

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. G. Gillessen-Kaesbach

**Okulokutaner Albinismus Typ 4:
Mutationsanalysen in einem
Membrantransporter-Gen**

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Carolin Criée
aus Schwelm

Lübeck 2007

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Ball

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2009

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.12.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Albinismus	5
1.2 Melaninsynthese	6
1.3 Formen des okulokutanen Albinismus (OCA)	7
1.3.1 OCA1	8
1.3.2 OCA2	8
1.3.3 OCA3... ..	9
1.3.4 OCA4	10
1.4 Okulärer Albinismus (OA1)	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits	14
2.1.2 Oligonukleotide	15
2.1.3 Geräte und Gebrauchsartikel	16
2.1.4 Stammlösungen	18
2.1.5 DNA-Proben... ..	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Agarosegel-Elektrophorese	19
2.2.2 Photometrie der DNA-Proben	19
2.2.3 Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR)	19
2.2.4 Quantitative Polymerasenkettenreaktion („real time PCR“)	21
2.2.5 DNA-Sequenzierung mit der Dideoxymethode	26

3. Ergebnisse	28
3.1 Sequenzierungen	28
3.1.1 Sequenzveränderungen im <i>MATP</i> -Gen von Kontrollen	28
3.1.2 Sequenzveränderungen im <i>MATP</i> -Gen von Personen mit Albinismus	31
3.2 Deletionsscreening	35
3.2.1 Quantitative PCR	35
3.2.1.1 Quantitative PCR mit FRDA-Kontroll-DNA	35
3.2.1.2 Quantitative PCR im <i>MATP</i> -Gen	37
4. Diskussion	38
4.1 Polymorphismen	39
4.1.1 Polymorphismus E272K	39
4.1.2 Polymorphismus T329T	41
4.1.3 Polymorphismus F374L	42
4.2 Sequenzanalyse des <i>OCA4</i> -Gens von Personen mit Albinismus	44
4.3 Deletionsscreening	48
4.4 Mögliche Gründe für den Nachweis nur einer Mutation bei den Patientenproben	51
5. Zusammenfassung	54
6. Anhang	55
6.1 Literatur	55
6.1.1 Bücher und Zeitschriften	55
6.1.2 Elektronische Datenbanken	63
6.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	64
6.3 Abkürzungen	65
6.4 Buchstabencode für Aminosäuren	67
6.5 Sequenzen	68
6.6 Danksagung	74
6.7 Lebenslauf	75

1 Einleitung

1.1 Albinismus

Der Albinismus (lateinisch albus = weiß) ist ein überall auf der Welt zu findendes Phänomen, das nicht nur beim Menschen, sondern auch im Tierreich vorkommt und sich klassischerweise durch auffallend helle Haut und Haare äußert.

Die Bezeichnung „Albino“ stammt aus dem Spanischen und wurde von portugiesischen Seefahrern geprägt, die im 18. Jahrhundert in Afrika sowohl auf dunkelhäutige („negros“) als auch auf hellhäutige („negros albinos“) Eingeborene trafen (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999).

Hautpigmentierung ist von großer sozialer, klinischer und kosmetischer Bedeutung (Fukamachi *et al.*, 2001). Auch heute noch stoßen Betroffene auf Grund ihres auffälligen Erscheinungsbildes mit hellen Haaren und heller Haut auf Probleme. So werden z.B. Betroffene in Afrika, die entsprechend ihrer ethnischen Zugehörigkeit eigentlich dunkel pigmentiert wären, von ihren Familien zurückgewiesen und ausgegrenzt (Lund, 2005).

Im Jahre 1908 wurde Albinismus von A. E. Garrod als genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung definiert (Garrod, 1908). Durch einen Mangel an Melanin kommt es zu Hypopigmentation von Haut, Haaren und Augen. Heute hat man ein umfangreiches Wissen über diese heterogene Erkrankung erlangt. Trotzdem werden viele biochemische Vorgänge noch nicht verstanden.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen dem nur die Augen betreffenden okulären Albinismus (OA) und dem okulokutanen Albinismus (OCA), der sich an Haut, Haaren und Augen manifestiert und eine weite Spanne an Erscheinungsbildern zeigt (Passmore *et al.*, 1999). Außerdem existieren verschiedene mit OCA assoziierte Syndrome wie beispielsweise das Hermansky-Pudlak-Syndrom oder das Chediak-Higashi-Syndrom.

Der OCA, der autosomal rezessiv vererbt wird, kommt weltweit bei ca. 1/20.000 Personen vor (Passmore *et al.*, 1999), Häufungen finden sich beispielsweise in afrikanischen Populationen. Die Phänotypen des OCAs reichen von der klassischen Vorstellung mit weißen Haaren und heller Haut bis zu braunen Haaren mit nachpigmentierender Haut. Außerdem zeigen sich durch den Mangel an Melanin bedingte Störungen in der Entwicklung des visuellen Systems mit daraus resultierender Verminderung der Sehschärfe, Nystagmus und Strabismus (Creel *et al.*, 1990, Oetting und King, 1999). Bei

Albinismus-Patienten besteht zudem ein erhöhtes Risiko an Hautkrebs zu erkranken (Oetting *et al.*, 1998).

Bisher wurden sechs Gene identifiziert, in denen Mutationen das Krankheitsbild des Albinismus hervorrufen können (Oetting und King, 1999). Es sind jedoch viele weitere an der Melaninsynthese beteiligte Gene bekannt, die somit auch an der Entstehung von OCA beteiligt sein könnten (Graf *et al.*, 2005). Zum Teil greifen die veränderten Proteine dieser mutierten Gene direkt in die Melaninsynthese ein oder sie sind am Aufbau von melaninspeichernden Zellorganellen, den so genannte Melanosomen, beteiligt (Opitz und Zühlke, 2002 b).

1.2 Melaninsynthese

Die Synthese des Pigmentes Melanin findet in Melanozyten in Melanosomen, speziellen Organellen mit Speicher- und Transportfunktion, statt. Der Vorgang erfordert ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Genen.

Die Melanozyten sind sowohl in der Epidermis als auch in Haarfollikeln, der Iris und im retinalen Pigmentepithel zu finden. Die Anzahl der Melanozyten ist bei allen Menschen ungefähr gleich, Unterschiede in der Pigmentierung werden durch die Menge und Qualität des produzierten Melanins hervorgerufen (Sturm *et al.*, 1998).

Die Synthese (siehe Abb.1) beginnt mit der Aminosäure L-Tyrosin, das im nächsten Schritt zu DOPA (Dihydroxyphenylalanin) hydroxyliert wird. Die darauf folgende Oxidation führt zu Dopaquinon. Sowohl Hydroxylierung als auch Oxidation werden durch das für die Melaninsynthese geschwindigkeitsbestimmende Enzym Tyrosinase katalysiert (Oetting und King, 1993). Dopaquinon kann auf zwei verschiedenen Wegen weiterverarbeitet werden: Zum einen kann aus Dopaquinon mit Cystein rotgelbes Phäomelanin in Phäomelanosomen hergestellt werden; zum anderen kann durch Polymerisierung in Eumelanosomen mit Hilfe verschiedener Proteine, wie beispielsweise TYPR-1 (TRP-1 bzw. 2), P-Protein, MATP und OA-1-Protein, über verschiedene Zwischenstufen Eumelanin katalysiert werden (siehe Abb.1).

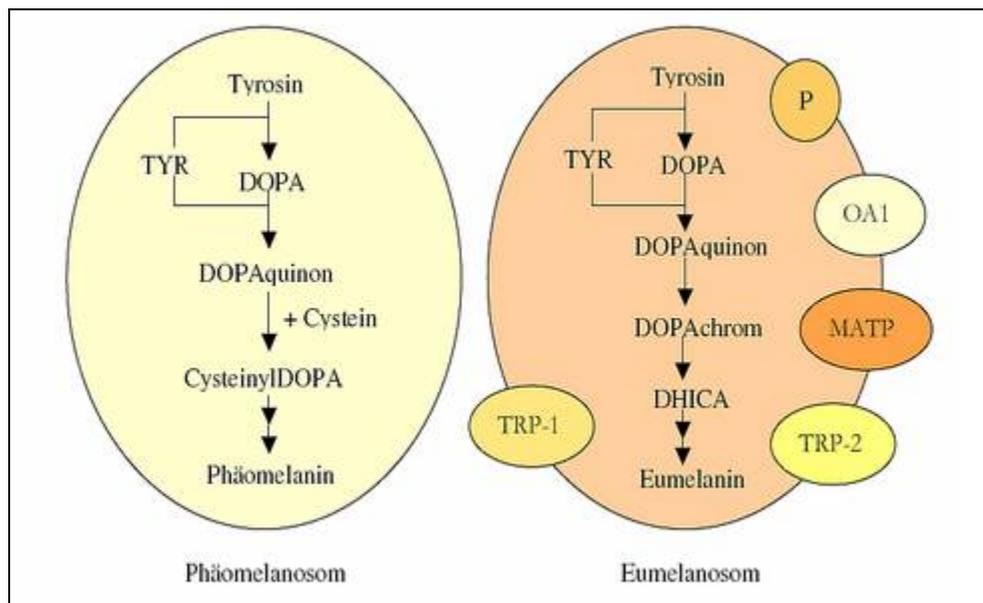


Abb.1: Melaninstoffwechsel, Opitz und Zühlke, 2002 a, (verändert)

Eumelanin, dessen Synthese durch das Hormon MSH (Melanin stimulierendes Hormon) angeregt wird, ist der biologisch bedeutsamere Melanintyp und hat eine braunschwarze Färbung. In der Haut werden die Melanosomen über die Dendriten der Melanozyten an die umliegenden Keratinozyten abgegeben und schützen den Zellkern der Keratinozyten vor schädlichen UV-Strahlen, indem sie sich zwischen Kern und Hautoberfläche anlagern. Im Gegensatz dazu geben die Melanozyten im Auge ihre Melanosomen nicht ab, sondern speichern sie in ihrem Zytoplasma (Opitz und Zühlke, 2002 a).

1.3 Formen des okulokutanen Albinismus (OCA)

Im Jahre 1952 beschrieb Trevor-Roper eine Familie, bei der beide Elternteile an Albinismus erkrankt waren, ihre Kinder jedoch normale Pigmentierung zeigten (Trevor-Roper, 1952). Dieses Phänomen war ein erster Hinweis auf die genetische Heterogenität der Erkrankung.

1.3.1 OCA1

Der okulokutane Albinismus OCA Typ 1 ist mit ca. 30-40 % in Europa die häufigste und biochemisch am besten verstandene Albinismusform (Oetting *et al.*, 2003). Es konnten über 100 Mutationen im Tyrosinase (*TYR*)-Gen nachgewiesen werden (Datenbank: International Albinism Center, University of Minnesota, Albinism Database). Das *TYR*-Gen ist auf Chromosom 11q14-21 lokalisiert und codiert mit fünf Exons für das Enzym Tyrosinase, das an wichtigen Schritten in der Melaninsynthese beteiligt ist (Oetting und King, 1993).

Man unterscheidet generell zwei Formen des OCA1:

Bei an OCA1A erkrankten Patienten besitzt die Tyrosinase keinerlei Aktivität (Giebel *et al.*, 1992), so dass sich die Patienten zeitlebens durch weiße Haut, weiße Haare und blaue Augen auszeichnen (Oetting *et al.*, 1998). Auch der Visus ist stark beeinträchtigt. Eine Gelbfärbung der Haare im Laufe der Jahre ist nicht auf eine Nachpigmentierung, sondern auf eine alters- und lichtinduzierte Denaturierung der Haarproteine zurückzuführen (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999). Beim Typ OCA1B besteht eine variable ausgeprägte Restaktivität des Tyrosinase-Enzyms. Die Pigmentierung variiert von weißlich-blondem Haar bis zu nahezu normaler Pigmentierung der Haut mit dunkelblondem Haar (Takizawa *et al.*, 2000). Beim Typ OCA1B lassen sich noch weitere Untergruppen abgrenzen: Zum einen gibt es den OCA1TS, den so genannten temperatursensitiven OCA1, bei dem das Enzym bei niedrigeren Temperaturen als der zentralen Körpertemperatur eine geringe Restaktivität zeigt. Dadurch kommt es zu einer leichten Pigmentierung an kühleren Körperregionen wie z. B. an den Extremitäten. Im Gegensatz dazu bleibt der Rumpf sehr hell. Ein anderer Typ ist der OCA1MP (MP = minimal-pigment), bei dem die Pigmentierung im Laufe des Lebens zunimmt.

1.3.2 OCA2

Der OCA2, die weltweit häufigste Form mit vermehrtem Vorkommen in Afrika, wird auf Mutationen im *P*-Gen, das auf Chromosom 15q11-q13 lokalisiert ist, zurückgeführt (Rinchik *et al.*, 1993). Das aus 25 Exons bestehende Gen, das nach dem „*pink-eye-dilution*-Gen“ der Maus benannt wurde, codiert für ein membranständiges Enzym,

p-Protein genannt, mit zwölf Transmembran-Domänen in Melanosomen (Oetting *et al.*, 1998).

Die Funktion ist weitestgehend unbekannt. Es wird diskutiert, ob es sich bei diesem Genprodukt um ein Protein handelt, das in Tyrosinase-Synthese und -Transport involviert ist (Oetting *et al.*, 2005) bzw. eine wichtige Rolle in der Erhaltung des melanosomalen pHs spielt (Puri *et al.*, 2000).

Bei Geburt weisen die Patienten eine helle Pigmentierung und hellblonde Haare auf, da die Phäomelanosomen weniger betroffen sind als die Eumelanosomen. Im späteren Leben lassen sich Sommersprossen und Naevi finden. Die Sehschärfe ist variabel ausgeprägt. Das große Ausprägungsspektrum lässt sich wie beim OCA1 auf eine Restaktivität des Enzyms zurückführen (Käsmann- Kellner und Ruprecht, 1999).

1.3.3 OCA3

Der OCA3 betrifft das *TYRP1*(Tyrosinase-related protein)-Gen, das auf Chromosom 9p23 lokalisiert ist und für ein der Tyrosinase ähnliches Genprodukt codiert. Das Gen besteht aus acht Exons, wobei Exon 2 bis 8 für das Protein codieren und Exon 1 wahrscheinlich eine Rolle für die Regulation der Genexpression spielt (Sarangarajan und Boissy, 2001). Erstmals entdeckt wurde dieser OCA-Typ bei einem afroamerikanischen Zwillingen, der im Gegensatz zu seinem normal pigmentierten Bruder hellbraune Haare, hellbraune Haut und blaugraue Iriden zeigte (Boissy *et al.*, 1996).

Typischerweise zeichnet sich der Phänotyp durch rötliche Färbung von Haut und Haaren aus, weshalb er teilweise als „red“ bzw. „rufous albinism“ bezeichnet wird. Bei weiteren Untersuchungen in der afrikanischen Bevölkerung wurden schließlich Mutationen im *TYRP1*-Gen mit diesem OCA-Typ assoziiert. Diese Mutationen führen zu einer Anhäufung von Tyrosinase im Endoplasmatischen Retikulum, außerdem scheint die Halbwertszeit der Tyrosinase zu sinken (Toyofuku *et al.*, 2001). Vermutlich spielt das TYRP1-Protein auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Melanosomenstruktur, sowie der Regulation der Melanozytenproliferation und -apoptose (Sarangarajan und Boissy, 2001).

1.3.4 OCA4

Es ist bekannt, dass bei der Maus eine Vielzahl von Genen Einfluss auf die Pigmentierung hat (Graf *et al.*, 2005); aus diesem Grunde werden auch beim Menschen weitere OCA-Typen mit Mutationen in anderen als den bisher bekannten Genen vermutet.

Die zurzeit jüngste Form des okulokutanen Albinismus - den OCA4 - entdeckten Newton und Mitarbeiter im Jahre 2001 bei einem Patienten türkischer Herkunft (Newton *et al.*, 2001).

Das zugehörige *MATP*(Membrane associated transporter protein)-Gen liegt auf Chromosom 5p13.3 und ist dem *uw*(underwhite)-Gen der Maus auf Chromosom 15 homolog. Vom murinen *uw*-Gen war bereits bekannt, dass Mutationen in diesem Gen bei Mäusen eine Hypopigmentierung verursachen. Außerdem fand man bei murinen *Matp*-Mutanten kleine faltige Melanosomen im Gegensatz zu den runden prallen Organellen bei nicht betroffenen Mäusen (Newton *et al.*, 2001).

Das Produkt des humanen *MATP*-Gens war schon vor der Entdeckung des OCA4 durch Newton bekannt und als AIM-1 (antigen in melanoma) bezeichnet worden. Da auch bei der Maus ein Protein mit der Bezeichnung aim-1 (absent in melanoma) bekannt ist, das jedoch kein Homolog zum *MATP*-Gen darstellt, und beim Menschen ebenfalls eine Kinase mit AIM-1 bezeichnet wird, wurde - um Verwechslungen zu vermeiden - das humane AIM-1 Protein auf MATP umbenannt (Newton *et al.*, 2001).

Das *MATP*-Gen besitzt sieben Exons, die für ein Protein mit 530 Aminosäuren codieren, welches zwölf Transmembran-Domänen aufweist (Newton *et al.*, 2001) und in Melanozyten exprimiert wird (Harada *et al.*, 2001)

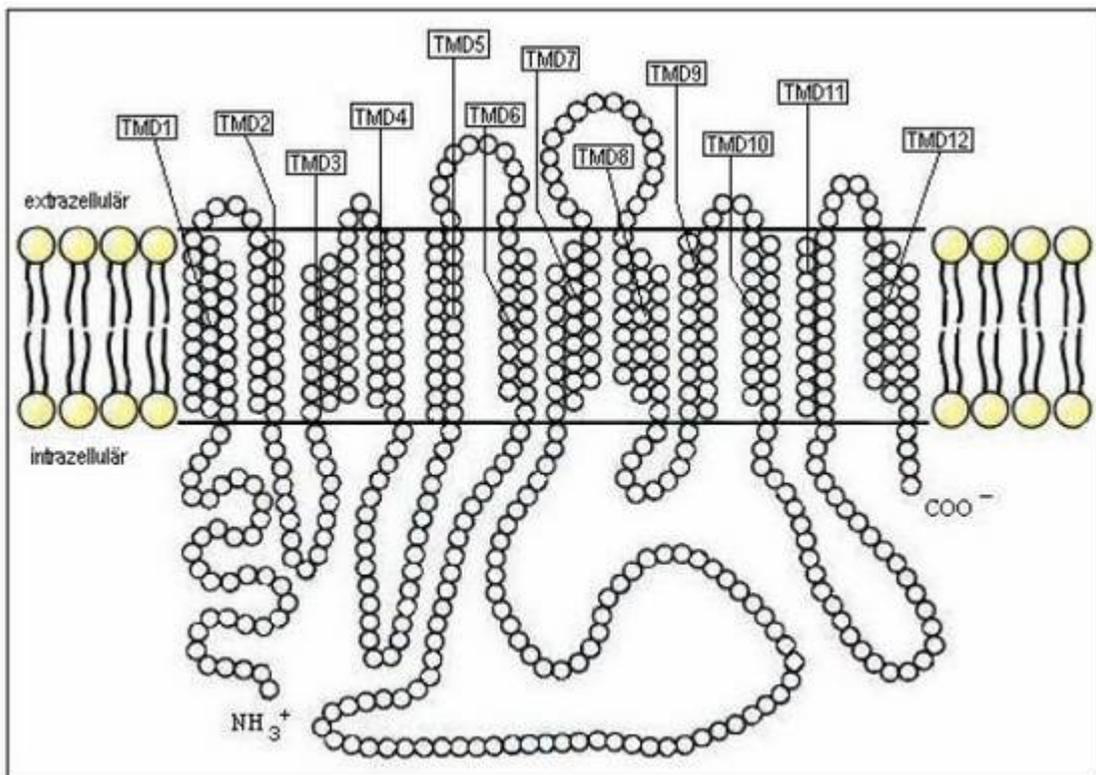


Abb.2: MATP-Protein mit Transmembran-Domänen (TMD), Newton *et al.*, 2001, (verändert)

Über die Funktion des MATP-Proteins existieren mehrere Theorien:

Das Protein zeigt zum einen große Ähnlichkeiten zu Saccharose-Protonen-Symportern aus Pflanzen. Man spekuliert, dass auch das MATP-Protein einen Co-Transport von Zuckermolekülen und Protonen ermöglicht und so das osmotische Potential, das für die Volumenregulation der Melanosomen erforderlich ist, aufrechterhält (Newton *et al.*, 2001). Die veränderte Form der Melanosomen (siehe oben) bei *uw*-mutierten Mäusen unterstützt diese These über die mögliche Aufgabe in der Osmo-Regulation (Newton *et al.*, 2001). Eine Ähnlichkeit zu Transportern, die Aminosäuren oder Monosaccharide transportieren, besteht nicht.

Zum anderen ließ sich auch eine gewisse Ähnlichkeit zum P-Protein (siehe OCA2) feststellen. Es wird vermutet, dass das P-Protein als ein Anionen-Transporter in der Melanosomen-Membran funktioniert. Es ist vorstellbar, dass beide Proteine durch Protonentransport zur Erhaltung des niedrigen pH-Wertes in den Melanosomen beitragen (Puri *et al.*, 2000).

Weitere Untersuchungen an der Maus zeigten, dass die Tyrosinase-Aktivität bei *uw*-Mutanten signifikant erniedrigt, die Synthese jedoch nicht beeinträchtigt ist. Dieses Phänomen kann mit einer herabgesetzten Stabilität der Tyrosinase erklärt werden und so möglicherweise darauf hindeuten, dass die intrazelluläre Prozessierung des Schlüsselenzyms Tyrosinase bei diesen Mutanten gestört ist (Costin *et al.*, 2003).

Der Phänotyp von OCA4-Patienten zeigt sich hochvariabel von leichtgradiger bis hin zu schwerster Hypopigmentation (Rundshagen *et al.*, 2004). Auch die okuläre Beeinträchtigung mit Visusverminderung und Nystagmus zeigt verschieden starke Ausprägungen. Bei einigen Patienten wurde eine Zunahme der Pigmentierung der Haare im Laufe ihres Lebens beschrieben (Rundshagen *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2005). Während der erste OCA4-Patient Ähnlichkeiten mit OCA2-Patienten aufwies (Newton *et al.*, 2001), beschrieben Inagaki und Suzuki auch Gemeinsamkeiten mit dem OCA1 (Inagaki *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2005).

In einem deutschen Kollektiv wurde der OCA4 mit einem Anteil von knapp 3 % (fünf von 176) der an Albinismus Erkrankten gefunden (Rundshagen *et al.*, 2004), in Japan dagegen stellt dieser Typ des OCAs mit ungefähr 24 % eine der häufigsten OCA-Formen dar (Inagaki *et al.*, 2004).

1.4 Okulärer Albinismus (OA1)

Beim okulären Albinismus (OA1) sind die pathologischen Veränderungen auf die Augen beschränkt, Haut- und Haarfarbe erscheinen bei Betroffenen unauffällig. Patienten zeigen reduzierte Pigmentierung der Augen mit herabgesetztem Visus, Nystagmus, Strabismus und Lichtempfindlichkeit (Fukai *et al.*, 1995). Der OA1 wird X-chromosomal rezessiv vererbt und ist somit häufiger bei Männern zu finden. Frauen sind auf Grund ihres zweiten X-Chromosoms seltener betroffen. Als Konduktorinnen fallen sie oft nur durch ein scheckiges Bild von pigmentierten und nicht pigmentierten Arealen der Netzhaut auf (Käsmann-Kellner und Ruprecht, 1999). Als beweisend für den OA1 gelten Riesenmelanosomen, die neben normal gestalteten Melanosomen in den Melanozyten des Auges und der Haut gefunden werden. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das *Oal*-Gen für die Reifung und Größe der Melanosomen verantwortlich ist (Cortese *et al.*, 2005).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

International liegen bisher wenige Daten zum OCA4 und dem betroffenen Gen vor. Ein Kollektiv deutscher Albinismuspatienten wurde von Uta Rundshagen 2004 auf Veränderung im OCA4-Gen untersucht (Dissertation, Universität Lübeck, 2004). Es wurden Mutationen und Polymorphismen gefunden. Über Sequenzvarianten in pigmentierten deutschen Kontrollpersonen und ihren potentiellen Einfluss auf die Hautfarbe sind keinerlei Daten veröffentlicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fragestellungen bearbeitet:

Im ersten Teil sollte ein Kollektiv von 95 deutschen Kontrollpersonen ohne Pigmentstörungen auf Veränderungen im OCA4-Gen untersucht. Es sollten folgende Aspekte erarbeitet werden:

- Bei 95 gesunden Personen deutscher Herkunft sollten die sieben Exons des OCA4-Gens auf Auffälligkeiten in der DNA-Sequenz untersucht werden.
- Nachweisbare Sequenz-Veränderungen sollten mit bekannten Polymorphismen bzw. Mutationen verglichen werden.
- Die Häufigkeiten von gefundenen Polymorphismen sollten berechnet und mit den Häufigkeiten in anderen untersuchten Kollektiven verglichen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten DNA-Proben von sechs Patienten, bei denen bisher nur eine Mutation in heterozygoter Form im OCA4-Gen nachgewiesen wurde, auf eine zweite Punktmutation und auf Vorliegen einer Deletion oder Duplikation eines oder mehrerer Exons, untersucht werden. Dazu sollte eine quantitative PCR-Methode etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Aqua Spüllösung	Delta-Pharma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck
Ethanol 100 %	Merck
Ethidiumbromid	Merck
ExoSAP-IT	usb Corporation
Ficoll	Pharmacia Biotech
Formamid 100 % (HIDI)	Eppendorf
HPLC-Wasser	J.T. Baker
Incubation-Mix T.Pol.10x	Q-biogene
Low DNA Mass Ladder	invitrogen
3 M Natriumacetat (pH = 4,6)	Applied Biosystems
d-NTPs Mix (10mM)	Q-biogene
Polymer POP 4 bzw. 7	Applied Biosystems
RealMasterMix 2,5x	Eppendorf
Sequenzier-Puffer (5x)	Applied Biosystems
Standard-Agarose	BMA
SYBR Solution 20x	Eppendorf
Taq-DNA-Polymerase	Q-biogene
TerminationsMix 1.1	Applied Biosystems
Tris	ICN Biomedicals
Xylencyanol	Sigma

2.1.2 Oligonukleotide

Tab.1: OCA4-Primer

Exon	Exon- größe/ PCR- Produkt -länge (in bp)	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
1	385/512	AIM1-F1-uni AIM1-R1-rev AIM1-F2-uni AIM1-R2-rev	uni-AAC ACA GAC CCT AGG ACC AC rev-CAC ACA ATG CTG TAC AGG CTG uni-TAT GTG ACC CCA GTC CTG CT rev-CTC CTG CAG AGG TAC ACA CTA
2	177/244	AIM2-F-uni AIM2-R-rev	uni-CAG GAT TTA GGA GAC CAA TGT rev-CTG AAG GAG AGA CTT TCT GGA
3	326/552	AIM3-F3 AIM3-R3 AIM3-F4 AIM3-R4	CAT ATC CAG GTT GCC TCT GCT GTC TTC CCA TGA AAC TCT TCT CGT CAA ACA GAC CTG TTC ATC TGT GCA GTA TCT CTG AAG C CAT TCC ATC TGA TGA CAA TGG AGG GTC
4	144/227	AIM4-F-uni AIM4-R-rev	uni-GGC TGA GTT TCT GCA GTG AAG rev-ACA GTG ATT GTG TGC ACA GAC
5	124/215	AIM5-F1-uni AIM5-R1-rev	uni-GTA CCT CAA CAG CCT CCA ATC rev-TCC AAG TTG TGC TAG ACC AGA
6	212/388	AIM6-F-uni AIM6-R-rev	uni-GAG GCA CTG CCA GCT GTA ATT rev-GTT ACC CAA GGC AGA GGT TCA
7	225/343	AIM7-F1-uni AIM7-R2-rev	uni-CTG ACC TGT GCC CTA AAT GAC rev-TCC TGC CAT GTG CTT CAC TGT

Angabe der Produktlänge ohne uni- bzw. rev-Sequenz (siehe unten)

Die OCA4-Primer 1-2 und 4-7 wurden von der Firma Invitrogen hergestellt, die Primer für Exon 3 von der Firma biomers.net.

uni = TGT AAA ACG AGC CAG T

rev = CAG GAA ACA GAT GAC C

Tab.2: M13-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'- 3')
M13 Forward	TGT AAA ACG AGC CAG T
M13 Reverse	CAG GAA ACA GAT GAC C

Die Primer wurden hergestellt von biomers.net.

Tab.3: FRDA-Primer

Exon	Exon- größe/Produkt- länge (in bp)	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
4	98/222	FA04 EX4-F	AGC AAT GAT GAC AAA GTG CTA AC
		FA04 EX4-R	TTC GGA AGT CTT TAA GAA TTA C
5a	195/231	FA04 EX5-F	GCT GTG GAA TTA CTA TGC ATT TG
		FA04 EX5-R	TCT TGG CCT GAT AGC TTT TAA TG

Die Primer wurden hergestellt von biomers.net.

2.1.3 Geräte und Gebrauchsartikel

BioPhotometer

Eppendorf

Computerprogramme

BioDocAnalyse

Biometra

SeqScape v2.1.1

Applied Biosystems

Sequencing Analysis

Applied Biosystems

REST-Programm

Pfaffl und Horgan (2001, 2002)

7300SDS V1.3.3

Applied Biosystems

Cycler

MasterCycler gradient

Eppendorf

RoboCycler Gradient 40

Stratagene

UNO II

Biometra

2720 Thermal Cycler

Applied Biosystems

Küvetten

UVette Eppendorf (8,5mm)

MTP-Platten	Applied Biosystems Sarstedt
Optische Folien (optical adhesive covers)	Applied Biosystems
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt
Pipetten	Eppendorf Gilson
Pipettenspitzen	Sarstedt
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems
Sequenziergerät	
3100 Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems
3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Spannungsgeber	
GenePowerSupply GPS 200	Pharmacia
GenePowerSupply GPS 400	Pharmacia
System zur Auswertung der Gelelektrophorese	
UV-Lampe	Vetter GmbH
Zentrifugen	
Centrifuge 5415C	Eppendorf
Centrifuge 5804	Eppendorf

2.1.4 Stammlösungen

Agarose-Gellösung	0,63 μ M Ethidiumbromid 2 mM EDTA 89 mM Tris 89 mM Borsäure 1,5 % (w/v) Standard-Agarose
3x Ficoll-Lösung	150 μ M Bromphenolblau 190 μ M Xylencyanol 7,5 % (w/v) Ficoll 400
10x TBE-Puffer	20 mM EDTA 890 mM Tris 890 mM Borsäure

2.1.5 DNA-Proben

Für dieses Projekt lag aus Vollblut isolierte genomische DNA vor. Die Proben der Personen mit Albinismus wurden von Frau Prof. Dr. Käsmann-Kellner aus der Augenklinik der Universität des Saarlandes gesammelt. Die Kontrollproben und die Probe des FRDA-Patienten stammen aus dem Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck.

2.2 Methoden

2.2.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine einfache Methode, die eine schnelle elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten, z.B. PCR-Produkten, erlaubt. Es wurden für alle Auftrennungen 2 %-ige Agarosegele mit Ethidiumbromid in 1x TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden als Gemisch aus 3 µl Produkt und 3 µl 3x Ficoll aufgetragen. Parallel wurden 2 µl eines Längen-Standards aufgetragen, um die Größe und Konzentration der Produkte abschätzen zu können. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 95-100 V in 1x TBE-Laufpuffer. Mit Hilfe einer UV-Lampe wurden die Proben zur Fluoreszenz angeregt und anschließend mit einer LCD-Kamera aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm „BioDocAnalyse“ (Firma: Biometra) ausgewertet.

2.2.2 Photometrie der DNA-Proben

Absorptionsmessungen wie die Photometrie werden durchgeführt, um Konzentrationen von Proteinen oder Nukleinsäuren zu bestimmen. Es gilt dabei das Lambert-Beersche Gesetz, nach dem die Extinktion proportional zu der Konzentration der absorbierenden Substanz und der durchlaufenden Schichtdicke ist.

Die DNA-Proben wurden mit HPLC-Wasser 1:10 verdünnt und gegen einen Leerwert aus HPLC-Wasser in Küvetten im Photometer (Biophotometer, Firma: Eppendorf) gemessen.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wird zur selektiven Amplifikation eines durch Oligonukleotide (Primer) definierten DNA-Abschnittes benutzt. Das Ausgangsmaterial bestand aus genomischer DNA, die im ersten Schritt bei 94 °C für 5 min denaturiert wurde. Im nächsten Schritt erfolgte bei einer primerspezifischen Temperatur das so genannte

„Annealing“, bei dem sich ein Primer an dem codierenden Strang, der andere an dem Komplementärstrang anlagerte. Die Annealing-Temperatur, die Menge der Primer und der Polymerase wurden zuvor auf einem Thermocycler (Firma: Applied Biosystems) oder einem Temperaturgradienten (MasterCycler gradient, Firma: Eppendorf) optimiert.

Im dritten Schritt, der Extension, synthetisierte die zugesetzte hitzestabile Taq-DNA-Polymerase bei 72 °C aus vorliegenden Nukleotiden (dATP; dTTP; dGTP; dCTG) einen neuen Strang. Diese drei Schritte wurden im Durchschnitt 35x wiederholt. Es folgte eine abschließende Extensionsphase über 5 min bei 72 °C, danach Kühlung auf 4 °C.

Es wurden 12,5 µl – Ansätze hergestellt:

- 1,25 µl Incubation-Mix T.Pol.10x
- 0,25 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl DNA (1:10 Verdünnung des Stocks, ca.10 ng/µl)
- Je 0,5 µl (bzw. 0,25 µl bei Exon 7) des F-Primers bzw. R-Primers (je 10 pmol/ml) (siehe Tab.4)
- 0,1 µl Taq-DNA-Polymerase
- 8,9 µl (bzw. 9,4 µl bei Exon 7) HPLC-Wasser

Tab.4: *Verwendete Primer, -mengen und Annealingtemperaturen (exonspezifisch), Primersequenz s. Tab.1*

Exon	Verwendete Primer	Primermenge in µl, c= 10 pmol/ml	Annealingtemperatur für 30 Sek in °C
1	AIM1-F1-uni, AIM1-R2-rev	0,5	55
1A	AIM1-F1-uni, AIM1-R1-rev	0,5	55
1B	AIM1-F2-uni, AIM1-R2-rev	0,5	55
2	AIM2-F-uni, AIM2-R-rev	0,5	55
3	AIM3-F3, AIM3-R3	0,5	62
3A	AIM3-F3, AIM3-R4	0,5	60
3B	AIM3-F4, AIM3-R3	0,5	60
4	AIM4-F-uni, AIM4-R-rev	0,5	58
5	AIM5-F1-uni, AIM5-R1-rev	0,5	58
6	AIM6-F-uni, AIM6-R-rev	0,5	58
7	AIM7-F1-uni, AIM7-R2-rev	0,25	58

2.2.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion („real time PCR“)

Bei der quantitativen PCR (qPCR) werden die Reaktionszyklen mit Hilfe von Fluoreszenzdetektoren verfolgt, wodurch eine Messung der Konzentrationen der Produkte möglich ist. Ziel der quantitativen PCR ist es, aus dieser Messung auf die anfangs eingesetzte DNA-Menge zu schließen. Dazu werden entweder sequenzspezifische Sondenmoleküle, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, oder DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Als Fluoreszenzdetektor wurde bei diesem Versuch SYBR-Green I eingesetzt, das bei Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) nach Anregung sein Fluoreszenzspektrum ändert und Fluoreszenz emittiert. Bei Bindung mit einsträngiger DNA emittiert dieser Detektor dagegen kaum Fluoreszenz.

Nach den ersten Amplifikationsrunden übersteigt das fluoreszierende PCR-Produkt den Hintergrund, wird messbar und die Reaktion lässt sich als exponentielle Funktion (siehe Abb.3) darstellen, bevor sie nach Verbrauch der Reagenzien eine Sättigung erreicht. Für die anschließende Berechnung wird der Ct-Wert ermittelt, der die Anzahl der PCR-Zyklen angibt, die nötig sind, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Das definierte Fluoreszenzniveau wird durch den so genannten „threshold“ dargestellt, der in Abb.3 durch die grüne horizontale Gerade abgebildet ist. Der Ct-Wert ist durch den Schnittpunkt der Reaktionsgraphen mit dem „threshold“ wiedergegeben.



Abb.3: Ct-Grafik: 1.Phase (Zyklus 1-15): die gebildeten PCR-Produkte sind in der Fluoreszenzintensität nicht vom unspezifischen Hintergrund zu diskriminieren; 2.Phase (Zyklus 16-28): die Produktbildung verläuft exponentiell, je höher die Ausgangskonzentration der DNA, desto eher wird der Messgrenzwert („threshold“) geschnitten (A=höchste, B=mittlere, C=geringste Ausgangskonzentration); 3.Phase (Zyklus 29-40): die Produktbildung geht in eine gesättigte Phase über, es erfolgt kein Fluoreszenzzuwachs. NTC= Leerwert mit Primerdimer-Fluoreszenz.

Mit dem Eppendorf „Real Master Mix“ wurden 20 µl Ansätze hergestellt:

- 9 µl 2.5x RealMasterMix/20x SYBR Solution
- Je 0,5 µl des F- bzw. R-Primer des jeweiligen Exons (10 pmol/ml) (s.Tab.4)
- 1 µl DNA (ca. 10 ng/µl)
- 9 µl HPLC-Wasser

Die Ansätze wurden in MTP-Platten pipettiert und mit optischen Folien verschlossen. Es wurden pro Analyselauf die Ct-Werte im 7300 Real Time PCR System (Firma: Applied Biosystems) von zwei Exons (ein Referenzexon und ein Zielexon) gemessen (siehe Tab.5) und anschließend verglichen. Jede Kontroll- bzw. Patientenprobe wurde als Triple-Wert bestimmt.

Außerdem wurde eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:5, 1:25, 1:75, 1:375, 1:1875) einer Test-DNA mit bekannter Konzentration als Standard mitpipettiert. Hierbei wurden Doppelwerte bestimmt.

Tab.5: Programm für die qPCR

Schritt 1 (Initiale Denaturierung)	95 °C	5:00 min	Zyklen:1
Schritt 2 (Denaturierung, Annealing, Extension)	95 °C	0:15 min	Zyklen: 40
	58 °C	0:30 min	
	68 °C	0:30 min	
Schritt 3 (Dissoziationskurve)	95 °C	0:15 min	Zyklen: 1
	60 °C	0:30 min	
	95 °C	0:15 min	

Die Datenerhebung, d.h. Messung der Fluoreszenz, erfolgte in Schritt 2 bei 68 °C.

Auswertung

Das Ergebnis wurde mit der 7300 System SDS (Sequence Detection Software) Version 1.3.1 von Applied Biosystems und REST (Relative Expression Software Tool = REST©-version 2, Calculation Software for the relative Expression in realtime PCR, using Pair wise fixed reallocation randomisation test©, Pfaffel und Horgan, 2001) ausgewertet.

Das REST-Programm wendet folgende Formel an:

$$R = \frac{\left(\text{Expression}_{(\text{Ziel exon})} \right)^{\Delta Ct_{(\text{Ziel exon})} (\text{MW (Kontrolle)} - \text{MW (Probe)})}}{\left(\text{Expression}_{(\text{Referenz exon})} \right)^{\Delta Ct_{(\text{Referenz exon})} (\text{MW (Kontrolle)} - \text{MW (Probe)})}}$$

Erläuterung: R = Ratio, MW = Mittelwert

Da SYBR-Green I unspezifisch an jede dsDNA bindet, somit auch an unerwünschte Primer-Dimere o.ä., wurden nur die Ct-Werte benutzt, die Messwerte des spezifischen Produktes beschrieben. Dazu wurde die Schmelzkurve „Dissociation Curve“ (7300SDS) ausgewertet:

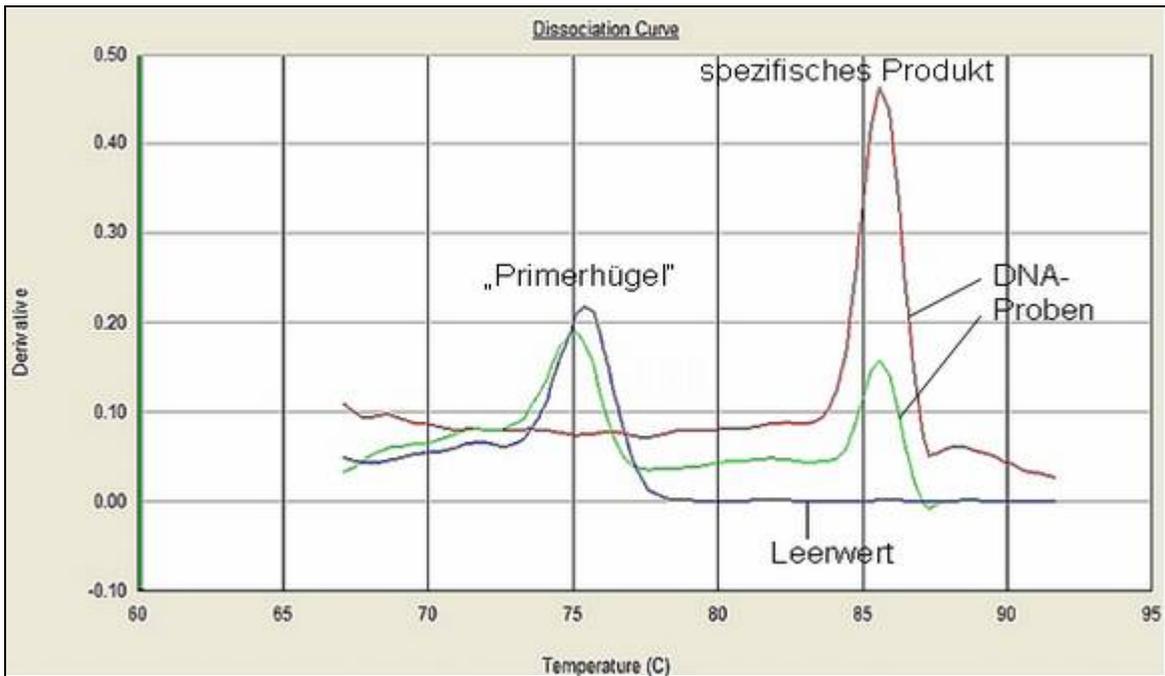


Abb.4: Schmelzkurve, DNA-Proben (grüner bzw. roter Graph) mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen. Es zeigen sich Peaks bei ca. 75 °C und 86 °C, wobei der erste Peak durch unspezifisches Produkt (z.B. Primerdimere) zu Stande kommt („Primerhügel“) und der zweite Peak bei höherer Temperatur das spezifische Produkt darstellt. Bei optimaler Ausgangskonzentration der DNA (roter Graph) bildet sich kaum unspezifisches, sondern fast nur spezifisches Produkt. Der blaue Graph bildet den Leerwert ab, bei dem nur der „Primerhügel“ zu erkennen ist, da kein spezifisches Produkt entsteht (kein Peak bei der höheren Temperatur).

Anhand des Leerwertes (blauer Graph, Abb.4), in dem keine DNA zugesetzt ist, kann man das unspezifische Produkt erkennen und bewerten (Wilhelm und Hahn, 2004). Das unspezifische Produkt entsteht z.B. durch Primer-Dimere und tritt in der Schmelzkurve als „Primerhügel“ bei geringerer Temperatur (Abb.4 bei ca. 75 °C) als das spezifische Produkt (Abb.4 bei ca. 86 °C) in Erscheinung. Abhängig von der eingesetzten DNA-Menge (roter bzw. grüner Graph) kann das Verhältnis von unspezifischen zu spezifischen Produkten (roter Graph) verschoben werden. Hierbei korreliert eine größere DNA-Menge nicht unbedingt mit spezifischeren Produkten.

Die DNA-Mengen der Proben wurden nach Auswertung der verschiedenen Verdünnungen der Standardkurve entsprechend ausgewählt. Dazu wurde die Funktion „quantity“ (SDS Programm), die die eingesetzte DNA-Menge berechnet, zur Hilfe genommen.

Da teilweise große Schwankungen bei Wiederholungsmessungen festgestellt worden waren, wurde jedes Exon aller Proben mindestens 5x gemessen, um „ausreissende“ Werte möglichst auszugleichen.

Mit der Standardkurve, erstellt aus den Verdünnungsstufen, wurde mit Hilfe des REST-Programms die Effizienz berechnet. Grundsätzlich geht man bei einer gut eingestellten PCR von einer 100%-igen Effizienz aus, d.h. es kommt in jedem Zyklus zu einer Verdopplung (2,0) der Produkte. Die wahre Effizienz unterliegt jedoch gewissen Schwankungen. In der vorliegenden Arbeit wurde darauf geachtet, dass die Effizienz bei ca. 2,0 lag und die „slope“ (Steigung der aufgetragenen Standardkurve) ca. -3 betrug (siehe Abb.5).

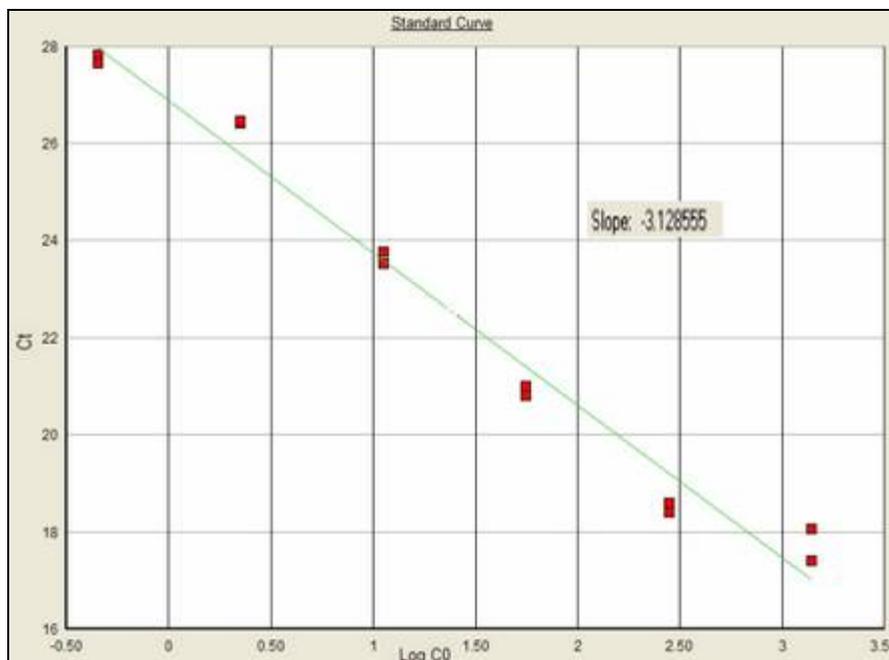


Abb.5: Standardkurve aus Verdünnungsreihe, halblogarithmische Darstellung der Ct-Werte aus Doppelbestimmungen in Abhängigkeit der Verdünnungsstufen

Bei den Kontrollen bzw. Patienten wurde mit den Mittelwerten der dreifach bestimmten Ct-Werte gerechnet. Nach den mindestens fünf Wiederholungsmessungen wurden Extremwerte herausgenommen und aus den restlichen (mindestens drei) Werten wiederum der Mittelwert bestimmt.

Die Methode wurde zunächst an einer DNA-Probe eines an der Friedreich-Ataxie-erkrankten Patienten (FRDA), bei dem bereits eine Exondeletion nachgewiesen wurde,

etabliert (nähere Erläuterungen siehe Ergebnisse). Anschließend wurde die Methode dann an den DNA-Proben der Albinismuspatienten durchgeführt.

2.2.5 DNA-Sequenzierung mit der Dideoxymethode

Die Dideoxymethode nach Sanger dient der Bestimmung von DNA-Sequenzen und erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruchs. Voraussetzung ist der statistisch verteilte Abbruch der komplementären Strangsynthese durch den Einbau von Didesoxynukleotiden, welche keine 3'OH Gruppe besitzen. Die Nukleotide sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (für A, T, G oder C) markiert. Anschließend erfolgt eine Auftrennung der Syntheseprodukte, wobei die DNA-Fragmente im elektrischen Feld an einem Laser vorbeiwandern, der die Fluoreszenz anregt. Die Signale werden mit einem Detektor aufgenommen und digital gespeichert.

Je 5 µl eines auf 5-10 ng/µl verdünnten PCR-Produktes wurde mit 2 µl „ExoSap“ (Enzymmix aus Exonuclease I, Phosphatase und speziellem Puffer) versetzt, um überschüssige Primer und dNTPs abzubauen. Der Mix wurde in einem Thermocycler 15 min bei 37 °C inkubiert, anschließend bei 80 °C für 15 min denaturiert.

Danach wurde ein 10 µl-Ansatz hergestellt:

- 1 µl Produkt (nach „ExoSap“-Behandlung)
- 1 µl Terminationsmix 1.1 (Firma: Applied Biosystems)
- 1,5 µl Sequenzier-Puffer (5x)
- 0,5 µl F- oder R-Primer des Exons bzw. M13-Primer FWD oder REV (10pmol/ml)
- 6 µl HPLC-Wasser

Tab.6: Programm für die Sequenzreaktion

Denaturierung	94 °C	1:00 min	Zyklen: 1
Sequenzreaktion	94 °C	0:10 min	Zyklen: 25
	60 °C	0:05 min	
	60 °C	1:00 min	
Kühlung	4 °C	∞	Zyklen: 1

Nach der PCR wurden die Proben aufgereinigt. Zunächst wurde jede Probe mit einem Mix aus 2 μ l 3 M Natriumacetat (pH = 4,6), 10 μ l HPLC-Wasser und 50 μ l Ethanol 95 % versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Danach wurden die Proben 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Proben mit je 50 μ l frisch hergestelltem Ethanol 70 % versetzt, nochmals 10 min zentrifugiert und wieder der Überstand abpipettiert. Die Proben wurden kurz bei 56 °C getrocknet und 20 μ l Formamid 100 % (HIDI, Firma: Eppendorf) zugegeben. Über Nacht lösten sich die Proben lichtgeschützt bei 4 °C und wurden am nächsten Tag auf dem Kapillar-Sequenziergerät 3130 Genetic Analyzer oder 3100 Avant Genetic Analyzer (Firma: Applied Biosystems) gemessen. Für die Messung wurde das Polymer POP7 bzw. POP4 (Firma: Applied Biosystems) verwendet und die Injektionszeit mit 6 sec eingestellt. Die Signale wurden aufgezeichnet und mit den Computerprogrammen Sequencing Analysis (Firma: Applied Biosystems) und SeqScape v2.1.1 (Firma: Applied Biosystems) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzierungen

In der vorliegenden Arbeit wurden, um die Frequenz von Polymorphismen und Mutationen zu evaluieren, 95 normal-pigmentierte Personen deutschen Ursprungs (im Folgenden Kontrollen genannt) auf Veränderungen im *MATP*-Gen untersucht. Für die DNA-Proben der Kontrollen wurden zunächst per PCR die sieben Exons des *MATP*-Gens amplifiziert. Es erfolgte eine stichprobenartige Erfolgskontrolle durch Agarosegel-Elektrophorese. Danach wurde jeweils ein Strang der Proben sequenziert. Bei Auffälligkeiten, unvollständigen Sequenzen oder unklaren Signalen wurde ergänzend die entsprechende Rückwärts- bzw. Vorwärtsreaktion angesetzt. Das Ergebnis wurde mit der cDNA-Sequenz aus einer öffentlichen Datenbank verglichen (NCBI Nucleotide, Zugangsnummer AF172849). Bei Sequenzabweichungen an identischer Stelle in der Vor- und Rücksequenzierung wurde von einer Veränderung auf DNA-Ebene ausgegangen. Von der Sequenzveränderung wurden mögliche Auswirkungen auf Proteinebene abgeleitet. Zusätzlich wurden die codierenden Bereiche der *MATP*-Gene von sechs Albinismuspatienten sequenziert, bei denen nur eine Mutation bekannt war. Die im Folgenden beschriebenen Sequenzveränderungen sind in Tab.7 und 8 zusammengefasst.

3.1.1 Sequenzveränderungen im *MATP*-Gen von Kontrollen

Bei fünf der 95 getesteten Kontroll-DNAs zeigten sich insgesamt zehn Auffälligkeiten, wobei eine der Auffälligkeiten im Intronbereich liegt. Vier der fünf auffälligen Proben zeigten mehrere Sequenzveränderungen. Die Veränderungen lagen in den Exons 3, 4, 5 bzw. in Exon 7 in 3'-Richtung vom Stopp-Codon.

c.814G>A

In Exon 3 ist an Position c.814 ein Guanin durch ein Adenin ausgetauscht, wodurch das Triplet anstatt für Glutaminsäure für Lysin codiert (E272K). Diese Auffälligkeit fand sich jeweils auf einem Allel (heterozygot) bei den Proben K7, K51 und K55.

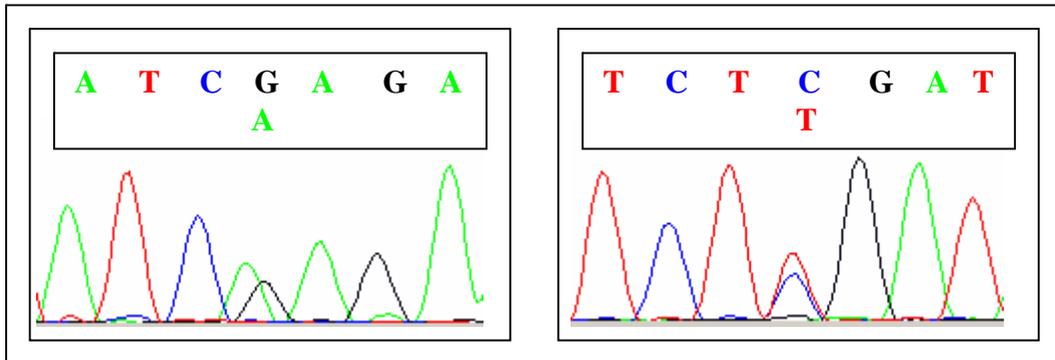


Abb.6: c.814G>A in Vorwärts- (links) bzw. Rückwärts-Sequenzierung (rechts), obere Buchstabenfolge entspricht der Wildtyp-Sequenz

c.987G>A

Diese Veränderung, bei der ein Guanin durch ein Adenin ersetzt wird, liegt in Exon 4 und wurde in den Proben K23 und K29 in heterozygoter Form gefunden. Diese Veränderung hat auf die abgeleitete Aminosäure-Sequenz (T329T) keine Auswirkung (so genannte stille Mutation).

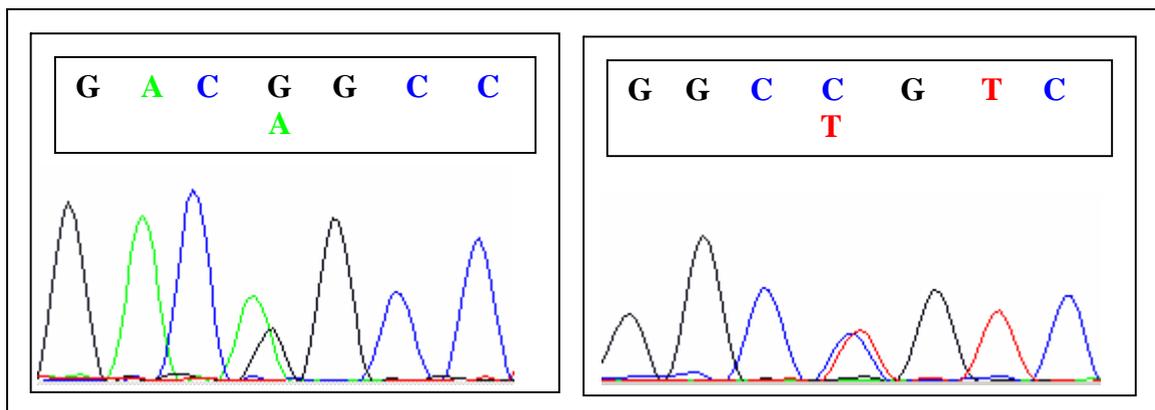


Abb.7: c.987G>A in Vorwärts- (links) bzw. Rückwärts-Sequenzierung (rechts), obere Buchstabenfolge entspricht der Wildtyp-Sequenz

c.1122C>G

An Position c.1122 in Exon 5 fand sich eine Überlagerung eines Cytosin- und eines Guaninsignals. Jeweils auf einem Allel ist ein Cytosin durch ein Guanin substituiert, wodurch die Aminosäure Phenylalanin an Stelle 374 durch Leucin ausgetauscht wird (F374L). Diese Veränderung wurde in vier Proben gefunden: K23, K29, K51 und K55.

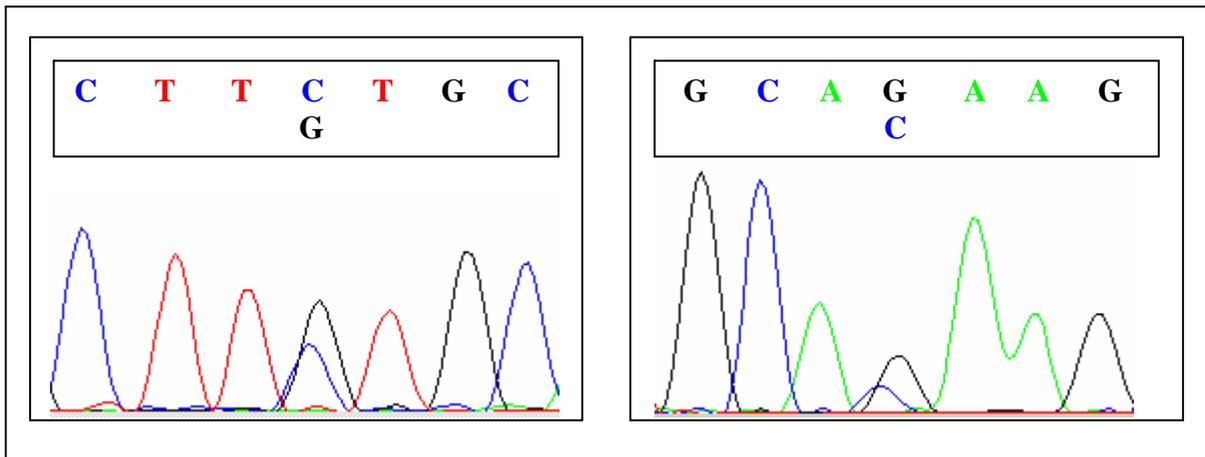


Abb.8: *c.1122C>G* in Vorwärts- (links) bzw. Rückwärts-Sequenzierung (rechts), obere Buchstabenfolge entspricht der Wildtyp-Sequenz

c.1617A>C

In Exon 7 ist die 24. Base nach dem Stopp-Codon (c.1617) betroffen, was auf Proteinebene keine Auswirkungen hat. An der Position 1617 überlagert ein Cytosin-Signal das eigentliche Adenosin-Signal (c.1617A>C). Die Probe K55 ist heterozygot für diese Veränderung. Aufgrund der Lage der Veränderung außerhalb des codierenden Bereichs und der Lage der eingesetzten Primer konnte die Veränderung nur auf einem Strang nachgewiesen werden.

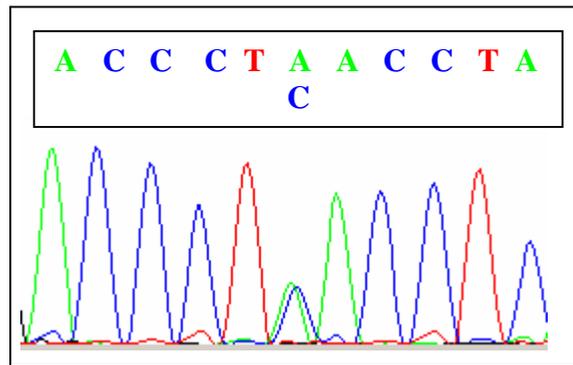


Abb.9: *c.1617A>C* in Vorwärts-Sequenzierung, obere Buchstabenfolge entspricht der Wildtyp-Sequenz.

3.1.2 Sequenzveränderungen im *MATP*-Gen von Personen mit Albinismus

Beim Sequenzieren der sechs Patientenproben, bei denen eine Mutation im *OCA4*-Gen in heterozygoter Form bekannt war, zeigten sich bei vier Proben zusätzliche Auffälligkeiten zu denen von Uta Rundshagen schon beschriebenen Mutationen bzw. Polymorphismen. Bei einer dieser Proben lag die Veränderung im Intronbereich und wurde deshalb nicht weiterverfolgt (siehe Diskussion). Für die anderen betroffenen Patienten wurden die Proben der Eltern angefordert, um zu untersuchen, ob die Mutationen in *cis* oder *trans* vorliegen. Hierbei bedeutet *cis*, dass beide Veränderungen auf einem Allel liegen; in *trans* trägt jedes Allel eine der Veränderung.

Patient 7431

Die Analyse dieser DNA bestätigte die von Rundshagen gefundene Deletion in Exon 4 (c.986delC) und die Veränderung in Exon 5 (c.1122C>G). Zusätzlich konnte eine Veränderung in Exon 2 nachgewiesen werden: An Position c.469 wird das Guanin von einem Adenin in einem Allel überlagert (c.469G>A), wodurch die Aminosäure Asparaginsäure an Stelle 157 durch Asparagin ausgetauscht wird (D157N).

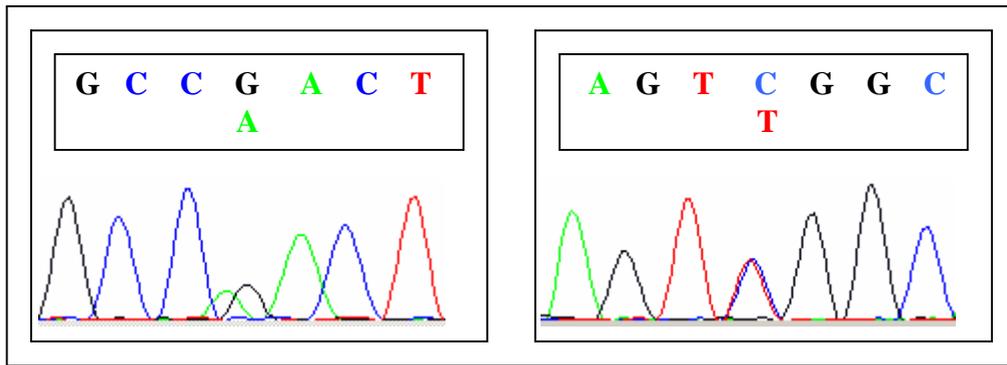


Abb.10: *c.469G>A in Vorwärts- (links) bzw. Rückwärts-Sequenzierung (rechts), obere Buchstabenfolge entspricht der Wildtyp-Sequenz*

In der mütterlichen DNA fand sich sowohl die Veränderung in Exon 5 (c.1122C>G) als auch die in Exon 4 (c.986delC), nicht jedoch in Exon 2 (c.469G>A). Die DNA des Vaters stand nicht zur Verfügung.

Patient 7665

Auch hier ließ sich die von Rundshagen gefundene Veränderung in Exon 3 an Position c.606 (c.606G>C) bestätigen, die einen Aminosäure-Austausch von Tryptophan zu Cystein an Stelle 202 verursacht (W202C).

Patient 7563

Sowohl die Veränderung in Exon 3 (c.814G>A, E272K) als auch in Exon 5 (c.1122C>G, F374L) wurde gefunden. Daneben wurde ein Austausch im Intron-Bereich des Exons 3 gefunden, der aber nicht weiterverfolgt wurde (-89/ Exon 3) (siehe Diskussion).

Patient 7593

Außer den von Rundshagen gefundenen Auffälligkeiten in Exon 4 (c.1047delC) und Exon 5 (c.1122C>G) konnten keine weiteren dargestellt werden.

Patient 7658

Zusätzlich zu der beschriebenen Insertion in Exon 7 (c.1573_1574insTGCTCTCT) wurde eine Signalüberlagerung an Position c.1082 (c.1082T>C) in Exon 5 gefunden, wodurch es in der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz zu einem Austausch von Leucin zu Prolin kommt (L361P). Dieser Austausch wurde bei Rundshagen bereits für einen anderen Patienten beschrieben. Die DNA der Eltern stand nicht zur Verfügung.

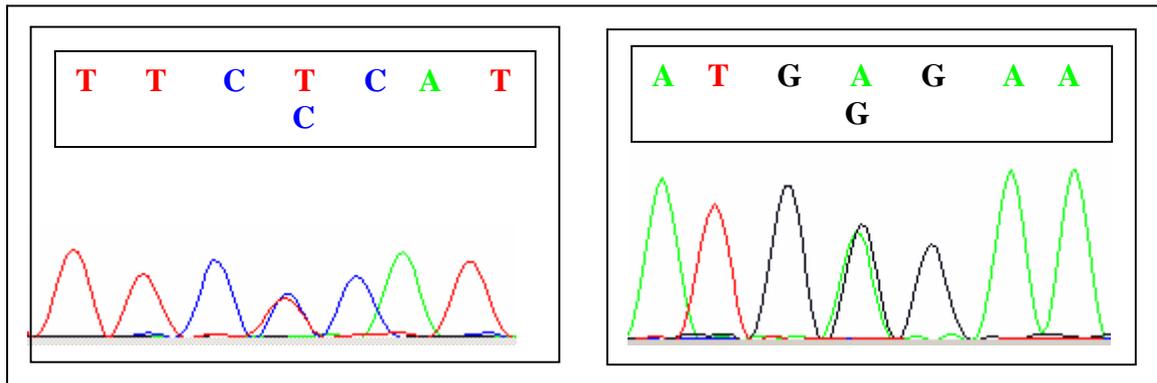


Abb.11: c.1082T>C in Vorwärts- (links) bzw. Rückwärts-Sequenzierung (rechts), obere Buchstabenfolge entspricht der Wildtyp-Sequenz

Patient 7541

Neben den Auffälligkeiten in Exon 4 (c.986delC) und Exon 5 (c.1122C>G) fand sich eine weitere Veränderung in Exon 4 an Position c.958. Hier wird in einem Allel das Cytosin durch ein Thymin ersetzt (c.958C>T), was zu dem Austausch der Aminosäure Leucin durch Phenylalanin (L320F) führt.

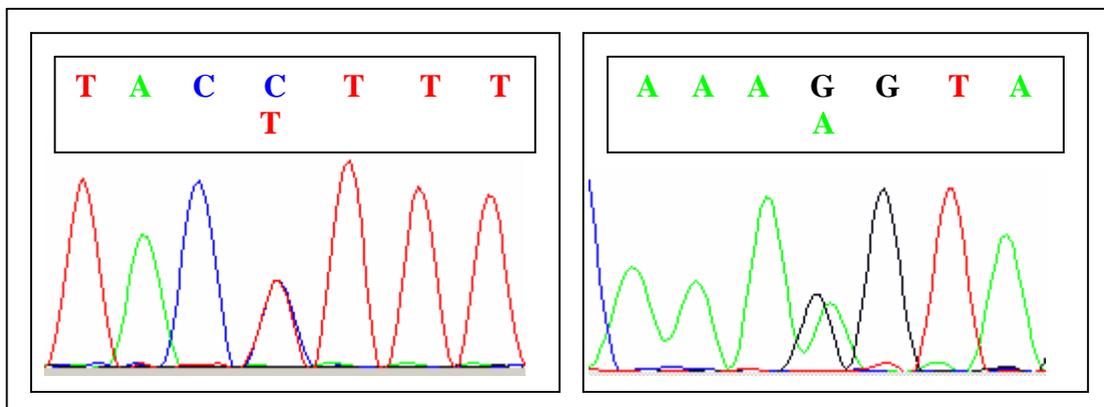


Abb.12: c.958C>T in Vorwärts- (links) bzw. Rückwärts-Sequenzierung (rechts), obere Buchstabenfolge entspricht der Wildtyp-Sequenz

Auch bei diesem Patienten wurden die elterlichen DNA-Proben angefordert und untersucht: Bei der Mutter fanden sich die Veränderungen c.986delC und c.1122C>G, bei dem Vater konnte die Veränderung c.958C>T nachgewiesen werden.

Tab.7: Zusammenfassung der gefundenen Sequenzveränderungen

Exon	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Proteinebene	DNA-Probe
2	c.469G>A	D157N	7431
3	c.606G>C	W202C	7665*
	c.814G>A	E272K	K7, K51, K55, 7563*
4	c.958C>T	L320F	7541
	c.986delC	Frameshift	7541*, 7593*, 7431*
	c.987G>A	T329T	K23, K29
5	c.1082T>C	L361P	7658
	c.1122C>G	F374L	K23, K29, K51, K55, 7431*, 7541*, 7563*, 7593*
7	c.1573_1574insTGCTCTCT	Frameshift	7658*

* = bereits von Rundshagen bei diesem Patienten beschrieben

Tab.8: Veränderungen außerhalb des codierenden Bereichs

Veränderung auf DNA-Ebene	DNA-Probe
-89/ Exon 3 (A>C)	7563
c.1617A>C, Base 24 nach Stopp-Codon	K55

3.2 Deletionsscreening

In der Arbeit von Uta Rundshagen werden sechs Patienten beschrieben, bei denen nur eine Mutation nachgewiesen werden konnte. Für die Krankheitsausprägung des Albinismus wie sie diese sechs Patienten zeigen, ist jedoch, da es sich um einen rezessiven Erbgang handelt, eine zweite Mutation zu erwarten. Bei Sequenzierungen können größere Deletionen wie z.B. die eines oder mehrerer Exons nicht erkannt werden, weil eine derartige Deletion von dem anderen Allel „überdeckt“ werden kann. In dieser Arbeit wurde eine genspezifische quantitative PCR-Analyse (qPCR) zum Nachweis von Exon-Deletionen oder -Duplikationen etabliert.

Bei der Resequenzierung (siehe oben) wurden bei drei der sechs Patienten weitere Veränderungen entdeckt, die wahrscheinlich als zweite krankheitsverursachende Mutation anzusehen sind. Wenn man davon ausgeht, dass ein Patient zwei Mutationen hat, so wird keine weitere Deletion eines oder mehrerer Exons zu erwarten sein, weil die gefundenen Veränderungen für die Ausbildung des Krankheitsbildes vermutlich ausreichen. Die DNA-Proben dieser drei Patienten wurden im Screening trotzdem mitgeführt. Die Messwerte dieser Proben können als weitere Kontrollen bewertet werden.

3.2.1 Quantitative PCR

3.2.1.1 Quantitative PCR mit FRDA-Kontroll-DNA

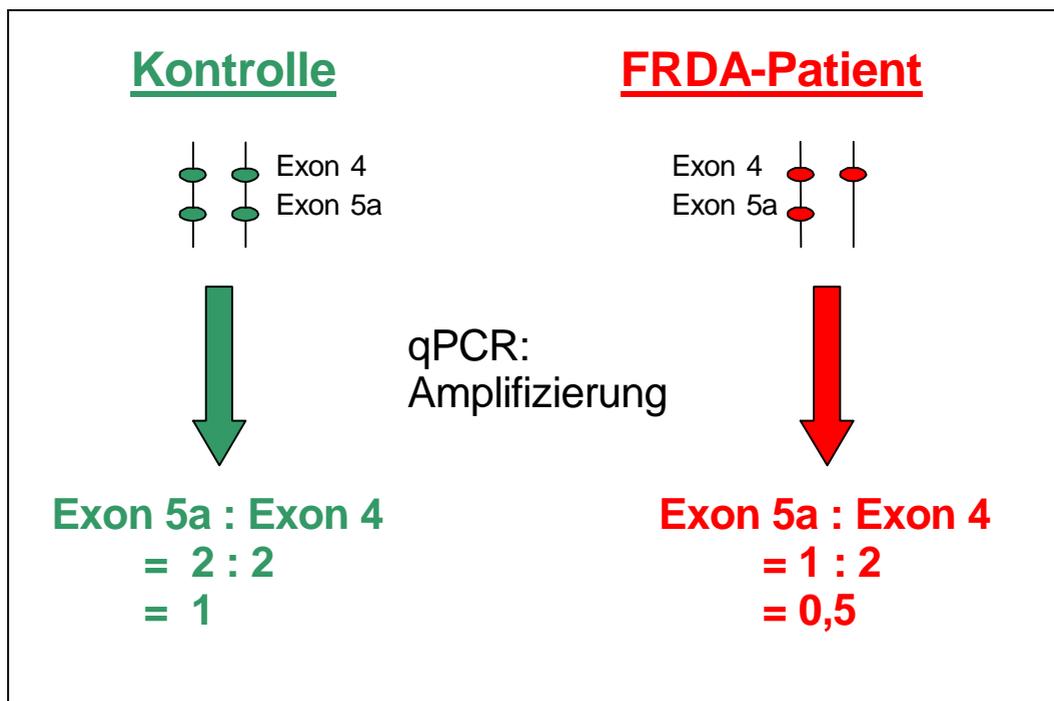
Die Methode der qPCR wurde mit einer DNA eines an der Friedreich-Ataxie erkrankten Patienten (FRDA) etabliert, bei dem eine Deletion von 2776 bp, die das vollständige Exon 5a beinhaltet, vorliegt. Der Patient war für diese Veränderung heterozygot, eine zweite Mutation in Form einer Trinukleotid-Expansion war nachgewiesen worden (Zühlke *et al.*, 2004).

Die Messungen mit verschiedenen DNA-Konzentrationen wurden jeweils 5x wiederholt und die Ergebnisse nach der Berechnung mit dem REST-Programm gemittelt (siehe Tab.9). Bedingt durch unterschiedliche PCR-Effizienzen der verschiedenen Exons wurden verschiedene DNA-Konzentrationen als Ausgangsmengen eingesetzt (siehe 2.2.4).

Tab.9: Mittelwerte der Ct-Werte der FRDA-Probe

Konzentrationen der DNAs Exon 4/Exon 5a	Mittelwert der Verhältnisse
1:10/1:1	0,538786
1:10/1:5	0,69682
1:50/1:1	0,520878
1:50/1:5	0,73435

Hierbei bedeutet ein Wert von „0,5“, dass Exon 5a (das zu untersuchende Ziel-Exon, das bei diesem Patienten deletiert ist) nur halb so viel/oft wie Exon 4 (als Referenz-Exon) amplifiziert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass im ursprünglichen Ansatz, der genomischen DNA des Patienten, Exon 4 „zweimal“, Exon 5a nur „einmal“, vorhanden war. Kontrollproben, bei denen keine Exondeletion vorliegt, erreichen somit Werte um 1,0 (siehe Abb.13).

**Abb.13:** Prinzip des Nachweises einer Exondeletion mit qPCR

3.2.1.2 Quantitative PCR im *MATP*-Gen

Bei den Proben der Albinismuspatienten wurden analog jeweils zwei Exons bzw. Exonabschnitte des *MATP*-Gens miteinander verglichen. Dazu wurden Exons mit ähnlicher Länge und ähnlichen PCR-Bedingungen ausgewählt. Als DNA-Kontrollproben wurden zwei Patienten ausgewählt, bei denen bereits zwei Mutationen im *MATP*-Gen nachgewiesen worden waren, so dass eine weitere Veränderung in Form einer Deletion oder Duplikation sehr unwahrscheinlich erscheint.

Wie in 2.2.4 beschrieben, wurden für jede Probe Triple-Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte der Ct-Werte mit Hilfe des REST-Programms ins Verhältnis gesetzt. Jedes Exon wurde mindestens fünf Mal gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein Exon möglichst gegen verschiedene Exons verglichen wurde, so dass eine mögliche Deletion von mehreren hintereinander liegenden Exons nicht übersehen werden konnte. Die Extremwerte aus den fünf Messungen wurden herausgenommen und aus den übrigen mindestens drei Werten wiederum ein Mittelwert errechnet (siehe Tab.10).

Tab.10: Mittelwerte der Ct-Werte der Albinismus-Patienten

Exon	Patient 7431	Patient 7541	Patient 7563	Patient 7593	Patient 7658	Patient 7665
1A	1,055102	1,159872	0,896793	0,823017	0,934549	1,26659
1B	1,230649	1,307769	1,203396	1,026253	1,242768	0,968430
2	0,889492	1,143958	0,915599	0,895546	1,006399	1,037111
3A	0,95863	0,87442	1,124164	1,21563	1,07512	0,94018
3B	0,815642	0,7664	0,835084	0,976548	0,83516	1,042924
4	1,079990	1,241156	1,044859	0,959126	1,236307	1,168861
5	1,118913	1,133814	1,080256	0,966195	1,18718	1,168861
6	0,98361	0,915486	0,948066	1,063039	0,839278	0,8448
7	0,98473	0,852669	1,042414	1,140512	0,860559	0,851047

Die gemessenen Werte liegen mit Schwankungen um den Wert 1,0. Der maximale Wert liegt bei 1,308, der minimale Wert bei 0,766 (Pat 7541). Alle anderen gemittelten Ct-Werte liegen zwischen 0,815 und 1,267.

4 Diskussion

Bei der Untersuchung des *MATP*-Gens von 95 normal pigmentierten deutschen Kontrollpersonen wurden vier verschiedene Sequenzveränderungen gefunden, die im Folgenden als Polymorphismus oder Mutation bewertet werden.

Ein **Polymorphismus** ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein zweier oder mehrerer Varianten, die in einer Population mit signifikanter Häufigkeit auftreten. Im weiteren Sinne meint man damit in der molekularen Genetik jede Sequenzvariante, die mit einer Häufigkeit von $> 1\%$ auftritt (Strachan und Read, 2005).

Der Begriff der Mutation wird in der Genetik nicht einheitlich definiert. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff **Mutation** für seltene (Häufigkeit $< 1\%$) Sequenzveränderungen mit zu erwartender Krankheitsrelevanz („disease-causing change“) verwendet (Dunnen und Antonarakis, 2001).

Mutationen können Folgen für das Genprodukt haben, in dem sie es in Struktur und Funktion verändern oder einschränken. Die Änderung einer Base, kann zum Austausch einer Aminosäure mit völlig anderen chemischen Eigenschaften führen und so das Protein funktionslos machen. Nach den Seitenketten, die für die chemischen Eigenschaften verantwortlich sind, teilt man Aminosäuren in hydrophile/hydrophobe, basische/saure/neutrale und polare/unpolare Gruppen ein. Die Sequenz der Aminosäuren, die so genannte Primärstruktur, bestimmt auch die räumliche Struktur (Sekundär- bzw. Tertiärstruktur), die durch die Interaktionen der verschiedenen Seitenketten determiniert wird. Eine in ihren Eigenschaften veränderte Seitenkette kann also auf das gesamte Protein Auswirkungen haben.

4.1 Polymorphismen

Häufigkeiten der gefundenen Polymorphismen (siehe Tab.11) im Kollektiv von 95 gesunden Personen deutscher Herkunft:

Tab.11: *Nachgewiesene Polymorphismen in den 95 DNA-Proben von Kontrollpersonen*

Gefundener Polymorphismus	DNA-Proben der Kontrollpersonen
E272K	K7, K51, K55
T329T	K23, K29
F374L	K23, K29, K51, K55

Die theoretische Verteilung der Allelkombinationen kann mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz errechnet und mit den Verteilungen der vorliegenden Arbeit verglichen werden.

Dabei gilt: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$,

wobei p = Häufigkeit des Wildtypallels (wt)

q = Häufigkeit des veränderten Allels (mut)

Gesamtzahl der Proben = 95

Gesamtzahl der Allele: $95 * 2 = 190$

4.1.1 Polymorphismus E272K

Die Veränderung c.814G>A, die einen Aminosäure-Austausch Glutamat durch Lysin (E272K) zur Folge hat, konnte bei drei von 95 Personen in heterozygoter Form gefunden werden. Das entspricht einem Anteil von 3,158 %.

Der Aminosäure-Austausch ist zwischen den Transmembran-Domänen 6 und 7 innerhalb einer intrazellulären Proteinschleife lokalisiert. Glutamat ist eine saure Aminosäure, deren Carboxylrest in der Seitenkette im physiologischen Milieu deprotoniert und somit als Anion vorliegt. Lysin dagegen ist eine basische Aminosäure, deren Aminogruppe in der

Seitenkette im physiologischen Milieu positiv geladen ist. Dieser Aminosäure-Austausch bedingt möglicherweise eine Veränderung der Ladungsverhältnisse im Protein.

Häufigkeit von wt/wt = 92

Häufigkeit von wt/mut = 3

Häufigkeit von mut/mut = 0

Berechnung der Allelhäufigkeiten:

$$p(\text{wt}) = (92 * 2 + 3) \div 190 = 98,42 \%$$

$$q(\text{mut}) = 3 \div 190 = 1,5789 \%$$

Berechnung der theoretischen Häufigkeiten:

$$\text{wt/wt} = p^2 * 95 = 92,02$$

$$\text{wt/mut} = 2pq * 95 = 2,9525$$

$$\text{mut/mut} = q^2 * 95 = 0,02368$$

Das theoretische Ergebnis stimmt mit dem tatsächlichen gut überein.

Der Polymorphismus E272K wurde in der Literatur bereits beschrieben:

Nakayama *et al.* fand diesen Polymorphismus in Kollektiven aus Japan (n=49) und aus Neu-Guinea (n=52), hingegen waren seine untersuchten Gruppen aus weißen Südafrikanern (n=54) und aus Ghana (n=50) monomorph (Allelfrequenz <0.01) in Bezug auf diese Veränderung (Nakayama *et al.*, 2002).

In einer weiteren Arbeit ergab sich in Kontroll-Allelen von 104 normal pigmentierten Japanern eine Allelfrequenz von 0,37 (76/208) für den Polymorphismus E272K (Inagaki *et al.*, 2004).

In der Arbeit von Rundshagen fand sich die Veränderung in einem Kollektiv von 176 Albinismuspatienten nur bei einer Person (1/176) und wurde daher per Definition (siehe oben) als Mutation gewertet (Rundshagen *et al.*, 2004). Wie auch bei Rundshagen wurden in dem untersuchten Kollektiv dieser Arbeit im Vergleich zu den oben genannten Arbeiten eher wenige Individuen (3/95), die diesen Polymorphismus tragen, gefunden. Dieses Ergebnis lässt sich möglicherweise auf bevölkerungs- bzw. populationsspezifische Unterschiede zurückführen.

4.1.2 Polymorphismus T329T

Der Austausch c.987G>A hat keine Veränderung auf Proteinebene zur Folge, da beide Triplets für Threonin (T329T) codieren. Die Veränderung wurde bei zwei von 95 Personen in heterozygoter Form gefunden, wodurch sich ein Anteil von 2,105 % ergibt.

Häufigkeit von wt/wt = 93

Häufigkeit von wt/mut = 2

Häufigkeit von mut/mut = 0

Berechnung der Allelhäufigkeiten:

$$p(\text{wt}) = (93 * 2 + 2) \div 190 = 98,95 \%$$

$$q(\text{mut}) = 2 \div 190 = 1,053 \%$$

Berechnung der theoretischen Häufigkeiten:

$$\text{wt/wt} = p^2 * 95 = 93,02$$

$$\text{wt/mut} = 2pq * 95 = 1,98$$

$$\text{mut/mut} = q^2 * 95 = 0,01053$$

Das theoretische Ergebnis stimmt mit dem tatsächlichen gut überein.

Newton fand in einem Kollektiv von 102 hypopigmentierten Personen verschiedener Herkunft 18 Personen, die Träger dieser Veränderung waren (17,6 %). Darunter waren 17 Heterozygote und ein Individuum, das die Veränderung in homozygoter Form trug (Newton *et al.*, 2001).

In einem Kollektiv von japanischen OCA-Patienten (n=34) fanden sich 18 Personen mit T329T, was eine Allelfrequenz von 0,26 ergibt. In einer Kontrollgruppe mit normal pigmentierten Japanern war die Frequenz für den Genotyp c.987G>A 0,27 (57 Allele von 208) (Inagaki *et al.*, 2004).

Die Untersuchungen von Rundshagen ergaben wie beim oben beschriebenen Polymorphismus einen niedrigeren Wert mit einer Allelfrequenz = 0,011 (Rundshagen *et al.*, 2004). Diese Allelfrequenz stimmt mit dem Wert aus der vorliegenden Arbeit gut überein, was wiederum im Hinblick auf das weitaus häufigere Auftreten in anderen Kollektiven (siehe oben) auf Populations- bzw. Bevölkerungsunterschiede schließen lässt.

4.1.3 Polymorphismus F374L

Die Punktmutation c.1122C>G, durch die es zum Aminosäure-Austausch von Phenylalanin zu Leucin kommt, wurde bei vier Personen in heterozygoter Form gefunden. Diese Veränderung ist der in diesem Kollektiv häufigste Polymorphismus mit einem Anteil von 4,211%.

Phenylalanin hat eine aromatische, Leucin eine aliphatische Seitenkette. Beide Aminosäuren gehören aber zur neutralen, nicht polaren Aminosäure-Gruppe. Auswirkungen auf die Funktion des Proteins sind nicht beschrieben.

Häufigkeit von wt/wt = 91

Häufigkeit von wt/mut = 4

Häufigkeit von mut/mut = 0

Berechnung der Allelhäufigkeiten:

$$p(\text{wt}) = (91 * 2 + 4) \div 190 = 97,89 \%$$

$$q(\text{mut}) = 4 \div 190 = 2,105 \%$$

Berechnung der theoretischen Häufigkeiten:

$$\text{wt/wt} = p^2 * 95 = 91,03$$

$$\text{wt/mut} = 2pq * 95 = 3,915$$

$$\text{mut/mut} = q^2 * 95 = 0,04209$$

Das errechnete Ergebnis stimmt mit den gefundenen Häufigkeiten gut überein.

Zu diesem Polymorphismus lassen sich aus der Arbeit von Newton *et al.* keine genauen Allelfrequenzen ermitteln, da die Angaben über Kollektivgröße und -zusammensetzung unklar sind. Die Veränderung F374L wird als die in dem untersuchten Kollektiv häufigste Veränderung beschrieben: so wurden 67 Träger dieses Polymorphismus gefunden, wobei einige normal pigmentierte Individuen für diese Veränderung homozygot waren (Newton *et al.*, 2001). Diese normal pigmentierten Individuen müssten zu dem vorher beschriebenen Kollektiv von 102 hypopigmentierten Individuen dazu gerechnet werden, was allerdings ohne Angaben über die genaue Anzahl der Proben nicht möglich ist.

In der Publikation von Nakayama *et al.* (2002) wird der Polymorphismus F374L andersherum beschrieben und so als L374F bezeichnet. Nakayama *et al.* fanden bei weißen Südafrikanern (n=54) Phenylalanin an der Stelle 374 mit einer Allelfrequenz von 0,89 (also Leucin mit 0,11), während er in den anderen untersuchten Kollektiven (Neuguinea (n=52), Japan (n=49), Ghana (n=50)) immer Leucin an dieser Stelle fand. Nakayama *et al.* schlussfolgerten daraus, dass Phenylalanin bei Kaukasiern als Polymorphismus vorkommt, dunkler pigmentierte Populationen und verschiedene Tierspezies (u.a. Affe, Maus, Medaka) aber an Position 374 stets Leucin besitzen. Man kann vermuten, dass die ursprüngliche Sequenz Leucin an Position 374 besitzt, der Polymorphismus L374F erst später in der Entwicklung dazukam. Das unterstützt auch die Arbeit von Yuasa *et al.*, in der Phenylalanin an Position 374 in hoher Allelfrequenz (0,96) in einer deutschen Population (n=93) gefunden wurde, wohingegen in einer japanischen Population (n=103) diese Veränderung nicht vorkam. Der Polymorphismus könnte somit als Abstammungsmarker für Kaukasier gewertet werden (Yuasa *et al.*, 2004).

Es wurde zudem vermutet, dass diese Varietät für Pigmentierungsgrade zuständig sein könnte und Kaukasier durch den Verlust des Leucins an Position 374 eine hellere Haut besitzen (Nakayama *et al.*, 2002). So konnten Graf *et al.* feststellen, dass die beiden Allele 374L und 272K bei Kaukasiern signifikant mit dunklen Haaren, Haut und Augenfarbe assoziiert sind (Graf *et al.*, 2005).

Bei Rundshagen ist F374L der häufigste Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von 0,043 (15/352) (Rundshagen *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Allelfrequenz im Kontrollkollektiv beträgt 0,021 und ist somit halb so häufig wie im Patientenkollektiv von Rundshagen. Dieser Unterschied könnte jedoch auf Grund der geringen Kollektivgrößen zu Stande gekommen sein und somit von geringer Bedeutung sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine homozygoten Träger von Polymorphismen gefunden, was sich durch die geringe Größe dieses Kollektives erklären lässt. Die statistischen Werte, die für mut/mut (beide Allele tragen die Veränderung) alle kleiner als eins (0,02; 0,01; 0,04) sind, unterstützen diese Annahme.

Von den fünf Personen, bei denen Sequenzveränderungen im *MATP*-Gen gefunden wurden, tragen vier Personen zwei Polymorphismen (siehe Tab.7). Eine der

Veränderungen ist dabei immer die Veränderung F374L, was ein Hinweis auf eine gemeinsame Herkunft sein könnte.

4.2 Sequenzanalyse des OCA4-Gens von Personen mit Albinismus

Bei der Resequenzierung von sechs Patienten mit Mutationen im OCA4-Gen konnten in drei Proben weitere Mutationen nachgewiesen werden (siehe Tab.12). Um herauszufinden, ob eine „Compound“-Heterozygotie vorliegt, also die Mutationen in *trans*, d.h. auf verschiedenen Allelen liegen, wurden die Proben der Eltern angefordert und molekulargenetisch untersucht. Konnte bestätigt werden, dass die Mutationen von verschiedenen Elternteilen abstammen, kann man davon ausgehen, dass die gefundenen Veränderungen Ursache des OCA4 sind.

Das Auffinden der Sequenzveränderungen in den elterlichen DNA-Proben und die wiederholt gefundenen Sequenzauffälligkeiten können als Bestätigung angesehen werden, dass die beschriebenen Varianten keine methodischen Fehler sind.

Tab.12: Nachgewiesene Sequenzveränderungen bei den sechs Patienten

Patient	gefundene Mutationen	gefundene Polymorphismen
7431	c.986delC (m) c.469G>A	c.1122C>G (F374L; m)
7541	c.986delC (m) c.958C>T (p)	c.1122C>G (F374L; m)
7658	c.1573_1574insTGCTCTCT c.1082T>C	
7563	(-89/Ex 3)	c.814G>A (E272K) c.1122C>G (F374L)
7665	c.606G>C	
7593	c.986delC	c.1122C>G (F374L)

(m) = Veränderung in der maternalen DNA-Probe nachgewiesen

(p) = Veränderung in der paternalen DNA-Probe nachgewiesen

Bei **Patient 7431** ließen sich zwei Mutationen c.986delC und c.469G>A und der Polymorphismus an Position c.1122C>G (F374L) nachweisen.

Die Deletion des Cytosins an Stelle 986 hat auf Proteinebene Folgen, da es zu einer Leserasterverschiebung kommt, so dass ab der transmembranären Domäne 7 die

Aminosäure-Sequenz verändert ist. Außerdem kommt es vorzeitig zur Entstehung eines Stopp-Codons, wodurch das veränderte Genprodukt nur 396 Aminosäuren besitzt (Rundshagen, Dissertation 2004).

Die zweite Mutation (c.469G>A) führt zur Veränderung der Aminosäure an Position 157. Hier findet innerhalb der zweiten zytoplasmatischen Schleife eine Substitution der sauren Asparaginsäure zum neutralen Asparagin (D157N) statt (Inagaki *et al.*, 2004). Bisher wurde diese Mutation nur bei Japanern und einem Patienten aus Korea gefunden, so dass ein Gründereffekt („founder effect“) für diese Mutation angenommen wurde. Außerdem beschrieb Inagaki, dass die Aminosäure Lysin an Position 272 häufig mit der Mutation p.D157N assoziiert ist (Inagaki *et al.*, 2005). Möglicherweise ist in der Population aus Japan bzw. Korea die Mutation auf dem Allel p.E272 entstanden und die Träger dieses Genotypes sind auf einen gemeinsamen Ursprung („Founder“) zurückzuführen. Bei Patient 7431 ließ sich diese Assoziation nicht finden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass der Patient deutscher Herkunft ist und keine gemeinsame Abstammung mit Japanern bzw. Koreanern hat.

Da für Patient 7431 nur die mütterliche DNA vorlag, bei der die Mutation c.986delC gefunden wurde, lässt sich nicht entscheiden, ob die zweite Mutation c.469G>A vom Vater vererbt wurde. Demnach ergeben sich drei Möglichkeiten (siehe Abb.14):

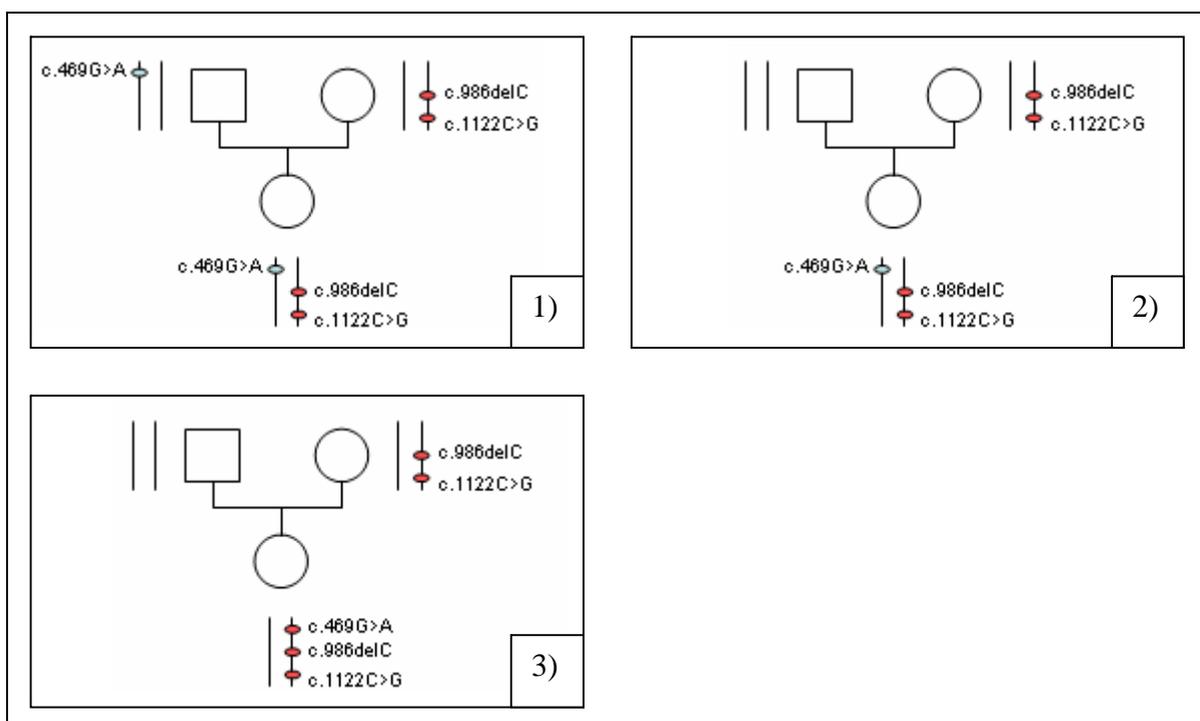


Abb.14: Mutations-Haplotypen für Patient 7431 und Eltern

- 1) Im Falle der Vererbung durch den Vater könnte die zweite gefundene Mutation möglicherweise als Erkrankungsursache angesehen werden, da sie auf dem paternalen Allel, also in *trans* liegt. Diese Möglichkeit ist sehr wahrscheinlich.
- 2) Im Falle einer Neumutation, die auf dem paternalen Allel lokalisiert ist, könnten die Mutationen als „compound“-heterozygot angesehen werden und ebenfalls Erklärung der Erkrankung sein.
- 3) Auch könnte es sich um eine Neumutation handeln, die auf dem gleichen, also dem maternalen, Allel wie die Mutation c.986delC liegt und somit nicht als zweite krankheitsverursachende Veränderung gelten kann.

Für **Patient 7541** wurden die Mutationen c.986delC und c.958C>T und der Polymorphismus c.1122C>G (F374L) gefunden.

Die Auswirkungen der Deletion an Position 986 auf Proteinebene wurden bei Patient 7431 bereits beschrieben (siehe oben).

Bei der Mutation c.958C>T wird an Position 320 die Aminosäure Leucin durch Phenylalanin ersetzt. Beide Aminosäuren sind apolar und hydrophob. Phenylalanin ist eine aromatische Aminosäure, besitzt also eine Ringstruktur in der Seitenkette, wohingegen Leucin eine aliphatische Aminosäure ist. Somit könnte dieser Austausch, der zwischen der sechsten und siebten Transmembran-Domäne liegt, Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des Proteins haben und die Pigmentierung beeinflussen. Diese Mutation wurde in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben und es existieren somit auch keinerlei Untersuchungen zu den Auswirkungen dieser Veränderung auf Proteinebene.

Anhand der DNA der Eltern konnte nachgewiesen werden, dass die Mutation c.958C>T vom Vater und c.986delC von der Mutter vererbt wurde. Da die Mutationen in *trans* vorliegen, besteht nachgewiesenermaßen eine „Compound“-Heterozygotie, die als Erkrankungsursache für den OCA4 bei Patient 7541 anzusehen ist (siehe Abb.15).

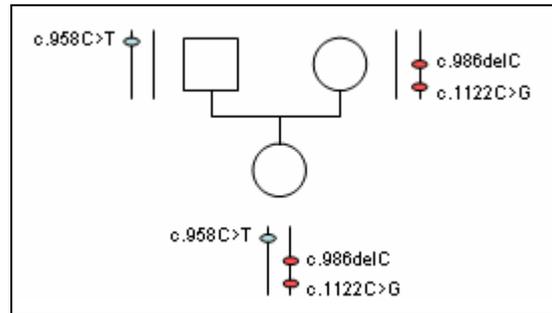


Abb.15: Mutations-Haplotypen für Patient 7541 und Eltern

Bei **Patient 7658** wurden die beiden Mutationen c.1573_1574insTGCTCTCT und c.1082T>C nachgewiesen.

Durch die Insertion von 8bp kommt es zur Verschiebung des Leserasters, so dass es verspätet zur Entstehung eines Stopp-Codons kommt. Das entstandene Genprodukt enthält also eine veränderte Aminosäure-Sequenz und ist neun Aminosäuren länger als das korrekte Produkt (Rundshagen, Dissertation 2004).

Durch die zweite Mutation c.1082T>C, die bereits von Rundshagen bei einem anderen Patienten in homozygoter Form beschrieben wurde, wird Leucin, eine unpolare Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette, gegen Prolin, eine Aminosäure mit einer Ringstruktur in der Seitenkette, ausgetauscht. Diese Veränderung liegt im Bereich einer extrazellulären Proteinschleife zwischen den Domänen 7 und 8.

Die DNA der Eltern stand nicht zur Verfügung, so dass nicht geklärt werden konnte, ob die Mutationen auf verschiedenen Allelen liegen und so als Krankheitsursache anzusehen sind. Diese Fragestellung könnte man durch Isolierung der RNA, cDNA-Synthese, Klonierung der einzelnen Allele und Sequenzierung beantworten.

In der DNA von **Patient 7563** wurden die Polymorphismen c.814G>A (E272K) und c.1122C>G (F374L) gefunden. In der Arbeit von Rundshagen (Dissertation, 2004) wurde die Veränderung c.814G>A (E272K) als Mutation gewertet, da sie nur einmal in dem untersuchten Kollektiv gefunden wurde und somit die Häufigkeit unter einem Prozent lag (siehe oben). Die Veränderung E272K wurde in der Literatur als Polymorphismus beschrieben, was auch durch die gefundenen Werte (Häufigkeit > 0,01) in der vorliegenden

Arbeit bestätigt wird. Somit ließ sich bei diesem Patienten keine weitere im *MATP*-Gen liegende Veränderung - außer den beiden beschriebenen Polymorphismen E272K und F374L und der Veränderung im Intron (-89/ Exon 3) - nachweisen. Es wäre möglich, dass bei diesem Patienten ein anderer OCA-Typ vorliegt oder Mutationen mit den angewendeten Methoden nicht nachweisbar waren. Ebenfalls möglich wäre, dass die Veränderung im Intronbereich pathologische Auswirkung hat und für den OCA dieses Patienten verantwortlich ist. Derartige Intronveränderungen wurden z.B. bereits für die Thalassämie gefunden (siehe auch 4.4.2)).

Bei den **Patienten 7665** und **7593** wurden keine zweiten Mutationen gefunden.

4.3 Deletionsscreening

In der vorliegenden Arbeit sind anhand der Ergebnisse bei den untersuchten Patienten keine Deletionen oder Duplikationen des *MATP*-Gens nachzuweisen. 52 von 54 gemittelten Werten liegen mit geringen Schwankungen um den Wert 1,0 (zwischen 0,815 und 1,267). Der Wert 1,0 bedeutet, dass die verglichenen Exons in den Proben im gleichen Verhältnis per PCR amplifiziert wurden (siehe Abb.13, Ergebnisteil).

Grenzwertige Ergebnisse von 0,766 (Exon 3B) und 1,308 (Exon 1B) treten nur bei Patient 7541 auf. Bei diesem Patienten konnte jedoch eine zweite Mutation gefunden werden und auch - durch Untersuchung der elterlichen DNA-Proben - nachgewiesen werden, dass die beiden Mutationen in *trans* vorliegen. Somit kann ein OCA4 bei diesem Patienten als bewiesen angesehen werden kann. Eine weitere Mutation in Form einer Exondeletion ist hier unwahrscheinlich.

Die Methode sollte etabliert werden, um sie in diagnostischen Screenings einzusetzen, da bei vielen Patienten, die klinisch eindeutig einer Krankheit wie z.B. dem Albinismus zuzuordnen sind, nur eine oder sogar keine krankheitsverursachende Mutation nachgewiesen werden konnte. Der Mutationsnachweis erfolgte bei diesen Patienten bisher mittels Sequenzierung, wobei mit dieser Methode intragenische Deletionen nicht erfasst werden.

Der Fluoreszenzdetektor SYBR-Green I bindet an dsDNA und ändert nach Anregung sein Fluoreszenzspektrum, bei Bindung an einsträngige DNA wird dagegen kaum Fluoreszenz emittiert (siehe Abb.16 und Material und Methoden 2.2.4).

Eine Methode mit SYBR-Green I wäre eine gute Möglichkeit für ein Screening auf Exon-Deletionen oder Duplikationen, da nicht für jede Krankheit, bei denen Variationen in der Kopienzahl als mögliche krankheitsverursachende Mutationen in Frage kommen, spezifische Sonden („Hybridization Probes“, siehe Abb.16) angeschafft werden müssten. Dies wäre in finanzieller Hinsicht ein besonderer Vorteil, da man ein Screening auch für Patienten mit selten vorkommenden Krankheiten durchführen könnte. Spezifische Sonden hingegen binden an eine definierte Nukleotidsequenz und emittieren beim Auftreffen auf ein Reportermolekül Fluoreszenz (siehe Abb.16).

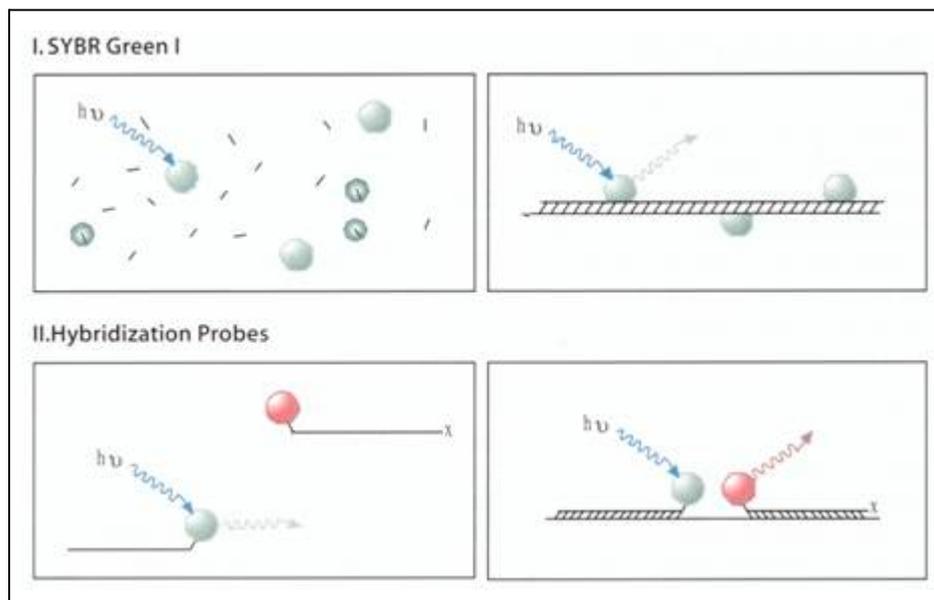


Abb.16: Prinzip von SYBR-Green I bzw. spezifischen Sonden; Meurer et al. (2001): Der Fluoreszenzdetektor SYBR-Green I emittiert bei Bindung an einsträngige DNA keine oder kaum Fluoreszenz (siehe links oben), bei Bindung an dsDNA jedoch wird Fluoreszenz messbar (siehe rechts oben). Spezifische Sonden (siehe untere Grafiken, blauer Kreis) binden an eine definierte DNA-Sequenz und emittieren erst bei Auftreffen auf ein Reportermolekül (roter Kreis), das ebenfalls DNA spezifisch bindet, Fluoreszenz.

Jedoch zeigte sich bei der praktischen Anwendung, dass für SYBR-Green I eine lange Phase der Etablierung anzusetzen ist, um spezifische Ergebnisse zu erhalten. Die unspezifische Bindung von SYBR-Green I an dsDNA kann einerseits als Vorteil angesehen werden, da sie einen möglichen universellen Einsatz in Aussicht stellt.

Andererseits kann das Bindungsverhalten auch als Nachteil gewertet werden, da die Bindung an unspezifische Produkte, wie z.B. an Primer-Dimere, erst durch eine genaue Etablierung eingeschränkt werden kann. Eine Akkumulation von Primer-Dimeren kann beispielsweise mit Hilfe des Leerwertes anhand der Schmelzkurve und der Standardkuve erkannt werden (vgl. Wilhelm und Hahn, 2004 und Material und Methoden 2.2.4).

Die - trotz der Etablierungsversuche mit FRDA-DNA - beobachteten Schwankungen, die möglicherweise unter anderem auch auf das Bindungsverhalten des Stoffes zurückzuführen sind (siehe oben), werden jedoch auch beim Einsatz von spezifischen Sonden in ähnlichem Ausmaß beobachtet. Diese Messungen mit spezifischen Sonden waren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, in der Literatur sind jedoch Erfahrungen mit solchen Methoden beschrieben: Hedrich *et al.* akzeptierten in ihrer Arbeit mit spezifischen Sonden Werte von 0,8 bis 1,2 bei zu erwartendem Wert von 1,0 und nahmen diese Werte als Normalwerte an (Hedrich *et al.*, 2001). Wilhelm und Hahn (2004) berichten, es lasse sich kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen feststellen, ob man Hybridization Probes oder SYBR-Green I zur Untersuchung einsetzt.

Probleme der Methode könnten zum einen durch die DNA-Menge begründet sein. Es existieren bei dieser Methode bisher keine Erfahrungen mit dem Einsatz von genomischer DNA. Ursprünglich wurde SYBR-Green I zum Einsatz von cDNA oder RNA entwickelt. Bei genomischer DNA besteht die Gefahr der Bildung unspezifischer Produkte durch mehrere Bindungsstellen der Primer, z.B. an Pseudogene. Unspezifische Produkte können die Messungen dann verfälschen (siehe oben).

Ein anderes Problem ist durch die PCR-Produktlänge bedingt. Laut Herstellerangaben wird für die qPCR eine Produktlänge von maximal 150-200 bp großen DNA-Abschnitten empfohlen. Die in der vorliegenden Arbeit amplifizierten Exons haben jedoch eine Länge bis zu 385 bp (siehe Tab.1). Die Primer liegen allerdings noch weiter „außen“ im Intronbereich, es müssen also jeweils ca. 30 bis 40 bp dazugerechnet werden, womit man endgültige Produktlängen von 244 bis 552 bp erhält. Aus diesem Grund wurden die größeren Exons in Abschnitte aufgeteilt (Exon 1 und 3, jeweils in Abschnitte A und B).

Auch der GC-Gehalt der zu amplifizierenden Abschnitte ist als problematisch anzusehen. Bei verschiedenen Exons war die Einstellung der PCR initial schwierig, was möglicherweise auf GC-reiche Abschnitte zurückzuführen ist. Die optimalen Bedingungen wurden dann durch unterschiedliche Primermengen und Unterteilung der Exons (siehe

oben) ermittelt, dadurch wurde der Vergleich mit anderen Exons jedoch eventuell erschwert.

Schließlich ist es möglich, dass die Messergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Das zu erwartende Mengenverhältnis (2:1 bzw. 1:0,5) liegt wahrscheinlich am Rande der Nachweisgrenze dieser Methode.

4.4 Mögliche Gründe für den Nachweis nur einer Mutation bei den Patientenproben

Um das Vorliegen eines OCA4 molekulargenetisch zu bestätigen, müssen zwei Mutationen in *trans* vorliegen, da diese Albinismusform autosomal rezessiv vererbt wird. Der Nachweis lediglich einer Mutation kann einen der folgenden Gründe haben:

- 1) unvollständige Mutationsdetektion: Mutationen könnten wie bei den Patienten 7431, 7541 und 7658 in der vorhergehenden Arbeit übersehen worden sein - trotz Resequenzierung und Analyse beider Stränge. Diese Fehler sollten jedoch weitgehend vermeidbar sein, denn die Sequenzierung an sich ist heutzutage eine sehr sichere Methode.
- 2) Mutation in nicht untersuchten Genabschnitten: In dieser Arbeit wurden die sieben codierenden Abschnitte des Gens untersucht. Jedoch sind auch in Intronbereichen Veränderungen zu finden, die eventuell relevante Veränderungen nach sich ziehen. Beispielsweise können Veränderungen in der Promotor- oder Spleißregion weitreichende Folgen für das Protein bzw. dessen Produktion haben und können so an der Krankheitsausprägung beteiligt sein. Derartige Veränderungen sind beispielsweise für das ATR-X Syndrom („alpha thalassemia retardation X linked“) (Nelson *et al.*, 2005) beschrieben. Ebenso wurden bei der Thalassämie Intronveränderungen mit unterschiedlichen Entfernungen zur Exongrenze (110 Nukleotide (Baysal) und 848 Nukleotide (Roper)) gefunden, die an der Krankheitsausprägung beteiligt sind (Baysal *et al.*, 1995; Roper *et al.*, 2006). Auch Newton fand eine homozygote Mutation im Randbereich eines Introns („splice-acceptor“-Sequenz), worauf er den OCA4 des Patienten zurückführte (Newton *et al.*, 2001). Da in den Übergangsbereichen Intron/Exon und

andersherum Primer binden, um ein vollständiges Produkt des Exons zu erhalten, wurden auch in der vorliegenden Arbeit Veränderungen außerhalb des codierenden Bereichs gefunden (Probe 7563 und K55). Es wurden jeweils mindestens 10 bis 15 bp vor und nach dem codierenden Bereich kontrolliert. Somit sind Veränderungen in diesen Bereichen, die meist als Spleißstellen funktionieren, bei den hier untersuchten Proben, außer den oben genannten, nicht nachweisbar. Dieses schließt aber nicht aus, dass weitere Veränderungen existieren, die außerhalb des kontrollierten Bereichs liegen und möglicherweise Einfluss auf den Spleißvorgang haben. In der Literatur werden beispielsweise für das kongenitale myasthenische Syndrom Sequenzveränderungen in Intronbereichen („intervening sequence“ IVS1-15C>A) beschrieben, die neue Akzeptor-Spleißstellen produzieren (Muller *et al.*, 2006). Die Krankheitsrelevanz von Veränderungen in Intronbereichen des *MATP*-Gens bleibt jedoch vorerst ungeklärt.

- 3) Zusammenwirken von Mutationen, die in unterschiedlichen Albinismus assoziierten Genen liegen: Es wäre möglich, dass Mutationen in Genen, die die Pigmentierung beeinflussen, sich in ihrer Wirkung addieren. Normalerweise wird bei rezessiven Erkrankungen eine Veränderung in einem Gen, die nur auf einem Allel lokalisiert ist, von dem anderen Wildtyp-Allel kompensiert, so dass es zu keiner Krankheitsausprägung kommt. In Untersuchungen wurde jedoch nachgewiesen, dass es auch bei heterozygoten Anlagenträgern bei bestimmten Krankheiten, z.B. der Phenylketonurie, zu einer Reduktion von Enzymaktivitäten (Guldberg *et al.*, 1998) und somit zu einer eventuell gemilderten Krankheitsausprägung kommt. Es wäre also möglich, dass zwei Veränderungen in verschiedenen Genen, die beide am gleichen Stoffwechselweg beteiligt sind, kleine Mängel verursachen und zusammen durch Addition ihrer Wirkungen zur Krankheitsausprägung führen. Solche digenische Vererbungen sind z. B. bei der hereditären Taubheit, der Holoprosencephalie und dem Waardenburg Syndrom bekannt (Ming und Muenke, 2002). Um derartige Vererbungsmodi beim Albinismus nachzuweisen, sind weitere Untersuchungen nötig.
- 4) Der Phänotyp Albinismus wird durch Mutationen anderer Genorte verursacht: In den Prozess der Pigmentproduktion sind beim Menschen wahrscheinlich über 100 Gene involviert (Graf *et al.*, 2005). Es ist wahrscheinlich, dass in der nächsten Zeit

weitere Mutationen in Genen, die Einfluss auf Pigmentierung haben bzw. ursächlich für Albinismus sind, beschrieben werden. So ist es denkbar, dass manche Patienten eine Mutation im *MATP*-Gen haben, aber zusätzlich noch zwei weitere Mutationen in einem heute noch unbekanntem Gen vorhanden sind. Somit könnten diese Patienten von einer anderen Form des Albinismus betroffen sein.

Diese Arbeit zeigt die Bedeutung der Differenzierung zwischen Mutationen und Polymorphismen bei Missense-Austauschen und die Notwendigkeit von populations-spezifischen Untersuchungen im Allgemeinen. In Bezug auf den OCA4 kann postuliert werden, dass die Frequenz heterozygoter Anlageträger in der deutschen Bevölkerung wahrscheinlich unter 1:100 liegt. Das Auftreten dieser Albinismusform sollte dementsprechend ($1/100 * 1/100 * 1/4 = 1/40.000$) unter 1:40.000 sein. Durch Sequenzanalysen kann zwischen einzelnen OCA-Typen unterschieden werden und mit Einschränkungen eine Differentialdiagnose beim Phänotyp Albinismus gestellt werden.

5 Zusammenfassung

Albinismus ist eine Stoffwechselerkrankung, die autosomal oder x-chromosomal rezessiv vererbt werden kann und deren Ursache ein Mangel oder eine Verteilungsstörung des Pigmentes Melanin ist. Aufgrund dieser Störung kommt es bei Betroffenen klassischerweise zu einer verschieden stark ausgeprägten Hypopigmentierung der Haare, der Augen und der Haut. Häufig liegt auch eine Sehbehinderung vor, da die Entwicklung des optischen Systems melaninabhängig verläuft. Tritt Albinismus sowohl an Haaren, Haut und Augen auf, spricht man vom okulokutanen Albinismus (OCA). Für den OCA sind bisher vier Typen molekulargenetisch klassifiziert worden: Der OCA1 betrifft das *TYR*-Gen, der OCA2, der häufigste Typ, tritt bei Mutationen im *P*-Gen auf. Der OCA3 ist assoziiert mit Veränderungen im *TYRP1*-Gen. Der OCA4, erstmals im Jahre 2001 beschrieben, betrifft das *MATP*-Gen und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Im ersten Teil wurde ein Kollektiv von 95 nicht von Albinismus betroffenen Personen deutscher Herkunft auf Veränderungen im *MATP*-Gen untersucht. Dazu wurden die sieben Exons des Gens mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Es wurden die Polymorphismen c.814G>A (E272K) bei drei (1,6% der Allele), c.987G>A (T329T) bei zwei Personen (1% der Allele) und c.1122C>G (F374L) bei vier Personen (2,1% der Allele) heterozygot gefunden. Vier der fünf Proben enthielten zwei dieser Polymorphismen. Diese drei Veränderungen wurden bereits in der Literatur beschrieben. Bei seltenen Veränderungen, die einen Aminosäure-Austausch zur Folge haben, ist die Unterscheidung zwischen Polymorphismus und Mutation oft schwierig. Für die Bewertung ist also die Untersuchung von ausreichend großen Kontrollkollektiven in verschiedenen Populationen von entscheidender Bedeutung.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde bei sechs Albinismuspatienten, bei denen nur eine Mutation im *MATP*-Gen bekannt war, zunächst eine Sequenzierung durchgeführt. Bei drei Patienten konnte dadurch eine weitere Mutation nachgewiesen werden, darunter die Mutation c.958C>T, die bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Die Mutationen c.469G>A und c.1082T>C sind bereits in anderen Kollektiven gefunden worden. Durch Untersuchung des *MATP*-Gens der Eltern konnte für einen Patienten eine „Compound“-Heterozygotie für die Mutationen c.986delC und c.958C>T nachgewiesen werden. Um nach Exondeletion oder -duplikation zu suchen, wurde eine quantitative PCR-Methode mit SYBR-Green I etabliert. Anhand der gemessenen Werte ließen sich jedoch in keiner Probe abweichende Kopienzahlen nachweisen. Somit wurden Deletionen oder Duplikationen des *MATP*-Gens bei diesen Proben ausgeschlossen.

6 Anhang

6.1 Literatur

6.1.1 Bücher und Zeitschriften

Baysal E, Kleanthous M, Bozkurt G, Kyrris A, Kalogirou E, Angastiniotis M, Ioannou P, Huisman TH:

Alpha-Thalassaemia in the population of Cyprus

Br J Haematol 89 (3): 496-499 (1995)

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 (6): 1145-1156 (1996)

Costin GE, Valencia JC, Vieira WD, Lamoreux ML, Hearing VJ:

Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4

J Cell Sci 116 (Pt15): 3203-3212 (2003)

Creel DJ, Summers CG, King RA:

Visual anomalies associated with albinism

Ophthalmic Paediatr Genet 11 (3): 193-200 (1990)

Cortese K, Giordano F, Surace EM, Venturi C, Ballabio A, Tacchetti C, Marigo V:

The ocular albinism type 1 (OA1) gene controls melanosome maturation and size

Invest Ophthalmol Vis Sci 46 (12): 4358-4364 (2005)

Dunnen JT, Antonarakis SE:

Nomenclature for the description of human sequence variations

Hum Genet 109: 121-124 (2001)

Fukai K, Holmes SA, Lucchese NJ, Siu VM, Weleber RG, Schnur RE, Spritz RA:

Autosomal recessive ocular albinism associated with a functionally significant tyrosinase gene polymorphism

Nature Genetics volume 9: 92-95 (1995)

Fukamachi S, Shimada A, Shima A:

Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka

Nat Genet 28 (4): 381-5 (2001)

Garrod AE:

Inborn errors of metabolism

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

Giebel LB, Tripathi RK, Strunk KM, Weleber RG, Spritz RA:

Tyrosinase gene mutations in type I (tyrosinase-deficient) oculocutaneous albinism define two clusters of missense substitutions

Am J Med Genet 43 (5): 865-71 (1992)

Graf J, Hodgson R, van Daal A:

Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation

Hum Mutat 25 (3): 278-284 (2005)

Guldberg P, Henriksen KF, Lou HC, Guttler F:

Aberrant phenylalanine metabolism in phenylketonuria heterozygotes

J Inherit Metab Dis 21 (4): 365-372 (1998)

Harada M, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA, Robbins PF:

Use of an in vitro immunoselected tumor line to identify shared melanoma antigens recognized by HLA-A*0201-restricted T cells

Cancer Res 61: 1089-1094 (2001)

Hedrich K, Kann M, Lanthaler AJ, Dalski A, Eskelson C, Landt O, Schwinger E, Vieregge P, Lang AE, Breakefield XO, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C:

The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism

Hum Mol Genet, Vol. 10, No. 16: 1649-1656 (2001)

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)

Inagaki K, Suzuki T, Ito S, Suzuki N, Fukai K, Horiuchi T, Tanaka T, Manabe E, Tomita Y:

OCA4: evidence for a founder effect for the p.D157N mutation of the MATP gene in Japanese and Korean

Pigment Cell Res 18: 385-388 (2005)

Käsmann-Kellner B, Ruprecht KW:

Albinismus – Klassifikation und klinisches Spektrum

Z Prakt Augenheilkd 20: 189-203 (1999)

Lund PM:

Oculocutaneous albinism in southern Africa: population structure, health and genetic care

Ann Hum Biol 32 (2): 168-173 (2005)

Meurer S, Wittwer C, Nakagawara K-I (Eds.):

Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and applications

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (2001)

Ming JE, Muenke M:

Multiple Hits during Early Embryonic Development: Digenic Diseases and Holoprosencephaly

Am J Hum Genet 71(5): 1017–1032 (2002)

Muller JS, Baumeister SK, Rasic VM, Krause S, Todorovic S, Kugler K, Muller-Felber W, Abicht A, Lochmuller H:

Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations

Neurol 67: 1159-1164 (2006)

Nakayama K, Fukamachi S, Kimura H, Koda Y, Soemantri A, Ishida T:

Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin colour

J Hum Genet 47: 92-94 (2002)

Nelson ME, Thurmes PJ, Hoyer JD, Steensma DP:

A novel 5`ATRX mutation with splicing consequences in acquired alpha thalassemia-myelodysplastic syndrome

Haematol 90: 1463-1470 (2005)

Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, Brilliant MH:

Mutation 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, King RA:

Molecular Basis of Type I (Tyrosinase-Related) Oculocutaneous Albinism:
Mutations and Polymorphisms of the Human Tyrosinase Gene

Hum Mutat 2: 1-6 (1993)

Oetting WS, Fryer JP, King RA:

Mutations of the Human Tyrosinase Gene Associated With Tyrosinase Related
Oculocutaneous Albinism (OCA1)

Hum Mutat 12 (6): 434 (1998)

Oetting WS, King RA:

Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes
associated with albinism

Hum Mutat 13 (2): 99-115 (1999)

Oetting WS, Fryer JP, Shriram S, King RA:

Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years

Pigment Cell Res 16 (3): 307-311 (2003)

Oetting WS, Garret SS, Brott M, King RA:

P Gene mutations associated with oculocutaneous albinism type II (OCA2)

Hum Mutat 25 (3): 323 (2005)

Opitz S, Zühlke C:

Albinismus – Leben ohne Melanin Teil 1: Biologie des Melaninstoffwechsels

BIOForum 10: 672-674 (2002 a)

Opitz S, Zühlke C:

Albinismus – Leben ohne Melanin Teil 2: Vom Genotyp zum Phänotyp

BIOForum 11: 754-756 (2002 b)

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 (3): 200-210 (1999)

Pfaffl MW:

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR

Nucleic Acids Res Heft 29, Vol.: 9: e45 (2001)

Puri N, Gardner JM, Brilliant MH:

Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (p) mutant melanocytes

J Invest Dermatol 115 (4): 607-613 (2000)

Rinchik EM, Bultman SJ, Horsthemke B, Lee S-T, Strunk KM, Spritz RA, Avidano KM, Jong MTC, Nicholls RD:

A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type 2römisch?? Oculocutaneous albinism

Nature 361: 72-76 (1993)

Ropero P, Villegas A, Munoz J, Briceno O, Mora A, Salvador M, Polo M, Gonzalez FA:

First Spanish case of thalassaemia major due to a compound heterozygosity for the IVS-II-848 (C→A) and codon 39 (C→T) mutations of the beta-globin gene

Hemoglobin 30 (1): 15-21 (2006)

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)

Rundshagen U (Dissertation):

Albinismus: Mutationssuche im OCA4-Gen

Universität zu Lübeck, Institut für Humangenetik (2004)

Sarangarajan R, Boissy R:

Typr1 and Oculocutaneous Albinism Type 3

Pigment Cell Res 14: 437-444 (2001)

Strachan T, Read AP:

Molekulare Humangenetik, 3.Auflage; Kapitel 5, 7, 11

Elsevier GmbH, München (2005)

Sturm RA, Box NF, Ramsay M:

Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep

BioEssays 20: 712-721 (1998)

Suzuki T, Inagaki K, Fukai K, Obana A, Lee S-T, Tomita Y:

A Korean case of oculocutaneous albinism type 4 IV caused by a D157N mutation in the MATP gene

Br J of Dermatol 125: 174-175 (2005)

Takizawa Y, Kato S, Matsunaga J, Aozaki R, Tomita Y, Nishikawa T, Shimizu H:

Electron microscopic DOPA reaction test for oculocutaneous albinism

Arch Dermatol Res 292 (6): 301-305 (2000)

Toyofuku K, Wada I, Valencia JC, Kushimoto T, Ferrans VJ, Hearing VJ:

Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Typr1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins

FASEB J 15 (12): 2149-2161 (2001)

Trevor-Roper PD:

Marriage of two complete albinos with normal pigmented offspring

Brit J Ophthalmol 36: 106-107 (1952)

Wilhelm J, Hahn M:

Measuring Genome Sizes by Absolute Quantification, Rapid Cycle Real-Time PCR – Methods and Applications, Quantification; Eds. Wittwer C, Hahn M, Kaul K, S.31-41

Springer Verlag Berlin Heidelberg (2004)

Yuasa I, Umetsu K, Watanabe G, Nakanura H, Endoh M, Irizawa Y:

MATP polymorphism in Germans and Japanese: the L374F mutation as a population marker for Caucasoids

Int J Legal Med 118 (6): 364-366 (2004)

Zühlke CH, Dalski A, Habeck M, Straube K, Hedrich K, Hoeltzenbein M, Konstanzer A, Hellenbroich Y, Schwinger E:

Extension of the mutation spectrum in Friedreich's ataxia: detection of an exon deletion and novel missense mutations

Eur J Hum Genet 12: 979-982 (2004)

6.1.2 Elektronische Datenbanken

e! Ensembl Genome Browser, The Wellcome Trust Sanger Institut:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/, Human Exon View, Ensembl Transcript ID ENST00000296589, aufgerufen am 01.09.2006

International Albinism Center, University of Minnesota, Albinism Database:

<http://albinismdb.med.umn.edu/oca4mut.html>, aufgerufen am 24.08.2006

National Center for Biotechnology Information (NCBI):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, humane MATP-cDNA (Zugangsnummer AF172849), humane genomische DNA Chromosom 5 clone CTD-2340N2 (Zugangsnummer AC008954), zuletzt aufgerufen 23.03.2007

6.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: OCA4-Primer	15
Tabelle 2: M13-Primer	16
Tabelle 3: FRDA-Primer	16
Tabelle 4: Verwendete Primer, -mengen und Annealingtemperaturen	20
Tabelle 5: Programm für die qPCR	23
Tabelle 6: Programm für die Sequenzreaktion	26
Tabelle 7: Zusammenfassung der gefundenen Sequenzveränderungen	34
Tabelle 8: Veränderungen außerhalb des codierenden Bereichs	34
Tabelle 9: Mittelwerte der Ct-Werte der FRDA-Probe	36
Tabelle 10: Mittelwerte der Ct-Werte der Albinismus-Patienten	37
Tabelle 11: Nachgewiesene Polymorphismen in den 95 DNA-Proben von Kontrollpersonen	39
Tabelle 12: Nachgewiesene Sequenzveränderungen bei Patienten	44
Abbildung 1: Melaninstoffwechsel	7
Abbildung 2: MATP-Protein mit Transmembrandomänen	11
Abbildung 3: Ct-Grafik	22
Abbildung 4: Schmelzkurve	24
Abbildung 5: Standardkurve aus Verdünnungsreihe	25
Abbildung 6: c.814G>A in Vorwärts- bzw. Rückwärtsreaktion	29
Abbildung 7: c.987G>A in Vorwärts- bzw. Rückwärts-Sequenzierung	29
Abbildung 8: c.1122C>G in Vorwärts- bzw. Rückwärts-Sequenzierung	30
Abbildung 9: c.1617A>C in Vorwärts-Sequenzierung	31
Abbildung 10: c.469G>A in Vorwärts- bzw. Rückwärts-Sequenzierung	32
Abbildung 11: c.1082T>C in Vorwärts- bzw. Rückwärts-Sequenzierung	33
Abbildung 12: c.958C>T in Vorwärts- bzw. Rückwärts-Sequenzierung	33
Abbildung 13: Prinzip des Nachweises einer Exondeletion mit qPCR	36
Abbildung 14: Mutations-Haplotypen für Patient 7431 und Eltern	45
Abbildung 15: Mutations-Haplotypen für Patient 7541 und Eltern	47
Abbildung 16: Prinzip von SYBR-Green I	49

6.3 Abkürzungen

A	Adenin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	copyDNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
d.h.	das heisst
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
dsDNA	doppelsträngige DNA
et al.	et alteri
F, FWD, fwd	forward (vorwärts)
g	Gramm
G	Guanin
HPLC	high performance liquid chromatography
LCD	Liquid Crystal Display
Lsg.	Lösung
Matp	membranassoziertes Transporterprotein (Maus)
MATP	membranassoziertes Transporterprotein (Mensch)
min	Minute
mut	verändertes Allel
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer

OA1	Okulärer Albinismus
OCA	Okulokutaner Albinismus
Pat	Patient
PCR	polymerase chain reaction
R, REV, rev	reverse (rückwärts)
s.	siehe
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TRP	tyrosinase related protein
TYR	Tyrosinase
ROCA	rofoous OCA
uni	universe
V	Volt
W	Watt
wt	Wildtyp-Allel
x	-fach
z.B.	zum Beispiel

6.4 Buchstabencode für Aminosäuren

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

6.5 Sequenzen

Legende:

kleine Buchstaben: DNA-Nukleotide

große Buchstaben: Einbuchstabencode für Aminosäuren

atg : Startcodon

tag : Stoppcodon

roter Buchstabe: erstes Nukleotid des Exons

cDNA des *MATP*-Gens:

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

↓ *Exon 1*

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

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

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

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

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

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

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

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

361 ctc aat ggg gct act gtt gta gca *gct* ttg att gct aac cca agg
L N G A T V V A A L I A N P R
↓ *Exon2*

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

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

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

541 cac tac cat gcc ctc ttc aca *ggt* ttt gga ggt gcc ctg ggt tac
H Y H A L F T G F G G A L G Y
↓ *Exon 3*

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

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

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

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

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

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

856 cag gga gca aaa aac aaa aat cat gct gaa cag *↓ Exon 4* act cgc agg gca
Q G A K N K N H A E Q T R R A

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

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

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

Exon 5

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

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

↓ Exon 6

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

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

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

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

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

↓ Exon 7

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

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

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

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

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

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

MATP-Gen nach Stopp-Codon

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

Ende Exon 7 ↓

...gtt aga tat gtg gat tag gtc aat aaa gag aca atg acc taa

MATP-Gen: Intron 2-3

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

... gtc ttc agg gag ttt tcc cac tga agg gga gtg tct atg cat gag

gaa aat gaa cga taa ttt gct aaa tat gct aac ata gct ttt ctt

↓ Exon 3

gct ttc cag gtt ttg gag gtg ccc tgg ...

6.6 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. E. Schwinger, Direktor bei Beginn der Doktorarbeit, und bei Frau Prof. Dr. G. Gillessen-Kaesbach, Direktorin des Instituts, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Humangenetischen Institut der Universität zu Lübeck bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ch. Zühlke, meiner Doktormutter, für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung auch bis hin nach Spanien, das stets offene Ohr für jegliche Probleme und Fragen und die immer schnelle und gründliche Korrektur der Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. A. Dalski, der mich während der gesamten Zeit im Labor und danach intensiv und geduldig betreut hat und meine Zweifel und Fragen immer ernst genommen hat.

Frau Prof. Dr. B. Käsmann-Kellner danke ich für die Bereitstellung der Blutproben.

Für die Zusammenarbeit und Hilfestellung beim Deletionscreening möchte ich mich bei Herrn Dr. J. Warnecke und Frau M. Hanke aus der Molekularen Medizin recht herzlich bedanken.

Für die Einarbeitung in Methoden und Handhabung der Geräte, die stete Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre im „Anbau“ bedanke ich mich bei Frau M. Albrecht, Frau V. Bernhard, Frau J. Atici, Frau U. Gehlken und besonders bei Frau H. Pawlak.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich von Herzen für die Ermöglichung des Studiums und der Doktorarbeit, das Vertrauen in mich und die Unterstützung und Motivation in allen Phasen der Doktorarbeit.

6.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Carolin Criée
Geburtsdatum	11.09.1982
Geburtsort	Schwelm

Schulbildung

1989 -1993	Grundschule Möllenkotten Schwelm
1993 -2002	Märkisches Gymnasium Schwelm
2002	Abitur

Studium

Okt 2002 – Aug 2004	Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum
Aug 2004	Physikum
seit Okt 2004	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Okt 2005 – Mai 2006	experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Humangenetik an der Universität zu Lübeck
Sep 2006 – Juli 2007	Studium an der Universidad de Murcia, Spanien