen“ Bevölkerung entsprechen.

4.2 Phänotyp der Mutationsträger im TRP-1-Gen

Um Aussagen zu den Auswirkungen des Genotyps auf die phänotypischen Merkmale machen zu können, müssten die Phänotypen der 171 Personen ohne Mutationen im TRP-1-Gen mit den Phänotypen der fünf Mutationsträger im TRP-1-Gen verglichen werden.

Da im Institut für Humangenetik keine Untersuchung des phänotypischen Spektrums der 176 Individuen mit OCA vorliegt (es wurden lediglich die Blutproben eingesandt), können in dieser Arbeit keine Aussagen zu den möglichen Einflüssen von TRP-1-Gen-Mutationen auf den Phänotyp gemacht werden.

Erschwerend käme hinzu, dass in allen fünf Fällen die Mutationen im TRP-1-Gen den OCA-Phänotyp nicht hinreichend erklären. Besonders bei den beiden Personen mit nur einer Mutation im TRP-1-Gen, bei denen ein OCA 1, 2 und 4 ausgeschlossen wurden, sind vermutlich noch andere unentdeckte Mutationen im Genotyp vorhanden, die letztlich den OCA-Phänotyp erklären könnten.

Zuletzt muss aufgrund der sehr kleinen Fallzahlen bezweifelt werden, dass durch eine vergleichende Untersuchung der Phänotypen signifikante Unterschiede festgestellt werden könnten.

4.3 Polymorphismus 259 C>A

Als Polymorphismus wird eine Veränderung in der DNA-Sequenz bezeichnet, die keine Veränderung auf der Proteinebene hervorruft oder die trotz einer Änderung des Proteins

keine krankheitsauslösende Ursache darstellt (*non-disease-causing-change*). Gleichzeitig soll diese Veränderung in der Basenpaarabfolge mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % in einer Population vorkommen (Dunnen und Antonarakis, 2001).

Legt man diese Definition zugrunde, dann wurde innerhalb des TRP-1-Gens im untersuchten Kollektiv ein Polymorphismus gefunden.

Bei 22 von 176 untersuchten Personen, also in 12,5 %, konnte im Exon 2 der Austausch c.259 C>A nachgewiesen werden. Auf der Proteinebene kam es nicht zur Veränderung der Aminosäure Arginin (p.87 Arg). Damit sind beide Kriterien für das Vorliegen eines Polymorphismus erfüllt.

Auch in diesem Fall kann das Hardy-Weinberg-Gesetz angewendet werden, um die tatsächlich vorgefundenen und die erwarteten Häufigkeiten der Genotypen zu vergleichen.

Es gilt:

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

Gesamtzahl der Proben	=	176	≅	100 %
Häufigkeit des Genotyps wt/wt	=	154	≅	87,5 %
Häufigkeit des Genotyps mut/wt	=	22	≅	<u>12,5 %</u>
Häufigkeit des Genotyps mut/mut	=	0	≅	0 %

Berechnung der Allelhäufigkeiten:

$$\text{Gesamtzahl der Allele} = 176 \cdot 2 = 352$$

$$p(\text{wt}) = (2 \cdot 154 + 22) / 352 = 0,938$$

$$q(\text{mut}) = 22 / 352 = 0,063$$

Berechnung der theoretischen Verteilung:

$$\text{theoretische Häufigkeit des Genotyps wt/wt} = p^2 = 0,880 \cong 88 \%$$

$$\text{theoretische Häufigkeit des Genotyps mut/wt} = 2pq = 0,118 \cong \underline{11,8 \%}$$

$$\text{theoretische Häufigkeit des Genotyps mut/mut} = q^2 = 0,004 \cong 0,4 \%$$

Ergebnis:

Die beobachtete Genotyphäufigkeit stimmt mit der erwarteten theoretischen sehr gut überein.

Der Polymorphismus 259 C>A im TRP-1-Gen wurde in der Literatur bereits an zwei Stellen erwähnt. Allerdings wird durch einen anderen Anfangspunkt bei der Nukleotidzählung dieser Polymorphismus in der Literatur „374 C>A“ genannt. Bei einem Patienten, der gleichzeitig von einer Pigment-Verteilungsstörung und einem Glaukom betroffen war, konnten der Polymorphismus 374 C>A und ein weiterer Polymorphismus (844 T>C) im TRP-1-Gen nachgewiesen werden. Für beide Polymorphismen war dieser Patient heterozygot (Lynch *et al.*, 2002).

Bei der Untersuchung des TRP-1-Gens bei 100 verschiedenen pigmentierten Kaukasiern fanden sich 11 Individuen, die heterozygot für den Polymorphismus 374 C>A waren (Box *et al.*, 1998). Das entspricht einer Häufigkeit von 11 % und stimmt mit der in dieser Arbeit gefundenen Häufigkeit von 12,5 % für den Polymorphismus 259 C>A (= 374 C>A) gut überein.

Da man das untersuchte Kollektiv von Box und Mitarbeitern als Kontrollkollektiv für diese Arbeit ansehen kann, sprechen die Ergebnisse dafür, dass der Polymorphismus 259 C>A bei Kaukasiern, unabhängig von einer Erkrankung an OCA, mit einer Häufigkeit von 11-12 % vorkommt.

4.4 DNA-Variationen in Intronbereichen des TRP-1-Gens

Die Untersuchung der Introns des TRP-1-Gens auf mögliche Veränderungen war nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit. Das Auffinden einiger DNA-Variationen in Intronbereichen ist darauf zurückzuführen, dass die gewählten Oligonukleotide innerhalb der Introns lagen und dadurch die an die Exons angrenzenden Intronbereiche ebenfalls sequenziert wurden. Die nachfolgend dargestellten DNA-Variationen innerhalb der Introns spiegeln daher nur eine kleine Auswahl der vermutlich größeren Anzahl vorhandener DNA-Variationen in den Introns des TRP-1-Gens wieder. Bei den

gefundenen DNA-Variationen könnte es sich um sog. *Single-Nucleotide-Polymorphisms* (SNPs) handeln. Dies sind Variationen in den Nukleotid-Sequenzen nicht verwandter Personen, die durchschnittlich an etwa jeder 1000. Stelle vorkommen (Knippers, 2001).

Es wurden zwei verschiedene DNA-Variationen in den Intronbereichen gefunden: c.1261+20 T>C in Intron 6 und c.1409-68 G>C in Intron 7. Die insgesamt sieben betroffenen Individuen waren teils homozygot und teils heterozygot für diese DNA-Variationen (Kap. 3.3.8, Tabelle 11, S. 50).

4.4.1 Intron 6

Bei der Analyse des Exons 6 wurden gleichzeitig die ersten 38 Basenpaare des darauffolgenden Introns 6 untersucht (Kap. 7.2.2, S. 83). Die fünf unterschiedlichen Bandenmuster (M1-M5) in der SSCP-Analyse können durch die gefundenen DNA-Variationen in Intron 6 und die Mutation in Exon 6 gut erklärt werden. Lediglich das Bandenmuster M4 der Probe 7450 kann durch die Sequenzierung nicht erklärt werden. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Sequenzierung von Exon 6 bezogen auf die fünf Bandenmuster in der SSCP-Analyse.

Bandenmuster in der SSCP-Analyse	M1		M2		M3		M4	M5
Anzahl der Proben mit einem Bandenmuster	61		82		32		1	1
untersuchte Proben Nr.	7504	7511	7440	7520	7412	7420	7450	7512
Mutationen/DNA-Variationen heterozygot/homozygot	keine		c.1261+20 T>C heterozygot		c.1261+20 T>C homozygot		keine	c.1261+20 T>C heterozygot c.1226 C>T heterozygot

Tabelle. 13: Ergebnisse der Sequenzierung von Exon 6.

Die untersuchten Proben der Bandenmuster M1-M3 wurden zufällig aus der Gesamtmenge aller Proben ausgesucht, die in der SSCP-Analyse durch die jeweiligen Muster M1, M2 oder M3 auffielen.

Tabelle 13 zeigt, dass die ausgewählten Proben mit dem Bandenmuster M1 keine Veränderungen aufweisen. Daher ist sehr wahrscheinlich auch bei den übrigen 59 Proben mit M1 mit dem Wildtyp zu rechnen. Die beispielhaft untersuchten Proben mit

M2 und M3 unterscheiden sich nicht in der Art der DNA-Variation in Intron 6, sondern nur in der Anzahl der betroffenen Allele. Man kann aufgrund dieser Ergebnisse darauf schließen, dass sehr wahrscheinlich alle 82 Proben mit M2 heterozygot für die DNA-Variation c.1261+20 T>C, während die 32 Proben mit M3 homozygot für diese DNA-Variation sind. Hätte das verwendete Oligonukleotid keinen Einblick in den Anfangsbereich des 6. Introns gewährt, hätten sehr wahrscheinlich alle Proben mit den Bandenmustern M1, M2 und M3 ein einheitliches Bandenmuster aufgewiesen, da sie keine Veränderungen im Bereich von Exon 6 zeigen.

Bei der Probe 7450 konnte keine Veränderung im untersuchten Exon 6 und in den ersten 38 Basenpaaren des Introns 6 gefunden werden, so dass sich für das eigenständige Bandenmuster M4 keine Erklärung finden lässt.

Dagegen ist das Bandenmuster M5 der Probe 7512 durch die Kombination der heterozygoten DNA-Variation c.1261+20 T>C in Intron 6 mit einer heterozygoten Mutation c.1226 C>T in Exon 6 sehr gut zu erklären.

4.4.2 Intron 7

Bei der Analyse von Exon 8 wurden 122 Basenpaare des angrenzenden Introns 7 mituntersucht (Kap. 7.2.2, S. 84).

In der SSCP-Analyse traten drei unterschiedliche Bandenmuster auf (M1-M3). Die folgende Tabelle 14 (S. 65) gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Sequenzierung von Exon 8 bei Proben mit den Bandenmustern M1, M2 oder M3.

Bandenmuster in der SSCP-Analyse	M1	M2		M3	
Anzahl der Proben mit einem Bandenmuster	1	103		71	
untersuchte Proben Nr.	7519	7542	7505	7715	7471
Mutationen/DNA-Variationen heterozygot/homozygot	keine	keine	c.1409-68 G>C homozygot	c.1409-68 G>C heterozygot	c.1410 T>C heterozygot

Tabelle 14: Ergebnisse der Sequenzierung von Exon 8.

Die Proben mit den Bandenmustern M2 und M3 wurden zufällig aus der Gesamtmenge der Proben ausgewählt, die in der SSCP-Analyse durch die Bandenmuster M2 oder M3 auffielen.

Aus der Tabelle 14 wird ersichtlich, dass das Laufverhalten der Proben in der SSCP-Analyse keine Entsprechung in der Untersuchung ihrer Sequenz findet. Eine Erklärung für diesen Umstand ist, dass die zusätzlich untersuchten 122 Basepaare des Introns 7 nicht vollständig in ihrer Sequenz auswertbar waren. Damit könnten sich noch weitere Mutationen in diesem Bereich von Intron 7 befinden.

Nur bei der Probe Nr. 7471 wurde in Exon 8 eine Mutation gefunden (c.1410 T>C). Da sie keine Auswirkungen auf das Protein zeigt (p.470 Ser), wird sie auch als stille Mutation bezeichnet (Seyffert *et al.*, 1998). Für einen Polymorphismus wird das Kriterium der Häufigkeit nicht erfüllt, da diese Mutation mit einer Häufigkeit von 0,6 % vorkommt. In einem solchen Fall spricht man von einer genetischen Varianz.

Da bis auf diese stille Mutation in Exon 8 der Probe Nr. 7471 keine weiteren Mutationen im Exonbereich gefunden wurden, wurde auf weitergehende Untersuchungen verzichtet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Albinismus ist eine klinisch und genetisch heterogene Erkrankung, die aus Störungen im Stoffwechsel des Pigmentes Melanin resultiert. Bei Betroffenen äußert sich der Mangel an Melanin in unterschiedlich stark ausgeprägter Hypopigmentierung der Haut, der Haare und der Iris und darüber hinaus in Störungen des optischen Apparates, die zu einer Sehbehinderung führen. Diese Form des Albinismus, die sowohl die Haut als auch das Auge betrifft, wird als okulokutaner Albinismus (OCA) bezeichnet. Der OCA folgt einem autosomal-rezessivem Erbgang.

Bisher sind Mutationen in vier Genen bekannt, die zum OCA führen. Diese Gene sind das Tyrosinase-Gen (OCA 1), das P-Gen (OCA 2), das TRP-1-Gen (OCA 3) und das MATP-Gen (OCA 4). Im Rahmen des Albinismus-Projektes wurde bei 176 Personen mit OCA, die überwiegend deutscher Herkunft sind, eine Mutationssuche in diesen vier Genen durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Mutationssuche im TRP-1-Gen (*tyrosinase related protein-1-gen*). Dazu wurden die sieben codierenden Exons des TRP-1-Gens mittels der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Nach Kontrolle der Produkte auf Agarose-Gelen konnten mit der elektrophoretischen Analyse der Konformationsänderungen der DNA-Einzelstränge auf Polyacrylamid-Gelen und der anschließenden Silberfärbung Veränderungen innerhalb der einzelnen Exons sichtbar gemacht werden. Auffällige Proben wurden sequenziert.

Es wurden bei insgesamt fünf Personen fünf unterschiedliche heterozygote Punktmutationen im TRP-1-Gen gefunden, die zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen. Da jedoch jeweils nur ein Allel betroffen ist, kann durch diese Mutationen bei keiner Person ein OCA 3 bewiesen werden. Weiterhin zeigten drei der fünf Mutationsträger im TRP-1-Gen eine digenische Vererbung mit je einer weiteren heterozygoten Mutation im Tyrosinase- bzw. im P-Gen. Der Polymorphismus 374 C>A wurde bei 22 Personen gefunden. Die Häufigkeit von 12,5 % entspricht der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit aus einer Untersuchung des TRP-1-Gens bei normal pigmentierten Kaukasiern. Bei einer weiteren Person konnte eine Mutation nachgewiesen werden, die zu keinem Aminosäureaustausch führt. Da sie, entgegen der Polymorphismusdefinition, nicht mit einer Häufigkeit von mehr als 1 % vorkommt, wird sie als genetische Varianz bezeichnet.

6. LITERATUR

6.1 Zeitschriften und Bücher

Abdel-Malek Z:

Regulation of human pigmentation by ultraviolet light and by endocrine, paracrine, and autocrine hormones. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P: The pigmentary system. Physiology and pathophysiology. 1. Aufl., Kap. 8, S. 119, Oxford University Press, New York 1998

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)

Bennett DC, Lamoreux ML:

The color loci of mice – a genetic century.

Pigment Cell Res 16: 333-344 (2003)

Boissy RE, Zhao H, Oetting WS, Austin LM, Wildenberg SC, Boissy YL, Zhao Y, Sturm RA, Hearing VJ, King RA, Nordlund JJ:

Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as „OCA3“.

Am J Hum Genet 58:1145-1156 (1996)

Bologna JL, Orlow SJ:

Melanocyte biology. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP: Dermatology. 1. Aufl., Kap. 65, S. 935ff, Mosby, Edinburgh 2003

Box NF, Wyeth JR, Mayne CJ, O'Gorman LE, Martin NG, Sturm RA:

Complete sequence and polymorphism study of the human TYRP1 gene encoding tyrosinase-related protein 1.

Mamm Genome 9: 50-53 (1998)

Cameron D:

On being an albino: a personal account.

Br Med J 1: 28-29 (1979)

Creel DJ, Summers CG, King RA:

Visual anomalies associated with albinism.

Ophthalmic Paediatr Genet 11: 193-200 (1990)

Dunnen JT, Antonarakis E:

Nomenclature of the description of human sequence variations.

Hum Genet 109: 121-124 (2001)

Garrod AE:

Inborn errors of metabolism.

Lecture II. Lancet 2: 73-79 (1908)

Hayashi K:

PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA.

Cold Spring Harb Lab Press 1: 34-38 (1991)

Inagaki K, Suzuki T, Shimizu H, Ishii N, Umezawa Y, Tada J, Kikuchi N, Takata M, Takamori K, Kishibe M, Tanaka M, Miyamura Y, Ito S, Tomita Y:

Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan.

Am J Hum Genet 74: 466-471 (2004)

Jimbow K, Quevedo WC, Fitzpatrick TB, Szabo G:

Some aspects of melanin biology: 1950-1975.

J Invest Dermatol 67: 72-89 (1976)

Käsmann-Kellner B, Ruprecht KW:

Albinismus – Klassifikation und klinisches Spektrum.

Z Prakt Augenheilkd 20: 189-203 (1999)

King RA:

Albinism. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P: The pigmentary system. Physiology and pathophysiology. 1. Aufl., Kap. 38, S. 553ff, Oxford University Press, New York 1998

King RA, Witkop CJ:

Hairbulb tyrosinase activity in oculocutaneous albinism.

Nature 263: 69-71 (1976)

King RA, Witkop CJ:

Detection of heterozygotes for tyrosinase-negative oculocutaneous albinism by hairbulb tyrosinase assay.

Am J Hum Genet 29: 164-168 (1977)

Knippers R:

Molekulare Genetik. 8. Aufl., Kap. 2, S. 23-24, Kap. 3, S. 37ff, Kap. 4, S. 81-83, Kap. 9, S. 245-249, Kap. 10, S. 304-310, Kap. 14, S. 398, Kap. 17, S. 475-476, Kap. 17, S. 492-493, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2001)

Lynch S, Yanagi G, DelBono E, Wiggs JL:

DNA sequence variants in the tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) gene are not associated with human pigmentary glaucoma.

Mol Vis 8: 127-129 (2002)

Manga P, Ramsay M, Kromberg J, Jenkins T:

Brown oculocutaneous albinism is allelic to tyrosinase-positive oculocutaneous albinism in southern african negroids.

Am J Hum Genet Suppl 55: A194 (1994)

Manga P, Kromberg JGR, Box NF, Sturm RA, Jenkins T, Ramsay M:

Rufous oculocutaneous albinism in southern african blacks is caused by mutations in the TYRP1 gene.

Am J Hum Genet 61: 1095-1101 (1997)

Manga P, Kromberg JGR, Turner A, Jenkins T, Ramsay M:

In southern africa, brown oculocutaneous albinism (BOCA) maps to the OCA2 locus on chromosome 15q: P-gene mutations identified.

Am J Hum Genet 68: 782-787 (2001)

Ming JE, Muenke M:

Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly.

Am J Hum Genet 71:1017-1032 (2002)

Moore KL, Persaud TVN:

Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. 4. Aufl., Kap. 20.1, S. 522ff, Schattauer, Stuttgart 1996

Morell R, Spritz RA, Ho L, Pierpont J, Guo W, Friedman TB, Asher Jr JH:

Apparent digenic inheritance of Waardenburg syndrome type 2 (WS2) and autosomal recessive ocular albinism (AROA).

Hum Mol Genet 6:659-664 (1997)

Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H:

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1: 263-273 (1986)

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)

Oetting WS, Fryer JP, Shriram S, King RA

Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years.

Pigment Cell Res 16: 307-311 (2003)

Oetting WS, King A:

Molecular basis of oculocutaneous albinism.

J Invest Dermatol 103: 131S-136S (1994)

Opitz S, Käsmann-Kellner B, Kaufman M, Schwinger E, Zühlke C:

Detection of 53 novel DNA variations within the tyrosinase gene and accumulation of mutations in 17 patients with albinism.

Hum Mutat Mutation in Brief #719 (2004)

Opitz S, Zühlke C:

Albinismus – Leben ohne Melanin. Teil 1: Biologie des Melaninstoffwechsels.

BIOForum 10: 672-674 (2002)

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K:

A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction.

Genomics 5: 874-879 (1989)

Orlow SJ:

The biogenesis of melanosomes. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P: The pigmentary system. Physiology and pathophysiology. 1. Aufl., Kap. 6, S. 103, Oxford University Press, New York 1998

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)

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)

Rundshagen U, Zühlke C, Opitz S, Schwinger E, Käsmann-Kellner B:

Mutations in the MATP gene in five german patients affected by oculocutaneous albinism type 4.

Hum Mutat 23: 106-110 (2004)

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA:

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science 239: 487-491 (1985)

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:

DNA sequencing with chain terminating inhibitors.

Proc Nat Acad Sci USA 74: 5463-5467 (1977)

Sarangarajan R, Boissy RE:

Tyrp1 and oculocutaneous albinism type 3.

Pigment Cell Res 14: 437-444 (2001)

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, Scharl M, Tautz D, Weber P:

Lehrbuch der Genetik. 1. Aufl., Kap. 29, S. 664-665, B: S. 975, 978-979, I: 1042-1044, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1998)

Shen B, Samaraweera P, Rosenberg B, Orlow S:

Ocular albinism type 1: more then meets the eye.

Pigment Cell Res 14: 243-248 (2001)

Shibata K, Takeda K, Tomita Y, Tagami H, Shibahara S:

Downstream region of human tyrosinase-related protein gene enhances ist promoter activity.

Biochem Biophys Res Commun 184: 568-575 (1992)

Strachan T, Read AP:

Molekulare Humangenetik. 1. Aufl., Kap. 3, S. 89ff.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1996)

Toyofuku K, Wada I, Spritz RA, Hearing VJ:

The molecular basis of oculocutaneous albinism type 1 (OCA 1): sorting failure and degradation of mutant tyrosinases results in a lack of pigmentation.

Biochem J 355: 259-269 (2001)

Trevor-Roper PD:

Marriage of two complete albinos with normally pigmented offspring.

Brit J Ophthalmol 36: 107-108 (1952)

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ:

Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans.

Nat Genet 11: 328-330 (1995)

Vogel F:

Clinical consequences of heterozygosity for autosomal-recessive diseases.

Clin Genet 25: 381-415 (1984)

Winder A, Kobayashi T, Tsukamoto K, Urabe K, Aroca P, Kameyama K, Hearing VJ:

The tyrosinase gene family – interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis.

Cell Mol Biol Res 40: 613-626 (1994)

Zühlke C, Dalski A, Kaufmann M, Opitz S, Lipka A, Rundshagen U, Schwinger E, Käsmann-Kellner B:

Molecular analysis in 163 unrelated patients with albinism: Mutations in the genes for OCA1, OCA2, OCA3 and OCA4.

Eur J Hum Genet 12, Suppl. 1: 229 (2004)

6.2 Elektronische Datenbanken

National Center for Biotechnology Information (NCBI). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, humane TRP-1-mRNA (Zugangsnummer NM_000550), humane cDNA des TRP-1-Gens (Zugangsnummer AF001295). Zuletzt aufgerufen: 03.08.2004.

Albinismus Datenbank. World Wide Web URL: <http://www.cbc.umn.edu/tad/>

Zuletzt aufgerufen am 10.07.2004.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungen

7.1.1 Allgemein

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b	Basen
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	komplémentäre DNA
CHS	Chediak-Higashi-Syndrom
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dest.	destiliert
d.h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alteri</i> („und die anderen“)
F	<i>forward</i> (vorwärts)
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HPS	Hermansky-Pudlak-Syndrom
Lsg.	Lösung

Matp	membran-assoziiertes Transporterprotein (Maus)
MATP	membran-assoziiertes Transporterprotein (Mensch)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mut	verändertes Allel
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nr.	Nummer
OA	okulärer Albinismus
OCA	okulokutaner Albinismus
PAA	Polyacrylamid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PWS	Prader-Willi-Syndrom
R	<i>reverse</i> (rückwärts)
REV	<i>reverse</i> (rückwärts)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism</i>
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP-1	<i>tyrosinase related protein-1</i>
ROCA	<i>rufous</i> OCA (roter OCA)
TYR	Tyrosinase
UNI	<i>universal</i>
u. U.	unter Umständen
(v/v)	Verhältnis Volumen zu Volumen
wt	Wildtyp-Allel
(w/v)	Verhältnis Gewicht zu Volumen
XC	Xylencyanol
x	-fach
z. B.	zum Beispiel

7.1.2 Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
M	Molarität (Einheit mol/l)
min	Minute
mol	Mol (=Stoffmenge, SI-Basiseinheit)
rpm	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
U	<i>Unit(s)</i> (Einheit der Enzymaktivitäten)
V	Volt
W	Watt (SI-Basiseinheit)

7.1.3 Vorsätze

k	Kilo	(= 10 ³)
c	Zenti	(= 10 ²)
m	Milli	(= 10 ⁻³)
μ	Micro	(= 10 ⁻⁶)
n	Nano	(= 10 ⁻⁹)
p	Pico	(= 10 ⁻¹²)

7.1.4 Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	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

Tabelle 15: Abkürzungen der Aminosäuren mit dem Ein- und Dreibuchstabencode.

7.2 cDNA- und mRNA-Sequenzen

7.2.1 mRNA-Sequenz des TRP-1-Gens

Legende: Erste Zeile: Buchstaben a, t, g und c stehen für die vier Nukleotide, die in Triplets angeordnet sind. Die Zählung der Nukleotide beginnt mit dem „a“ des Startkodons atg.

Zweite Zeile: Übersetzung der Nukleotid-Sequenz in die Aminosäuren-Sequenz mit dem Dreibuchstabencode der Aminosäuren (Knippers, 2001). Die Zählung der Aminosäuren beginnt mit Methionin.

Mit Pfeilen oberhalb der ersten Zeile wurden die Exonanfänge markiert.

(Quelle: NCBI-Datenbank, mRNA des humanen TRP-1-Gens mit der Zugangsnummer: NM_000550 (Kap. 6.2, S. 74))

↓ Exon 2

```

1   atg agt gct cct aaa ctc ctc tct ctg ggc tgt atc ttc ttc ccc
1   Met Ser Ala Pro Lys Leu Leu Ser Leu Gly Cys Ile Phe Phe Pro

46  ttg cta ctt ttt cag cag gcc cgg gct caa ttc cca aga cag tgt
16  Leu Leu Leu Phe Gln Gln Ala Arg Ala Gln Phe Pro Arg Gln Cys

91  gcc act gtt gag gct ttg aga agt ggt atg tgt tgc cca gac ctg
31  Ala Thr Val Glu Ala Leu Arg Ser Gly Met Cys Cys Pro Asp Leu

136 tcc cct gtg tct ggg cct ggg aca gac cgc tgt ggc tca tca tca
46  Ser Pro Val Ser Gly Pro Gly Thr Asp Arg Cys Gly Ser Ser Ser

181 ggg agg ggc aga tgt gag gca gtg act gca gac tcc egg ccc cac
61  Gly Arg Gly Arg Cys Glu Ala Val Thr Ala Asp Ser Arg Pro His

```

226 agc cct cag tat ccc cat gat ggc aga gat gat cgg gag gtc tgg
76 Ser Pro Gln Tyr Pro His Asp Gly Arg Asp Asp Arg Glu Val Trp

271 ccc ttg cgc ttc ttc aat agg aca tgt cac tgc aac ggc aat ttc
91 Pro Leu Arg Phe Phe Asn Arg Thr Cys His Cys Asn Gly Asn Phe

316 tca gga cac aac tgt ggg acg tgc cgt cct ggc tgg aga gga gct
106 Ser Gly His Asn Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arg Gly Ala

↓ Exon 3

361 gcc tgt gac cag agg gtt ctc ata gtc agg aga aat ctt ctg gac
121 Ala Cys Asp Gln Arg Val Leu Ile Val Arg Arg Asn Leu Leu Asp

406 tta agt aaa gaa gaa aag aac cac ttt gtc cgg gcc ctg gat atg
136 Leu Ser Lys Glu Glu Lys Asn His Phe Val Arg Ala Leu Asp Met

451 gca aag cgc aca act cac cct tta ttt gtc att gcc acc agg aga
151 Ala Lys Arg Thr Thr His Pro Leu Phe Val Ile Ala Thr Arg Arg

496 tca gaa gaa ata ctg ggg cca gat ggc aac acg cca caa ttt gag
166 Ser Glu Glu Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn Thr Pro Gln Phe Glu

541 aac att tcc att tat aac tac ttt gtt tgg aca cac tat tac tca
181 Asn Ile Ser Ile Tyr Asn Tyr Phe Val Trp Thr His Tyr Tyr Ser

586 gtc aaa aag act ttc ctt ggg gta gga cag gaa agc ttt ggt gaa
196 Val Lys Lys Thr Phe Leu Gly Val Gly Gln Glu Ser Phe Gly Glu

631 gtg gat ttc tct cat gag gga cca gct ttt ctc aca tgg cac agg
211 Val Asp Phe Ser His Glu Gly Pro Ala Phe Leu Thr Trp His Arg

↓ Exon 4

676 tac cac ctc ctg cgt ctg gag aaa gac atg cag gaa atg ttg caa
226 Tyr His Leu Leu Arg Leu Glu Lys Asp Met Gln Glu Met Leu Gln

721 gag cct tct ttc tcc ctt cct tac tgg aat ttt gca acg ggg aaa
241 Glu Pro Ser Phe Ser Leu Pro Tyr Trp Asn Phe Ala Thr Gly Lys

766 aat gtc tgt gat atc tgc acg gat gac ttg atg gga tcc aga agc
256 Asn Val Cys Asp Ile Cys Thr Asp Asp Leu Met Gly Ser Arg Ser

811 aac ttt gat tcc act cta ata agc cca aac tct gtc ttt tct caa
271 Asn Phe Asp Ser Thr Leu Ile Ser Pro Asn Ser Val Phe Ser Gln

856 tgg cga gtg gtc tgt gac tcc ttg gaa gat tat gat acc ctg gga
286 Trp Arg Val Val Cys Asp Ser Leu Glu Asp Tyr Asp Thr Leu Gly

↓ Exon 5

901 aca ctt tgt aac agc acc gag gat ggg cca att agg aga aat cca
301 Thr Leu Cys Asn Ser Thr Glu Asp Gly Pro Ile Arg Arg Asn Pro

946 gct gga aat gtg gcc aga cca atg gtg caa cgt ctt cct gaa cca
316 Ala Gly Asn Val Ala Arg Pro Met Val Gln Arg Leu Pro Glu Pro

991 cag gat gtc gct cag tgc ttg gaa gtt ggt tta ttt gac acg cct
331 Gln Asp Val Ala Gln Cys Leu Glu Val Gly Leu Phe Asp Thr Pro

1036 cct ttt tat tcc aac tct aca aac agt ttc cga aac aca gtg gaa
346 Pro Phe Tyr Ser Asn Ser Thr Asn Ser Phe Arg Asn Thr Val Glu

↓ Exon 6

1081 ggt tac agt gac ccc acg gga aag tat gac cct gct gtt cga agt
361 Gly Tyr Ser Asp Pro Thr Gly Lys Tyr Asp Pro Ala Val Arg Ser

1126 ctt cac aat ttg gct cat cta ttc ctg aat gga aca ggg gga caa
376 Leu His Asn Leu Ala His Leu Phe Leu Asn Gly Thr Gly Gly Gln

1171 acc cat ttg tct cca aat gat cct att ttt gtc ctc ctg cac acc
391 Thr His Leu Ser Pro Asn Asp Pro Ile Phe Val Leu Leu His Thr

1216 ttc aca gat gca gtc ttt gat gaa tgg ctg agg aga tac aat gct
406 Phe Thr Asp Ala Val Phe Asp Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Asn Ala

↓ Exon 7

1261 gat ata tcc aca ttt cca ttg gaa aat gcc cct att gga cat aat
421 Asp Ile Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Ala Pro Ile Gly His Asn

1306 aga caa tac aac atg gtg cca ttc tgg ccc cca gtc acc aac aca
436 Arg Gln Tyr Asn Met Val Pro Phe Trp Pro Pro Val Thr Asn Thr

1351 gaa atg ttt gtt act gct cca gac aac ctg gga tac act tat gaa
451 Glu Met Phe Val Thr Ala Pro Asp Asn Leu Gly Tyr Thr Tyr Glu

↓ Exon 8

1396 att caa tgg cca agt cgg gag ttt agt gta cct gag ata att gcc
466 Ile Gln Trp Pro Ser Arg Glu Phe Ser Val Pro Glu Ile Ile Ala

1441 ata gca gta gtt ggc gct ttg tta ctg gtt gca ctc att ttt ggg
481 Ile Ala Val Val Gly Ala Leu Leu Leu Val Ala Leu Ile Phe Gly

1486 act gct tct tat ctg att cgt gcc aga cgc agt atg gat gaa gct
496 Thr Ala Ser Tyr Leu Ile Arg Ala Arg Arg Ser Met Asp Glu Ala

1531 aac cag cct ctc ctc act gat cag tat caa tgc tat gct gaa gaa
511 Asn Gln Pro Leu Leu Thr Asp Gln Tyr Gln Cys Tyr Ala Glu Glu

1576 tat gaa aaa ctc cag aat cct aat cag tct gtg gtc taa
526 Tyr Glu Lys Leu Gln Asn Pro Asn Gln Ser Val Val STP

7.2.2 cDNA-Sequenzen der untersuchten Intronbereiche

(Quelle: NCBI-Datenbank, cDNA des humanen TRP-1-Gens mit der Zugangsnummer: AF001295 (Kap. 6.2, S. 74))

Intron 6

Legende: Die Buchstaben a, t, c und g stehen für die vier Nukleotide und sind in Triplets angeordnet. Dabei sind die **Primer** rot markiert, das **Exon 6** ist blau markiert und der Intronbereich von Intron 6 ist schwarz.

Mit Pfeilen oberhalb der Nukleotide sind die Anfänge von Exon 6 und Intron 6 markiert.

```

                                Exon 6
                                ↓
ctc ctt acc atg tgt cta ggt tac agt gac ccc acg gga aag tat
gac cct gct gtt cga agt ctt cac aat ttg gct cat cta ttc ctg
aat gga aca ggg gga caa acc cat ttg tct cca aat gat cct att
ttt gtc ctc ctg cac acc ttc aca gat gca gtc ttt gat gaa tgg
                                Intron 6
                                ↓
ctg agg aga tac aat gct ggt aag aca ttt tca tat gct ttt tgc
atg ctc agc tgg gcg gat tgt tta gat ggc at

```

Intron 7

Legende: Die Buchstaben a, t, c und g stehen für die vier Nukleotide und sind in Triplets angeordnet. Dabei sind die **Primer** rot markiert, das **Exon 8** ist blau markiert und der Intronbereich von Intron 7 ist schwarz. Die grün markierten Nukleotide gehören zu einer Region von Exon 8, die nicht für das Protein TRP-1 codiert. Die Codierregion endet mit dem STOP-Codon „taa“.

Der blaue Pfeil oberhalb der Nukleotide markiert den Beginn von Exon 8. Der schwarze Pfeil deutet an, dass nicht der Anfang von Intron 7 dargestellt ist, sondern nur der Teil, der an Exon 8 grenzt.

Intron 7 →

tgg ctt caa ggc cat gtg gcc aat gta aat taa ata tga gga ttt

ctg tta aaa tag aca ttt cta aat ttc atg tgt cca ctt ttt ggt

gat aac tat ttt aat att tgt ctt ttt att ttt aat ctt cct ttc

caa ata **↓ Exon 8**
ggt cgg gag ttt agt gta cct gag ata att gcc ata gca

gta gtt ggc gct ttg tta ctg gtt gca ctc att ttt ggg act gct

tct tat ctg att cgt gcc aga cgc agt atg gat gaa gct aac cag

cct ctc ctc act gat cag tat caa tgc tat gct gaa gaa tat gaa

aaa ctc cag aat cct aat cag tct gtg gtc taa **caa atg ccc tac**

tct ctt atg cat ta

7.3 Danksagung

Zum Gelingen und zur Durchführung dieser Dissertation haben viele Menschen beigetragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Eberhard Schwinger, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. rer. nat. Christine Zühlke für ihre hervorragende und intensive Betreuung in allen Phasen der Erstellung der Arbeit. Sie hatte stets ein offenes Ohr für alle Fragen und konnte mir mit wertvollen Tipps weiterhelfen. Durch das sorgfältige Lesen des Manuskripts und ihre Motivation hat sie mir bei der Verfassung der Arbeit sehr geholfen.

Für die Einarbeitung in die Labortechniken danke ich Herrn Dr. Sven Opitz. Sein Programm *SeqWorks* war mir eine große Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Frau Priv. Doz. Dr. Barbara Käsmann-Kellner danke ich für die Bereitstellung der Blutproben.

Bei den alltäglichen praktischen Problemen im Labor standen mir besonders Frau Ulrike Gehlken, Frau Heike Pawlak, Frau Melanie Albrecht und Frau Jassemien Atici zur Seite, wofür ich ihnen herzlich danke.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie danke ich für die vielen kleinen und großen Hilfeleistungen, die es mir letztlich ermöglicht haben, diesen Weg zu gehen.

Meinem Lebenspartner Holger Stell danke ich für sein Verständnis, seine Geduld und die Hilfestellung bei der Formatierung der Arbeit.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Aleksandra Lipka
Geburtsdatum:	22. Juli 1978
Geburtsort:	Zebrzydowice (Polen)

Schulbildung:

09/1985 – 04/1989	Volksschule Cieszyn (Polen)
05/1989 – 07/1989	Grundschule Kötzing
08/1989 – 10/1989	Hauptschule Kötzing
10/1989 – 07/1991	Hauptschule Medebach
08/1991 – 07/1995	Gymnasium Medebach
08/1995 – 01/1996	Gymnasium Winterberg
02/1996 – 06/1998	Gymnasium Korbach
	Abschluss: Hochschulreife

Studium:

seit 10/1998	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/2000	Ärztliche Vorprüfung
08/2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2002 – 08/2003	Experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck
03/2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
voraussichtlich Herbst 2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung