

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität zu Lübeck  
Direktorin: Prof. Dr. med. Gillessen-Kaesbach

---

# Mutationssuche bei Patienten mit Ataxie und erniedrigtem Ceruloplasmin

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von  
Dorothea Henkel  
aus Halle (Saale)

Lübeck 2011

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

2. Berichterstatter: PD Dr. Jürgen Eggers

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2012

Zum Druck genehmigt: 04.06.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

---

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Aceruloplasminämie .....	5
1.2 Ceruloplasmin .....	9
1.3. Morbus Wilson .....	11
1.4 ATP7B.....	15
1.5 Fragestellung .....	18
<b>2 Materialien und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	19
2.2 Stammlösungen und Puffer .....	20
2.3 DNA-Standards und Nukleinsäuren .....	21
2.4 Synthetische Oligonukleotide .....	21
2.5 Geräte und Gebrauchsartikel .....	25
2.6 Programme .....	27
2.7 Datenbanken.....	27
2.8 Patientengut und DNA-Isolierung.....	27
2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	29
2.10 Agarosegel-Elektrophorese .....	31
2.11 DNA-Sequenzierung .....	32
2.12 Allelspezifische PCR .....	35
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
3.1 Ergebnisse der Sequenzierung des Ceruloplasmin-Gens (CP) ..	40
3.1.1 Exon 9: c.1632 A>T (p.E544D).....	43
3.1.2 Intron 12 .....	44
3.1.3 Intron 15: IVS16-9 T>C.....	45
3.1.4 Exon 16: c.2684 G>C (p.G895A).....	46
3.1.5 Allelspezifische PCR .....	47

---

3.2	Ergebnisse der Sequenzierung des Wilson-Gens (WND) .....	48
3.2.1	Exon 1: 5'UTR-119insCGCCG .....	51
3.2.2	Exon 1: 5'UTR-75 C>A.....	52
3.2.3	Exon 2: c.1216 T>G (p.S406A).....	53
3.2.4	Exon 3: c.1366 G>C (p.V456L).....	54
3.2.5	Exon 4: c.1607 T>C (p.V536A).....	55
3.2.6	Exon 10: c.2495 A>G (p.W832R) .....	56
3.2.7	Exon 12: c.2855 G>A (p.R952W) .....	57
3.2.8	Exon 13: c.2972 C>T (p.T991M) .....	58
3.2.9	Exon 16: c.3419 T>C (p.V1140A).....	59
3.2.10	Intron 18: IVS18+6 C>T.....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>61</b>
4.1	Mutationssuche im Ceruloplasmin-Gen (CP) .....	62
4.1.1	Bewertung der Sequenzvarianten .....	63
4.1.2	Bedeutung der Sequenzvarianten .....	65
4.2	Mutationssuche im Wilson-Gen (WND).....	70
4.2.1	Bewertung der Sequenzvarianten .....	71
4.2.2	Bedeutung der Sequenzvarianten .....	72
4.3	Ausblick.....	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Anhänge</b> .....	<b>99</b>
7.1	Tabellen .....	99
7.2	Abkürzungsverzeichnis .....	104
7.3	Ethikvotum .....	107
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>109</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>110</b>

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Chemikalien, Enzyme und Kits .....	19
<b>Tabelle 2:</b> Inhalt des Big Dye Terminator Mix v.1.1 von Applied Biosystems ..	20
<b>Tabelle 3:</b> Stammlösungen und Puffer .....	20
<b>Tabelle 4:</b> DNA-Standards und Nukleinsäuren .....	21
<b>Tabelle 5:</b> Primer für die PCR des Ceruloplasmin-Gens .....	21
<b>Tabelle 6:</b> spezifischer Primer für Sequenzierung von Exon 13 (CP) .....	22
<b>Tabelle 7:</b> Primer der allelspezifischen PCR von Exon 16 (CP) .....	23
<b>Tabelle 8:</b> Primer für die PCR des ATP7B-Gen.....	23
<b>Tabelle 9:</b> Geräte und Gebrauchsartikel .....	25
<b>Tabelle 10:</b> Programme .....	27
<b>Tabelle 11:</b> Datenbanken.....	27
<b>Tabelle 12:</b> Pipettierschema .....	30
<b>Tabelle 13:</b> Pipettierschema .....	37
<b>Tabelle 14:</b> Zusammenfassung der Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen40	
<b>Tabelle 15:</b> Zusammenfassung der Sequenzvarianten im Wilson-Gen .....	48
<b>Tabelle 16:</b> Mutationen im Ceruloplasmin-Gen.....	99
<b>Tabelle 17:</b> Zusammenfassung der klinischen Symptome bei Morbus Wilson102	
<b>Tabelle 18:</b> Abkürzungen der Aminosäuren .....	106

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Beschriebene Mutationen im Ceruloplasmin-Gen. ....	6
<b>Abbildung 2:</b> Zusammenfassung der klinischen Symptome bei Aceruloplasminämie.....	8
<b>Abbildung 3:</b> Stammbaum der Familie. ....	28
<b>Abbildung 4:</b> Schema der Allelspezifischen PCR .....	36
<b>Abbildung 5:</b> Übersicht der Sequenzvarianten in der Familie.....	41
<b>Abbildung 6:</b> Übersicht der Sequenzvarianten bei P1 und P2.....	42
<b>Abbildung 7:</b> DNA-Sequenz für c.1268 A>T heterozygot. ....	43
<b>Abbildung 8:</b> DNA-Sequenz für c.1268 A>T homozygot.....	44
<b>Abbildung 9:</b> Übersicht der Varianten im Intron 12. ....	45
<b>Abbildung 10:</b> DNA-Sequenz für IVS16-9 T>C heterozygot. ....	45
<b>Abbildung 11:</b> DNA-Sequenz für c.2684 G>C heterozygot.....	46
<b>Abbildung 12:</b> Ergebnisse der Allelspezifischen PCR. ....	47
<b>Abbildung 13:</b> Übersicht der Sequenzvarianten in der Familie. ....	49
<b>Abbildung 14:</b> Übersicht der Sequenzvarianten in P1 und P2.....	50
<b>Abbildung 15:</b> DNA-Sequenz für 5'UTR -119insCGCCG heterozygot .....	51
<b>Abbildung 16:</b> DNA-Sequenz für 5'UTR -75 C>A heterozygot .....	52
<b>Abbildung 17:</b> DNA-Sequenz für 5'UTR -75 C>A homozygot .....	52
<b>Abbildung 18:</b> DNA-Sequenz für c.1216 T>G heterozygot .....	53
<b>Abbildung 19:</b> DNA-Sequenz für c.1216 T>G homozygot .....	53
<b>Abbildung 20:</b> DNA-Sequenz c.1366 G>C heterozygot.....	54
<b>Abbildung 21:</b> DNA-Sequenz c.1366 G>C homozygot.....	54
<b>Abbildung 22:</b> DNA-Sequenz für c.1607 T>C heterozygot .....	55
<b>Abbildung 23:</b> DNA-Sequenz für c.2495 A>G heterozygot.....	56

---

<b>Abbildung 24:</b> DNA-Sequenz für c.2495 A>G homozygot .....	56
<b>Abbildung 25:</b> DNA-Sequenz für c.2855 G>A heterozygot .....	57
<b>Abbildung 26:</b> DNA-Sequenz für c.2855 G>A homozygot .....	57
<b>Abbildung 27:</b> DNA-Sequenz für c.2972 C>T heterozygot .....	58
<b>Abbildung 28:</b> DNA-Sequenz für c.3419 T>C heterozygot .....	59
<b>Abbildung 29:</b> DNA-Sequenz für c.3419 T>C homozygot .....	59
<b>Abbildung 30:</b> DNA-Sequenz für IVS18+6 C>T heterozygot .....	60
<b>Abbildung 31:</b> DNA-Sequenz für IVS18+6 C>T homozygot .....	60
<b>Abbildung 32:</b> Sequenzauffälligkeiten im Ceruloplasmin-Gen .....	62
<b>Abbildung 33:</b> Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen bei P1 und P2 .....	65
<b>Abbildung 34:</b> Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen in der Familie .....	68
<b>Abbildung 35:</b> Sequenzauffälligkeiten im Wilson-Gen .....	70
<b>Abbildung 36:</b> Sequenzvarianten im Wilson-Gen bei P1 und P2 .....	72
<b>Abbildung 37:</b> Sequenzvarianten im Wilson-Gen in der Familie .....	73

---

# 1 Einleitung

Der Begriff Neurodegeneration setzt sich aus dem griechischen Wort „neuro“ für „Nerven“ und aus dem lateinischen Wort „degenerare“ für „aus-/entarten“ zusammen. In der Neurologie beschreibt der Begriff eine Gruppe von meist langsam fortschreitenden, erblich oder sporadisch auftretenden Erkrankungen des Nervensystems, dessen Hauptmerkmal ein Verlust von Nervenzellen ist. Je nach Ausprägung, Lokalisation und Genese ergeben sich verschiedene neurologische Krankheitsbilder, die häufig mit zerebellären oder extrapyramidalen bedingten Bewegungsstörungen einhergehen.

Die zerebellären Bewegungsstörungen sind durch den Verlust von Nervenzellen im Bereich des Kleinhirns bedingt und sind typischerweise gekennzeichnet durch mangelhafte Koordination verschiedener Muskelgruppen bei der Ausführung von Bewegungen, die sich im klinischen Bild der Ataxie ausdrückt. Die Betroffenen fallen durch ein unsicheres, breitbasiges Gangbild (Gangataxie) auf, verlieren oft das Gleichgewicht, haben Sprachstörungen (Dysarthrie) und leiden zunehmend an Störungen der Feinmotorik.

Extrapyramidale Bewegungsstörungen sind Ausdruck einer Neurodegeneration im extrapyramidalen System. Dieses System setzt sich aus verschiedenen Hirnbereichen zusammen wie den Basalganglien (Putamen, Globus pallidus, Nucleus caudatus, Nucleus lentiformis), dem Nucleus ruber und der Substantia nigra im Mittelhirn. Nervenverlust in diesem Bereich führt zu einer Zunahme oder Abnahme von Bewegung. Die Folge ist entweder ein hypokinetisches Syndrom mit Parkinson-ähnlichen Symptomen (Rigor, Starre Mimik, Dysarthrie) oder ein hyperkinetisches Syndrom verbunden mit Dystonien (unwillkürliche Muskelanspannungen und Muskelbewegungen).

Die Einteilung, der für die Neurodegeneration zugrunde liegenden Erkrankungen, erfolgt nach vererbaren und nicht-vererbaren Ursprung. Sie können hinsichtlich des Vererbungsmodus in autosomal-dominante, autosomal-rezessive, X-chromosomal-rezessive und mitochondriale Erbgänge eingeteilt werden. Zu den eher selteneren genetischen Ursachen der Neurodegeneration gehören die

Gruppe der Erkrankungen, die mit Eisenablagerungen im Gehirn einhergehen (NBIA = Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation) wie die Aceruloplasminämie (aCP) und Erkrankungen aus dem Bereich der hereditären Kupferstoffwechselstörungen wie den Morbus Wilson.

Bei der Aceruloplasminämie und dem Morbus Wilson handelt es sich um zwei autosomal-rezessive Erkrankungen, die durch einen nicht-messbaren beziehungsweise erniedrigten Ceruloplasmin-Spiegel auffallen und durch Störungen im Eisenbeziehungsweise Kupferstoffwechsel zu neurodegenerativen Veränderungen mit zerebellären oder extrapyramidalen Bewegungsstörungen führen.

Die beiden Erkrankungen werden in den folgenden Abschnitten genauer besprochen, da sie Gegenstand der molekulargenetischen Untersuchungen dieser Arbeit sind.

## 1.1 Aceruloplasminämie

Bei der Aceruloplasminämie (aCP; OMIM Nr.117707) handelt es sich um eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des Eisenmetabolismus (Miyajima et al., 1987), die durch Mutationen im Ceruloplasmin-Gen verursacht wird (Yoshida et al., 1995), (Harris et al., 1995). Die Prävalenz der Erkrankung wird mit eins zu zwei Millionen im japanischen Raum angegeben, in Europa ist sie weitaus seltener (Miyajima et al., 1999), (Bosio et al., 2002). Das Manifestationsalter liegt zwischen der vierten und sechsten Lebensdekade (Takahashi et al., 1996), (Gitlin, 1998), (Miyajima et al., 2003), (Miyajima 2011).

Bis her sind weltweit knapp 40 Mutationen im Ceruloplasmin-Gen identifiziert, die zum Krankheitsbild der Aceruloplasminämie führen (siehe Tabelle 16 im Anhang bzw. Abbildung 1). Bei mehr als der Hälfte dieser Mutationen handelt es sich um Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon führen (Kono und Miyajima, 2006).

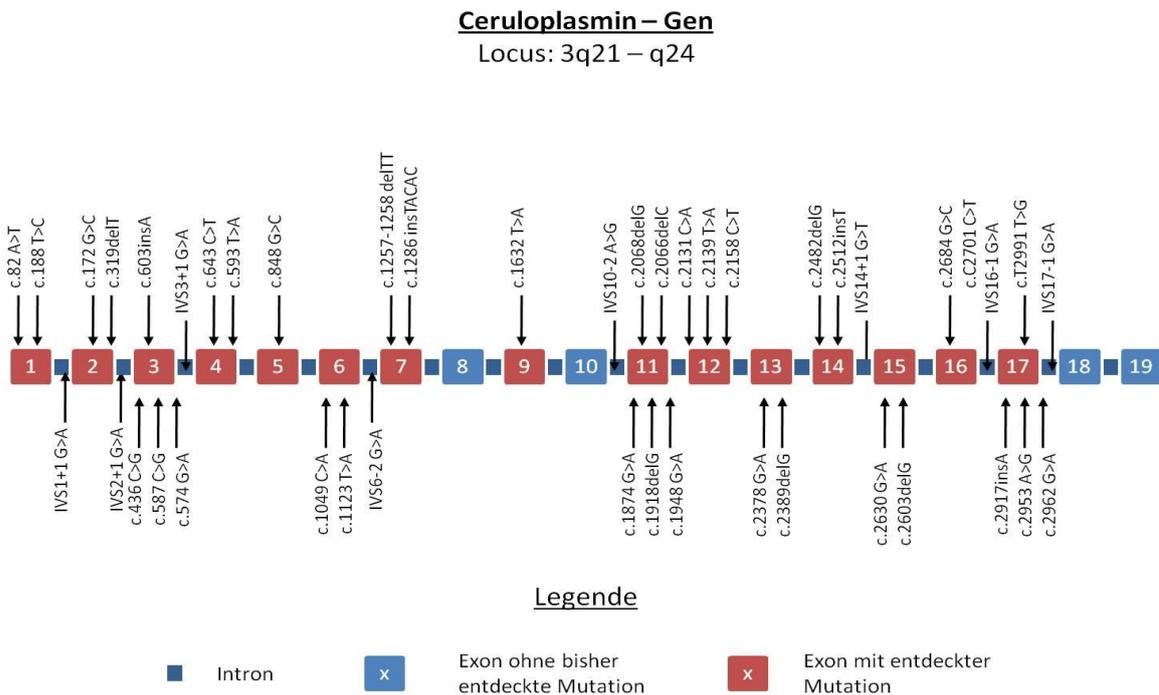


Abbildung 1: Beschriebene Mutationen im Ceruloplasmin-Gen.

Dargestellt sind die 19 Exons des Ceruloplasmin-Gens. Die Abbildung fasst die bisher veröffentlichten Mutationen im Gen zusammen. Die beschrifteten Pfeile weisen jeweils auf die betroffenen Exons beziehungsweise Introns (umgezeichnet nach Kono und Miyajima, 2006).

Die Pathologie der Erkrankung beruht auf dem Mangel oder der Dysfunktion des Protein Ceruloplasmin, wodurch es zu einem gestörten Eisenefflux aus der Zelle und zu einer progredienten Eisenansammlung in verschiedenen Geweben wie dem Gehirn kommt (De Domenico et al., 2007). Eisenvermittelter oxidativer Stress führt, über Schädigung von Proteinen, DNA und Lipiden der Zellmembran, zu einer irreversiblen Nervenschädigung in den betroffenen Hirngebieten und zum allgemeinen Zelltod (Kaneko et al., 2002), (Oide et al., 2006), (Duvigneau et al., 2008). Die Folgen sind neurodegenerative Veränderungen.

Die neurologischen Symptome der Erkrankung sind durch die Lokalisation der Eisenakkumulation in den entsprechenden Hirnarealen bestimmt und können vielfältig ausgeprägt sein. Sie beginnen zwischen der vierten und fünften Lebensdekade (Takahashi et al., 1996), (Gitlin, 1998). Der Großteil der Patienten leidet

---

unter zerebellären Symptomen (86%), die mit Eisenablagerungen im Kleinhirn einhergehen (Miyajima, 2002), (Patel et al., 2002), (Miyajima et al., 2003). Sie fallen durch eine Stand- oder Gangataxie und mit Störungen in der Feinmotorik (Dysdiadochokinese) auf. Des Weiteren können zerebelläre Symptome wie verwaschene oder skandierende Sprache (Dysarthrie) und Spontannystagmus hinzutreten (Miyajima, 2002), (Miyajima et al., 2003). Ein anderer Teil der Patienten (40-60%) entwickelt extrapyramidale Bewegungsstörungen, die mit Ablagerungen in den Basalganglien (Striatum, Putamen, Nucleus dentatus) und im Thalamus assoziiert sind (Patel et al., 2002), (Miyajima, 2002), (McNeill et al., 2008). Es treten sowohl hyperkinetische Symptome mit Dystonien (am Hals oder im Gesicht), Tremor oder choreaartige Bewegungen auf, als auch hypokinetische Bewegungsstörungen mit Rigor (Muskelsteifigkeit) und Bewegungsarmut bis hin zur Akinesie (Bewegungslosigkeit) (Miyajima, 2002), (Miyajima et al., 2003). Zu all diesen Symptomen können sich schleichend kognitive Dysfunktionen hinzugesellen, die sich bis zu einer Demenz ausweiten (Logan et al., 1994), (Miyajima, 2002). Die Symptome sind langsam progressiv und führen durch typische Komplikationen wie Pneumonie zum Tod vieler Patienten in der sechsten Lebensdekade (McNeill et al., 2008).

Neben der neurologischen Symptomatik treten meist zwei weitere charakteristische Manifestationen hinzu. Zum einen entwickelt ein Großteil der Patienten zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr durch Eisenablagerung im Pankreas einen Diabetes mellitus (Kato et al., 1997), (Hellman et al., 2000). Zum anderen wird im selben Altersabschnitt oft eine progressive Retinadegeneration festgestellt, die auf Eisenüberladung in den Müller-Zellen und im Pigmentepithel der Retina zurückzuführen ist (Miyajima et al., 2002), (Dunaief, 2006).

Zusammenfassend ergibt sich daraus die charakteristische Trias der Erkrankung: Bewegungsstörungen, Retinadegeneration und Diabetes mellitus, bedingt durch Eisenakkumulation im ZNS, in der Retina und im Pankreas (Yoshida et al., 1995), (Miyajima et al., 2003). Eine Übersicht der Krankheitssymptome ist in Abbildung 2 aufgeführt.

Zusammenfassung der klinischen Symptome bei Aceruloplasminämie	
1. klinische Manifestation	
Retina Degeneration	(93%)
Diabetes mellitus	(89%)
Anämie	(80%)
Neurologische Symptome	(73%)
Ataxie	(86%)
Dysarthrie	(skandierende o. verschwaschene Sprache),
Gangataxie, Nystagmus	
Unwillkürliche Bewegungen	(60%)
Dystonie	(Blepharospasmus, Grimassieren Halsdystonien),
Tremor, Chorea	
Parkinsonismus	(41%)
Rigor, Akinesie	
Kognitive Dysfunktion und Demenz	(40%)
2. Krankheitsbeginn	
Retina Degeneration	
Unbekannt, da sie keine subjektiven Symptome verursacht	
Diabetes mellitus	
20-29 Lbj:	25%; 30-39 Lbj: 40%; 40-49Lbj: 23%; ≥50 Lbj: 12%
Neurologische Symptome	
30-39 Lbj:	2%; 40-49 Lbj: 71%; 50-59 Lbj: 23%; ≥60 Lbj: 4%

Abbildung 2: Zusammenfassung der klinischen Symptome bei Aceruloplasminämie  
(aus Miyajima, 2002 und Miyajima und Takahashi, 2003)

Diagnostisch wegweisend für die Aceruloplasminämie sind MRT-Untersuchungen des Kopfes und laborchemische Untersuchungen des Bluts. In T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern des MRTs findet man als Zeichen für die Eisenakkumulation charakteristische Hypointensitäten in den Basalganglien, im Thalamus, im Kleinhirn und im zerebralen Kortex (McNeill et al., 2008). CT-Bilder können zu dem auf die Eisenüberladung im Pankreas hinweisen (Ogimoto et al., 2011).

Das Labor wird in fast allen Fällen dominiert durch einen nichtmessbaren Ceruloplasmin-Spiegel im Serum (N: 0,21-0,36 g/l), sowie stark erniedrigten Serumkupfer (< 10 µg/dl; N: 70-150 µg/dl) und Eisenspiegel (< 45 µg/dl; N: männl. 60-180 µg/dl, weibl. 60-140 µg/dl). Die Ceruloplasmin-Ferroxidase-Aktivität, nach der Methode von Erel (Erel, 1998), ist nicht mehr messbar (N: 500-680 U/L) (Miyajima 2011). Bei Menschen, bei denen nur ein Allel betroffen ist, ist der Ceruloplasmin- und Kupferspiegel um die Hälfte des normalen Wertes erniedrigt (McNeill et al., 2008).

Die Diagnose Aceruloplasminämie kann aber nur durch eine genetische Untersuchung des entsprechenden Gens gesichert werden.

## 1.2 Ceruloplasmin

Das bei der Aceruloplasminämie betroffene Gen kodiert für das Protein Ceruloplasmin (Ensemble ENST:000002646213) (Mukhopadhyay et al., 1998), (Jeong und David, 2003) und ist auf dem Chromosom 3q23-q24 lokalisiert (Royle et al., 1987). Es erstreckt sich über eine Länge von 4419 bp und ist aus 19 Exons zusammengesetzt (Koschinsky et al., 1986), (Daimon et al., 1995). Aus einem Transkript von 3700 Nukleotiden wird das Protein Ceruloplasmin (Synonym: Ferroxidase 1, Oxygenreduktase) mit 1046 Aminosäuren und einer Masse von 132 kDa translatiert (Takahashi et al., 1984), (Ortel et al., 1984).

Ceruloplasmin ist ein heterogenes  $\alpha_2$ -Glycoprotein, das mit sechs Kupferatomen reversibel verbunden ist und damit 90-95 % des Gesamtkupfers im Plasma transportiert (Gitlin, 1998), (Miyajima et al., 2003). Es gehört zu der Familie der Multi-Kupfer-Oxydasen, die mit Hilfe der Elektronen ihrer Kupferatome Substrate oxidieren können, während Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Messerschmidt und Huber, 1990). Für die Funktion des Proteins müssen alle sechs Kupferatome besetzt sein, sonst kommt es zur Bildung von Apoceruloplasmin (Hellman et al., 2002b). Dieses besitzt keine enzymatische Aktivität und wird schnell abgebaut (Gitlin et al., 1992).

Molekularbiologisch besteht das Protein aus einer Polypeptidkette mit drei nah beieinander liegenden homologen Einheiten, die jeweils hinsichtlich Funktion und Aufbau in drei Domänen unterteilt werden können. Innerhalb der drei großen Einheiten besteht eine Sequenzähnlichkeit von 35-40 % (Ortel et al., 1984).

Durch alternative Splicevorgänge liegen verschiedene Isoformen des Proteins vor (Yang et al., 1990), (Patel und David, 1997). Der Hauptsyntheseort sind die Leberzellen (Patel und David, 1997). Sie bilden die Blutplasma-Form des Ceruloplasmins mit 1046 Aminosäuren. Diese Form dient dem Kupfertransport und der Kupferversorgung des Körpers über die Blutbahn (Gutteridge et al., 1980) und wird für den Eisenefflux aus den Körperzellen benötigt. Darüber hinaus spielt es eine größere Rolle als Akute-Phase-Protein (Gitlin, 1988) und dient für eine

---

Vielzahl von Substraten wie Dopamin oder Katechol-Derivate zur Oxidation (Frieden und Hsieh, 1976), (Stoj und Kosmann, 2003).

Da die Plasma-Form aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nicht in das Gehirn gelangen kann, besitzt das Gehirn seine eigene Variante des Ceruloplasmins. Durch alternative Splicevorgänge am Exon 18 werden fünf Aminosäuren C-Terminal durch 30 Aminosäuren ersetzt. Es entsteht ein 1065 bp großes Protein, das fest in der Zellmembran verankert ist (sog. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored Ceruloplasmin) (Patel und David, 1997), (Patel et al., 2000), (Hellman et al., 2002a). Diese Anker-Form wird reichlich in den Gliazellen der Substantia nigra, in den Basalganglien und in der Retina gebildet (Klomp und Gitlin, 1996), (Patel und David, 1997), (Patel et al., 2000).

Die zentrale Rolle des Proteins im Körper und vor allem im Gehirn liegt in der Regulation des Eisenhaushaltes der Zellen und der Vermeidung von oxidativen Stress (Mukhopadhyay et al., 1998), (Jeong und David, 2003). Ceruloplasmin katalysiert die sichere Umwandlung von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  und ermöglicht so den Eisen-transport aus der Zelle (Gutteridge, 1992), (Harris et al., 1999). Es verhindert die Bildung von Radikalen, ist selber ein Radikalfänger und wirkt unabhängig von seiner Ferroxidase-Aktivität neuroprotektiv (Hineno et al., 2011).

Bei Verlust der Ferroxidase-Aktivität von Ceruloplasmin kommt es zu einem gestörten Eisenefflux und zu einer zunehmenden Eisenakkumulation vorrangig in den Gliazellen (De Domenico et al., 2007). Des Weiteren verliert das Protein seine anti-oxidative Eigenschaft die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu unterbinden (Halliwell und Gutteridge, 1990). Es kommt zur Bildung von zytotoxischen Radikalen, die über Lipidperoxidation, Brüchen in den DNA-Strängen und Zerfall von Biomolekülen, zur oxidativen Zerstörung der Nervenzellen führen (Kaneko et al., 2002), (Oide et al., 2006) und dadurch neurodegenerative Prozesse bedingen (Patel et al., 2002), (Galaris und Pantopoulos, 2008). Aufgrund der geringen Eisenaufnahmerate in den Gliazellen (entspricht nur 3,5 % der Aufnahmerate der Leberzellen), steigt die Eisenakkumulation nur langsam in den Hirnnerven an (Richardson, 1999), (Jeong und David, 2003). Die neurodegenerativen Prozesse

---

setzen daher erst in höherem Alter ein und führen erst ab dem 40. Lebensjahr und später zu neurologischen Auffälligkeiten.

Differentialdiagnostisch ist bei der Aceruloplasminämie ein großes Feld der neurodegenerativen Erkrankungen zu berücksichtigen. Wichtig sind dabei Erkrankungen, die sowohl neurodegenerative Veränderungen mit entsprechender Klinik als auch den niedrigen Ceruloplasmin-Spiegel aufweisen. Dazu zählen zum Beispiel das Menkes-Syndrom und der Morbus Wilson, zwei Erkrankungen aus dem Bereich der hereditären Stoffwechselstörungen. Beim Menkes-Syndrom ist die intestinale Kupferresorption gestört, was zu Kupfermangel und erniedrigten Ceruloplasmin-Spiegel führt. Da die Erkrankung meist schon in den ersten Monaten nach der Geburt beginnt, ist sie als Diagnose rasch auszuschließen (Tümer und Møller, 2010). Schwieriger ist die Differenzierung zwischen Aceruloplasminämie und Morbus Wilson. Auch hier kommt es zu neurodegenerativen Veränderungen mit zerebellären oder extrapyramidalen Störungen bei gleichzeitig erniedrigtem Ceruloplasmin-Spiegel. Das Manifestationsalter ist variabel. Da der Morbus Wilson eine wichtige Differentialdiagnose der Aceruloplasminämie ist, wird er im folgenden Abschnitt ausführlicher besprochen.

### 1.3. Morbus Wilson

(Synonyme: Hepatolenticuläre Degeneration, Pseudosklerose Westphal, Kupferspeicherkrankheit, Wilson-Krankheit, Dystonie lenticularis)

Der Morbus Wilson (OMIM Nr. 606882) ist eine autosomal-rezessive Erkrankung des Kupferstoffwechsels (Walshe, 2006), die durch Mutationen im Gen des Kupfertransporter ATP7B verursacht wird (Bull et al., 1993). Die Prävalenz wird allgemein mit 1:30.000 angegeben (Maier-Dobersberger, 1999), aber in Regionen wie China, Japan oder Sardinien kann sie mit 1:10.000 weit öfters auftreten (Cox und Roberts 2006). Das Manifestationsalter liegt zwischen dem 5. und 45. Lebensjahr mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 13. und 24. Lebensjahr (Roberts und Cox, 1998), (Wilson et al., 2000).

---

Bisher sind mehr als 500 Mutationen bekannt (Li et al., 2011), die in der „Wilson Disease Mutation Database“ der Universität von Alberta zusammengefasst sind ([www.wilsondisease.med.ualberta.ca](http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca)) (Kenney und Cox, 2007). Die meisten Betroffenen sind „compound“ heterozygot, das heißt, sie haben zwei unterschiedliche Mutationen in den beiden Kopien des Gens (Pfeiffer, 2007). Die häufigste Mutation in unseren Breiten ist die Punktmutation H1069Q. Sie wird mit einer Häufigkeit von 40-60 % angegeben (Caca et al., 2001), (Gromadzka et al., 2006), (Bruha et al., 2011).

Die Pathologie der Erkrankung beruht auf der Dysfunktion des Kupfertransporters ATP7B, der für die Kupferausscheidung und für die Biosynthese von Ceruloplasmin unersetzlich ist (Yang et al., 1997), (Hung et al., 1997). Bei Verlust seiner Kupfertransportfähigkeit kommt es zu einer verringerten Ceruloplasmin-Biosynthese und zu einer progressiven Kupferakkumulation im Körper (Schilsky, 1996), (Yang et al., 1997), (Ferenci, 2006). Zunächst findet die Kupferablagerung in der Leber statt, später in anderen Organen von denen bevorzugt das Gehirn, vor allem die Basalganglien (Putamen), und die Kornea betroffen sind (Yang et al., 1997), (Buiakova et al., 1999), (Ferenci, 2004). Kupfer hat wie Eisen die Eigenschaft in freier Form die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen zu begünstigen (Sokol et al., 1994), (Britton, 1996), (Rossi et al., 2004). Kupfer vermittelter oxidativer Stress führt dann über Schädigung von Lipiden, Proteine, Nukleinsäuren und Mitochondrien zu irreversiblen Zerstörungen in der Leber und im Gehirn, welche mit Lebererkrankungen und neurodegenerativen Veränderungen im Gehirn einhergehen können (Waggoner et al., 1999), (Watt und Hooper, 2001).

Die Klinik ist vielfältig ausgeprägt. Sie erstreckt sich über isolierte Lebererkrankungen mit und ohne neurologische Störungen, bis hin zu progressiver Neurologie ohne hepatischen Auffälligkeiten und psychiatrischen Störungen (siehe Tabelle 17 im Anhang) (Roberts und Schilsky, 2008). Bezüglich des Schweregrades und der Symptome zeigt die Erkrankung eine große Heterogenität (Schilsky, 2009). Selbst innerhalb einer Familie und innerhalb von Patientengruppen mit gleicher Mutation gibt es große klinische Unterschiede in der Ausprägung als auch im Manifestationsalter der Erkrankung (Pyeritz, 1997),

---

(Shah et al., 1997), (Takeshita et al., 2002). Eine Korrelation von Genotyp und Phänotyp konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Shah et al., 1997), (Leggio et al., 2006), (Møller et al., 2011).

Im Kindesalter steht die Lebersymptomatik variablen Ausmaßes im Vordergrund. Sie beginnt häufig zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr, selten vor dem 5. oder nach dem 40. Lebensjahr, und ist durch einen Ikterus charakterisiert (Gow et al., 2000), (Diener und Hermann 2008). Die hepatischen Symptome können einer einfachen akuten selbst-limitierenden Hepatitis-ähnliche Erkrankung oder einer asymptomatische Leber- und Milzvergrößerung entsprechen und bis zum fulminanten Leberversagen führen (Roche-Sicot und Benhamou, 1979), (Pfeiffer, 2007). Im weiteren Krankheitsverlauf können neurologische Störungen dazu treten.

Im Vergleich zu den Patienten mit hepatischer Erstmanifestation, manifestiert sich das neurologische Erkrankungsbild in einem höheren Alter (Li et al., 2011). Die Symptome beginnen nach dem 10. Lebensjahr im Durchschnitt mit 19 Jahren und äußerst selten vor dem 6. oder nach dem 72. Lebensjahr (Ala et al., 2005). Es handelt sich bei 40-60 % der Patienten um den primären Phänotyp (Walshe, 1962), (Pfeiffer, 2007), (Diener und Hermann 2008). Die Neurodegenerationen sind vornehmlich mit den Basalganglien, aber auch mit dem Thalamus, dem Kleinhirn oder dem Hirnstamm assoziiert. Vor allem das Putamen ist in Folge zystischer Degeneration betroffen und verursacht extrapyramidale Störungen. Je nach Manifestationsalter der Erkrankten treten hypo- oder hyperkinetische Bewegungsstörungen auf (Marsden, 1987), (Pfeiffer, 2007).

Zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr zeigen sich vor allem hypokinetische Symptome. Das klinische Bild verläuft ähnlich des Parkinsons mit starrer Mimik, Rigor und allgemeiner Verlangsamung. Die Patienten leiden unter Schluck- (Dysphagie) und Sprechstörungen (Dysarthrie). Es kann außerdem eine Pseudobulbärparalyse (supranukleäre Läsion im Hirnstamm) mit pathologischen Lachen und Weinen auftreten (Saito, 1987), (Marsden, 1987), (Lin et al., 2006), (Cox und Roberts 2006), (Pfeiffer, 2007).

---

Nach dem 20. Lebensjahr bis hin zur 4. Lebensdekade stehen die hyperkinetischen Symptome im Vordergrund (Marsden, 1987). Sie beginnen zumeist mit einem Haltungs- und Intentionstremor, der bei progredienter Leberinsuffizienz im Rahmen der Enzephalopathie in einen „flapping tremor“ übergehen kann. Im Verlauf treten ataktische Gangstörungen auf, die von Überbewegungen der Beine, der Arme oder des Gesichtes (dystonen und choreatischen Hyperkinesien) begleitet werden. Bei einem Teil der Patienten kommt es ebenfalls zum Verlust der Feinmotorik und der Koordination (Marsden, 1987), (Cox und Roberts 2006), (Pfeiffer, 2007). Mit Einsetzen der neurologischen Symptomatik stellen sich oft Gedächtnis-, Konzentrations-, Antriebs- und Affektstörungen ein (Oder et al., 1991), (Lin et al., 2006), (Pfeiffer, 2007). Diese können sich in Persönlichkeitsveränderungen, Depressionen oder abnormalen Verhalten bis hin zu schizophrenen Symptomen, kriminellen Verhalten oder Suizid manifestieren (Dening und Berrios, 1989), (Kaul und McMahon, 1993).

Zusammenfassend ergibt sich aus dem Symptomkatalog ein komplexes Krankheitsbild, das sich aus drei zentralen Punkten zusammensetzt: Erkrankung der Leber, Basalgangliensymptomen und psychiatrische Auffälligkeiten. Da die Symptome einzeln oder zusammen auftreten können, ist der Phänotyp der Krankheit sehr variabel und lässt sich kaum anhand der zugrundeliegenden Mutation vorhersagen (Shah et al., 1997), (Leggio et al., 2006), (Møller et al., 2011).

Diagnostisch richtungsweisend sind die klassischen Kayser-Fleischer-Kornealringe, die sich bei 50-60 % der Patienten mit Lebersymptomatik und bei über 95 % der Patienten mit neurologischen und psychiatrischen Störungen finden lassen (Oder et al., 1991), (Cox und Roberts 2006). Es handelt sich dabei um grün-bräunliche Kupferablagerungen in der Descemet Membran der Kornea, welche Ausdruck der exzessiven Kupferablagerung im Gehirn sind (Wiebers et al., 1977), (Pfeiffer, 2007).

Zudem ist der Ceruloplasmin-Spiegel im Serum bei 95 % der Patienten erniedrigt (< 20 mg/dl; N: 0,21-0.36 g/l) (Macintyre et al., 2004). Der Serumkupfer-Spiegel ist erniedrigt (< 60 µg/dl; N: 70-150 µg/dl), aber die Serumkonzentration von freiem (nicht Ceruloplasmin gebundenem) Kupfer erhöht (> 25 µg/dl; N: < 15 µg/dl)

---

(Diener und Hermann 2008), (Roberts und Schilsky, 2008). Im Gegensatz zur Aceruloplasminämie ist beim Morbus Wilson zusätzlich die Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin ( $> 80 \mu\text{g}/\text{dl}$ , N:  $< 40 \mu\text{g}/\text{dl}$ ) wie auch der Kupfergehalt im Leberbiopsat ( $> 250 \mu\text{g}/\text{g}$  Trockengewicht; N:  $< 50 \mu\text{g}/\text{g}$  Trockengewicht) erhöht (Ferenci et al., 2005), (Roberts und Schilsky, 2008).

In  $T_2$ -gewichteten MRT-Bildern des Kopfes kommt es durch Kupfer induzierte Demyelinisation, zystische Degeneration und neuronale Nekrose zu Signalanhebungen in den Basalganglien, im Thalamus, im Hirnstamm sowie in bestimmten Kleinhirnstrukturen (Nucleus dentatus, Vermis). Es wird eine allgemeine Atrophie des Gehirns beobachtet (Svetel et al., 2001), (Sener, 2003), (Kim et al., 2006).

Die klinische Diagnose kann nur bei Vorhandensein typischer Symptome und charakteristischer Laborwerte gestellt werden (Sternlieb, 1990), (Ferenci et al., 2003). Gesichert ist sie allein durch die genetische Untersuchung des Wilson-Gens (Maier-Dobersberger, 1999), (Ala et al., 2007).

## 1.4 ATP7B

Das beim Morbus Wilson betroffene Wilson-Gen (Ensemble ENST:00000242839, Synonym: ATP7B, Wilson's disease gene, WND) ist auf Chromosom 13 (13q14.3) lokalisiert (Frydman et al., 1985), (Bowcock et al., 1988), (Bull et al., 1993). Es erstreckt sich bei einer Länge von 7,5 kbp auf 21 Exons und kodiert für einen 1465 Aminosäuren großen und 165 kDa schweren Kupfertransporter (Tanzi et al., 1993), (Bull et al., 1993), (Yang et al., 1997). Es handelt sich um die Kupfer-ATPase ATP7B. Diese ist hauptverantwortlich für die Kupferausscheidung des Körpers und für die Biosynthese von Ceruloplasmin (Schaefer et al., 1999), (La Fontaine und Mercer, 2007).

Die ATPase gehört zur  $P_{1B}$ -Subfamilie einer großen Familie von Kationentransportern (P-Typ ATPase) mit mehr als 100 Vertretern (Tanzi et al., 1993), (Bull et al., 1993), (Bartee und Lutsenko, 2007). Diese Gruppe von Transmembran-Ionenpumpen ist durch Hydrolyse von ATP und Bildung eines

---

phosphorylierten Zwischenprodukts in der Lage Metallionen durch eine Membran zu transportieren (Kühlbrandt et al., 1998), (Kühlbrandt, 2004), (Lutsenko et al., 2007a).

Es besteht eine hohe Sequenzähnlichkeit von über 65 % zu dem sogenannten Menke-Gen (ATP7A) (Bull et al., 1993), (Tanzi et al., 1993), ein Kupfertransporter in den intestinalen Mukosazellen, der für die intestinale Kupferaufnahme zuständig ist. Auch bei Mutationen im Menke-Gen resultiert eine Kupferstoffwechselstörung, die aber im Gegensatz zum Morbus Wilson schon im frühesten Kleinkindalter beginnt und mit ausgeprägter Neurologie und Bindegewebsstörungen einhergeht (Tümer und Møller, 2010).

Der Transporter besteht aus mehreren Domänen: einer Kupferbindungsdomäne für sechs Kupfermoleküle, acht Transmembrandomänen und einer Domäne für die ATP-Hydrolyse-Funktion (Lutsenko et al., 2007b), (Bartee et al., 2009).

Das mRNA-Transkript für die komplette Proteinelänge wird überwiegend in der Leber, dem Zentralorgan für die Kupferausscheidung gebildet (Petrukhin et al., 1994), (Schaefer et al., 1999), (La Fontaine und Mercer, 2007). Es kommt ebenfalls in anderen Geweben des Körpers wie den Nieren, den Augen, der Lunge, dem Gehirn, der Plazenta und den Brustdrüsen vor (Bull et al., 1993), (Tanzi et al., 1993), (Lutsenko et al., 2007b), (Barnes et al., 2009). Zudem sind im Gehirn Splice-Varianten der ATPase entdeckt worden (Tanzi et al., 1993), (Petrukhin et al., 1994), (Yang et al., 1997), (Lutsenko und Copper, 1998). So findet man dort ein Genprodukt des Wilson-Gens mit einer Länge von 1258 Aminosäuren, dem Exon 6, 7, 8 und 12 fehlen. Die Rolle dieser Variante ist ungeklärt (Petrukhin et al., 1994), (Yang et al., 1997), (Lutsenko et al., 2007a). Eine andere Splice-Variante ist die sogenannte PINA. Sie wird in der Retina und in der Zirbeldrüse (Pinealdrüse) gebildet und reguliert im zirkadianen Rhythmus den Kupferhaushalt der Photorezeptorzellen und der Pinealozyten. Ihre Bedeutung ist ebenfalls unbekannt (Borjigin et al., 1999).

Die Hauptaufgabe der ATP7B ist die Aufrechterhaltung der Kupferhomeostase des Menschen (Sato und Gitlin, 1991), (La Fontaine und Mercer, 2007). Die Funktion

---

der ATPase wird abhängig von der extrazellulären Kupferkonzentration gesteuert. Bei normaler Kupferkonzentration befindet sich das Protein im Golgi-Apparat der Hepatozyten und transportiert für die Biosynthese von Ceruloplasmin Kupfer in das Lumen des Golgi-Apparats (Sato und Gitlin, 1991), (Lutsenko und Copper, 1998), (La Fontaine et al., 2001). Steigt die extrazelluläre Kupferkonzentration auf über 1  $\mu\text{mol/l}$  wird die ATPase zur apikalen Membran der Hepatozyten transportiert, um Kupfer in die Gallengänge zu entlassen und damit die Kupferausscheidung zu ermöglichen (Hung et al., 1997), (Schaefer et al., 1999), (Roelofson et al., 2000).

Bei Verlust der Transportfähigkeit der ATP7B kommt es zu einer gestörten Kupferexkretion und einer damit verbundenen Kupferakkumulation in den Zellen. Durch Überschreitung der Kupferspeicherkapazität der Hepatozyten gelangt das Kupfer über die Blutbahn und Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn. Betroffen sind dann die Basalganglien, Thalamus, Hirnstamm und Teile des Kleinhirns (Buiakova et al., 1999), (Ferenci, 2004), (Choi und Zheng, 2009). Mit zunehmender Kupferbelastung kommt es vermutlich zur Bildung von Hydroxylradikalen, die wie bei der Aceruloplasminämie über Schädigung der Lipide, Proteine, Nukleinsäuren und Mitochondrien zur oxidativen Zerstörung der Zellen führen (Sokol et al., 1994), (Rossi et al., 2004), (Zischka et al., 2011). Neben weitflächiger Leberzellschädigung verursachen die beschriebenen Zeldestruktionen ausgeprägte neurodegenerative Veränderungen (Svetel et al., 2001), (Sener, 2003), (Kim et al., 2006). Das Ergebnis dieser Pathologie ist der Morbus Wilson mit seiner neurologischen, aber auch hepatischen Symptomatik.

Die mangelhafte Biosynthese von Ceruloplasmin und der daraus entstehende verminderter Ceruloplasmin-Spiegel hat im Gegensatz zu der Aceruloplasminämie nach bisherigen Untersuchungen keine pathologische Relevanz für den Morbus Wilson (Meyer et al., 2001).

## 1.5 Fragestellung

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lagen sieben Proben zur molekulargenetischen Untersuchung vor. Fünf der sieben Proben stammen aus einer Familie, die übrigen beiden von einzelnen nicht-blutsverwandten Personen. Sowohl zwei Kinder der Familie als auch die zwei Einzelpersonen leiden seit einigen Jahren an einer progredienten zerebellären Klinik und weisen zusätzlich einen verminderten Ceruloplasmin-Spiegel auf. Bei den Patienten ist meist ein zweites Geschwisterkind mit betroffen, während Eltern und andere Geschwister gesund sind (siehe Kapitel 2.8). Es wird auf eine genetische Grundlage ihrer Erkrankung geschlossen und ein autosomal-rezessiver Erbgang vermutet. Die Aceruloplasminämie und der Morbus Wilson kommen als mögliche Verdachtsdiagnose in die engere Wahl.

Die Zentralfrage dieser Arbeit lässt sich daher wie folgt formulieren: Gibt es Mutationen in den entsprechenden Genen der Patienten, die ihrem Phänotyp zugrunde liegen?

Daraus leiten sich folgende Aufgabenstellungen ab:

- Das Ceruloplasmin-Gen und das ATP7B-Gen bei den sieben DNA-Proben mittels PCR-Technik und Sequenzierung auf Veränderungen in ihrer Nukleotidsequenz untersuchen.
- Die möglichen Veränderungen gemäß der internationalen Nomenklatur benennen und eventuelle Auswirkungen auf die Proteinebene ableiten.
- Die gefundenen Sequenzveränderungen mit aus der Literatur bekannten Mutationen und Polymorphismus vergleichen.

---

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Tabelle 1: Chemikalien, Enzyme und Kits

Produkt	Hersteller
5x-Sequenzierung Puffer	Applied Biosystems
Agarose	StarLab
Aqua dest.	Merck
Big Dye Terminator Mix v.1.1	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
EDTA (Titriplex III)	Merck
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
Exonuklease und Shrimp Alkaline Phosphatase (ExoSAP-It)	USB Corporation
Ficoll 400	Pharmacia
Hidi-Formamid	Applied Biosystems
Incubation Mix T. Pol. mit MgCl <sub>2</sub>	Qbiogene
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Qbiogene
Sephadex	Ge healthcare
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Qbiogene
Tris	MP Biomedicals
Xylencyanol	Sigma

---

Tabelle 2: Inhalt des Big Dye Terminator Mix v.1.1 von Applied Biosystems

## Terminator Ready Reaction Mix:

---

A-Dye Terminator labeled with dichloro [R6G]  
 C-Dye Terminator labeled with dichloro [ROX]  
 G-Dye Terminator labeled with dichloro [R110]  
 T-Dye Terminator labeled with dichloro [TAMRA]  
 Desoxynucleoside triphosphates (dATP, dCTP, dTTP, dUTP)  
 AmpliTaq DNA Polymerase, FS, with thermally stable pyrophosphatase  
 $MgCl_2$   
 Tris-HCl buffer, pH 9.0

---

## 2.2 Stammlösungen und Puffer

Tabelle 3: Stammlösungen und Puffer

Produkt	Inhalt
1,5 %ige Agarosegel-Lösung	3 g Agarose 5 $\mu$ l Ethidiumbromid 200 ml 1xTBE-Puffer
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
6xFicoll-Lösung	290 $\mu$ M Bromphenolblau 15 $\mu$ M Ficoll 400 370 $\mu$ M Xylencyanol
10xTBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	890 mM Borsäure
(Gebrauchslösungen: 6x und 1xTBE-Puffer)	20 mM EDTA (Titriplex III) 890 mM Tris

## 2.3 DNA-Standards und Nukleinsäuren

Tabelle 4: DNA-Standards und Nukleinsäuren

Produkt	Hersteller
100 bp DNA-Ladder	Invitrogen
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Q-Biogene
Low Mass Ladder	Invitrogen

## 2.4 Synthetische Oligonukleotide

### 2.4.1 Verwendete Primer für das Ceruloplasmin-Gen

Die Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH synthetisiert.

Tabelle 5: Primer für die PCR des Ceruloplasmin-Gens

Exon	PCR-Primer	Sequenz (5' nach 3')	Exon-länge (bp)	PCR-Produkt (bp)
1	CP-Ex1-F	gctgtgacatattgtcagagg	396 <sup>1)</sup>	643
	CP-Ex1-R	gagattgattcaagtgctctgg		
2	CP-Ex2-F	ctaactaccagccctccacttc	248	507
	CP-Ex2-R	cttatccaggagagaagtccac		
3	CP-Ex3-F	ctacacaccctagccattagc	213	498
	CP-Ex3-R	ccttacctgctcaatctcagc		
4	CP-Ex4-F	gagtgactggtccagacttg	174	418
	CP-Ex4-R	gaccacagactagacacacag		
5	CP-Ex5-F	gaataccagcatgtgtgccag	255	484
	CP-Ex5-R	gatgccagttcaaagctcag		
6	CP-Ex6-F	ctactgtcatcaccggagc	172	426
	CP-Ex6-R	ctcaagctcagactcttacatc		
7	CP-Ex7-F	gagtggactggaactgtctg	140	413
	CP-Ex7-R	gaaatcatgcagtaggtcctg		

8	CP-Ex8-F	cggttgctcctagtagttc	153	335
	CP-Ex8-R	catactgtcagtgaccagtac		
9	CP-Ex9-F	ggatgcaatcacatcgggtctg	212	544
	CP-Ex9-R	ggtgtgataattgtgggca		
10	CP-Ex10-F	gaaagctctggtggtgaactg	151	464
	CP-Ex10-R	gattaccttcaggacactattg		
11	CP-Ex11-F	gttggctcctggaaagtctgtg	213	414
	CP-Ex11-R	gaagggcacttcagaggcttg		
12	CP-Ex12-F	gcagaagggtgtggaaagctag	208	410
	CP-Ex12-R	ggtgtaattcttacttctctg		
13	CP-Ex13-F	gcactcagatggctaggtatg	140	418
	CP-Ex13-R	gacatgaattgacggttactg		
14	CP-Ex14-F	cctgggacgcagtataaatcc	129	411
	CP-Ex14-R	cacacagacacctccttgcattcc		
15	CP-Ex15-F	ccaatacaaccagatcca	107	302
	CP-Ex15-R	cataggtagcagcatagttgc		
16	CP-Ex16-F	ggcagtaccacattgggca	217	491
	CP-Ex16-R	ggattctacctgacatacaaag		
17	CP-Ex17-F	gcttttggtgcaaagtcctag	140	470
	CP-Ex17-R	gaatccacggatatgaagcaccg		
18	CP-Ex18-F	caatatccctgagctgaacat	163	371
	CP-Ex18-R	cagggcagcagattcacaatgc		
19	CP-Ex19-F	gcagcaatagaatgagaga	988	441
	CP-Ex19-R	gcggtgatattcattagactgt		

<sup>1)</sup> in Exon 1 ist die Länge ab ATG Position angegeben

Tabelle 6: spezifischer Primer für Sequenzierung von Exon 13 (CP)

Exon	Primer	Sequenz (5' nach 3')
13	CP-Ex13-Fseq	ttaagtgtttcaaatgcatt

Tabelle 7: Primer der allelspezifischen PCR von Exon 16 (CP)

Primer	Sequenz (5´ nach 3´)
CP-Ex16-F c.2684C	ctctacagtggattaattgc
CP-Ex16-Fwt c.2684G	cacgacgttgtaaacgacctctacagtggattaattgg
CP-Ex16-Rwt	acagaagggcaaatccag

#### 2.4.2 Verwendete Primer für das ATP7B-Gen

Die Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH synthetisiert.

Tabelle 8: Primer für die PCR des ATP7B-Gen

Exon	PCR-Primer	Sequenz (5´ nach 3´)	Exon- länge (bp)	PCR- Produkt (bp)
1	ATP7B-exon1-F	gcgcaactttgaatcatccgtg	51 <sup>1)</sup>	353
	ATP7B-exon1-R	gcgagtaagcgccgaacgcgg		
2 <sup>2)</sup>	ATP7B-exon2-F	gccagagaagctgggatgttg	1234	Teil 1:
	ATP7B-exon2-RM	gtgaccacatggcttccttg		795
	ATP7B-exon2-FM	gctgccatcaagagcaaagtg		Teil 2:
	ATP7B-exon2-R	gttcactgttgacatgggag		782
3	ATP7B-exon3-F	ggacaatgaaccctcaccaag	258	430
	ATP7B-exon3-R	gctgggtattctgaaggag		
4	ATP7B-exon4-F	gctgttctagaggattctgg	164	382
	ATP7B-exon4-R	accagacacgtccaagatgg		
5	ATP7B-exon5-F	gtcttgagagcagtgctgag	162	427
	ATP7B-exon5-R	gactgagcttattccatggg		
6	ATP7B-exon6-F	ccacaaagtctactgaggcac	77	299
	ATP7B-exon6-R	catgggaagacaagaccagc		
7	ATP7B-exon7-F	ggagtggtctgtaatccaggtg	175	315
	ATP7B-exon7-R	gcttagcgggcagaatatctgag		

8	ATP7B-exon8-F	gaagaagtactgtcacgactg	234	429
	ATP7B-exon8-R	ggtgttcagaggaagtggag		
9	ATP7B-exon9-F;	gtctctaacaccacgcttg	92	248
	ATP7B-exon9-R	gcatctgatgcagctcacacag		
10 u.	ATP7B-exon10u11-F	cagcagctgcacgataaatc	ex10:	624
11 <sup>3)</sup>	ATP7B-exon10u11-R	ctgatttcccagaactcttcac	128	
			ex11:	155
12	ATP7B-exon12-F	gtgaagagttctgggaaatcag	135	463
	ATP7B-exon12-R	gtgactgtttatcctactctg		
13	ATP7B-exon13-F	ctgtttccggaaccaagtc	195	424
	ATP7B-exon13-R	cactgctgtcttgagtggtc		
14	ATP7B-exon14-F	ggatcacgttaggaagctgtg	183	396
	ATP7B-exon14-R	gcagctaggagagaaggacatg		
15	ATP7B-exon15-F	ctgctctcttgccaccttcac	169	391
	ATP7B-exon15-R	cttagccatgaaccgtctgc		
16	ATP7B-exon16-F	ggatgctgtcacaagaggtg	144	429
	ATP7B-exon16-R	atcttctggaaaacaggcctg		
17	ATP7B-exon17-F	gcaagtgtggtatcttggtg	143	309
	ATP7B-exon17-R	gcaggagtacagctcagtgtg		
18 u.	ATP7B-exon18u19-F	cactgactggacccagaggcc	ex18:	612
19 <sup>4)</sup>	ATP7B-exon18u19-R	ccagccagtgagtgagccac	204	
			ex19:	118
20	ATP7B-exon20-F	gccaggtggagacctcactg	103	297
	ATP7B-exon20-R	gcaagttccactgtgctaag		
21	ATP7B-exon21-F	cctgtttctagaatggctc	274 <sup>5)</sup>	445
	ATP7B-exon21-R	catatccaggaggcggaagtc		

<sup>1)</sup> in Exon 1 ist die Länge ab ATG Position angegeben

<sup>2)</sup> Exon 2 ist wegen seiner Länge für die PCR in zwei Teile geteilt worden

<sup>3)</sup> Exon 10 u. 11 ist in der PCR zusammengelegt worden

<sup>4)</sup> Exon 18 u. 19 ist in der PCR zusammengelegt worden

<sup>5)</sup> in Exon 21 ist die Länge bis zum Stoppcodon angegeben

## 2.5 Geräte und Gebrauchsartikel

Tabelle 9: Geräte und Gebrauchsartikel

Produkt	Hersteller
Agarosegel-Kammer	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership BM 100
Agarosegel-Träger	Serva Blue Marine 100
Drucker	Sony Digital Graphic Printer
Eismaschine	Ziegra ZBE 30-100
Elektrophoresekammer	Hoefer Elektrophorese He 99x MAX Amersham Biosciences submarine elektrophorese Unit He 99x
Filterpapier	Mucheray-Nagel
Filterplatte	Millipore MultiScreen
Kämme	Life Technologies Gibco BRL 25er Haifisch- zahnkamm, mylar, 0,4 mm stark; Serva 14er Kämme, 1,5 mm stark
Magnetrührer	Ikamag RET Ikamag RH
Mikrowelle	Hitachi Micro 700
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt Tubes 0,5-1,5 ml ABgene 96er PCR-Mikrotiterplatte + Deckel- kette (U-Strip) Thermo Scientific PCR Plates ABgene + Deckelplatte (Cap Strip)
Pipetten	Eppendorf Pipetten 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20- 200 µl, 100-1000 µl Eppendorf Multipette®Stream Brand W-Germany Transferpipette®-8 Gilson Pipetman 20 µl Finntip Pipetten Micro 0,2-10 µl Eppendorf Pipetten 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-

---

Pipettenspitzen	200 µl, 100-1000 µl Sarstedt Blaue Spitzen Sarstedt Gelbe Spitzen Sarstedt 0,5/1,0/2,0 ml
Reaktionsgefäße	Sarstedt 0,5/1,0/2,0 ml
Schraubbehälter	Schott Duran 500 ml
Sequenziergerät	Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer
Sequenzierplatte	Applied Biosystems Plate 96-Well optimal Reaction + Deckelsystem (Septum 96-Well Plate
Spannungsgeber	Pharmacia Gene Power Supply GPS 200 Pharmacia Gene Power Supply GPS 400
Stoppuhr	Oregon Scientific
Thermocycler	Biometra T Gradient Applied Biosystems 2720 Applied Biosystem 2700
Vortexer	Fisher Bioblock Scientific: Vortex Top Mix 11118
Waage	Satorius Laboratory L420 P
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415 C Eppendorf Zentrifuge 5804 Heathrow Scientific Sprout Minifuge
Zylinderglas	IDL Germany

---

## 2.6 Programme

Tabelle 10: Programme

Programm	Hersteller
BioDocAnalyze v.1.0	Firma Biometra
IrfanView	Irfan Skiljan
SeqScape v.2.5	Applied Biosystems
Sequencin Analysis 5.2	Applied Biosystems
Seqworks	Sven Opitz

## 2.7 Datenbanken

Tabelle 11: Datenbanken

Datenbank	Webseite
Biobase	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk">www.hgmd.cf.ac.uk</a>
Ensemble	<a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a>
OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>
Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
Wilson Disease Mutation Database	<a href="http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca">www.wilsondisease.med.ualberta.ca</a>

## 2.8 Patientengut und DNA-Isolierung

Für die Suche nach Mutationen im Ceruloplasmin- und ATP7B-Gen wurden in dieser Arbeit DNA-Proben von sieben Personen verwendet. Diese sind freundlicherweise von Frau Dr. Martina Minnerop aus der Klinik für Neurologie an der Universitätsklinik zu Bonn gesammelt und für die genetische Untersuchung zur Verfügung gestellt wurden. Die Extraktion der DNA aus dem Vollblut der Personen erfolgte durch die Mitarbeiter des Institutes für Humangenetik der Universität zu Lübeck. Die DNA-Konzentration lag bei 50 ng/µl.

Fünf der sieben Proben stammen aus einer betroffenen Familie, die beiden anderen Proben von einzelnen Patienten aus nicht-blutsverwandten Familien. Im Folgenden werden die Patienten näher vorgestellt.

### Familie

In der Familie sind fünf Mitglieder aus zwei Generationen untersucht worden (Stammbaum siehe Abbildung 3). Für ein Geschwisterteil (II<sub>4</sub>) stand keine DNA-Probe zur Verfügung. Die Kinder II<sub>1</sub> und II<sub>2</sub> zeigten zum Untersuchungszeitpunkt neurologische Symptome wie zerebelläre Gang- und Standataxie. II<sub>2</sub> zeigte zudem zerebelläre Okulomotorikstörungen mit Doppelbildern, dafür aber eine mildere Ausprägung der Ataxie als II<sub>1</sub>. Der Kupferspiegel war bei beiden Patienten normal (67 µg/dl bzw. 82 µg/dl (N: 65-165 µg/dl)), während der Ceruloplasmin-Spiegel unter dem Normalwert lag (0,19 g/l bzw. 0,22 g/l (N: 0,25-0,36 g/l)). Beim MRT des Gehirns wurde bei beiden eine isolierte Kleinhirnatrophie festgestellt. Das Manifestationsalter lag bei II<sub>1</sub> zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr, während sich bei II<sub>2</sub> erst mit dem 35. Lebensjahr Symptome entwickelten. I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>, sowie II<sub>3</sub> und II<sub>4</sub> zeigten keinerlei Anomalitäten und sind klinisch gesund.

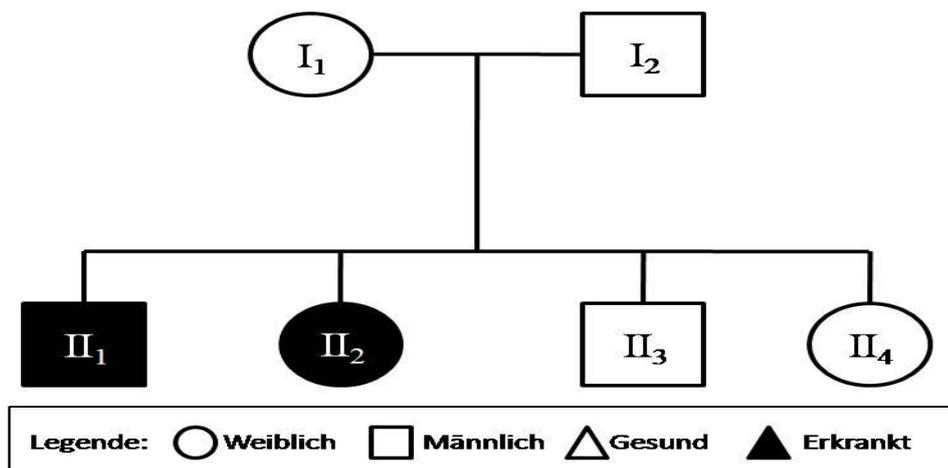


Abbildung 3: Stammbaum der Familie.

I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> entsprechen der Elterngeneration, während II<sub>x</sub> die Generation der Kinder darstellt. Die Abbildung stellt die Verteilung des Phänotyps der Erkrankung dar. Der Legende entsprechend, stehen die schwarz gefüllten Symbole für die erkrankten Mitglieder der Familie und die ungefüllten für die Gesunden. Es sind nur zwei Geschwister betroffen, während die übrigen Geschwister und die Eltern klinisch gesund sind.

**P1 (Patient 1)**

Die Probe von P1 wurde einzeln und unabhängig von dessen Familie untersucht. Anamnestisch soll ein Geschwisterteil betroffen sein, was auf eine genetische Grundlage der Symptome hinweist. Es standen aber keine weiteren Proben der Familie zur Verfügung. P1 zeigt seit seinem 23. Lebensjahr progressive zerebelläre Symptome, dazu zählen Stand- und Gangataxie sowie eine leichte Spastik. Im Labor wurde ein verminderter Ceruloplasmin- (0,13 g/l; N: 0,25-0,36 g/l) und Kupferspiegel (51 µg/dl; N: 65-165 µg/dl) nachgewiesen. Eine MRT Untersuchung des Kopfes zeigte eine isolierte Kleinhirnatrophie.

**P2 (Patient 2)**

Die Probe von P2 stammt von einem einzelnen Betroffenen. Anamnestisch soll ein Elternteil des Betroffenen ebenfalls ataktische Symptome zeigen. Es ist von einem genetischen Vererbungsmuster auszugehen, wobei ein autosomal-dominanter Erbgang nicht auszuschließen ist. Weitere Proben der Familie standen nicht zur Verfügung. P2 zeigt seit dem 37. Lebensjahr progressive zerebelläre Symptome. Der Ceruloplasmin- und Kupferspiegel schwankte bei dem Patienten auf einem niedrigen Niveau.

**2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die PCR (polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion) wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und ist seit Mitte der 80ziger Jahre eine häufig verwendete Methode, die dem Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Abschnitte und deren Vervielfältigung dient (Mullis et al., 1992), (Saiki et al., 1985). Das Reaktionsprinzip basiert auf der zyklisch wiederholten Verdoppelung von DNA. Für die Durchführung der PCR werden eine thermostabile DNA-Polymerase, Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), der zu untersuchende DNA-Abschnitt und zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt. Die Primer werden komplementär zu der entsprechenden Sequenz auf dem DNA-Strang synthetisch hergestellt und dienen der DNA-Polymerase als „Starthilfe“: Vorwärts-(F)-Primer lagern sich auf einem codierenden DNA-Bereich „vor“ (upstream) dem zu untersuchenden Abschnitt an

und Rückwärts-(R)-Primer auf einen nicht codierenden DNA-Bereich „nach“ (downstream) dem Ende des zu untersuchenden Abschnitts.

Die PCR verläuft in drei Schritten. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei circa 90°C. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung (Annealing) der komplementären Primer an die spezifische DNA-Sequenz bei circa 50 bis 60°C. Im letzten Schritt erfolgt unter Zugabe einer thermostabilen DNA-Polymerase und dem erwähnten Nukleotidgemisch die Amplifizierung der DNA-Stränge bei einer Temperatur von circa 70°C. Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Amplifikation wird mehrmals durchgeführt, wobei die gewünschten DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt werden. Im Idealfall erhält man nach 20 Zyklen eine Million und nach 30 Zyklen eine Milliarde Kopien einer Sequenz. Für jede einzelne PCR muss eine Anpassung von Temperatur, Zyklusanzahl und Konzentration der einzelnen Bestandteile erfolgen (Nowrousian 2003).

Die für die Amplifikation verwendeten Primer sind in Tabelle 5 und Tabelle 8 zusammengestellt. Die Reaktionsansätze enthielten circa 50 ng genomische DNA als Matrize, jeweils 0,5 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit je 10 mM, je 10 pmol Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer), die entsprechende Menge des konzentrierten Reaktionspuffer (2,5 µl) und 0,25 U Taq-Polymerase. Mit Aqua dest. wurde die Probe auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die Pipettiervorgänge erfolgten auf Eis.

Tabelle 12: Pipettierschema

Produkt	Konzentration	Volumen in µl
DNA	50 ng/µl	1
Aqua dest.		18,95
Puffer	10x	2,5
dNTPs	je 10 mM	0,5
F-Primer	je 10 pmol/µl	1
R-Primer	je 10 pmol/µl	1
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,05
Gesamtvolumen		25

Abweichend von diesem Pipettierschema erfolgte die Amplifikation von Exon 14 mit 0,1 µl Taq-Polymerase

Die Annealing-Temperatur wurde jeweils an die verwendeten Primer angepasst. Der PCR Zyklus erfolgte nach folgendem Schema.

#### PCR-Zyklus Parameter

95°C	5 min	initiale Denaturierung
30 Zyklen:		
95°C	30 s	Denaturierung
55°C	30 s	Annealing
72°C	30 s	DNA- Synthese
72°C	7 min	
4°C	~	Pause

Abweichend von diesem Schema wurde für Exon 14 eine Annealing-Temperatur von 57°C und für Exon 4 eine Temperatur von 62°C verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen.

## 2.10 Agarosegel-Elektrophorese

Mit der Gelelektrophorese können einzelne DNA-Produkte aus der PCR auf einem einfachen und schnellen Weg nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt werden. Die negativ geladenen Basen wandern im elektrischen Feld in Richtung der Anode (positiv geladener Pol). Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der gegebenen Feldstärke des elektrischen Feldes, dem pH-Wert des Laufpuffers, der Konzentration des Agarosegels und ganz wesentlich von der Ladung und Größe der DNA-Sequenz. Im Anschluss an die Elektrophorese können die DNA-Moleküle durch den fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Piotrowski 2003). Bei gleichzeitiger Auftrennung einer 100-Basenpaar-Leiter kann die Größe der untersuchten DNA-Stränge abgeschätzt

werden. Diese Methode wurde in der Arbeit zur Qualitätsprüfung der PCR-Produkte verwendet.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten werden für das 1,5 %ige Agarosegel 3 g Agarose in 200 ml 1xTBE Puffer aufgekocht. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht wird dem Agarose-Gemisch 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Nach Abkühlung der Gel-Lösung im Eisbad auf circa 60°C wird es in den Gelträger der Gelkammer gegossen. Dieser ist mit Kämmen besetzt. So entstehen im erstarrten Gel 0,5 bis 1 cm große Geltaschen, die mit circa 7 µl der Probe (4 µl PCR Produkt und 3 µl 3xFicoll) und mit der obengenannte 100-Basenpaar-Leiter gefüllt werden. Die Auftrennung erfolgt bei einer gleichmäßigen Spannung von 120 bis 130 mV mit einem 1xTBE Laufpuffer für eine Dauer von 30 Minuten. Im Anschluss an die Elektrophorese werden die DNA-Moleküle unter UV-Licht sichtbar gemacht. Mit einer Digitalkamera werden die Ergebnisse der Gelelektrophorese dokumentiert.

## 2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung verläuft nach der Kettenabbruchmethode, die auf Sanger zurückzuführen ist (Sanger et al., 1977). Sie dient der Bestimmung der Basenabfolge eines bestimmten DNA-Abschnittes und basiert auf der Neusynthese des komplementären DNA-Einzelstrangs eines bestimmten DNA-Bereichs. Zur Durchführung werden, neben der DNA, eine modifizierte Taq-Polymerase und vier Nukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) benötigt. Zusätzlich wird in geringer Menge 2'-3'-Dideoxynukleosidtriphosphat (ddNTPs) hinzugegeben. Dieses verhindert durch Fehlen der OH-Gruppe an der 3'-Stelle der Desoxyribose die weitere Anlagerung von Nukleotiden und induziert so den Kettenabbruch bei der DNA-Neusynthese. Wegen der höheren Konzentration der Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), werden hauptsächlich die Triphosphate verbaut und nur vereinzelt wird die Synthese durch Dideoxyribonucleosidtriphosphaten (ddNTPs) gestoppt. So entsteht ein DNA-Gemisch, das alle möglichen Stranglängen bis hin zum komplett synthetisierten Strang aufweist. An den Dideoxynukleotiden ist ein spezifischer Fluorochrome

befestigt, sodass jedes DNA-Produkt farblich markiert wird. Als DNA-Polymerase wird eine modifizierte Taq-Polymerase verwendet, die keine hohe Diskriminierung hinsichtlich dNTPs und ddNTPs aufweist (Piotrowski 2003).

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgt mittels Kapillar-Gelelektrophorese im Kapillar-Sequencer. Die unterschiedlich langen Kettenabbruchprodukte werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die Abfolge der Farbsignale wird von einem Detektor erfasst und einem Computer registriert. Aus diesen Daten rekonstruiert der Computer die Basenabfolge des sequenzierten DNA-Moleküls.

Um die PCR-Produkte für die DNA-Sequenzierung verwenden zu können, werden sie zuvor mit „ExoSAP“ behandelt. Bei ExoSAP handelt es sich um die hydrolytischen Enzyme Exonuklease I und Alkaline-Phosphatase, die in der Lage sind, überschüssige Primer und Didesoxynukleotide abzubauen.

Auf 5 µl PCR-Produkt werden 2 µl ExoSAP gegeben. Die Pipettiervorgänge erfolgen auf Eis. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wird mit einer Temperatur von 37°C die durch die Enzyme vermittelte Hydrolyse gestartet. Im zweiten Schritt wird mit einer Temperatur von 80°C die Inaktivierung der Enzyme erreicht.

Reaktionsbedingungen: ExoSAP

37°C	15 min	Hydrolyse
80°C	15 min	Inaktivierung
4°C	~	

Für die Sequenzierung werden 1 µl PCR-Produkt der ExoSAP-Reaktion mit 1,5 µl 5x Seq.-Puffer, 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 1 µl Terminator-Mix v.1.1 (siehe Tabelle 2) gemischt. Ein Gesamtvolumen von 10 µl wird durch Zugabe von Aqua dest. erreicht. Für Exon 13 wird zur Verbesserung der Sequenzierungsergebnisse ein spezieller Primer verwendet (siehe Tabelle 6), dessen Anlagerungsstelle im kodierenden Bereich liegt.

Im Cyclor läuft die Kettenabbruchreaktion wie bei der PCR in drei Schritten (Denaturierung, Annealing, Extension) ab.

#### Cyclor- Parameter

96°C	1 min	initiale Denaturierung
25 Zyklen:		
96°C	10 s	Denaturierung
60°C	5 s	Primer-Annealing
60°C	1 min	Elongation
4°C	~	

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt über Sephadex, ein Polysaccharid (Dextran). Dazu wird Sephadex auf die vorgesehene Filterplatte aufgetragen und mit jeweils 300 µl Aqua dest. versetzt. Der Ansatz quillt anschließend über eine Stunde. Im Anschluss wird die Filterplatte fünf Minuten lang bei 2600 Umdrehungen zentrifugiert und dabei das Wasser in eine Auffangplatte abfiltriert. Die Prozedur wird einmal, nachdem 150 µl Aqua dest. auf die Sephadex-Filterplatte aufgetragen wurde, wiederholt.

Auf die so gereinigte Sephadexplatte werden nun 10 µl der PCR-Produkte mit 10 µl Aqua dest. pipettiert und bei 2500 Umdrehungen fünf Minuten lang zentrifugiert. Jeweils 5 µl des aufgereinigten PCR-Materials werden mit 10 µl Formamid zur Stabilisierung der einzelsträngigen DNA versetzt und zur Sequenzanalyse in einen Kapillar-Sequenzierer gegeben. Der Laser im Sequenzierer bestimmt die Reihenfolge der fluoreszierenden DNA-Fragmente und gibt die Daten an einen Computer weiter. Das Programm Sequencing Analysis 5.2 erstellt aus den erhaltenen Daten eine Datei, in der Thymin rot, Cytosin blau, Alanin grün und Guanin schwarz kodiert wiedergegeben werden.

Zur weiteren graphischen Darstellung und Auswertung werden die bestimmten Sequenzen in eine Bioinformatikdatenbank (SeqScape v.2.5) eingegeben, die

anschließend die DNA-Sequenz darstellt. Mit Hilfe dieses Programmes und den Daten für die Referenz-DNA aus der Ensemble Genom Browser Datenbank wird schon vorab ein DNA-Text erstellt, anhand dessen die ermittelten Daten verglichen werden können. Sequenzen der Proben, die mit der Referenz-DNA nicht übereinstimmen, werden sowohl graphisch im Sequenzabschnitt markiert, als auch in einem separaten Mutationsreport aufgelistet. Anhand der computer-gesteuerten Analyse können so die Sequenzveränderungen direkt abgelesen werden und mit bekannten Datenbanken verglichen oder mit anderen Methoden näher untersucht (allelspezifische PCR) werden.

## 2.12 Allelspezifische PCR

Um die Bedeutung einer Sequenzveränderung in unserer Bevölkerung darzustellen, wird das Vorkommen der Variante in der DNA von gesunden Kontrollen untersucht. Mit Hilfe der allelspezifischen PCR werden DNA-Proben von insgesamt 120 gesunden Kontrollen (240 Allele) untersucht.

Mit dieser Methode können Basenveränderungen untersucht werden. Dafür wird die PCR mit kurzen Oligonukleotiden als Primer durchgeführt, die komplementär zum Basenaustausch enthaltende DNA-Sequenz sind. Die Sequenz des Primers enthält die veränderte Base am 3'-Ende und ermöglicht bei optimaler Annealing-Temperatur die spezifische Anlagerung nur an die veränderte DNA-Sequenz. Bei gesunden Individuen, die diesen Basenaustausch nicht aufweisen, lagert sich der Primer nicht an und bildet kein PCR-Produkt. Das entstandene PCR-Produkt ist für die Mutationsstelle sequenzspezifisch. Zur Kontrolle der PCR wird ein zweites Primerpaar zum Ansatz gegeben, das eine bekannte Sequenz amplifiziert und bei allen untersuchten Proben ein Kontrollprodukt bildet (Holinski-Feder 2006). Die Auswertung erfolgt mittels der Agarosegel-Elektrophorese. Es zeigt sich, dass Individuen, die den Basenaustausch in ihrer DNA-Sequenz haben, zwei Banden aufweisen, während bei den Gesunden nur die Kontrollbande sichtbar ist (siehe Abbildung 4).

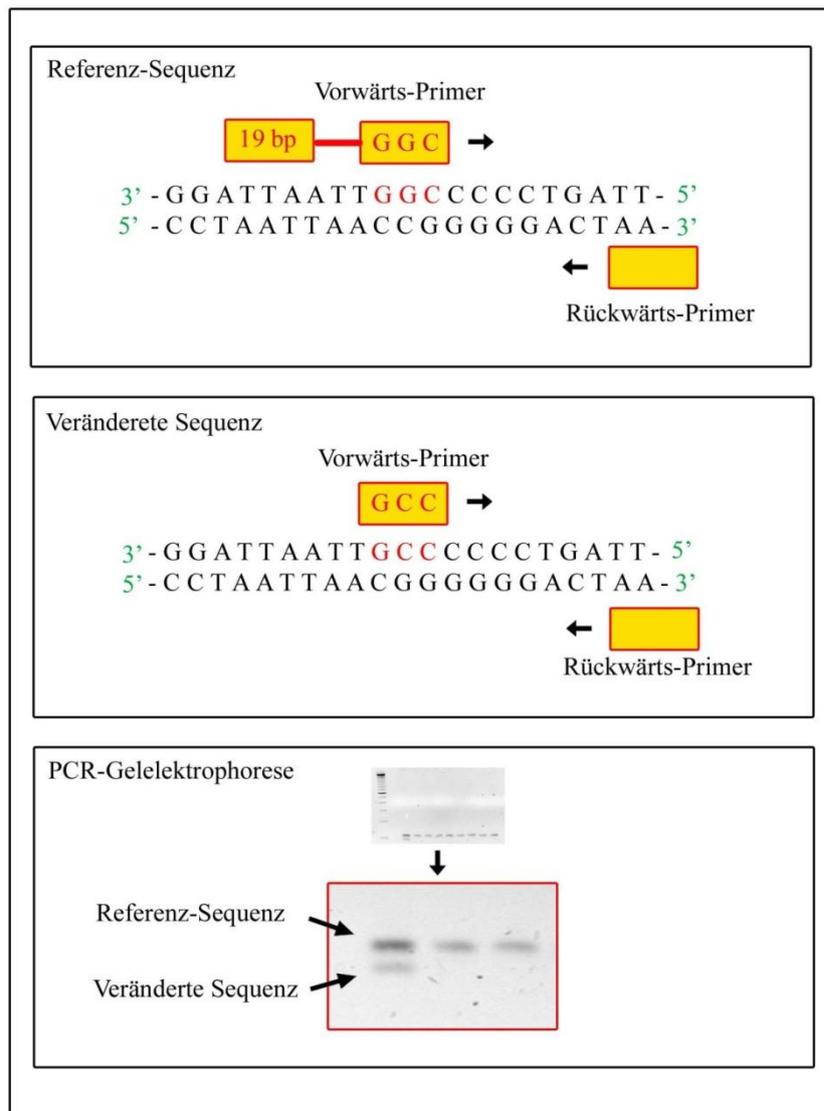


Abbildung 4: Schema der Allelspezifischen PCR

Für die allelspezifische PCR werden zwei verschiedene Primer verwendet: der spezifische Primer für den Basenaustausch und der Kontrollprimer für eine bekannte Sequenz. Der Kontrollprimer ist in diesem Fall 19 Basen länger als der spezifische Primer. Der Rückwärtsprimer ist für beide Primerpaare derselbe. Nach der Gelelektrophorese zeigt sich, dass Individuen mit dem Basenaustausch zwei Banden aufweisen, während bei den Individuen ohne Sequenzveränderung nur eine Kontrollbande sichtbar ist (umgezeichnet nach Holinski-Feder, 2006).

---

Die PCR wurde wie unter Punkt 2.9 beschrieben durchgeführt. Die Primer für die allelspezifische PCR sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Die Reaktionsansätze enthielten circa 50 ng genomische DNA als Matrize, jeweils 0,5 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), die entsprechende Menge des konzentrierten Reaktionspuffer (2,5 µl) und 0,25 U Taq- Polymerase. Zu diesem Gemisch wurde jeweils 1 µl des Vorwärt-Primers für die mutierte Sequenz und je 1 µl des Primerpaars für die PCR-Kontrolle hinzugegeben. Mit Aqua dest. wurde die Probe auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die Pipettiervorgänge erfolgten auf Eis.

Tabelle 13: Pipettierschema

Produkt	Konzentration	Volumen in µl
DNA	50 ng/µl	1
Aqua dest.		17,95
Puffer	10x	2,5
dNTPs	je 10 mM	0,5
F-Primer mut	je 10 mM	1
F-Primer	je 10 pmol/µl	1
R-Primer	je 10 pmol/µl	1
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,05
Gesamtvolumen		25

---

---

Der PCR Zyklus erfolgte nach folgendem Schema.

PCR-Zyklus Parameter:

95°C	5 min	initiale Denaturierung
30 Zyklen:		
95°C	30 s	Denaturierung
55°C	30 s	Annealing
72°C	30 s	DNA- Synthese
72°C	7 min	
4°C	~	Pause

Zur besseren Auftrennung der PCR-Produkte wird ein 2,5 %iges Agarosegel verwendet. Dafür werden 5 g Agarose in 200 ml 1xTBE Puffer aufgekocht und zur späteren Visualisierung unter UV-Licht 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Nach Abkühlung der Gel-Lösung wird das Gel in die Kammer mit eingesetzten Kämmen gegossen. In die 0,5 bis 1 cm große, Geltaschen werden 7 µl der Probe (4 µl PCR Produkt und 3 µl 3xFicoll) und zur Abschätzung der Fragmentgröße eine 100-Basenpaar-Leiter gefüllt. Um die zwei Banden in sichtbarem Abstand voneinander aufzutrennen, läuft die Elektrophorese mit einem 1xTBE Laufpuffer bei einer gleichmäßigen Spannung von 100 mV für die Dauer von circa einer Stunde. Im Anschluss erfolgt unter UV-Licht die Dokumentation der Ergebnisse mit der Digitalkamera.

---

## 3 Ergebnisse

Für diese Arbeit standen DNA-Proben von sieben Personen zur Verfügung, deren klinische Daten unter Punkt 2.8 zusammengefasst sind. Fünf der sieben Proben stammen aus einer Familie, die übrigen beiden Proben von einzelnen nicht-blutsverwandten Erkrankten (P1 und P2). Die Familie setzt sich aus der Eltern-generation ( $I_1$  und  $I_2$ ) und der Generation der Kinder ( $II_1$ ,  $II_2$ ,  $II_3$ ,  $II_4$ ) zusammen, wobei nur drei der Geschwister untersucht wurden ( $II_1$ ,  $II_2$ ,  $II_3$ ).

Es erfolgte von allen sieben Personen eine Sequenzierung des Ceruloplasmin- und Wilson-Gens. Zunächst wurden die Exons und die Übergänge zu den Introns beider Gene (CP: 19 Exons; WND: 21 Exons) einzeln mittels PCR amplifiziert. Nach der Kontrolle der PCR-Produkte auf Agarosegel erfolgte die Sequenzierung der Exons doppelsträngig. Zur Beurteilung wurden die Datensätze aus der Sequenzierung mit der Referenzsequenz-DNA aus der elektronischen Datenbank Ensemble (Zugangsnummer: CP-ENST:000002646213/ WND-ENST:00000242839) verglichen. Aus den Veränderungen in der Basenabfolge sind die Auswirkungen auf der Protein-Ebene abgeleitet worden. Die Bezeichnung der Sequenzen-Veränderungen erfolgt entsprechend der internationalen Nomenklatur (Den Dunnen und Antonarakis, 2001).

### 3.1 Ergebnisse der Sequenzierung des Ceruloplasmin-Gens (CP)

Es sind sechs Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen gefunden worden. Diese sind in der Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen (mit hom=homozygot und het=heterozygot)

	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Protein-Ebene	Häufigkeit	hom/het
Exon 9	c.1632 A>T	p.E544D	7 von 7	6xhom/1xhet
Exon 16	c.2684 G>C	p.G895A	1 von 7	1xhet
IVS 13-15	IVS13-15 G>T	noncoding	5 von 7	1xhom/4xhet
IVS 13-16	IVS13-16delT	noncoding	3 von 7	3xhet
IVS 13-19	IVS13-19insT	noncoding	1 von 7	1xhet
IVS 16-9	IVS16-9 T>C	noncoding	1 von 7	1xhet

Die Tabelle 14 listet die Sequenzvarianten in Abhängigkeit von ihrer Häufigkeit in den Proben auf. Dabei kristallisiert sich der Missense-Austausch c.1632 A>T (p.E544D) als häufigste Variante heraus. Sie tritt bei sechs der sieben Proben (I<sub>1</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>, P1, P2) homozygot und bei einer Probe heterozygot (I<sub>2</sub>) auf. Es zeigt sich außerdem, dass im 20-Basenbereich vor dem Exon 13 (IVS13) eine variantenreiche Region vorliegt. Drei verschiedene Sequenzveränderungen wurden in diesem Abschnitt identifiziert. Sie treten kombiniert oder einzeln in heterozygoter oder homozygoter Form auf. Alle sieben Proben weisen eine oder zwei Veränderungen in diesem Bereich auf. Hervorzuheben ist der Missense-Austausch c.2684 G>C im Exon 16. Dieser wurde nur bei einer Person (P1) identifiziert. Dasselbe gilt für die Basenveränderung im Intron 15 (IVS16-9 T>C), die nur bei P2 auftrat.

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse sind die Sequenzvarianten nachfolgend in Abbildung 5 und Abbildung 6 personen- beziehungsweise familienbezogen aufgelistet. Auf die Sequenzveränderungen und deren Auswirkungen auf die Proteinebene wird in den folgenden Abschnitten gesondert eingegangen.

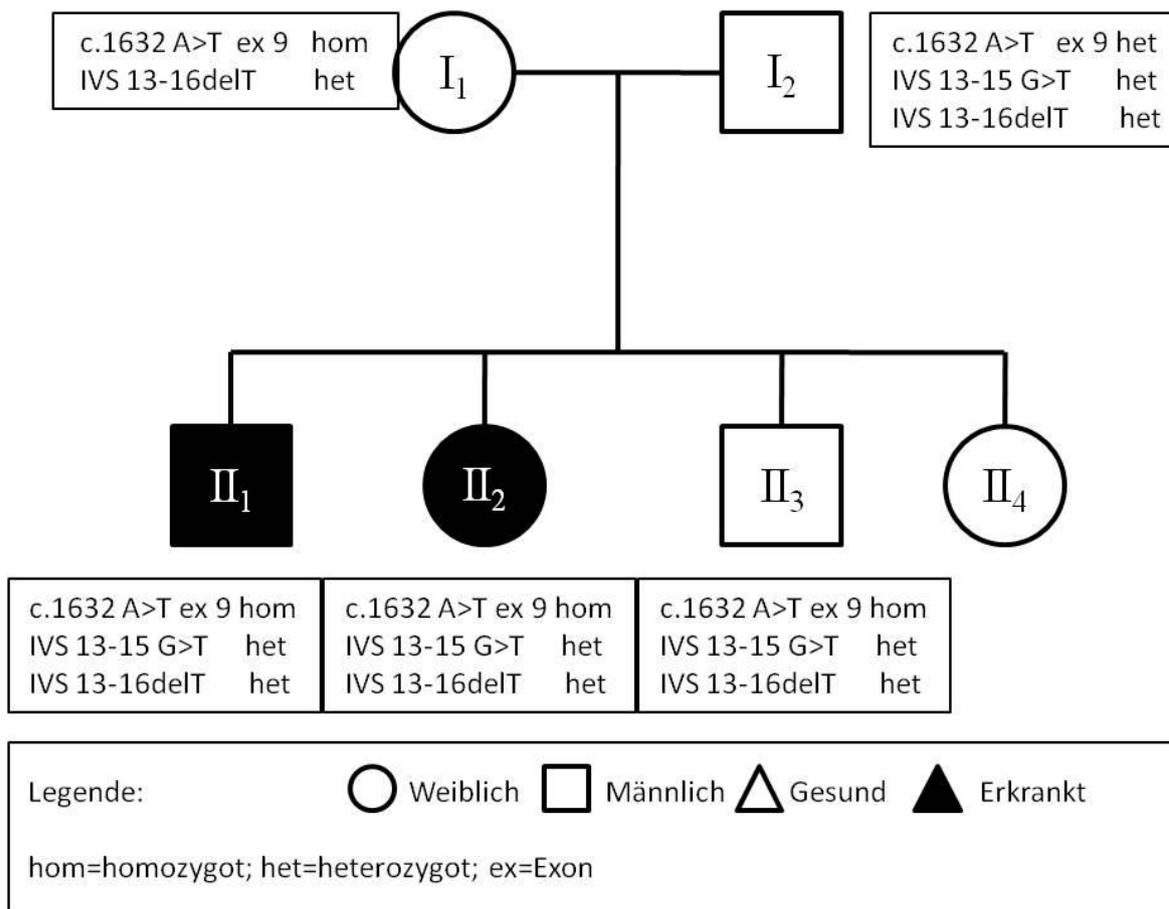


Abbildung 5: Übersicht der Sequenzvarianten in der Familie.

In Kästchen sind die Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen der jeweiligen Person zusammengestellt. Der Legende entsprechend, stehen die schwarz gefüllten Symbole für die erkrankten Mitglieder der Familie und die ungefüllten für die Gesunden.

Abgesehen von I<sub>2</sub> ist der Missense Austausch c.1632 A>T bei allen Mitgliedern der Familie homozygot vertreten. Die Sequenzvariante IVS13-6 G>T im Intron 12 tritt bei I<sub>2</sub> und bei allen Kindern (II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>) heterozygot auf. Die Sequenzveränderung IVS13-16delT war bei allen Familienmitgliedern in heterozygoter Form nachzuweisen.

Patient 1 (P1)	Patient 2 (P2)
c.1632 A>T ex 9 hom	c.1632 A>T ex 9 hom
c.2684 G>C ex 16 het	IVS13-19insT het
IVS 13-15 G>T hom	IVS16-9insT het
IVS13-16delT het	

hom=homozygot; het=heterozygot; ex= Exon

Abbildung 6: Übersicht der Sequenzvarianten bei P1 und P2.

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung der Sequenzveränderung für P1 und P2. Beide besitzen den Missense-Austausch c.1632 A>T im Exon 9 in homozygoter Form. P1 hat des Weiteren als einziger der untersuchten Personen den Missense-Austausch c.2684 G>C. Zusätzlich besitzt er die Sequenzvarianten IVS13-15 G>T (homozygot) und IVS 13-16delT (heterozygot), die bereits bei der Familie beschrieben worden sind. P2 weist zwei Sequenzveränderungen auf, die bei keinen der anderen Patienten nachzuweisen ist (IVS13-19insT, IVS16-9insT). Sie liegen beide im nicht-kodierenden Bereich.

### 3.1.1 Exon 9: c.1632 A>T (p.E544D)

In dieser Basensequenz erfolgt ein Austausch von Thymin durch Adenin an der Position 1632 (c.1268 A>T). Das verursacht bei der Translation einen Austausch der Aminosäure Glutamat durch Aspartat (p.E544D). Im Ceruloplasmin-Gen lag der Missense-Austausch am häufigsten vor. Er trat in sechs Fällen homozygot (II<sub>1</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>, P1 und P2) und in einem (I<sub>2</sub>) heterozygot auf (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).

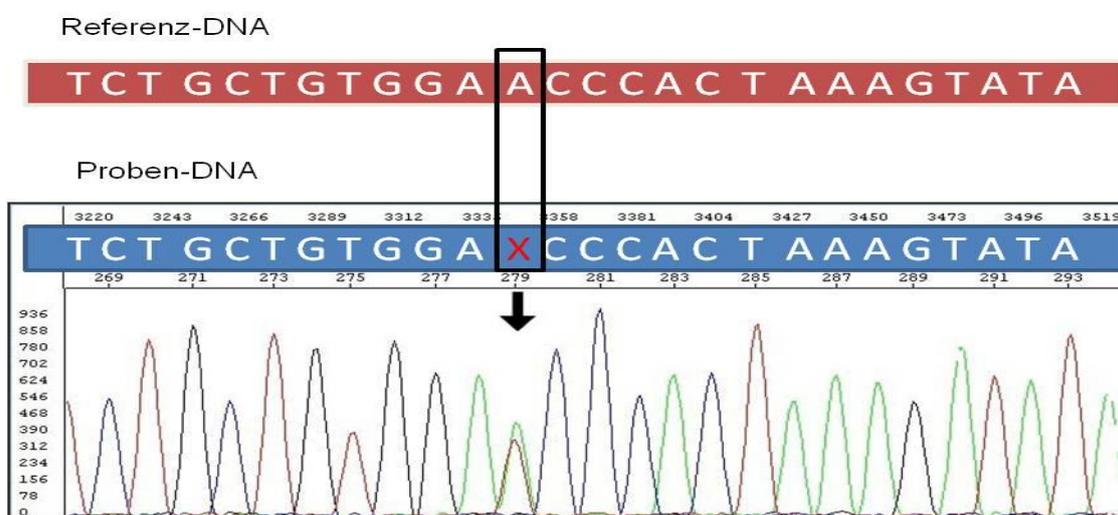


Abbildung 7: DNA-Sequenz für c.1268 A>T heterozygot.

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante c.1268 A>T wieder. Die erste Reihe steht für die Basenfolge in der Referenz-DNA, die zweite für die Basenfolge in einer Proben-DNA. Die Peaks darunter entsprechen der jeweiligen Base. Dabei kodiert rot für Thymin, blau für Cytosin, grün für Adenin und schwarz für Guanin. Mit Großbuchstaben wird der kodierende Bereich (Exon), mit Kleinbuchstaben der nicht-kodierende Bereich (Intron) des Gens dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet den Basenaustausch in den Peaks. Mit einem roten X ist ein heterozygoter Austausch in der Proben-DNA markiert, während homozygote Veränderungen mit einem roten Buchstaben, der jeweiligen Base entsprechend, gekennzeichnet sind. Dieser Aufbau gilt für alle folgenden Sequenz-Abbildungen.

In diesem Fall liegen Adenin und Thymin in der Proben-DNA gleichzeitig vor. Nach der Referenz-DNA wäre Adenin zu erwarten.

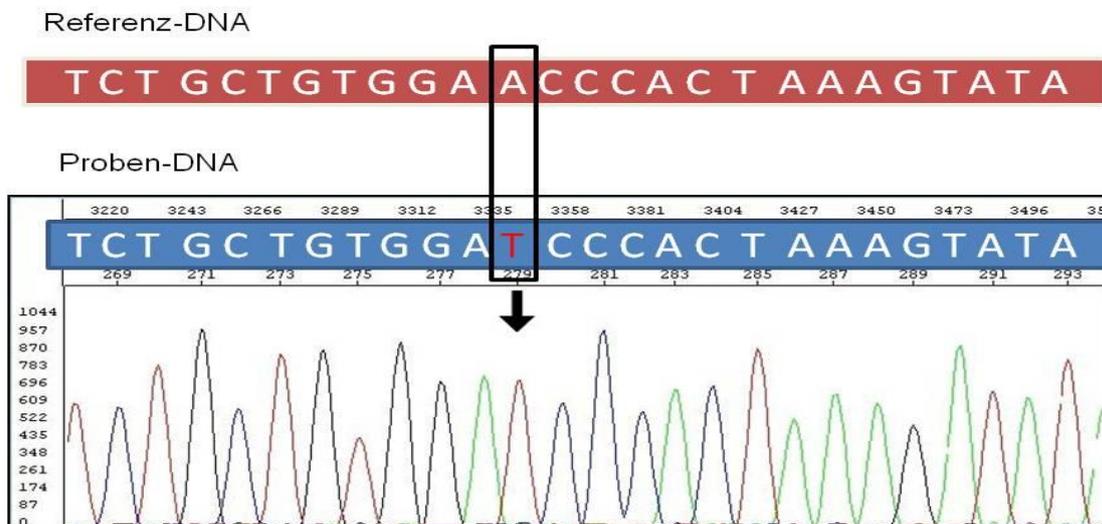


Abbildung 8: DNA-Sequenz für c.1268 A>T homozygot.

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante c.1268 A>T wieder. Es liegt anstelle von Adenin Thymin homozygot vor. Die Stelle ist mit einem roten T in der Proben-DNA markiert.

### 3.1.2 Intron 12

Die identifizierten Sequenzveränderungen im Intron 12 (IVS13-15 G>T, IVS13-16delT, IVS13-19insT) befinden sich im 20-Basenbereich vor Exon 13. Dieser Bereich ist gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl von Thyminbasen (16 x Thymin), die für Sequenzveränderungen in diesem Bereich prädisponiert zu sein scheinen. Es treten hier Deletion, Insertion oder Substitution von Thymin auf (siehe Abbildung 9).

Der Basenaustausch IVS13-15 G>T tritt in der Familie ((I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>) heterozygot auf und bei P1 homozygot. Es kommt dabei zum Austausch von Thymin durch Guanin. Die Basendeletion IVS13-16delT hingegen tritt nur heterozygot auf und findet sich bei allen Familienmitgliedern (I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>). Die letzte Variante in dieser Region ist die Insertion IVS13-19insT. Sie tritt heterozygot nur bei P2 auf.

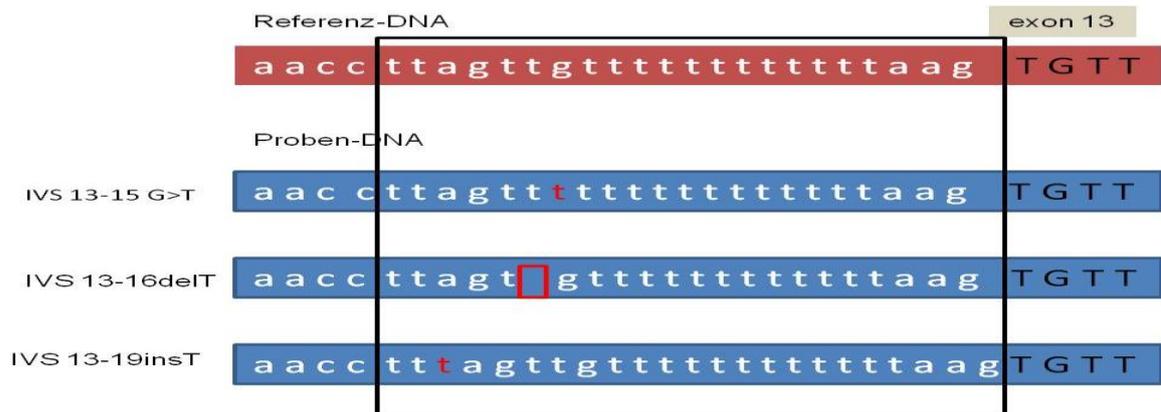


Abbildung 9: Übersicht der Varianten im Intron 12.

Die Abbildung gibt einen Überblick über die identifizierten Sequenzvarianten im Vergleich zur Referenzsequenz. Der obere rote Balken steht für die Referenz-DNA, während die drei darunter folgenden blauen Balken die jeweilige Sequenzvariante (IVS13-1 G>T, IVS13-16delT, IVS 13-19insT) darstellen. Mit Großbuchstaben wird der kodierende Bereich, mit Kleinbuchstaben der nicht-kodierende Bereich des Gens dargestellt. Die roten Kästchen beziehungsweise Buchstaben kennzeichnen die Veränderung der Sequenz in der Proben-DNA. Die schwarze Umrahmung umfasst den 20-Basenbereich vor Exon 13.

### 3.1.3 Intron 15: IVS16-9 T>C

Im Intron 15 kommt es zu einem Austausch von Thymin durch Cytosin neun Basen vor Exon 16 (IVS16-9 T>C). Die Variante liegt im nicht-kodierenden Bereich vor dem Exon 16. Sie tritt heterozygot nur bei P2 auf (siehe Abbildung 10).

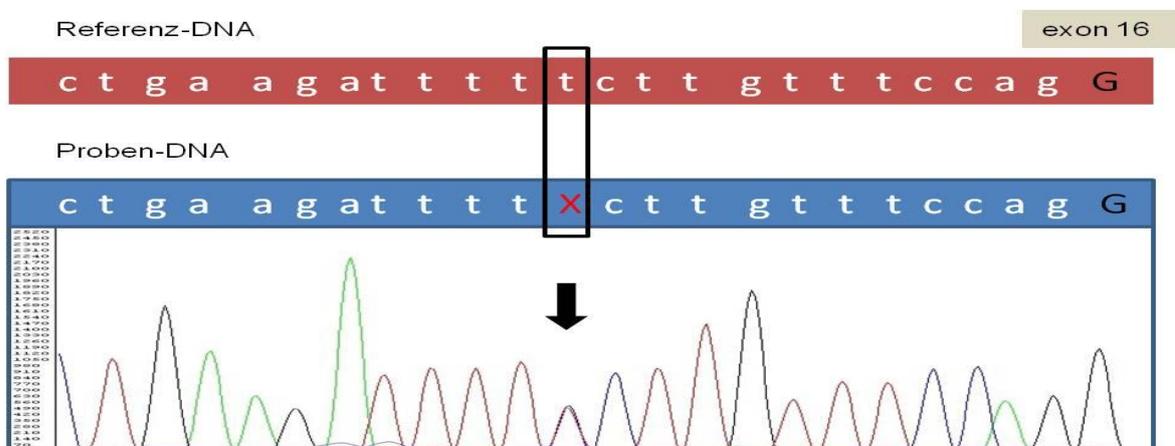


Abbildung 10: DNA-Sequenz für IVS16-9 T>C heterozygot.

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante IVS16-9 T>C wieder. Es liegen hier Cytosin und Thymin gleichzeitig vor, obwohl nach der Referenz-DNA Thymin zu erwarten ist.

### 3.1.4 Exon 16: c.2684 G>C (p.G895A)

In dieser Basensequenz erfolgt an der Position 2684 (c.2684 G>C) ein Austausch von Guanin durch Cytosin. Dieses verursacht einen Aminosäureaustausch in der Proteinebene. Alanin wird an Position 895 durch Glycin ersetzt (p.G895A). Der Missense-Austausch tritt heterozygot nur bei P1 auf (siehe Abbildung 11).

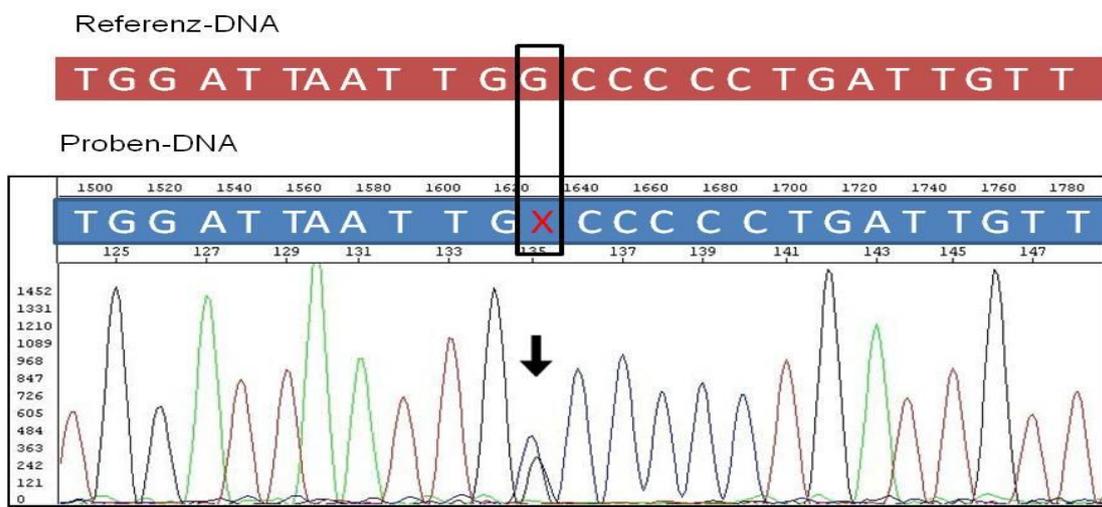


Abbildung 11: DNA-Sequenz für c.2684 G>C heterozygot.

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante c.2684 G>C dar. An dieser Stelle liegen Guanin und Cytosin gleichzeitig vor, obwohl Guanin zu erwarten ist.

In der Literatur ist dieser Missense-Austausch bisher nur in der japanischen Bevölkerung bekannt (Kono und Miyajima, 2006), in Europa ist er noch nicht beschrieben. Um die Bedeutung der Sequenzvariante in unseren Breiten zu untersuchen, wurde das Vorkommen der Variante in der DNA von gesunden Kontrollen mit Hilfe der allelspezifischen PCR untersucht. Eine nähere Untersuchung innerhalb der Familie des Betroffenen konnte nicht erfolgen, da keine weiteren Proben zur Verfügung standen.

### 3.1.5 Allelspezifische PCR

Um das Vorkommen der Sequenzvariante c.2684 G>C in einer gesunden Population zu bestimmen, wurde mit Hilfe der allelspezifischen PCR DNA-Proben von 120 gesunden Kontrollen (240 Allele) untersucht. Die Auswertung erfolgte über die Agarosegel-Elektrophorese. Der Theorie nach zeigen Individuen, die den Basenaustausch besitzen zwei Banden, während die, die diese Variante nicht tragen, nur eine Bande, die Kontrollbande, aufweisen.

In keiner der Kontrollproben konnte das Allel c.2684G>C nachgewiesen werden. Lediglich für P1 waren zwei Banden sichtbar. Das Ergebnis ist beispielhaft in der Abbildung 12 dargestellt.

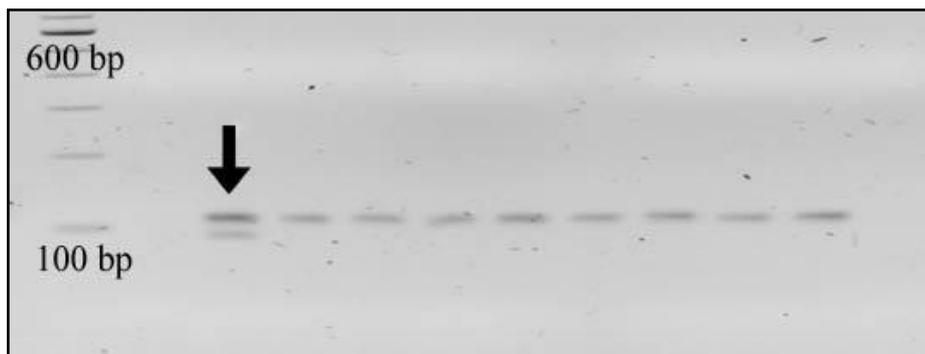


Abbildung 12: Ergebnisse der Allelspezifischen PCR.

Die Abbildung zeigt eine Fotografie eines Agarosegels. In der ersten Spur befindet sich der Längensstandard, der hier von 100 bis 600 bp reicht. Die zweite Spur ist der Leerwert. In der dritten Spur, auf die der Pfeil weist, wurde die Probe von P1 aufgetragen, während die restlichen Spuren Proben der Kontrollgruppe wiedergeben. Der Pfeil markiert die Stelle, an der zwei Banden zu sehen sind. Zwei Banden repräsentieren zum einen das Vorhandensein der Kontrollsequenz (die obere Bande), als auch das Vorhandensein der veränderten Sequenz (die untere Bande). P1 weist als einziger zwei Banden und damit die Sequenzveränderung auf.

### 3.2 Ergebnisse der Sequenzierung des Wilson-Gens (WND)

Es sind zehn Sequenzvarianten im Wilson-Gen gefunden worden. Diese sind in der Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Sequenzvarianten im Wilson-Gen  
(mit hom=homozygot und het=heterozygot)

	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Protein-Ebene	Häufigkeit	hom/het
Exon 1	5'UTR-119insCGCCG	noncoding	1 von 7	1xhet
Exon 1	5'UTR-75 C>A	noncoding	6 von 7	1xhom/5xhet
Exon 2	c.1216 T>G	p.S406A	4 von 7	1xhom/3xhet
Exon 3	c.1366 G>C	p.V456L	4 von 7	1xhom/3xhet
Exon 4	c.1607 T>C	p.V536A	1 von 7	1xhet
Exon 10	c.2495 A>G	p.W832R	4 von 7	1xhom/3xhet
Exon 12	c.2855 G>A	p.R952W	4 von 7	1xhom/3xhet
Exon 13	c.2972 C>T	p.T991M	2 von 7	2xhet
Exon 16	c.3419 T>C	p.V1140A	4 von 7	1xhom/3xhet
IVS 18+6	IVS18+6 C>T	noncoding	5 von 7	1xhom/4xhet

Die Tabelle listet die Sequenzvarianten in Abhängigkeit von ihrer Häufigkeit in den Proben auf. Die am häufigsten auftretende Sequenzveränderung ist der im nicht-kodierenden Bereich liegende Basenaustausch 5'UTR -75 C>A. Er tritt außer bei I<sub>1</sub>, bei II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>, P1, P2 heterozygot beziehungsweise homozygot bei I<sub>2</sub> auf. Acht der zehn aufgelisteten Sequenzveränderungen sind innerhalb der Familie zu finden. Davon liegen sieben der acht Varianten beim Vater (I<sub>2</sub>) und den Kindern (II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>) vor. Bei der Mutter (I<sub>1</sub>) wurde nur eine Sequenzveränderung (c.2972 C>T) im Wilson Gen gefunden, die auch heterozygot bei Kind II<sub>1</sub> auftritt. Der Missense-Austausch c.1607 T>C im Exon 4 und die Insertion 5'UTR-119insCGCCG im nicht-kodierenden Bereich des Exon 1 tritt nur einmal auf.

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse sind die Sequenzvarianten nachfolgend in Abbildung 13 und Abbildung 14 personen- beziehungsweise familienbezogen aufgelistet. Auf die Sequenzveränderungen und deren Auswirkungen auf die Proteinebene wird in den folgenden Abschnitten gesondert eingegangen.

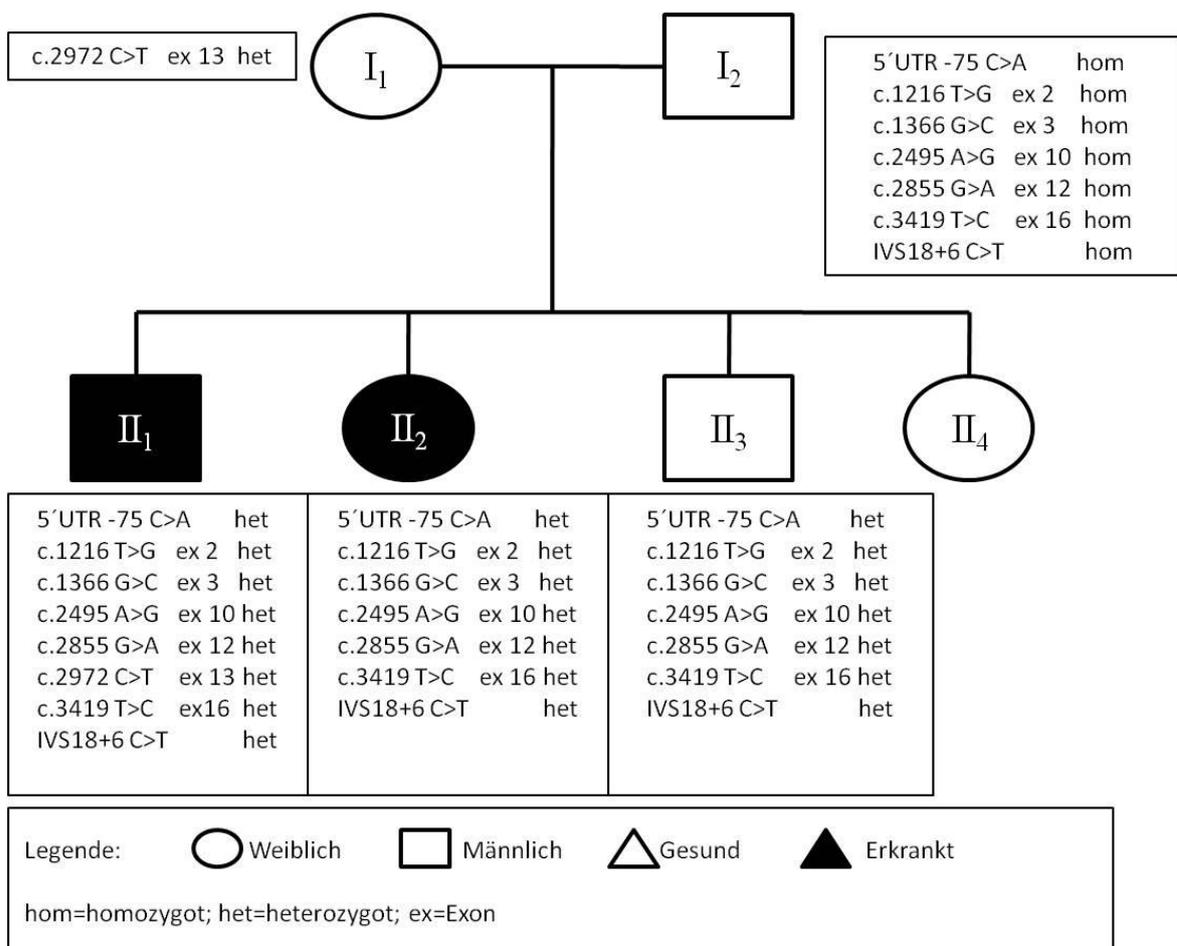


Abbildung 13: Übersicht der Sequenzvarianten in der Familie.

In Kästchen sind die Sequenzvarianten im Wilson-Gen der jeweiligen Person zusammengestellt. Der Legende entsprechend, stehen die schwarz gefüllten Symbole für die erkrankten Mitglieder der Familie und die ungefüllten für die Gesunden.

Wie der Übersicht zu entnehmen ist, ist ein Elternteil (I<sub>2</sub>) homozygot für sieben Sequenzveränderungen. Die Kinder (II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, III<sub>3</sub>) haben diese Sequenzvarianten heterozygot vererbt bekommen. Die Mutter (I<sub>1</sub>), zeigt nur eine einzige Basenveränderung (c.2972 C>T) im Wilson-Gen, die auch beim Kind II<sub>1</sub> zusätzlich zu den anderen sieben Sequenzveränderungen, wieder zu finden ist.

Patient 1 (P1)	Patient 2 (P2)
5'UTR -119insCGCCG het	5'UTR -75C>A het
5'UTR -75C>A het	c.1607 T>C ex 4 het
IVS18+6 C>T het	

hom=homozygot; het=heterozygot; ex= Exon

Abbildung 14: Übersicht der Sequenzvarianten in P1 und P2

Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung der Sequenzveränderung für P1 und P2. Beide weisen die Basenveränderung 5'UTR-165 C>A im Exon 1 heterozygot auf, die schon in der Familie beschrieben wurde. P2 besitzt zusätzlich den Missense-Austausch im Exon 4 (c.1607 T>C), während P1 hingegen zwei weitere Veränderungen im nicht-kodierenden Bereich aufweist (5'UTR-119insCGCCG und IVS18+6 C>T). Sowohl die Insertion 5'UTR -119insCGCCG als auch die Substitution c.1607 T>C im Exon 4 traten jeweils nur einmal in den Proben auf.

### 3.2.1 Exon 1: 5'UTR-119insCGCCG

Bei dieser Sequenzvariante kommt es 119 Basen vor dem Startcodon ATG des Exon 1 zu einer Insertion der Basen CGCCG (5'UTR-119insCGCCG). Sie befindet sich im nicht-kodierenden Bereich des Wilson-Gens. Sie konnte nur bei P1 nachgewiesen werden und liegt heterozygot vor (siehe Abbildung 15).

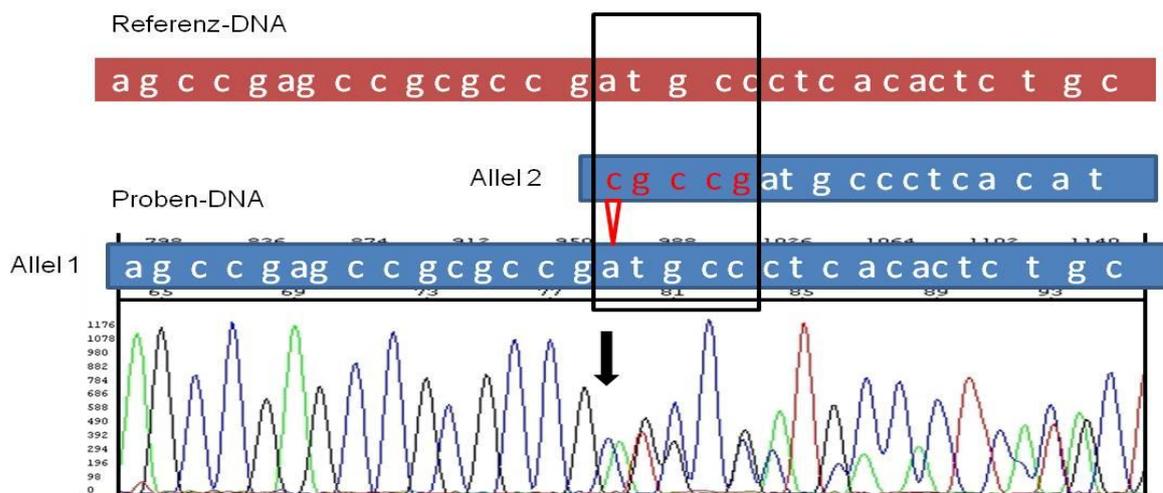


Abbildung 15: DNA-Sequenz für 5'UTR -119insCGCCG heterozygot

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante 5'UTR -119insCGCCG dar. Im Allel 2 der DNA-Probe kommt es zur Insertion von fünf Basen (CGCCG, rot gekennzeichnet), während die DNA-Sequenz des Allel 1 der Referenz-DNA entspricht. Es kommt es zu einer Sequenzüberlagerung, dessen Beginn mit einem Pfeil markiert ist.

### 3.2.2 Exon 1: 5'UTR-75 C>A

In dieser Basensequenz kommt es 75 Basen vor dem Startcodon ATG des Exon 1 zum Austausch von Cytosin gegen Adenin (5'UTR -75 C>A). Die Sequenzvariante liegt daher im nicht-kodierenden Bereich des Wilson-Gen. Sie konnte bei sechs Personen nachgewiesen werden: bei II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>, P1, P2 heterozygot (siehe Abbildung 16) und bei I<sub>2</sub> homozygot (siehe Abbildung 17).

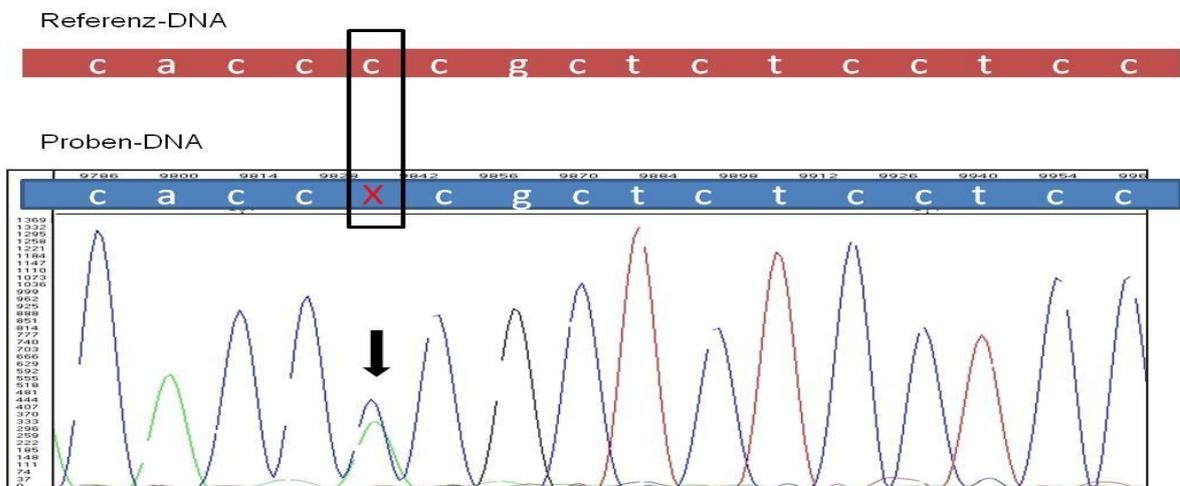


Abbildung 16: DNA-Sequenz für 5'UTR -75 C>A heterozygot

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante 5'UTR -75 C>A dar. Es liegen hier Cytosin und Adenin gleichzeitig vor, obwohl Cytosin zu erwarten ist.

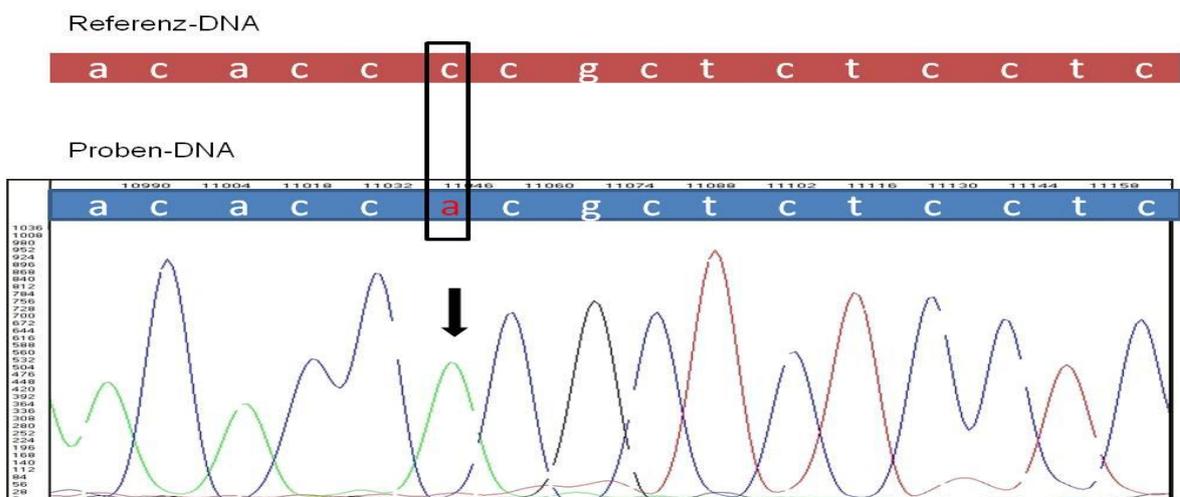


Abbildung 17: DNA-Sequenz für 5'UTR -75 C>A homozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante 5'UTR -75 C>A wieder. Es liegt anstelle von Cytosin Adenin homozygot vor.

### 3.2.3 Exon 2: c.1216 T>G (p.S406A)

Der Austausch von Thymin durch Guanin an der Stelle 1216 (c.1216 T>G) sorgt dafür, dass bei der Translation Serin an Position 406 durch die Aminosäure Alanin ersetzt wird (p.S406A). Der Missense-Austausch wurde nur innerhalb der Familie beobachtet. I<sub>2</sub> weist den Austausch homozygot (siehe Abbildung 19) und die Kinder II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub> heterozygot auf (siehe Abbildung 18).

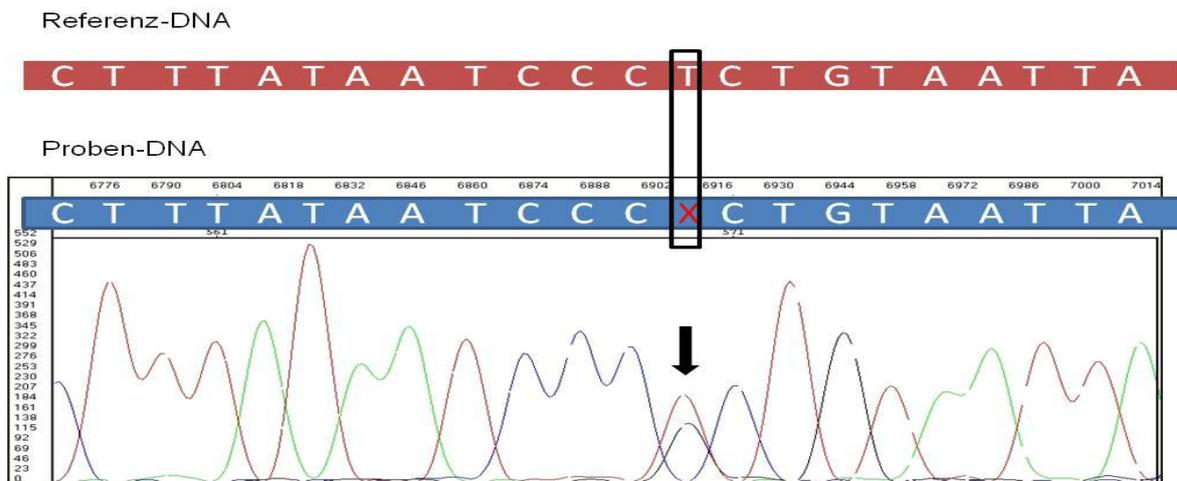


Abbildung 18: DNA-Sequenz für c.1216 T>G heterozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante c.1216 T>G wieder. Es liegen Guanin und Thymin gleichzeitig vor, obwohl Thymin zu erwarten ist.

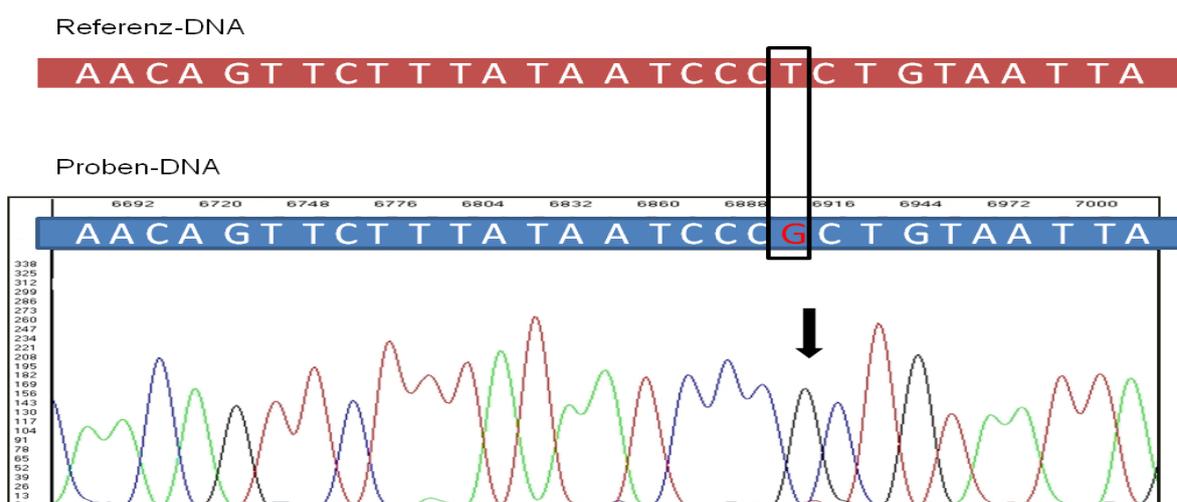


Abbildung 19: DNA-Sequenz für c.1216 T>G homozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante c.1216 T>G wieder. Es liegt anstelle des Thymins Guanin homozygot vor.

### 3.2.4 Exon 3: c.1366 G>C (p.V456L)

In der Basensequenz erfolgt ein Austausch von Guanin durch die Base Cytosin an der Position 1366 (c.1366 G>C). Dies führt zu einem Aminosäureaustausch auf der Proteinebene. Valin wird an Position 456 durch Leucin ersetzt (p.V456L). Die Sequenzvariante ist nur innerhalb der Familie beobachtet worden. Sie liegt beim Vater ( $I_2$ ) homozygot (siehe Abbildung 21) und bei den Kindern ( $II_1$ ,  $II_2$ ,  $II_3$ ) heterozygot vor (siehe Abbildung 20).

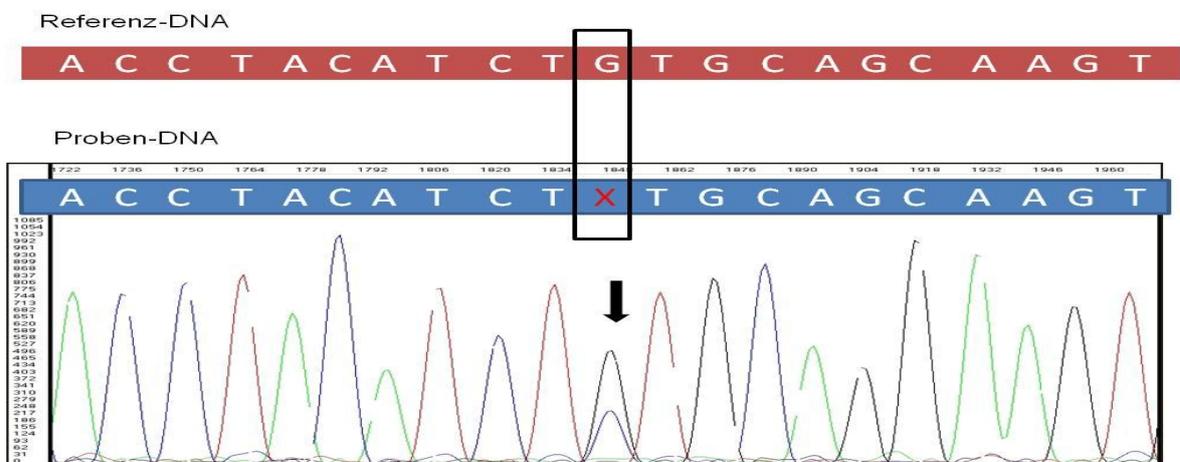


Abbildung 20: DNA-Sequenz c.1366 G>C heterozygot

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante c.1366 G>C dar. Es liegen Cytosin und Guanin gleichzeitig vor, obwohl Guanin zu erwarten ist.

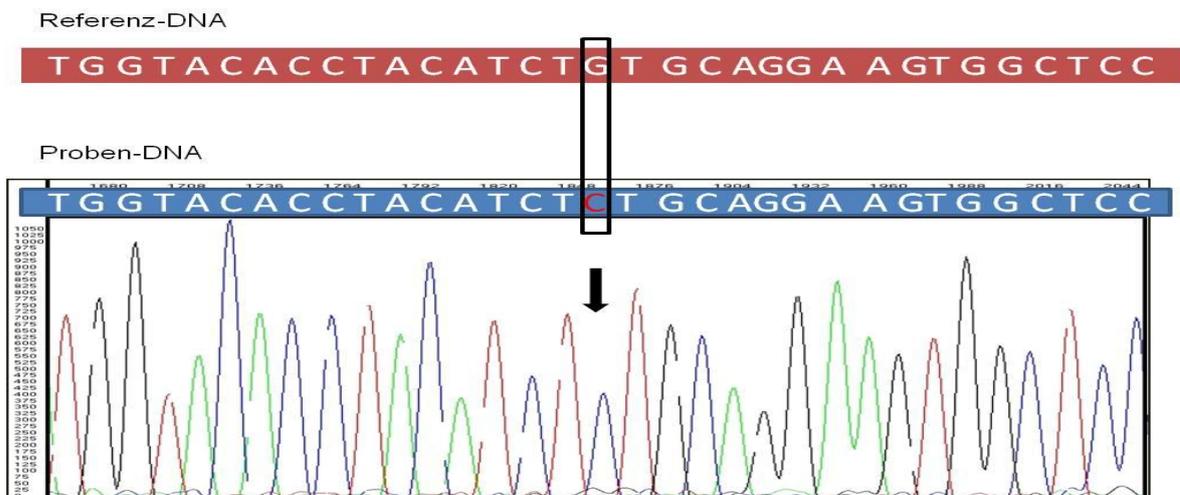


Abbildung 21: DNA-Sequenz c.1366 G>C homozygot

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante c.1366 G>C dar. Es liegt anstelle von Guanin Cytosin homozygot vor.

### 3.2.5 Exon 4: c.1607 T>C (p.V536A)

Aufgrund des Austauschs von Thymin durch Cytosin auf DNA-Ebene (c.1607 T>C), kommt es auf der Proteinebene zum Austausch von Valin durch die Aminosäure Alanin an der Position 536 (p.V536A). Der Basenaustausch im Exon 4 wurde heterozygot bei P2 nachgewiesen (siehe Abbildung 22). Weder in der Familie noch bei P1 tritt diese Veränderung auf.

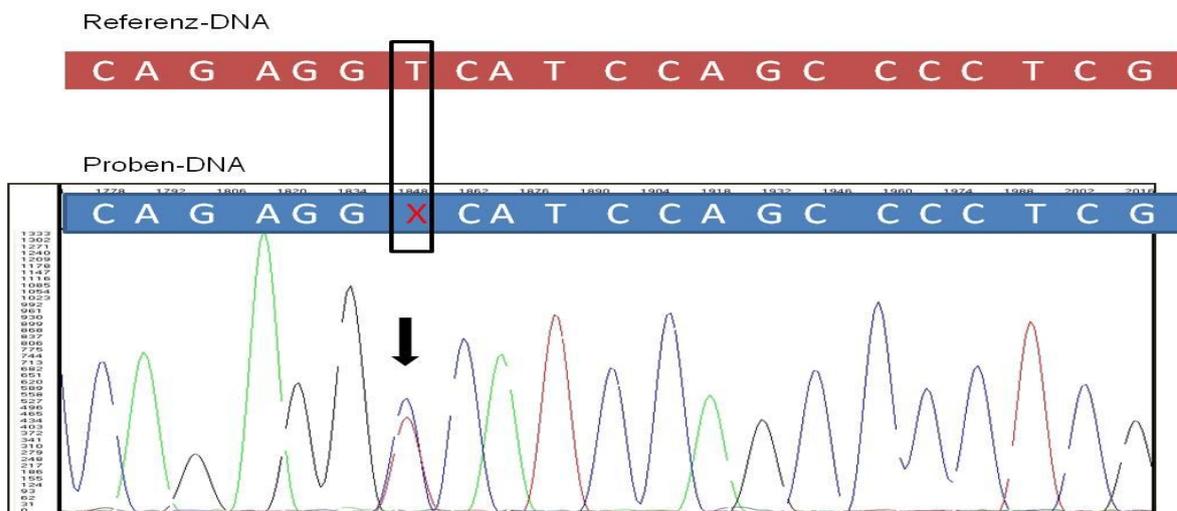


Abbildung 22: DNA-Sequenz für c.1607 T>C heterozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante c.1607 T>C wieder. Es liegen hier Cytosin und Thymin gleichzeitig vor, obwohl nur Thymin zu erwarten ist.

### 3.2.6 Exon 10: c.2495 A>G (p.W832R)

Es erfolgt hier in der Basensequenz ein Austausch von Thymin durch Guanin an der Position 2495 (c.2495 A>G). Dadurch wird bei der Translation Tryptophan durch die Aminosäure Arginin an Position 832 ersetzt (p.W832R). Die Sequenzvariante ist nur innerhalb der Familie beobachtet worden. Sie liegt beim Vater (I<sub>2</sub>) homozygot (siehe Abbildung 21) und bei allen drei Geschwistern (II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>) heterozygot vor (siehe Abbildung 23).

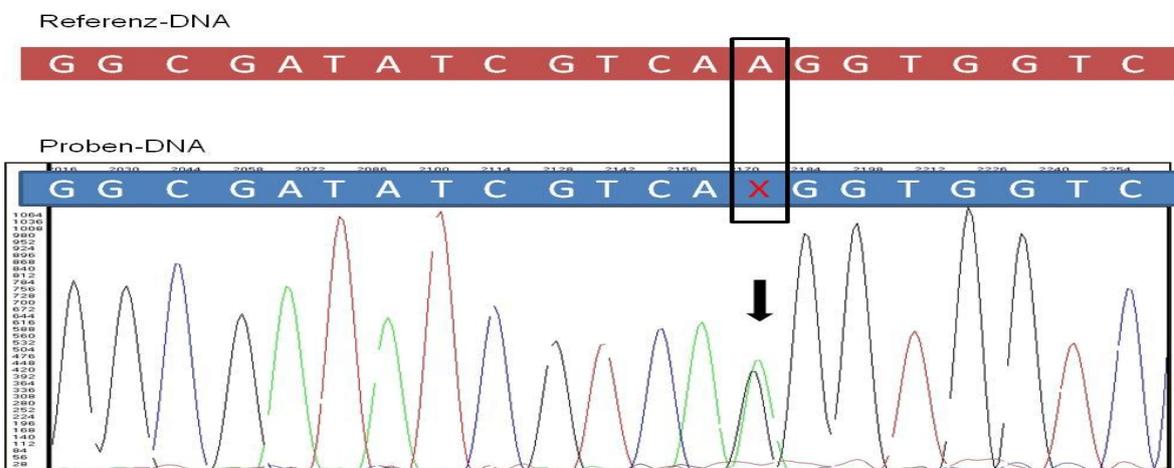


Abbildung 23: DNA-Sequenz für c.2495 A>G heterozygot

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante c.2495 A>G dar. Es liegen Guanin und Adenin gleichzeitig vor, obwohl Adenin zu erwarten ist.

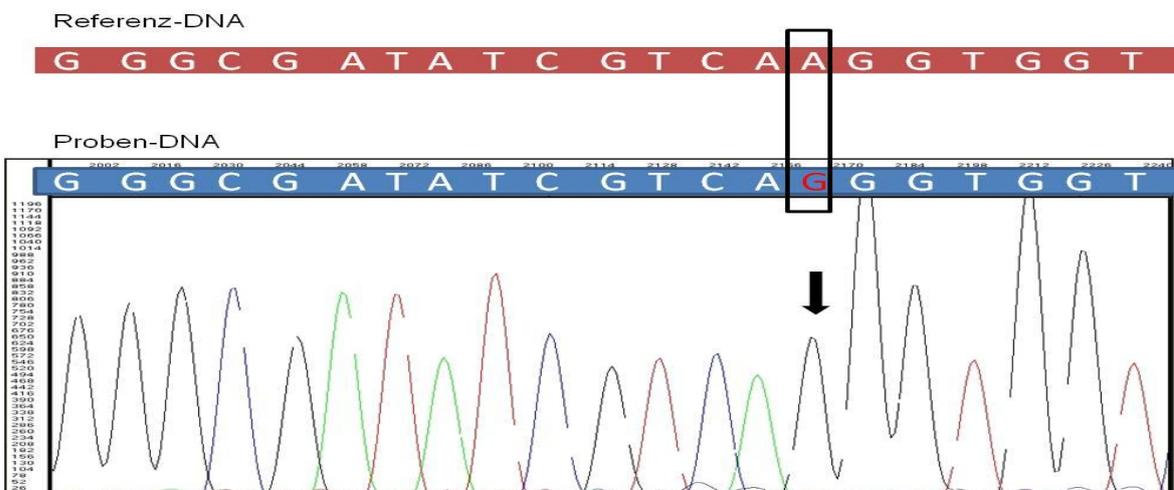


Abbildung 24: DNA-Sequenz für c.2495 A>G homozygot

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante c.2495 A>G dar. Es liegt anstelle von Adenin Guanin homozygot vor.

### 3.2.7 Exon 12: c.2855 G>A (p.R952W)

Es handelt sich hierbei um einen Austausch von Guanin an der Stelle 2855 durch die Base Adenosin (c.2855 G>A). Dadurch erfolgt ein Aminosäureaustausch von Arginin an Position 952 gegen Tryptophan (p.R952W). Die Sequenzvariante tritt nur in der Familie auf. Sie liegt beim Vater (I<sub>2</sub>) homozygot (siehe Abbildung 26) und bei den Kindern (II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>) heterozygot vor (siehe Abbildung 25).

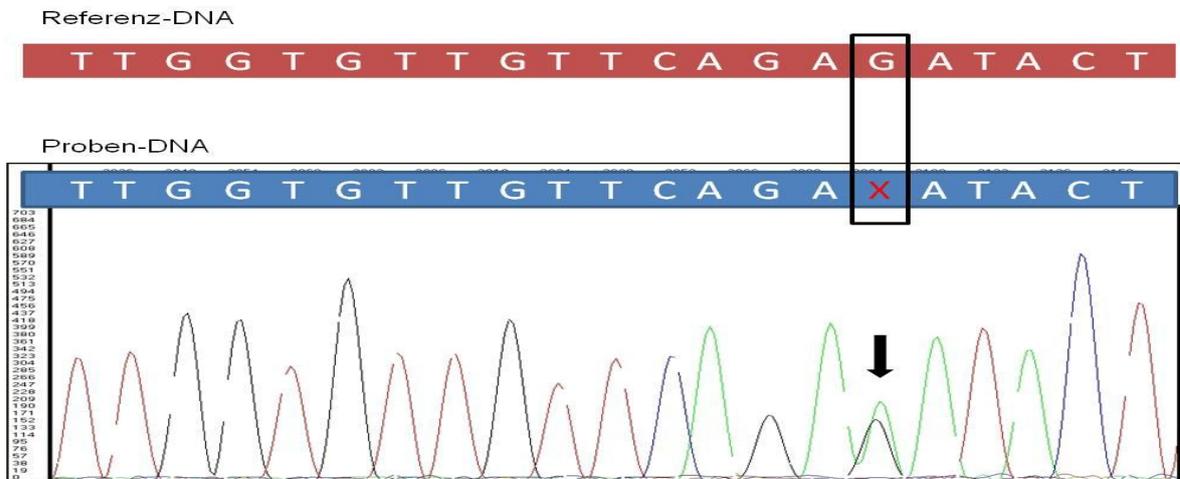


Abbildung 25: DNA-Sequenz für c.2855 G>A heterozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante c.2855 G>A wieder. An dieser Stelle liegen Guanin und Adenin gleichzeitig vor, obwohl Guanin zu erwarten ist.

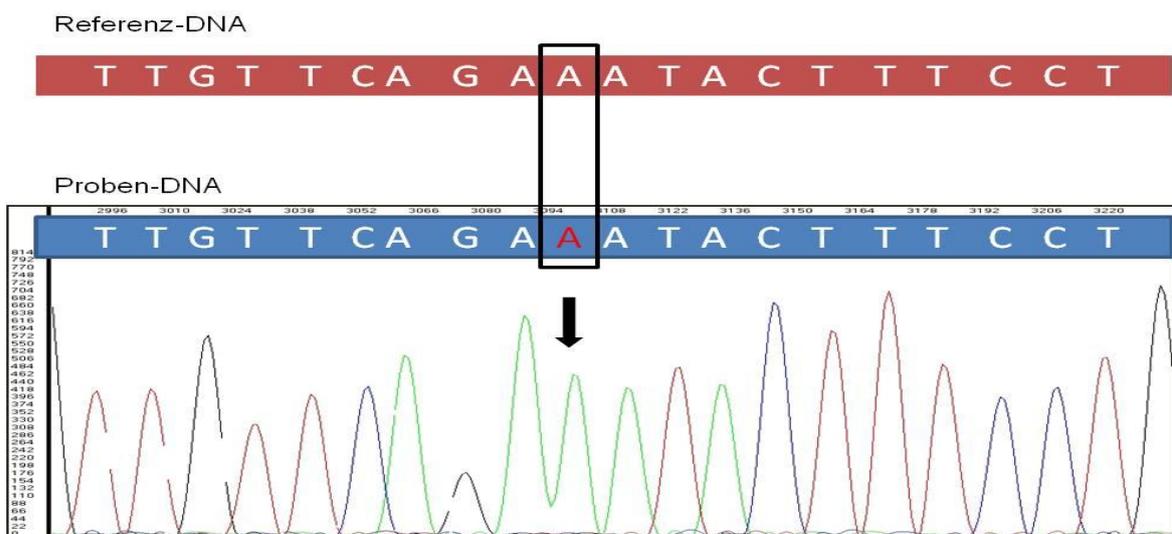


Abbildung 26: DNA-Sequenz für c.2855 G>A homozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante c.2855 G>A wieder. Es liegt anstelle von Guanin Adenin homozygot vor.

### 3.2.8 Exon 13: c.2972 C>T (p.T991M)

In der Basensequenz erfolgt der Austausch von Cytosin gegen Thymin in der DNA an Position 2972 (c.2972 C>T). Dadurch kommt es bei der Translation zu einem Austausch von Threonin gegen die Aminosäure Methionin (p.T991M). Die Sequenzvariante tritt heterozygot bei I<sub>1</sub> und II<sub>1</sub> auf (siehe Abbildung 27).

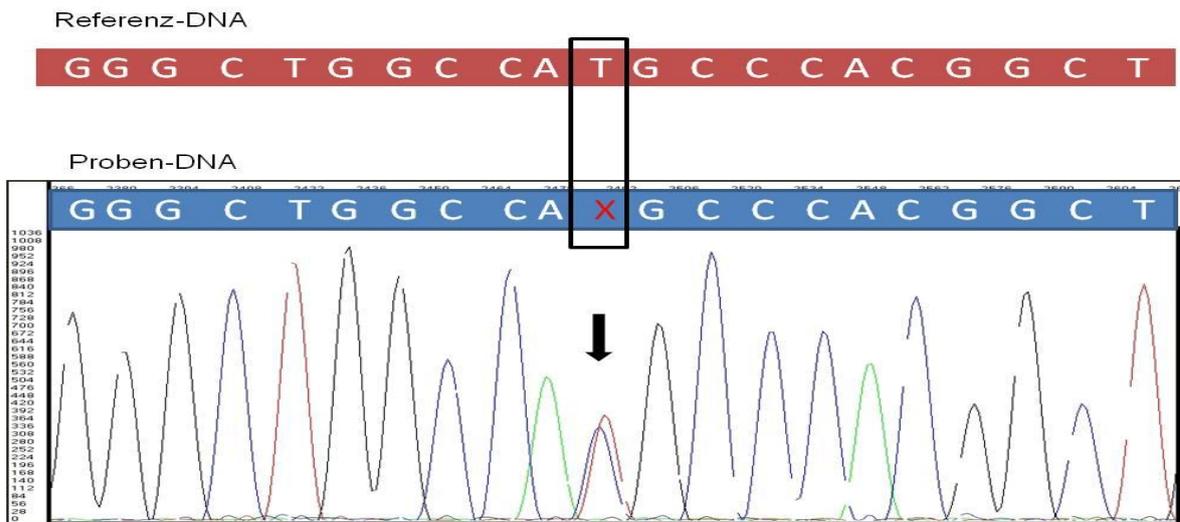


Abbildung 27: DNA-Sequenz für c.2972 C>T heterozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante c.2972 C>T wieder. Es liegen dabei Cytosin und Thymin gleichzeitig vor, obwohl Cytosin zu erwarten ist.

### 3.2.9 Exon 16: c.3419 T>C (p.V1140A)

Es erfolgt hier auf DNA-Ebene ein Austausch von Thymin durch die Base Cytosin an der Position 13419 (c.3419 T>C). Dadurch kommt es zu einem Aminosäuren-Austausch auf der Proteinebene: Valin wird an Position 1140 durch Adenin ersetzt (p.V1140A). Der Missense-Austausch ist nur innerhalb der Familie beobachtet worden. I<sub>2</sub> weist den Austausch homozygot (siehe Abbildung 29) und die Kinder II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub> heterozygot auf (siehe Abbildung 28).

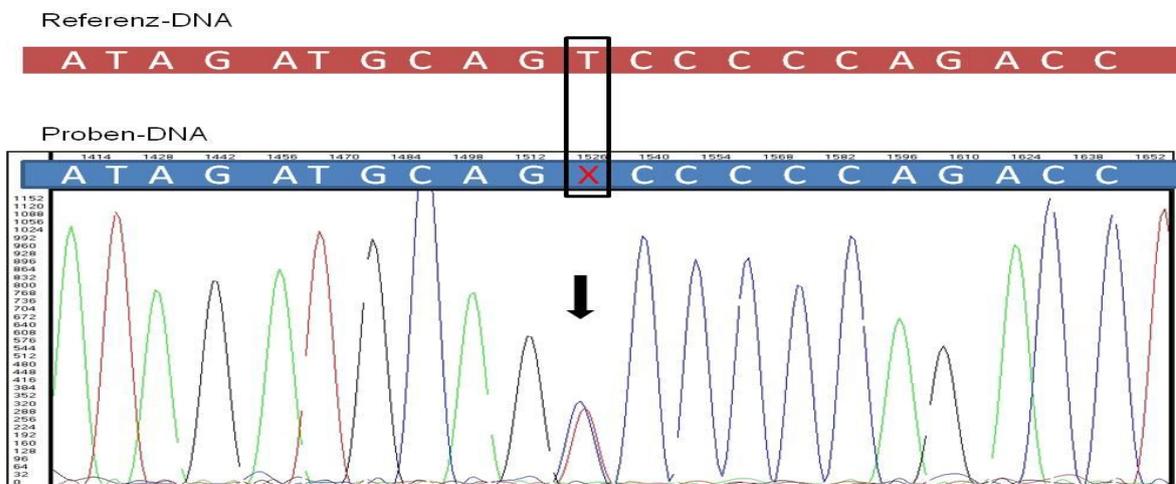


Abbildung 28: DNA-Sequenz für c.3419 T>C heterozygot

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante c.3419 T>C dar. Es liegen Cytosin und Thymin gleichzeitig vor, obwohl Thymin zu erwarten ist.

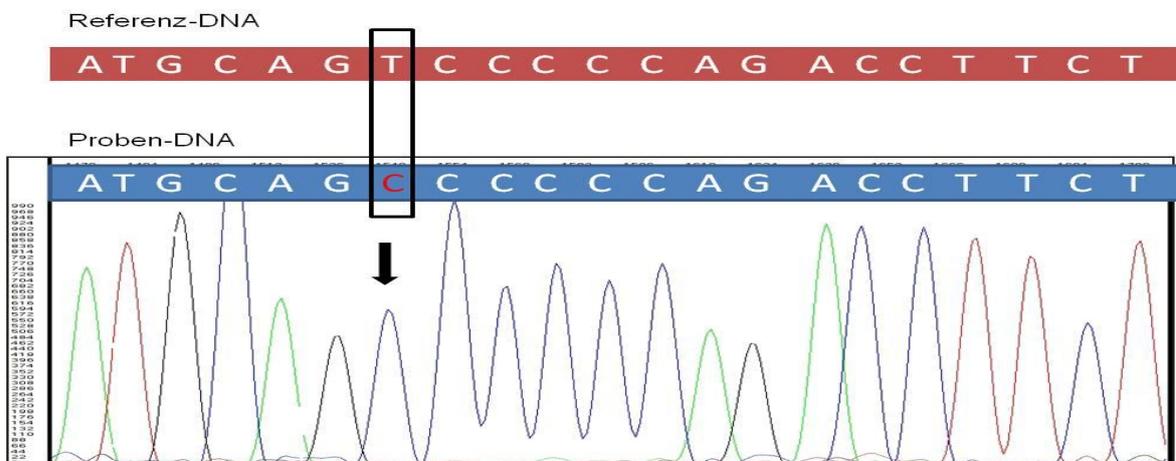


Abbildung 29: DNA-Sequenz für c.3419 T>C homozygot

Die Abbildung stellt die Sequenzvariante c.3419 T>C dar. Es liegt anstelle von Thymin Cytosin homozygot vor.

## 3.2.10 Intron 18: IVS18+6 C&gt;T

Der Basenaustausch IVS18+6C>T befindet sich im nicht-kodierenden Bereich. Es kommt dabei zu einem Austausch von Cytosin durch Thymin sechs Basen nach dem Exon 18 (IVS18+6 C>T). Die Sequenzvariante ist nur innerhalb der Familie beobachtet worden. Sie liegt beim Vater (I<sub>2</sub>) homozygot (siehe Abbildung 21) und bei den Kindern (II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>) heterozygot vor (siehe Abbildung 23).

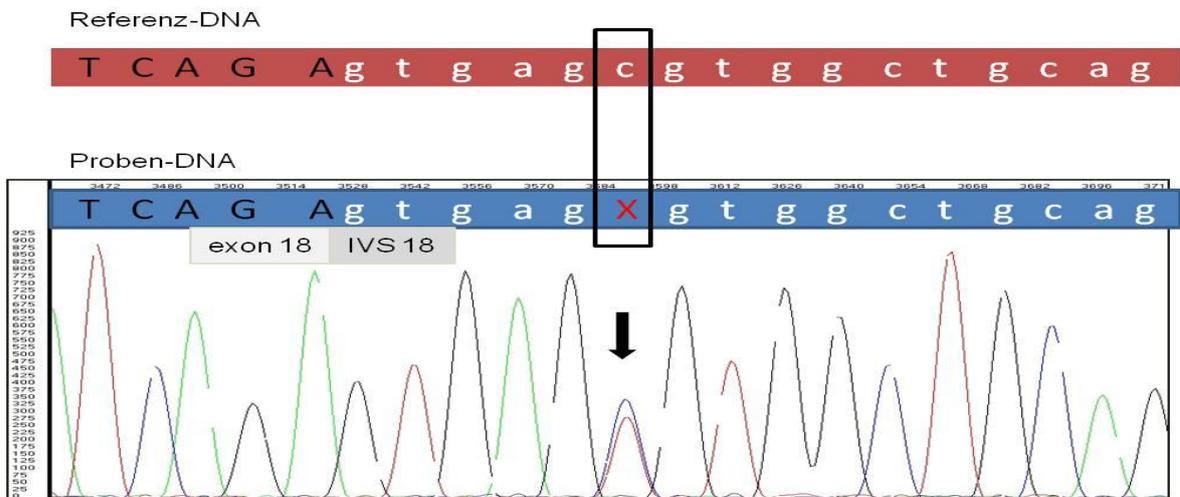


Abbildung 30: DNA-Sequenz für IVS18+6 C&gt;T heterozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante IVS18+6 C>T wieder. Es liegen Cytosin und Thymin gleichzeitig vor, obwohl Cytosin zu erwarten ist.

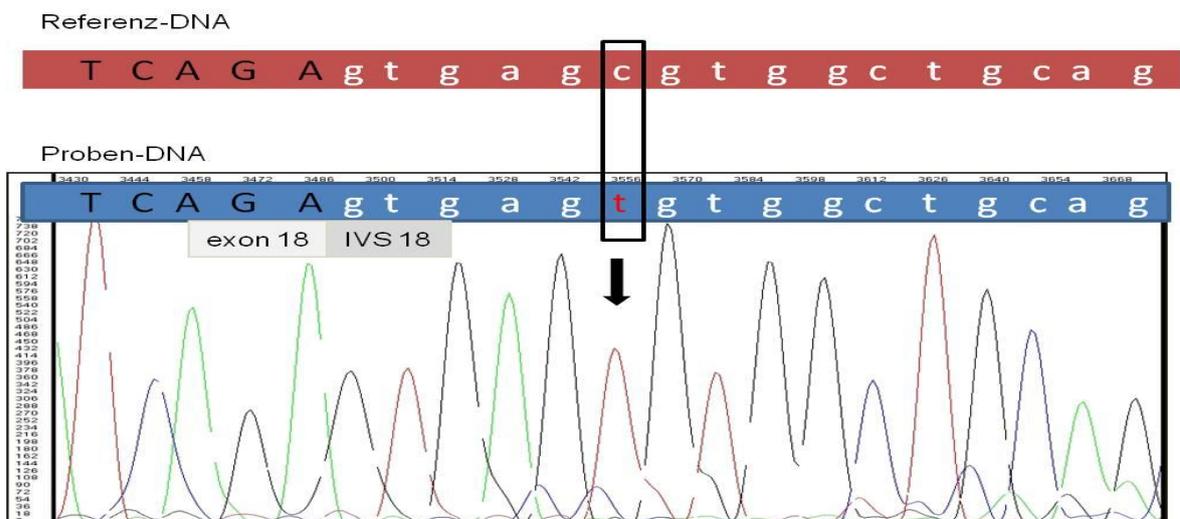


Abbildung 31: DNA-Sequenz für IVS18+6 C&gt;T homozygot

Die Abbildung gibt die Sequenzvariante IVS18+6 C>T wieder. Es liegt anstelle von Cytosin Thymin homozygot vor.

---

## 4 Diskussion

Aufgabe dieser Arbeit war die zugrunde liegenden Mutationen für die ausgewählten Patienten mit Bewegungsstörungen und erniedrigten Ceruloplasmin-Spiegel zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden Proben von vier Betroffenen (P1, P2, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>) und drei Proben von Verwandten ersten Grades der Betroffenen II<sub>1</sub> und II<sub>2</sub> (I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>) genetisch untersucht. Die Patienten zeigten progrediente zerebelläre Symptome (Gangataxie), eine isolierte Kleinhirnatrophie und einen verminderten Ceruloplasmin-Spiegel. Anhand der Klinik und der Familienanamnese wurden die Aceruloplasminämie und der Morbus Wilson als mögliche Verdachtsdiagnosen in die engere Wahl genommen. Die Primärfrage der Arbeit lautete nun, ob Mutationen in den entsprechenden Genen vorliegen, die den Phänotyp der Patienten erklären können. Hierzu erfolgte die Amplifizierung der 19 beziehungsweise 21 Exons der beiden Gene (Ceruloplasmin-Gen und Wilson-Gen) mittels PCR und die anschließende Sequenzierung. Die Nukleotidsequenzen wurden mit der Referenz-DNA aus der Ensemble Datenbank verglichen und Sequenzveränderungen herausgearbeitet. Mit Hilfe von Literaturquellen, Mutationsdatenbanken und Einträgen der Ensemble-Datenbank wurden die identifizierten Sequenzvarianten hinsichtlich Mutation oder Polymorphismus bewertet.

Mutationen, wie Insertionen, Deletionen, Missense- oder Splice-site Mutationen, können über die Änderung der genetischen Grundlage zu Fehlfunktionen von Proteinen führen und damit krankheitsverursachend sein. So reicht im Ceruloplasmin-Gen ein einziger Basenaustausch aus, um die Enzymaktivität des Protein so zu beeinträchtigen, dass das Krankheitsbild der Aceruloplasminämie entsteht (Gitlin et al., 1992), (Hellman et al., 2002b). Dahingegen steht der Begriff Polymorphismus für eine Genvariante, die innerhalb einer Bevölkerung zu finden ist. Sie tritt mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Population auf (Den Dunnen und Antonarakis, 2001) und spielt für die Entwicklung von genetischen Erkrankungen primär keine große Rolle.

Da es sich bei der Aceruloplasminämie und beim Morbus Wilson um autosomal-rezessive Erkrankungen handelt, müssen zur Ausprägung von Krankheitsmerkmalen beide Allele durch eine Mutation betroffen sein.

In den folgenden Abschnitten werden die identifizierten Varianten in Abhängigkeit von ihrem Gen und den betreffenden Personen näher vorgestellt, in Mutation und Polymorphismus eingeteilt und hinsichtlich ihrer Pathogenität diskutiert.

#### 4.1 Mutationssuche im Ceruloplasmin-Gen (CP)

Die molekulargenetische Untersuchung des Ceruloplasmin-Gens deckte sechs Sequenzvarianten auf (siehe Abbildung 32). Dabei konnte eine Missense-Mutation nachgewiesen werden. Bei den anderen Sequenzvarianten handelt es sich um einen Einzelnukleotidpolymorphismus (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) im kodierenden Bereich, sowie um vier kleine Insertions-, Deletions- und Substitutionsvarianten im nicht-kodierenden Bereich des Ceruloplasmin-Gens.

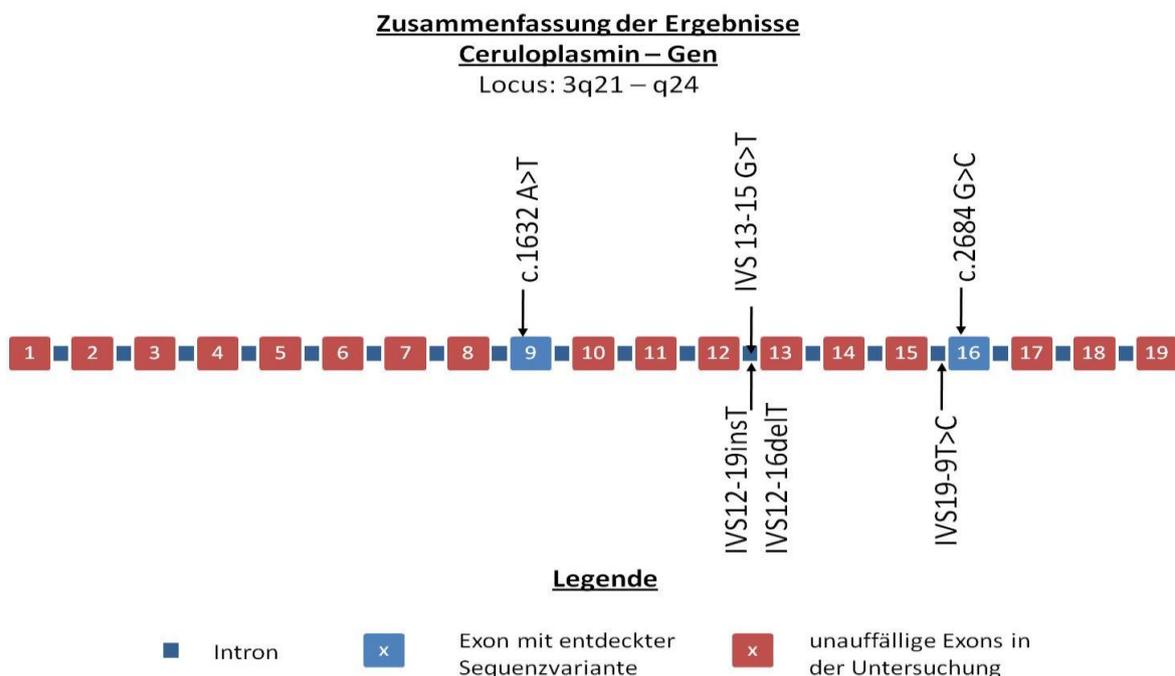


Abbildung 32: Sequenzauffälligkeiten im Ceruloplasmin-Gen

Dargestellt sind die 19 Exons des Ceruloplasmin-Gens. Die Pfeile sind auf die Exons beziehungsweise Introns gerichtet, in denen Sequenzveränderungen gefunden wurden.

#### 4.1.1 Bewertung der Sequenzvarianten

Es sind sechs Sequenzveränderungen identifiziert worden. Von diesen war der Basenaustausch c.1632 A>T (p.E544D) im Exon 9 am häufigsten vertreten. Er lag bei sechs Personen (P1, P2, I<sub>1</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>) homozygot und bei einer Person (I<sub>2</sub>) heterozygot vor. In der Ensemble Datenbank ist der Sequenzaustausch als rs701753 registriert und als Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) bezeichnet. Er ist in Europa weit verbreitet und kommt mit einer Häufigkeit zwischen 20 bis 50 % in der Bevölkerung vor. Eine pathogene Bedeutung ist ihm nicht zu zusprechen.

Darüber hinaus wurden drei verschiedene Sequenzveränderungen im Intron 12 gefunden. Sie befinden sich im nicht-kodierenden Bereich, 20 Basen vor dem Exon 13. Dieser Bereich ist durch eine hohe Anzahl von Thyminbasen (16 x Thymin) gekennzeichnet. Es kam hier sowohl zu einer Substitution (IVS13-15 G>T), also auch zu einer Deletion (IVS13-16delT) und einer Insertion (IVS13-19insT). Weder in den Datenbanken (Ensemble, Biobase) noch in der Literatur sind diese bisher beschrieben worden. Sie traten in Kombination oder einzeln, sowohl bei den Erkrankten, als auch bei den Gesunden auf. Aufgrund der Häufigkeit der Variabilität liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine sensible Region handelt, die für Sequenzveränderungen prädisponiert beziehungsweise instabil ist. Es ist zu diskutieren, ob es sich bei dem Wiederholungsmotiv „Thymin“ um eine repetitive DNA-Sequenz handelt. Diese Art von Sequenztyp ist im unterschiedlichen Ausmaß im ganzen Genom zu finden. Die Repeat-Motive neigen zu Sequenzveränderungen, die aber in der Regel keine Auswirkungen auf den Phänotyp des Individuums haben (Cichon et al., 2002). In diesem Falle wäre die pathologische Bedeutung der drei Sequenzvarianten als gering einzustufen. Darüber hinaus zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit und Verteilung der Sequenzvarianten IVS13-15 G>T und IVS13-16delT bei den Erkrankten und bei den Gesunden. Dies unterstützt die Theorie, dass es sich bei den Sequenzveränderungen um harmlose Varianten des Gens ohne pathogenen Einfluss handelt.

Die Insertion IVS13-19insT ist nur bei dem Betroffenen P2 aufgetreten. Sie liegt ebenfalls im sensiblen Sequenzbereich vor dem Exon 13 und damit außerhalb des

---

Translationsbereichs des Gens. Auch wenn eindeutige Aussagen über die Häufigkeit der Variante in einer gesunden Population fehlen, ist ein pathologischer Effekt eher auszuschließen. Sie kann, wie die anderen beiden Sequenzveränderungen, als harmlose Variante des Gens eingestuft werden. Weitere molekulargenetische Untersuchungen sind allerdings notwendig, um diesen Sachverhalt zu bestätigen.

Die fünfte Basenveränderung im nicht-kodierenden Bereich ist der Basenaustausch IVS16-9 T>C im Intron 15. Er tritt nur bei P2 als heterozygote Variante auf. Weder in den Datenbanken (Ensemble, Biobase) noch in der Literatur ist diese Sequenzveränderung beschrieben worden. Sie liegt nicht in der Region des Gens, die für die Translation eine Rolle spielt. Ihre pathologische Bedeutung ist demnach als gering einzustufen, doch kann eine eindeutige Aussage erst nach Untersuchung weiterer Proben erfolgen.

Die Bedeutung des Missense-Austauschs c.2684 G>C (p.G895A) im Exon 16 ist leichter abzuleiten. Es kommt hier zu einem Basenaustausch von Guanin durch Cytosin, der für den Aminosäureaustausch von Glycin gegen Alanin (p.G895A) sorgt. Die Mutation ist von Kono und Miyajima publiziert (Kono und Miyajima, 2006) und bisher nur im asiatischen Raum beschrieben worden. Sie trat bei dem Betroffenen P1 in heterozygoter Form auf. Die Missense-Mutation wurde in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Verteilung in unserer Population untersucht. Dazu wurden mit Hilfe der allelspezifischen PCR 120 Kontrollproben von Gesunden untersucht. Die Mutation konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Somit bestätigt sich die Aussage von Kono und Miyajima, dass es sich bei dem Basenaustausch weniger um einen Polymorphismus als um eine Mutation handelt. In homozygoter Form ist ein pathogener Effekt nicht auszuschließen.

### 4.1.2 Bedeutung der Sequenzvarianten

Im folgenden Abschnitt wird die Bedeutung der jeweiligen Sequenzveränderung für die betroffenen Personen erläutert. Zu diesem Zweck sind in entsprechenden Abbildungen die Ergebnisse für jeden Patienten zusammengefasst.

Patient 1 (P1)			Patient 2 (P2)		
c.1268 A>T ex 9	hom	SNP	c.1268 A>T ex 9	hom	SNP
c.2684 G>C ex 16	het	Mut	IVS13-19insT	het	V
IVS 13-15 G>T	hom	V	IVS16-9insT	het	V
IVS13-16delT	het	V			

hom=homozygot; het=heterozygot; ex= Exon  
 SNP=Single Nucleotide Polymorphismus ; V=Variante des Gens  
 Mut=Mutation

Abbildung 33: Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen bei P1 und P2

Die Abbildung stellt die Verteilung der Sequenzvarianten und deren Bedeutung für die Einzelpersonen dar. Dabei steht SNP für Polymorphismus, Mut für Mutation (rote Schrift) und V für Variante des Gens. Als Variante werden die Sequenzveränderungen eingestuft, bei denen die Einstufung in Polymorphismus oder Mutation zum Zeitpunkt der Arbeit nicht möglich war.

Der Betroffene P1 weist insgesamt vier Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen auf. Davon ist der Polymorphismus im Exon 9 für die Krankheitsausprägung zu vernachlässigen. Dasselbe könnte auch für die Sequenzvarianten (IVS13-15 G>T, IVS13-16delT) im Intron 12 gelten, da sie in gleicher Verteilung und Ausprägung in den Proben der gesunden Personen zu finden sind, ohne dass dabei ein pathologischer Zusammenhang beobachtet wurde. Genauer zu beleuchten ist dahingegen die Mutation c.2684 G>C im Exon 16, die hier in heterozygoter Form vorliegt. In homozygoter oder in „compound“ heterozygoter Form wäre sie potenziell krankheitsverursachend. Zu diskutieren ist, ob die Mutation auch in heteroalleler Form einen pathogenen Effekt hat. Bekannt ist, dass bei Patienten mit heteroalleler Mutation der Ceruloplasmin-Spiegel um die Hälfte des normalen Wertes reduziert ist (McNeill et al., 2008). Diese Aussage findet sich beim Patienten P1

---

bestätigt, der einen Ceruloplasmin-Spiegel von 0,13 g/l (N: 0,25-0,36 g/l) aufweist. Es sind in der Literatur ebenfalls einzelne Mutationen im Ceruloplasmin-Gen beschrieben worden, die in heteroalleler Form zum Krankheitsbild der Aceruloplasminämie führen können (Miyajima et al., 2001), (Hellman et al., 2002a), (Di Patti et al., 2009). Diese Erkrankungsformen gehen mit zerebellärer Symptomatik (Gangataxie und Dysathrie) und ausgeprägter Kleinhirnatrophie einher (Miyajima et al., 2001). Um diese Möglichkeit bei dem Patienten einbeziehungsweise auszuschließen, bedarf es weitergehender Untersuchungen. Einerseits müssen gesunde und betroffene Geschwister, als auch die gesunden Eltern hinsichtlich dieser Mutation untersucht werden. Sollte die Mutation bei den gesunden Familienmitgliedern ebenfalls zu finden sein, würde es die Theorie über eine dominante Mutation widerlegen. Andererseits können Blutuntersuchungen von gesunden Angehörigen mit gleicher Mutation weitere Hinweise liefern. Ist bei den Gesunden der Ceruloplasmin-Spiegel in gleicherweise wie bei P1 erniedrigt, so liegt der Verdacht nahe, dass dies durch die Mutation hervorgerufen wurde. Leider war es nicht möglich, weitere Proben aus der Familie zu erhalten. Im Allgemeinen spricht aber das Manifestationsalter des Betroffenen von 23 Jahren gegen das Vorliegen einer Aceruloplasminämie (normalerweise: 40.-60. Lbj.). Darüber hinaus sind bisher keine heteroallele Fälle für die Mutation c.2684 G>C bekannt. Diese Fakten als auch die Tatsache, dass es sich bei der Aceruloplasminämie um eine autosomal-rezessive Erkrankung handelt, führen zu dem Schluss, dass die Mutation heteroallel keinen krankheitsverursachenden Effekt hat. Einzig und allein der erniedrigte Ceruloplasmin-Spiegel lässt sich dadurch erklären.

Der Patient P2 weist drei Sequenzvarianten auf, den Polymorphismus im Exon 9, eine Baseninsertion im Intron 12 (IVS13-19insT) und eine Basensubstitution im Intron 16 (IVS16-9T>C). Die Rolle der beiden letzten Sequenzveränderungen ist nicht leicht zu ermitteln, da sie einzig bei P2 zu finden waren und es keine Vergleichsmöglichkeiten zu gesunden Individuen im Rahmen dieser Arbeit gab. Doch anhand der Klinik des Patienten P2 ist eine Bedeutung abzuleiten. Der Patient entspricht in vielen Punkten nicht dem Bild der Aceruloplasminämie. Seine Ceruloplasmin-Werte schwanken im Blut zwischen niedrig und normal. Bei der

---

Aceruloplasminämie sind diese aber entweder nicht messbar oder bei Vorliegen einer heteroallelen Mutation halbiert (McNeill et al., 2008), (Miyajima 2011). Die Klinik des Betroffenen ist nicht typisch für die Erkrankung. Zwar kommt es in 80 % der Fälle zu einem zerebellären Krankheitsbild (Miyajima et al., 2002), (Miyajima et al., 2003), eine isolierte Kleinhirnatrophie ist, außer in Ausnahmefällen, nicht vorhanden. Vielmehr ist das extrapyramidale System betroffen (McNeill et al., 2008). Es gibt außerdem keine Hinweise dafür, dass der Patient unter einer Retinadegeneration und an einem Diabetes mellitus leidet. Die klassische Trias der Erkrankung wird nicht erfüllt (Miyajima et al., 2003). Auch das Manifestationsalter ist nicht typisch für die Aceruloplasminämie. Die neurologischen Symptome beginnen im späteren Lebensalter (40.-60 Lbj.) und so gut wie nie in jüngeren Jahren (20.-30. Lbj.) (Miyajima et al., 2003). Darüber hinaus ist aufgrund der Familienanamnese bei P2 ein dominanter Erbgang nicht auszuschließen, da ebenfalls ein Elternteil betroffen ist. Die autosomal-rezessive Aceruloplasminämie ist eher unwahrscheinlich und die Bedeutung der Sequenzvarianten (IVS13-19insT; IVS16-9insT) aus diesem Grund als gering einzuschätzen. Differentialdiagnostisch sollte in diesem Fall eher an autosomal-dominanten Ataxie-Formen gedacht werden.

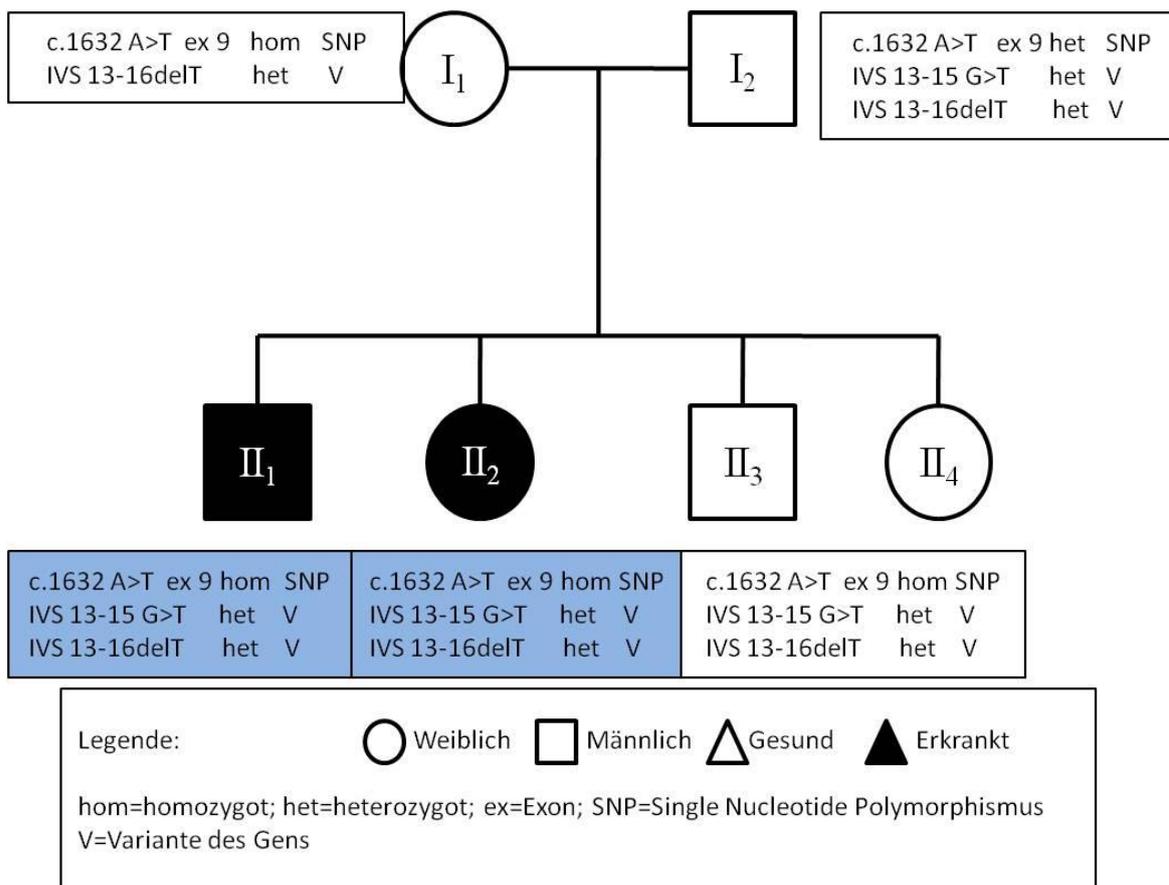


Abbildung 34: Sequenzvarianten im Ceruloplasmin-Gen in der Familie

Die Abbildung 34 stellt die Verteilung der Sequenzvarianten und deren Bedeutung innerhalb der Familie da. Dabei steht SNP für Polymorphismus und V für Variante des Gens. Als Variante werden die Sequenzveränderungen eingestuft, bei denen die Einstufung in Polymorphismus oder Mutation zum Zeitpunkt der Arbeit nicht möglich war. Die schwarz gefüllten Symbole beziehungsweise die blauen Kästchen stehen für die erkrankten Personen.

Bei den betroffenen Nachkommen (II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>) aus der Familie konnte keine krankheitsverursachende Sequenzveränderung im Ceruloplasmin-Gen nachgewiesen werden. Sie besitzen den Polymorphismus c.1632 A>T in Exon 9 und zwei Sequenzveränderungen im Intron 12 (IVS13-15 G>T, IVS13-16delT). Da die Basenveränderungen im Intron 12 in gleicher Art ebenfalls bei den gesunden Familienmitgliedern auftreten, ist ihre Bedeutung für die Ausbildung einer Aceruloplasminämie zu vernachlässigen. Eine genetische Ursache für den Phänotyp der beiden Erkrankten konnte im Ceruloplasmin-Gen nicht nachgewiesen werden. Eine Aceruloplasminämie liegt nicht vor. Unterstützt wird diese

Aussage durch die für die Aceruloplasmin eher untypische Klinik der Patienten. Beide haben einen gut messbaren Ceruloplasmin-Spiegel (0,19 bzw. 0,22 g/l (N: 0,25-0,36 g/l)), eine Retinadegeneration oder ein Diabetes mellitus liegt nicht vor und im MRT ist nur das Kleinhirn betroffen ohne Hinweise für Störungen im extrapyramidalen System.

Die Untersuchung des Ceruloplasmin-Gens ergab bei allen vier Erkrankten keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Aceruloplasminämie. Abgesehen von P1, besteht kein nachweislicher Zusammenhang zwischen dem erniedrigten Ceruloplasmin-Spiegel und den Sequenzveränderungen im Gen.

Nach Ausschluss der Aceruloplasminämie wurde das Vorliegen eines Morbus Wilson untersucht. Bei Patienten, die unter 45 Jahre an unklaren Bewegungsstörungen erkranken, sollte das Vorliegen eines Morbus Wilson differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden (Reddy, 2006).

## 4.2 Mutationssuche im Wilson-Gen (WND)

Es erfolgte die genetische Untersuchung des Wilson-Gen bei allen sieben Personen. Es wurden zehn Sequenzvarianten identifiziert (siehe Abbildung 35). Es handelte sich dabei um acht Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) im kodierenden als auch im nicht-kodierenden Bereich, einen heterozygoten Insertionpolymorphismus im nicht-kodierenden Bereich und eine heterozygote Missense-Mutation.

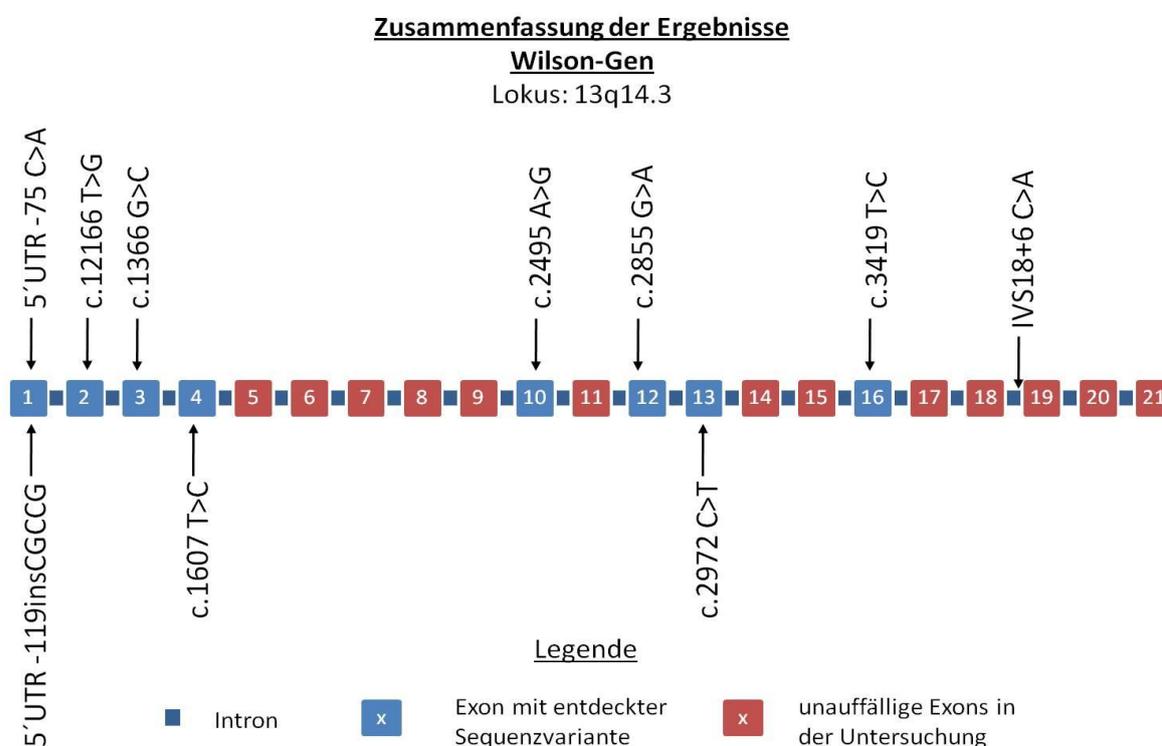


Abbildung 35: Sequenzauffälligkeiten im Wilson-Gen

Dargestellt sind die 21 Exons des Wilson-Gens. Die Pfeile sind auf die Exons beziehungsweise Introns gerichtet, in denen Sequenzveränderungen gefunden wurden.

#### 4.2.1 Bewertung der Sequenzvarianten

Bei den zehn Sequenzveränderungen im Wilson-Gen handelt es sich um neun Polymorphismen und eine Mutation, die in der Mutationsdatenbank der Universität von Alberta (Wilson Disease Mutation Database) und in zahlreichen Publikationen veröffentlicht sind.

Zu den Polymorphismen im kodierenden Bereich zählen die Sequenzvarianten c.1216 T>G im Exon 2, c.1366 G>C im Exon 3, c.1607 T>C im Exon 4, c.2495 A>G im Exon 10, c.2855 G>A im Exon 12 und c.3419 T>C im Exon 16 ([www.wilsondisease.med.ualberta.ca](http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca)), (Tanzi et al., 1993), (Thomas et al., 1995), (Davies et al., 2008). Sie traten sowohl bei den Patienten als auch den gesunden Individuen gleichermaßen auf. Ein pathologischer Zusammenhang mit Morbus Wilson ist nicht bekannt.

Ähnlich verhält es sich mit dem Einzelnukleotidpolymorphismen 5'UTR -75 C>A im nicht-kodierenden Bereich des Exon 1. Sowohl in verschiedenen Publikationen (Caca et al., 2001), (Loudianos et al., 2003), als auch in der Datenbank der Universität von Alberta wird die Variante als Polymorphismen eingestuft. Abhängig von der zugrunde liegenden Referenz-DNA wird der Basenaustausch auch als c.-75 A>C beschrieben.

Im nicht-kodierenden Bereich des Exon 1 wurde ein zweiter Polymorphismus heterozygot identifiziert. Es handelt sich dabei um eine fünf Baseninsertion 119 Basen vor dem Startcodon ATG des Exon 1 (5'UTR -119CGCCG). Er konnte nur bei einer Person (P1) nachgewiesen werden. Die Sequenzveränderung wurde in einer Publikation von Lirong et al. veröffentlicht und als Polymorphismus eingestuft (Lirong et al., 2009). Eine pathogene Bedeutung konnte ihr nicht nachgewiesen werden.

Die Sequenzvariante im Intron 18 (IVS18+6 C>T) ist als Mutation in der Splice-Region beschrieben und in der ostdeutschen Bevölkerung beobachtet worden. Wie der Publikation von Caca et al. zu entnehmen ist, soll dabei aber kein Zusammenhang zur Erkrankung Morbus Wilson bestehen (Caca et al., 2001). Sie kam in der Familie sowohl bei den erkrankten Kindern als auch bei den gesunden

Familienmitgliedern heterozygot beziehungsweise homozygot ( $I_2$ ) vor. Ein krankheitsverursachender Effekt ist daher eher auszuschließen.

Im Gegensatz dazu wird bei der Sequenzveränderung c.2972 C>T im Exon 13 in einer Publikation eine enge Beziehung zur Erkrankung vermutet (Cox et al., 2005). Die Mutation führt auf Aminosäurenebene zu einem Austausch von Threonin durch Methionin. Sie ist vor allem in Deutschland und in England beobachtet worden. Ob es sich dabei eher um eine seltene Normalvariante des Gens handelt, konnte in der Publikation nicht ausgeschlossen werden (Cox et al., 2005).

#### 4.2.2 Bedeutung der Sequenzvarianten

Im folgenden Abschnitt wird noch einmal gesondert auf die Bedeutung der jeweiligen Sequenzveränderung für den Betroffenen eingegangen. Zur besseren Übersicht über die Verteilung der Sequenzvarianten, sind die Ergebnisse personenbezogen in den Abbildungen zusammengefasst.

Patient 1 (P1)	Patient 2 (P2)
5'UTR -119insCGCCG het INS 5'UTR -75C>A het SNP IVS18+6 C>T het SNP	5'UTR -75C>A het SNP c.1607 T>C ex 4 het SNP
hom=homozygot; het=heterozygot; ex= Exon SNP=Single Nucleotide Polymorphism INS= Insertion	

Abbildung 36: Sequenzvarianten im Wilson-Gen bei P1 und P2

Die Abbildung stellt die Verteilung der Sequenzvarianten und deren Bedeutung für die Einzelpersonen dar. Dabei steht SNP für den Einzelnukleotid-Polymorphismus und INS für Insertion, die für den Fall 5'UTR -119insCGCCG als Polymorphismus bewertet wird.

Wie der Abbildung 36 zu entnehmen ist, weisen sowohl P1 und als auch P2 nur Polymorphismen auf. Es gibt bisher keine Hinweise, dass die aufgelisteten Varianten einzeln oder in Kombination eine Verbindung zur Erkrankung haben (siehe [www.wilsondisease.med.ualberta.ca](http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca)). Ein Morbus Wilson kann bei P1 und P2 aus diesem Grund ausgeschlossen werden.

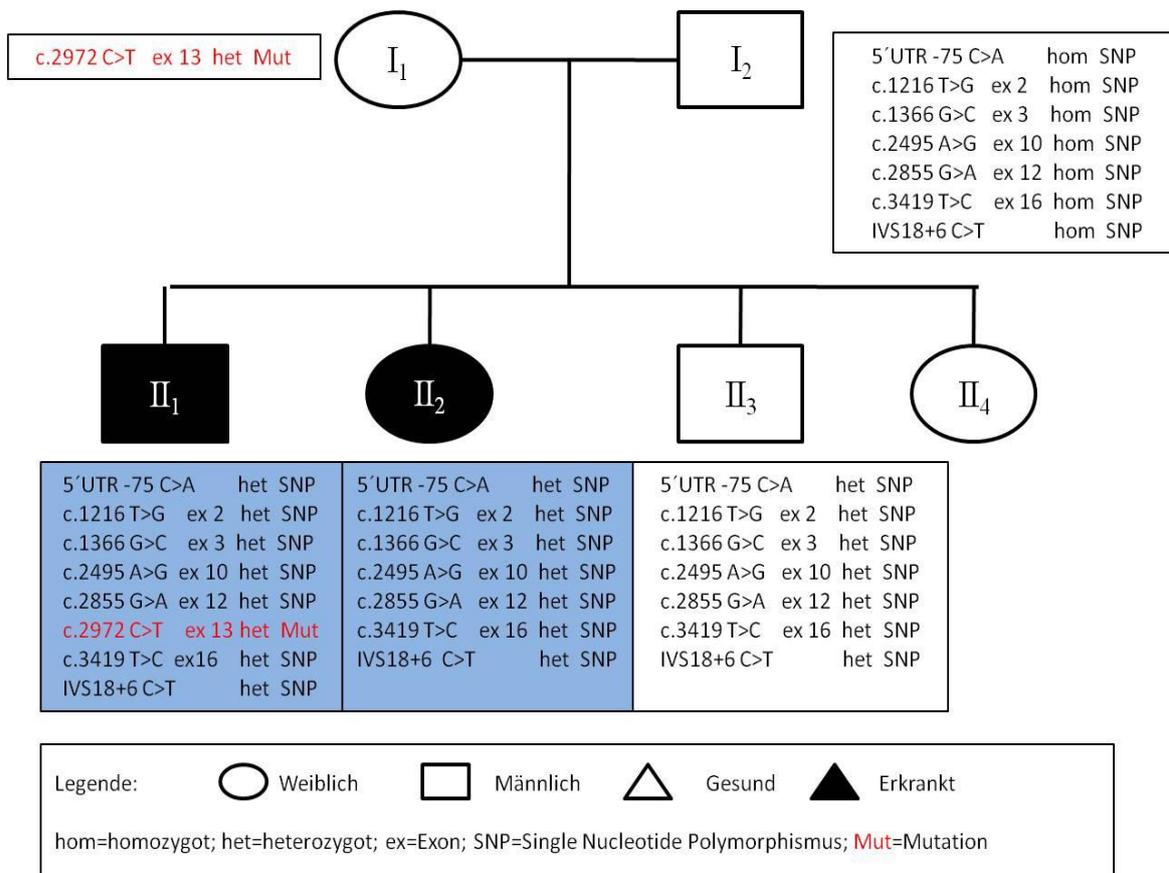


Abbildung 37: Sequenzvarianten im Wilson-Gen in der Familie

Die Abbildung 34 stellt die Verteilung der Sequenzvarianten und deren Bedeutung innerhalb der Familie dar (SNP für Polymorphismus bzw. Mut für Mutation). Die schwarz gefüllten Symbole bzw. die blauen Kästchen stehen für die erkrankten Personen. In roter Schrift ist die Mutation hervorgehoben.

Bei den beiden Betroffenen der Familie sind in den untersuchten Genen sieben (II<sub>2</sub>) beziehungsweise acht (II<sub>1</sub>) Basenveränderungen festgestellt worden. Bei den sieben Sequenzveränderungen des Erkrankten II<sub>2</sub> handelt es sich ausschließlich um Polymorphismen. Sie sind in gleicher Kombination sowohl bei einem gesunden Geschwisterkind (II<sub>3</sub>) als auch in homozygoter Form beim gesunden Vater (I<sub>2</sub>) vertreten. Dieser Sachverhalt unterstützt die Aussage, dass weder einzeln noch in Kombination diese Polymorphismen einen pathogenen Einfluss haben. Ein Morbus Wilson ist bei II<sub>2</sub> daher auszuschließen.

Das erkrankte Kind II<sub>1</sub> weist hingegen neben den sieben bekannten Polymorphismen die Mutation (c.2972 C>T) im Exon 13 auf, für die eine

---

Beziehung zum Morbus Wilson bekannt ist. Sie liegt heterozygot vor. Nur in Ausnahmefällen kann es durch eine heteroallele Mutation zum Ausbruch der Krankheit kommen. Das Erkrankungsalter liegt in diesen Fällen aber deutlich höher (>50. Lbj.) als das des Patienten (25. Lbj.). Zudem gehen sie eher mit Parkinson-ähnliche Symptome einher, als mit einer isolierten zerebellären Symptomatik (Sechi et al., 2006). Der pathogene Effekt dieser Mutation ist in heteroalleler Form als gering einzuschätzen. Die Mutter ( $I_1$ ) des Patienten trägt dieselbe Sequenzveränderung und ist gesund. Möglich ist, dass die Mutation den niedrigen Ceruloplasmin-Spiegel des Patienten hervorruft. Bei vielen Menschen, die heteroallel für eine Mutation im Wilson-Gen sind, wird ein reduzierter Spiegel gemessen (Pfeiffer, 2007). Wenn der Ceruloplasmin-Spiegel der Mutter ebenfalls erniedrigt ist, könnte dies für diese Theorie sprechen. Es gab aber keine Angaben über den Ceruloplasmin-Spiegel der Mutter.

Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass kein Zusammenhang zwischen Mutation und dem Ceruloplasmin-Spiegel existiert. Das ebenfalls betroffene Kind  $II_2$  weist im Gegensatz zu  $II_1$  den Missense-Austausch nicht auf, hat aber trotzdem einen ähnlich niedrigen Ceruloplasmin-Spiegel (CP-Spiegel: ( $II_1$ ) 0,19 bzw. ( $II_2$ ) 0,22 g/l (N: 0,25-0,36 g/l)) bei fast gleicher neurologischer Symptomatik. Eine gemeinsame genetische Ursache für ihre Erkrankung ist daher naheliegend, diese ist aber nicht im Wilson-Gen zu finden.

Weder im Wilson-Gen noch im Ceruloplasmin-Gen konnte die genetische Ursache für den Phänotyp der Patienten nachgewiesen werden. Die Untersuchungen beweisen vielmehr, dass keine der beiden Erkrankungen vorliegt. Retrospektiv betrachtet stimmt dieses Ergebnis auch mit der Klinik der Patienten überein. Für die Aceruloplasminämie waren die Patienten zu jung und der Ceruloplasmin-Spiegel zu hoch. Darüber hinaus konnte keiner von ihnen die klassische Trias (Bewegungsstörung, Retinadegeneration, Diabetes mellitus) aufweisen. Für den Morbus Wilson fehlten die typischen Kayser-Fleischer-Kornealringe, die bei über 95 % der Patienten mit neurologischen und psychiatrischen Störungen zu finden sind (Oder et al., 1991), (Cox und Roberts 2006). Ein Fehlen dieser Ringe schließt die Diagnose Morbus Wilson zwar nicht aus (Maier-Dobersberger, 1999), aber

---

gerade bei neurologischen Patienten macht es die Diagnose unwahrscheinlicher (Ross et al., 1985), (Pfeiffer, 2007).

Ein erniedrigter Ceruloplasmin-Spiegel wird ebenfalls bei anderen degenerativen Erkrankungen beobachtet wie dem Menke-Syndrom, der Multisystematrophie (MSA) oder der progressiven Myelopathie. Da das Menke-Syndrom schon im Kleinkindalter auftritt (Tümer und Møller, 2010), die Multisystematrophie auch mit autonomen Störungen einhergeht (De Mello et al., 2010) und die progressive Myelopathie sich durch eine sensorische und weniger motorische Ataxie im Zuge eines sekundären Kupfermangels auszeichnet (Kumar et al., 2004), sind sie als Differentialdiagnose hier eher auszuschließen.

Es stellt sich die Frage, ob überhaupt ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Ceruloplasmin-Werten und der neurologischen Klinik besteht, oder ob sie isoliert voneinander betrachtet werden müssen. Der Ceruloplasmin-Spiegel kann ebenfalls bei Kupfermangel-Ernährung leicht erniedrigt sein. Aufschluss darüber könnte die Enzymaktivität (Ferroxidase-Aktivität) des Proteins geben. Bei nutritiven Störungen bliebe trotz Ceruloplasmin-Mangel, die Enzym-Aktivität unbeeinflusst, während sie bei Mutationen im Ceruloplasmin-Gen oder im Wilson-Gen stark reduziert bis nicht messbar ist (Kono et al., 2006), (Merle et al., 2010). Da es keine näheren Angaben beziehungsweise Untersuchungen über die Kupfermenge im Urin oder den Ferritin-Gehalt im Blut gab, ist nicht bewiesen, dass eine Kupfer- beziehungsweise Eisenstoffwechselstörung bei den Patienten vorliegt.

Wenn man die zerebellären Symptome unabhängig vom Ceruloplasmin-Spiegel betrachtet, können auch andere hereditäre Erkrankungen der neurologischen Klinik zugrunde liegen. Es sollten autosomal-rezessive und autosomal-dominante Ataxie-Formen berücksichtigt werden. Die autosomal-rezessive Friedreich-Ataxie, die mit zerebellärer Klinik und Kleinhirnatrophie einhergeht, kann sich bei 30 % der Patienten erst nachdem 25. Lebensjahr entwickeln (De Michele et al., 1989), (Koeppen, 2011). Diese Erkrankung sollte vor allem bei P1 näher in Betracht gezogen werden, da seine zerebellären Symptome am wenigsten mit dem erniedrigten Ceruloplasmin-Spiegel in Verbindung stehen.

---

Es können aber auch dominante Ataxien trotz leerer Familienanamnese vorliegen. Weitere genetische Untersuchung in Richtung spinocerebelläre Ataxien (SCA) sind erforderlich. Spinocerebelläre Ataxien wie die in Deutschland verbreitete SCA6 oder die seltene SCA8, sind Erkrankungen, die mit reiner Kleinhirnsymptomatik und isolierter Kleinhirnatrophie einhergehen (Schöls et al., 1997). Gerade bei Patient P2, bei dem ein dominanter Erbgang nicht ausgeschlossen werden kann, liegt der Verdacht einer spinocerebellären Ataxie nahe.

### 4.3 Ausblick

In den letzten Jahren hat die Bedeutung des Ceruloplasmin-Spiegels zugenommen. Es kommt immer mehr der Verdacht auf, dass niedrige Ceruloplasmin-Werte in Beziehung zu neurodegenerativen Veränderungen stehen. Die Studiengruppe von Moriai stellte fest, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen Hypoceruloplasminämie (Ceruloplasmin-Mangel) und neurologischer Krankheitsbilder existiert unabhängig von Mutationen im Ceruloplasmin- oder Wilson-Gen (Moriai et al., 2001). Es ist unlängst erwiesen worden, dass z. B. striatonigrale Degenerationen, wie sie bei der MSA auftreten, mit Ceruloplasmin-Mangel einhergehen (Yomono et al., 2003). Es kann daher auch bei den untersuchten Patienten ein Zusammenhang zwischen dem Ceruloplasmin-Wert und ihrer neurologischen Klinik bestehen, trotz negativem Ergebnis in der Gen-Analyse.

Die genetische Ursache für einen Ceruloplasmin-Mangel muss nicht allein in seinem Gen zu finden sein. Von der Expression des Gens, über die Kupferaufnahme und Weiterverarbeitung bis hin zur Biosynthese des Holoproteins, sind unzählige andere Proteine an diesem Prozess beteiligt. So gibt es die sogenannten Chaperone (wie Atox1), die für den Kupfer-Transport in der Zelle verantwortlich sind. Sie arbeiten eng mit der ATP7B zusammen und regulieren sie (Field et al., 2002), (Bartee et al., 2009). Aber auch eine Vielzahl anderer Enzyme und Proteine wie Clusterin oder die Proteinkinase D, sind an der Regulation des Kupferhaushaltes und indirekt an der Biosynthese von Ceruloplasmin beteiligt (Materia et al., 2011), (Pilankatta et al., 2011). Denkbar ist, dass Funktions-

---

störungen dieser Proteine einen Ceruloplasmin-Mangel hervorrufen und die Entstehung von neurodegenerativen Prozessen begünstigen.

Auf dieser Basis aufbauend wurde 2009 von einer chinesischen Arbeitsgruppe der Begriff „Hypoceruloplasminemia-related movement disorder“ (HCMD) eingeführt (Lirong et al., 2009). Die Krankheitsgruppe fasst dabei Patienten zusammen, bei denen Bewegungsstörungen mit einem erniedrigter Kupfer- und Ceruloplasmin-Spiegel einhergehen, ohne dass eine Mutation im Wilson- oder Ceruloplasmin-Gen vorliegt. Es handelt sich dabei um eine autosomal-rezessive Erkrankungsgruppe, die sich durchschnittlich ab dem 29. Lebensjahr  $\pm$  12 Jahre manifestiert. Die Klinik reicht von Parkinson-ähnlichen Syndromen über rein zerebelläre Klinik bis hin zu Zeichen einer Multisystematrophie. Es treten keine Kayser-Fleischer-Kornealringe auf. Das Labor zeigt nur einen leichten Ceruloplasmin-Abfall ( $0,178 \pm 0,025$  g/l (N: 0,25-0,36 g/l)). MRT-Untersuchungen des Kopfes sind meist unauffällig. Vermutet werden genetische Veränderungen bei noch nicht untersuchten Proteinen des Kupferstoffwechsels.

Das neu eingeführte Krankheitsbild entspricht in vielen Punkten der Klinik der untersuchten Patienten, insbesondere II<sub>1</sub> und II<sub>2</sub>, und sollte daher differentialdiagnostisch, nach Ausschluss anderer hereditären Ataxie-Formen, mit einbezogen werden. Bisher gibt es, abgesehen von der Arbeitsgruppe um Lirong (Lirong et al., 2009), keine weiteren Publikationen, die sich mit diesem neuen Krankheitsbild beschäftigt. Die betroffenen Proteine und ihre entsprechenden Gene für diese Krankheitsgruppe sind noch nicht identifiziert. Eine sichere Diagnose der HCMD ist daher zur Zeit noch nicht möglich.

Zukünftige Forschungen in diese Richtung können wohlmöglich bisher unbekannte hereditäre Krankheiten aufdecken und Erklärungen für den Zusammenhang zwischen Ceruloplasmin-Mangel und neurodegenerativen Veränderungen liefern.

---

## 5 Zusammenfassung

Der Begriff Neurodegeneration beschreibt eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die mit einem Verlust an Nervenzellen einhergeht. Zu den eher selteneren Ursachen der Neurodegeneration zählen die autosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen Aceruloplasminämie und Morbus Wilson. Sie gehen beide mit einem nicht messbaren beziehungsweise erniedrigten Ceruloplasmin-Spiegel einher und führen durch Störungen im Eisen- beziehungsweise Kupferstoffwechsel zu neurodegenerativen Veränderungen, die mit zerebellären oder extrapyramidalen Symptomen einhergehen. Ursache sind homozygote oder „compound“ heterozygote Mutationen im Ceruloplasmin- beziehungsweise Wilson-Gen.

Zum Zeitpunkt der Arbeit lagen sieben Proben zur molekulargenetischen Untersuchung vor. Fünf der sieben Proben stammen aus einer Familie, die übrigen beiden Proben von einzelnen nicht-blutsverwandten Personen. Sowohl zwei der vier Kinder aus der Familie als auch die zwei Einzelpersonen leiden seit einigen Jahren an einer progredienten zerebellären Klinik und weisen zusätzlich einen verminderten Ceruloplasmin-Spiegel auf.

Aufgabe dieser Arbeit war die Mutationssuche im Ceruloplasmin- und Wilson-Gen, um die genetische Ursache für den Phänotyp der Patienten aufzudecken.

Dazu wurden die 19 und 21 Exons der entsprechenden Gene (Ceruloplasmin-Gen bzw. Wilson-Gen) aller sieben Proben mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Ergebnisse aus der Sequenzierung wurden mit einer Referenz-DNA verglichen und Sequenzveränderungen herausgearbeitet.

Insgesamt sind sechs DNA-Variationen im Ceruloplasmin-Gen und zehn DNA-Variationen im Wilson-Gen identifiziert worden. Vier der sechs Sequenzveränderungen im Ceruloplasmin-Gen liegen im nicht-kodierenden Bereich und waren zum Zeitpunkt der Arbeit unbekannt. Sie traten bei den Erkrankten und Gesunden in gleicherweise auf und wurden als Normalvarianten des Gens interpretiert. Bei den zwei anderen Basenveränderungen handelt es sich um

---

den Polymorphismus c.1216 T>G im Exon 9 und um die Missense-Mutation c.2684 G>C im Exon 16, die beide bereits publiziert sind. Die Missense-Mutation trat nur heterozygot auf und ist daher für die Ausbildung einer Aceruloplasminämie unwahrscheinlich.

Im Wilson-Gen sind neun bekannte Polymorphismen und eine vorbeschriebene Missense Mutation (c.2972 C>T) im Exon 13 identifiziert worden. Die Mutation kam heterozygot bei einem Gesunden und bei einem Erkrankten vor. Ein pathologischer Zusammenhang zum Morbus Wilson ist für die heteroallelen Mutation molekulargenetisch nicht gesichert werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist sowohl die Aceruloplasminämie als auch der Morbus Wilson bei den Betroffenen auszuschließen. Es konnte weder im Wilson-Gen noch im Ceruloplasmin-Gen die genetische Ursache für den Phänotyp der Patienten nachgewiesen werden. Um die zugrunde liegende Erkrankung beziehungsweise den Zusammenhang zwischen dem Ceruloplasmin-Mangel und den neurodegenerativen Veränderungen der Patienten aufzudecken, sind weitere molekulargenetischen Untersuchungen notwendig.

---

## 6 Literaturverzeichnis

Ala A, Borjigin J, Rochwarger A, Schilsky M: Wilson disease in septuagenarian siblings: raising the bar for diagnosis. *Hepatology*. 41: 668-670; 2005

Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML: Wilson's disease. *Lancet*. 369: 397-408; 2007

Barnes N, Bartee MY, Braiterman L, Gupta A, Ustiyani V, Zuzel V, Kaplan JH, Hubbard AL, Lutsenko S: Cell-specific trafficking suggests a new role for renal ATP7B in the intracellular copper storage. *Traffic*. 10: 767-779; 2009

Bartee MY, Lutsenko S: Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level. *Biometals*. 20: 627-637; 2007

Bartee MY, Ralle M, Lutsenko S: the loop connecting metal-binding domains 3 and 4 of ATP7B is a target of a kinase-mediated phosphorylation. *Biochemistry*. 48: 5573-5581; 2009

Borjigin J, Payne AS, Deng J, Li X, Wang MM, Ovodenko B, Gitlin JD, Snyder SH: A novel pineal night-specific ATPase encoded by the Wilson disease gene. *J Neurosci*. 19: 1018-1026; 1999

Bosio S, Gobbi MD, Roetto A, Zecchina G, Leonardo E, Rizzetto M, Lucetti C, Petrozzi L, Bonuccelli U, Camaschella C: Anemia and iron overload due to compound heterozygosity for novel ceruloplasmin mutations. *Blood*. 100: 2246-2248; 2002

Bowcock AM, Farrer LA, Hebert JM, Agger M, Sternlieb I, Scheinberg IH, Buys CH, Scheffer H, Frydman M, Chajek-Saul T, Bonne-Tamir B, Cavalli-Sforza LL: Eight closely linked loci place the Wilson disease locus within 13q14-q21. *Am J Hum Genet*. 43: 664-674; 1988

Britton R: Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis*. 16: 3-12; 1996

---

Bruha R, Marecek T, Paspisilova L, Nevsimalova S, Vitek L, Martasek P, Nevoral J, Petrtý J, Urbanek P, Jiraskova A, Ferenci P: Long-term follow-up of Wilson disease: Natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver int.* 31: 83-91; 2011

Buiakova OI, Xu J, Lutsenko S, Zeitlin S, Das K, Das S, Ross BM, Mekios C, Scheinberg IH, Gilliam TC: Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Hum Mol Genet.* 8: 1665-1671; 1999

Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW: The Wilson disease gene is a putative copper transporting p-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet.* 5: 327-337; 1993

Caca K, Ferenci P, Kühn HJ, Polli C, Willgerodt H, Kunath B, Hermann W, Mössner J, Berr F: High prevalence of the H106Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *J Hepatol.* 35: 575-581; 2001

Choi BS, Zheng W: Copper Transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF Barrier. *Brain Res.* 1248: 14-21; 2009

Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM: Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Dtsch Arztebl.* 99: A3091-A3101; 2002

Cox DW, Prat L, Walshe JM, Heathcote J, Gaffney D: Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly European ancestry. *Hum Mutat.* 26: 280; 2005

Cox D, Roberts E: Wilson disease - Hepatolentikular Degeneration (2006). In: NCBI Bookshelf: GeneReviews. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1512/>] Tag des Zugriffs: 6. September 2011

---

Daimon M, Susa S, Ohizumi T, Moriai S, Kawanami T, Hirata A, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Kato T: A novel mutation of the ceruloplasmin gene in a patient with heteroallelic ceruloplasmin gene mutation (HypoCPGM). *Tohoku J Exp Med.* 191:119-122; 2000

Daimon M, Yamatani K, Igarashi M, Fukase N, Kawanami T, Kato T, Tominaga M, Sasaki H: Fine structure of the human ceruloplasmin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 208: 1028-1035; 1995

Davies LP, Macintyre G, Cox DW: New mutations in the Wilson disease gene, ATP7B: implications for molecular testing. *Genet Test.* 12: 139-145; 2008

De Domenico J, McVey WD, Bonaccorsi di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, Kaplan J: Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.* 26: 2823-2831; 2007

De Mello RA, Ferreira D, Dias da Costa JM, Rosas MJ, Quinaz JM: multiple-System atrophy with zerebellar predominance presenting as respiratory insufficiency and vocal cords paralysis. *Case Report Med.* pii: 351239, 4 Seiten; 2010

De Michele G, Filla A, Barbieri F, Perretti A, Santoro L, Trombetta L, Santorelli F, Campanella G: Late onset recessive ataxia with Friedreich's disease phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 52: 1398-1401; 1989

Den Dunnen JT, Antonarakis SE: Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 109: 121-124; 2001

Dening TR, Berrios GE: Wilson's disease. Psychiatric symptoms in 195 cases. *Arch Gen Psychiatry.* 46: 1126-1134; 1989

Di Patti MC, Maio N, Rizzo G, De Francesco G, Persichini T, Colasanti M, Polticelli F, Musci G: Dominant mutants of ceruloplasmin impair the copper loading machinery in aceruloplasminemia. *J Biol Chem.* 284: 4545-4554; 2009

---

Diener H, Hermann W: Morbus Wilson (2008). In: AWMF Leitlinien online . [<http://www.awmf.org>] Tag des Zugriffs: 31. August 2011

Dunaief IL: Iron induced oxidative damage as a potential factor in age-related macular degeneration: the cogan lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47: 4660-4664; 2006

Duvigneau JC, Piskernik C, Haindl S, Kloesch B, Hartl RT, Hüttemann M, Lee I, Ebel T, Moldzio R, Gemeiner M, Redl H, Kozlov AV: A novel endotoxin-induced pathway: upregulation of heme oxygenase 1, accumulation of free iron, and free iron-mediated mitochondrial dysfunction. *Lab Invest.* 88: 70-77; 2008

Erel O: Automated measurement of serum ferroxidase activity. *Clin Chem.* 44: 2313-2319; 1998

Ferenci P: Regional distribution of mutations of the ATP gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet.* 120: 151-159; 2006

Ferenci P: Pathophysiology and clinical features of Wilson disease. *Metab Brain Dis.* 19: 229-239; 2004

Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, Schilsky M, Cox D, Berr F: Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int.* 23: 139-142; 2003

Ferenci P, Steindl-Munda P, Vogel W, Jessner W, Gschwantler M, Stauber R, Datz C, Hackl F, Wrba F, Bauer P, Lorenz O: Diagnostic value of quantitative hepatic copper determination in patients with Wilson's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3: 811-818; 2005

Field LS, Luk E, Culotta VC: Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J Bioenerg Biomembr.* 34: 373-379; 2002

Finkenstedt A, Wolf A, Höfner E, Gasser BI, Bösch S, Bakry R, Creus M, Kremser C, Schocke M, Theurl M, Moser P, Schranz M, Bonn G, Poewe W, Vogel W,

---

Janecke AR, Zoller H: Hepatic but not brain is rapidly chelated by deferasirox in aceruloplasminemia due to a novel gene mutation. *J Hepatol.* 53: 1101-1107; 2010

Frieden E, Hsieh HS: The biological role of ceruloplasmin and its oxidase activity. *Adv Exp Med Biol.* 74: 505-529; 1976

Frydman M, Bonn -Tamir B, Farrer LA, Conneally PM, Magazanik A, Ashbel S, Goldwicht Z: Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 1819-1821; 1985

Galaris D, Pantopoulos K: Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 45: 1-23; 2008

Gitlin JD: Aceruloplasminemia. *Pediatr Res.* 44: 271-276; 1998

Gitlin JD: Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. *J Biol Chem.* 263: 6281-6287; 1988

Gitlin JD, Schroeder JJ, Lee-Abrose LM, Cousins RJ: Mechanisms of ceruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rats. *Biochem J.* 282: 835-839; 1992

Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB: Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut.* 46: 415-419; 2000

Gromadzka G, Schmidt HH-, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B, Litwin T, Chabik G, Cz nkowska A: p.H1069Q mutation in ATP7B and biochemical parameters of copper metabolism and clinical manifestation of Wilson's disease. *Mov Disord.* 21: 245-248; 2006

Gutteridge JM: Iron and oxygen radicals in brain. *Ann Neurol.* 32: S16-S21; 1992

---

Gutteridge JM, Richmond R, Halliwell B: Oxygen free-radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein ceruloplasmin. *FEBS Lett.* 112: 269-272; 1980

Haemers I, Kono S, Goldman S, Gitlin JD, Pandolfo M: Clinical, molecular, and PET study of a case of aceruloplasminaemia presenting with focal cranial dyskinesia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75: 334-337; 2004

Halliwell B, Gutteridge JM: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280: 1-8; 1990

Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD: Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 10812-10817; 1999

Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillevray RTA, Gitlin JG: Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 2539-2543; 1995

Hatanaka Y, Okano T, Oda K, Yamamoto K, Yoshida K: Aceruloplasminemia with juvenile-onset diabetes mellitus caused by exon skipping in the ceruloplasmin gene. *Intern Med.* 42: 599-602; 2003

Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogeboom AJ, De Jong GJ, Gitlin JD: Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *J Biol Chem.* 277: 46632-46638; 2002b

Hellman NE, Kono S, Miyajima H, Gitlin JD: Biochemical analysis of a missense mutation in aceruloplasminemia. *J Biol Chem.* 277: 1375-1380; 2002a

Hellman NE, Schaefer M, Gehrke S, Stegen P, Hoffman WJ, Gitlin JD: Hepatic iron overload in aceruloplasminaemia. *Gut.* 47: 4878-4903; 2000

Hineno A, Kaneko K, Yoshida K: Ceruloplasmin protects against rotenone-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Neurochem Res.* 36: 2127-2135; 2011

---

Hochstrasser H, Bauer P, Walter U, Behnke S, Spiegel J, Csoti I, Zeiler B, Bornemann A, Pahnke J, Becker G, Riess O, Berg D: Ceruloplasmin gene variations and substantia nigra hyperechogenicity in Parkinson disease. *Neurology*. 63: 1912-1917; 2004

Holinski-Feder E: DNA-Untersuchung - Diagnostische Anwendung beim Menschen. In: Murke J, Grimm T, Holinski-Feder E. Humangenetik; Aufl. 7. S. 111-112, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2006

Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD: Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 272: 21461-21466; 1997

Jeong SY, David S: Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem*. 278: 27144-27148; 2003

Kaneko K, Yoshida K, Arima K, Ohara S, Miyajima H, Kato T, Ohta M, Ikeda SI: Astrocytic deformity and globular structures are characteristic of the brains of patients with aceruloplasminemia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 61: 1069-1077; 2002

Kato T, Daimon M, Kawanami T, Ikezawa Y, Sasaki H, Maeda K: Islet changes in hereditary ceruloplasmin deficiency. *Hum Pathol*. 28: 499-502; 1997

Kaul A, McMahon D: Wilson's disease and offending behavior: a case report. *Med Sci Law*. 33: 353-358; 1993

Kenney SM, Cox DW: Sequenz variaton database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat*. 28: 1171-1177; 2007

Kim TJ, Kim IO, Kim WS, Cheon JE, Moon SG, Kwon JW, Seo JK, Yeon KM: MR imaging of the brain in Wilson disease of childhood: findings before and after treatment with clinical. *AJNR Am J Neuroradiol*. 27: 1373-1378; 2006

---

Klomp LWJ, Gitlin JD: Expression of the ceruloplasmin gene in the human retina and brain: implications for a pathogenic model in aceruloplasminemia. *Hum Molec Genet.* 5: 1989-1996; 1996

Koeppen AH: Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J Neurol Sci.* 303: 1-12; 2011

Kono S, Miyajima H: Molecular and pathological basis of aceruloplasminemia. *Biol Res.* 39: 15-23; 2006

Kono S, Miyajima H, Takahashi Y, Inoue Y: Aceruloplasminemia with a novel mutation associated with parkinsonism. *Neurogenetics.* 2: 237-238; 2000

Kono S, Suzuki H, Takahashi K, Takahashi Y, Shirakawa K, Murakawa Y, Yamaguchi S, Miyajima H: Hepatic iron overload associated with a decreased serum ceruloplasmin level in a novel clinical type of aceruloplasminemia. *Gastroenterology.* 131: 240-245; 2006

Koschinsky ML, Funk WD, van Oost BA, MacGillivray RTA: complete cDNA Sequence of human preceruloplasmin. *Proc Nat Acad Sci.* 81: 5086-5090; 1986

Kühlbrandt W: Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 282-295; 2004

Kühlbrandt W, Auer M, Scarborough GA: Structure of the P-type ATPases. *Curr Opin Struct Bio.* 8: 510-516; 1998

Kuhn J, Miyajima H, Takahashi Y, Kunath B, Hartmann-Klosterkoetter U, Cooper-Mahkorn D, Schaefer M, Bewermeyer H: Extrapyrmidal and cerebellar movement disorder in association with heterozygous ceruloplasmin gene mutation. *J Neurol.* 252: 111-113; 2005

Kumar N, Gross JB Jr, Ahlskog JE: Copper deficiency myelopathy produces a clinical picture like subacute combined degeneration. *Neurology.* 63: 33-39; 2004

---

La Fontaine S, Mercer JF: Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys.* 463: 149-167; 2007

La Fontaine S, Theophilos MB, Firth SD, Gould R, Parton RG, Mercer JFB: Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localization of Wnd, the murine homologue of the Wilson copper ATPase. *Hum Molec Genet.* 10: 361-370; 2001

Leggio L, Addolorato G, Loudianos G, Abenavoli L, Gasbarrini G: Genotype-phenotype correlation of the Wilson disease ATP7B gene. *Am J Med Gen.* 140: 933; 2006

Li XH, Lu Y, Ling Y, Fu QC, Xu J, Zang GQ, Zhou F, De-Min Y, Han Y, Zhang DH, Gong QM, Lu ZM, Kong XF, Wang JS, Zhang XX: Clinical and molecular characterization of Wilson's disease in China: identification of 14 novel mutations. *BMC Med Genet.* 12: 6; 2011

Lin JJ, Lin KL, Wang HS, Wong MC: Psychological presentations without hepatic involvement in Wilson disease. *Pediatr Neurol.* 35: 284-286; 2006

Lirong J, Jianjun J, Hua Z, Guoqiang F, Yuhao Z, Xiaoli P, Xiaomin Z, Yuwen Z, Yu M, Jie C, Jihong D, Yueshi M, Zhenyao M, Chunjiu Z: Hypoceruloplasminemia-related movement disorder without Kayser-Fleischer rings is different from Wilson disease and not involved in ATP7B mutation. *Eur J Neurol.* 16: 1130-1137; 2009

Logan JI, Harveyson KB, Wisdom GB, Hughes AE, Archbold GPR: Hereditary caeruloplasmin deficiency, dementia and diabetes mellitus. *QJM.* 87: 663-670; 1994

Loréal O, Turlin B, Pigeon C, Moisan A, Ropert M, Morice P, Gandon Y, Jouanolle AM, Vérin M, Hider RC, Yoshida K, Brissot P: Aceruloplasminemia: new clinical, pathophysiological and therapeutic insights. *J Hepatol.* 36: 851-856; 2002

---

Loudianos G, Kostic V, Solinas P, Lovicu M, Dessi V, Svetel M, Major T, Cao A: characterization of the molecular defect in the ATP7B gene. *Genet Test.* 7: 107-112; 2003

Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY: Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev.* 87: 1011-1046; 2007b

Lutsenko S, Copper MJ: Localisation of the Wilson's disease protein product to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 6004-6009; 1998

Lutsenko S, Leshane ES, Shinde U: Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys.* 463: 134-148; 2007a

Macintyre G, Gutfreund KS, Martin WR, Camicioli R, Cox DW: Value of an enzymatic assay for the determination of serum ceruloplasmin. *J Lab Clin Med.* 144: 294-301; 2004

Maier-Dobersberger T: Morbus Wilson. Diagnosestellung mit konventionellen und molekularbiologischen Methoden. *Dtsch Med Wochenschr.* 124: 493-496; 1999

Mariani R, Arosio C, Pelucchi S, Grisoli M, Piga A, Trombini P: Iron chelation therapy in aceruloplasminaemia: study of a patient with a novel missense mutation. *Gut.* 53: 756-758; 2004

Marsden CD: Wilson's disease. *Q J Med.* 65: 959-966; 1987

Materia S, Cater MA, Klomp LW, Mercer JF, La Fontaine S: Clusterin (apolipoprotein J), a molecular chaperone that facilitates degradation of the copper-ATPases ATP7A and ATP7B. *J Biol Chem.* 286: 10073-10083; 2011

McNeill A, Pondolfo M, Kuhn J, Shang H, Miyajima H: The neurological presentation of ceruloplasmin gene mutations. *Eur Neurol.* 60: 200-205; 2008

Merle U, Weiss KH, Eisenbach C, Tuma S, Ferenci P, Stremmel W: Truncating mutations in the Wilson disease gene ATP7B are associated with very low serum

---

ceruloplasmin oxidase activity and an early onset of Wilson disease. *BMC Gastroenterol.* 10: 8; 2010

Messerschmidt A, Huber R: The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *EurJ Biochem.* 187: 341-352; 1990

Meyer LA, Durley AP, Prohaska JR, Harris ZL: Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J Biol Chem.* 276: 36857-36861; 2001

Miyajima H: Aceruloplasminemia (2011). In: NCBI Bookshelf: GeneReviews. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1493/>] Tag des Zugriffs: 18. Juli 2011

Miyajima H: Genetic disorders affecting proteins of iron and copper metabolism: clinical implications. *Intern Med.* 41: 762-769; 2002

Miyajima H, Kohno S, Takahashi Y, Yonekawa O, Kanno T: Estimation of the gene frequency of aceruloplasminemia in Japan. *Neurology.* 53: 617-619; 1999

Miyajima M, Kono S, Takahashi Y, Sugimoto M, Sakamoto M, Sakai N: cerebellar ataxia associated with heteroallelic ceruloplasmin gene mutation. *Neurology.* 57: 2205-2210; 2001

Miyajima H, Nishimura Y, Mizoguchi K, Sakamoto M, Shimizu T, Honda N: Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration. *Neurology.* 37: 761-767; 1987

Miyajima H, Takahashi : Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism. *Biometals.* 16: 205-213; 2003

Miyajima H, Takahashi Y, Kono S: Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism. *Biometals.* 16: 205-213; 2003

---

Miyajima H, Takahashi Y, Kono S, Sugimoto M, Suzuki Y, Hishida A, Sakamoto M, Ouchi Y: Glucose and oxygen hypometabolism in aceruloplasminemia brains. *Intern Med.* 41: 186-190; 2002

Møller LB, Horn N, Jeppesen TD, Vissing J, Wibrand F, Jennum P, Ott P: Clinical presentation and mutations in Danish patients with Wilson disease. *Eur J Hum Genet.* 19: 935-941; 2011

Moriai S, Daimon M, Susa S, Kurimura M, Kawanami T, Kurita K, Kato T: Hypoceruloplasminemia in neurological diseases. *Intern Med.* 40: 548-549; 2001

Mukhopadhyay CK, Attieh ZK, Fox PL: Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science.* 279: 714-717; 1998

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology.* 24: 17-27; 1992

Nowrousian M: Nachweis und Kartierung von Genen auf der Ebene der DNA. In: Balling R, Bunse A, de Couet HG, Fischbach K, Glätzer K, Hagemann R, Hess O, Hollenberg CP, Jäckle H, Jürgens G, Kück U, Melchers I, Nickelsen J, Nordheim A, Nowrousian M, Pieler T, Piotrowski M, Pöggeler S, Scharl M, Schnetz K, Schoof H, Seyffert W, Sommer RJ, Speit G, Steinbach P, Tautz D. Lehrbuch der Genetik; (Hrsg) Seyffert, W. Aufl. 2, S. 1127-1129, Spektrum Verlag /Gustav Fischer Verlag, Heidelberg; 2003

Oder W, Grimm G, Kollegger H, Ferenci P, Schneider B, Deecke L: Neurological and neuropsychiatric spectrum of Wilson's disease: a prospective study of 45 cases. *J Neurol.* 238: 281-287; 1991

Ogimoto M, Anzai K, Takenoshita H, Kogawa K, Akehi Y, Yoshida R, Nakano M, Yoshida K, Ono J: Criteria for early identification of aceruloplasminemia. *Intern Med.* 50: 1415-1418; 2011

---

Oide T, Yoshida K, Kaneko K, Ohta M, Arima K: Iron overload and antioxidative role of perivascular astrocytes in aceruloplasminemia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 32: 170-176; 2006

Okamoto N, Wada S, Oga T, Kawabata Y, Baba Y, Habu D, Takeda Z, Wada Y: Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis. *Hum Genet.* 97: 755-758; 1996

Ortel TL, Takahashi N, Putnam FW: Structural model of human ceruloplasmin based on internal triplication, hydrophilic/hydrophobic character, and secondary structure of domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81: 4761-4765; 1984

Patel BN, David S: A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J Biol Chem.* 272: 20185-20190; 1997

Patel BN, Dunn RJ, David S: alternativ RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J Biol Chem.* 275: 4305-4310; 2000

Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, Zhu Q, Julian JP, David S: Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci.* 22: 6578-6586; 2002

Pérez-Aguilar F, Burguera JA, Benlloch S, Berenguer M, Rayón JM: Aceruloplasminemia in an asymptomatic patient with a new mutation. Diagnosis and family genetic analysis. *J Hepatol.* 42: 947-949; 2005

Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC: Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet.* 3: 1647-1656; 1994

Pfeiffer RF: Wilson's disease. *Semin Neurol.* 27: 123-132; 2007

---

Pilankatta R, Lewis D, Inesi G: Involvement of protein kinase D in expression and trafficking of ATP7B (copper ATPase). *J Biol Chem.* 286: 7389-7396; 2011

Piotrowski M: vom Protein zur DNA und zurück. In: Balling R, Bunse A, de Couet HG, Fischbach K, Glätzer K, Hagemann R, Hess O, Hollenberg CP, Jäckle H, Jürgens G, Kück U, Melchers I, Nickelsen J, Nordheim A, Nowrousian M, Pieler T, Piotrowski M, Pöggeler S, Scharl M, Schnetz K, Schoof H, Seyffert W, Sommer JR, Speit G, Steinbach P, Tautz D. Lehrbuch der Genetik; (Hrsg) Seyffert, W. Aufl.2, S. 1156-1158, Spektrum Verlag/ Gustav Fischer Verlag, Heidelberg; 2003

Piotrowski M: Trennung von Makromolekülen. In: Balling R, Bunse A, de Couet HG, Fischbach K, Glätzer K, Hagemann R, Hess O, Hollenberg CP, Jäckle H, Jürgens G, Kück U, Melchers I, Nickelsen J, Nordheim A, Nowrousian M, Pieler T, Piotrowski M, Pöggeler S, Scharl M, Schnetz K, Schoof H, Seyffert W, Sommer RJ, Speit G, Steinbach P, Tautz D. Lehrbuch der Genetik; (Hrsg) Seyffert, W. Aufl. 2 S. 1075, Spektrum Verlag/ Gustav Fischer Verlag, Heidelberg; 2003

Pyeritz RE: Genetic heterogeneity in Wilson disease: lessons from rare alleles. *Ann Intern Med.* 127: 70-72; 1997

Reddy KR: Late onset Wilson disease frequently overlooked. *Gastroenterol.* 131: 343; 2006

Richardson DR: Role of ceruloplasmin and ascorbate in cellular iron release. *J Lab Clin Med.* 2741: 454-465; 1999

Roberts EA, Cox DW: Wilson disease. *Bailliere's Clin Gastroenterol.* 12: 237-256; 1998

Roberts EA, Schilsky ML: Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology.* 47: 2089-2111; 2008

Roche-Sicot J, Benhamou JP: Acute intravascular hemolysis and acute liver failure associated as a first manifestation of Wilson's disease. *Ann Intern Med.* 86: 301-303; 1979

---

Roelofson H, Wolters H, Van Luyn MJ, Miura N, Kuipers F, Vonk RJ: Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology*. 119: 782-793; 2000

Rossi L, Lobardo MF, Cirilo MR, Rotilio G: Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochem Res*. 29: 493-504; 2004

Ross ME, Jacobson IM, Dienstag JL, Martin JB: Late-onset Wilson's disease with neurological involvement in the absence of Kayser-Fleischer rings. *Ann Neurol*. 17: 411-413; 1985

Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RTA, Hamerton LJ: Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Molec Genet*. 13: 285-292; 1987

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-1354; 1985

Saito T: Presenting symptoms and natural history of Wilson disease. *Eur J Pediatr*. 146: 261-265; 1987

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74: 5463-5467; 1977

Sato M, Gitlin JD: Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem*. 266: 5128-5134; 1991

Schaefer M, Hopkins RG, Failla ML, Gitlin JD: Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *Am J Physiol*. 276: G637-G646; 1999

Schilsky ML: Wilson disease: current status and the future. *Biochimie*. 91: 1278-1281; 2009

---

Schilsky ML: Wilson disease: genetic basis of copper toxicity, and natural history. *Semin Liver Dis.* 16: 83-95; 1996

Schöls L, Amoirides G, Büttner T, Przuntek H, Epplen JT, Riess O: Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes ?. *Ann Neurol.* 42: 924-932; 1997

Sechi G, Antoni Cocco G, Errigo A, Deiana L, Rosati G, Agnetti V, Stephen Paulus K, Mario Pes G: Three sisters with very-late-onset major depression and parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 13: 122-125; 2006

Sener RN: Diffusion MR imaging changes associated with Wilson disease. *Am J Neuroradiol.* 24: 965-967; 2003

Shah AB, Chernoc I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, Parano E, Pavone L, Evgrafov O, Ivanova-Smolenskava IA, Anneren G, Westermark K, Urrutia FH, Penchaszadeh GK, Sternlieb I, Scheinberg IH, Gilliam TC, Petrukhin K: Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet.* 61: 317-328; 1997

Shang HF, Jiang XF, Burgunder JM, Chen Q, Zhou D: Novel mutation in the ceruloplasmin gene causing a cognitive and movement disorder with diabetes mellitus. *Mov Disord.* 21: 2217-2220; 2006

Sokol RJ, Twedt D, McKim JM Jr, Devereaux MW, Karrer FM, Kam I, von Steigman G, Narkewicz MR, Bacon BR, Britton RS, Neuschwander-Tetri BA: Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington terriers with copper toxicosis. *Gastroenterology.* 107: 1788-1798; 1994

Sternlieb I: Perspectives on Wilson's disease. *Hepatology.* 12: 1234-1239; 1990

Stoj C, Kosmann DJ: Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: Implication for function. *FEBS Lett.* 554: 422-426; 2003

---

Svetel M, Kozić D, Stefanova E, Seminic R, Dragasevic N, Kostic VS: Dystonia in Wilson´s disease. *Mov Disord.* 16: 719-723; 2001

Takahashi Y, Miyajima H, Shirabe S, Nagataki S, Suenaga A, Gitlin JD: Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease. *Hum Mol Genet.* 5: 81-84; 1996

Takahashi N, Ortel TL, Putman FW: Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule. *Proc Nat Acad Sci.* 81: 390-394; 1984

Takehita Y, Shimizu N, Yamaguchi Y, Nakazono H, Saitou M, Fujikawa Y, Aoki T: Two families with Wilson disease in which siblings showed different phenotypes. *J Hum Genet.* 47: 543-547; 2002

Takeuchi Y, Yoshikawa M, Tsujino T, Kohno S, Tsukamoto N, Shiroy A, Kikuchi E, Fukui H, Miyajima H: A case of aceruloplasminaemia: abnormal serum ceruloplasmin protein without ferroxidase activity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 72: 543-545; 2002

Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pacone L, Brzustowicz LM, Devoto M, Peppercorn J, Bush AL, Sternlieb I, Pirastu M, Gusella JF, Evgrafov O, Penchaszadeh GK, Honig B, Edelman IS, Soar MB, Scheinberg IH, Gilliam TC: The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet.* 5: 344-350; 1993

Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW: The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet.* 9: 210-217; 1995

Tümer Z, Møller LB: Menkes disease. *Eur J Hum Genet.* 18: 511-518; 2010

Waggoner DJ, Bartnikas TB, Gitlin JD: The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis.* 6: 221-230; 1999

---

Walshe JM: History of Wilson's disease: 1912 to 2000. *Mov Disord.* 21: 142-147; 2006

Walshe JM: Wilson's disease: presenting symptoms. *Arch Dis Child.* 37: 253-256; 1962

Watt NT, Hooper NM: The response of neurones and glial cells to elevated copper. *Brain Res Bull.* 5: 219-224; 2001

Wiebers DO, Hollenhorst RW, Goldstein NP: The ophthalmologic manifestations of Wilson's disease. *Mayo Clin Proc.* 52: 409-416; 1977

Wilson DC, Phillips MJ, Cox DW, Roberts EA: Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. *J Pediatr.* 137: 719-722; 2000

Yang F, Friedrichs WE, Cupples RL, Bonifacio MJ, Stanford JA, Horton WA, Bowmann BH: Human ceruloplasmin: tissue specific expression of transcripts produced by alternative splicing. *J Biol Chem.* 265: 10780-10785; 1990

Yang XL, Miura N, Kawarada Y, Terada K, Petrukhin K, Gilliam TC, Sugiyama T: Two forms of Wilson disease protein produced by alternative splicing are localized in distinct cellular compartments. *Biochem J.* 326: 897-902; 1997

Yazaki M, Yoshida K, Nakamura A, Furihata K, Yonekawa M, Okabe T, Yamashita N, Ohta M, Ikeda S: A novel splicing mutation in the ceruloplasmin gene responsible for hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis. *J Neurol Sci.* 156: 30-34; 1998

Yomono H, Kurisaki H, Murayama S, Hebisawa A, Miyajima H, Takahashi Y: An autopsy case of multiple system atrophy with a heteroallelic ceruloplasmin gene mutation. *Rinsho Shinkeigaku.* 43: 398-402; 2003

Yoshida K, Furihata K, Takeda S, Nakamura A, Yamamoto K, Morita H, Hiyamuta S, Ikeda S, Shimizu N, Yanagisawa N: A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet.* 9: 267-272; 1995

Zischka H, Lichtmanegger J, Schmitt S, Jägemann N, Schulz S, Wartini D, Jennen L, Rust C, Larochette N, Galluzzi L, Chajes V, Bandow N, Gilles VS, DiSpirito AA, Esposito I, Goettlicher M, Summer KH, Kroemer G: Liver mitochondrial membrane crosslinking and destruction in a rat model of Wilson disease. *Clin Invest.* 121: 1508-1518; 2011

## 7 Anhänge

### 7.1 Tabellen

Tabelle 16: Mutationen im Ceruloplasmin-Gen

(wenn nicht anders vermerkt ist von homozygoter Vererbung auszugehen)

Lokalisation	Mutation auf DNA-Ebene	Mutation auf Protein-Ebene	Quelle
Exon 1/ nt.82	c.82 A>T	p.I9F	(Daimon et al., 2000)
Exon 1/ nt.188	c.188T >C	p.I44T	(Hochstrasser et al., 2004)
Intron 1/ nt.146+1	IVS1+1 G>A Akzeptorseite	vorzeitiges Stoppcodon	(Haemers et al., 2004)
Exon 2/ nt.172	c.172 G>C	p.R58H	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 2/ nt.319	c.319delT	p.V107X	(Ogimoto et al., 2011)
Intron 2/ nt.146+1	IVS2+1 G>A Donorseite	vorzeitiges Stoppcodon	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 3/ nt.436	c.436 C>G	p.Q146E	(Bosio et al., 2002) <sup>1)</sup>
Exon 3/ nt.574	c.574 G>A	p.G176R	(Kono und Miyajima, 2006) <sup>2)</sup>
Exon 3/ nt.587	c.587 C>G	p.P177R	(Hellman et al., 2002a) <sup>3)</sup>
Exon 3/ nt.603	c.603insA	Stoppcodon bei AS 194	(Okamoto et al., 1996)
Intron 3/ nt.607+1	IVS3+1 G>A Donorseite	Exon 3 wird rausgespleißt	(Hatanaka et al., 2003)
Exon 4/ nt.593	c.593 T>A	p.F198S	(Mariani et al., 2004)
Exon 4/ nt.643	c.643 C>T	p.R196X	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 5/ nt.848	c.848 G>C	p.W264S	(Shang et al., 2006)
Exon 6/ nt.1049	c.1049 C>A	p.A331N	(Pérez-Aguilar et al., 2005)

Lokalisation	Mutation auf DNA-Ebene	Mutation auf Protein-Ebene	Quelle
Exon 6/ nt.1123	c.1123 T>A	p.V356H	(Hellman et al., 2002b)
Intron 6/ nt.1209-2	IVS6-2 G>A Akzeptorseite	Stoppcodon bei AS 388	(Yazaki et al., 1998)
Exon 7/ nt.1257-1258	c.1257-1258delTT	p.Y401X	(Finkenstedt et al., 2010)
Exon 7/ nt.1286	c.1286insTACAC	p.D410X	(Miyajima et al., 2002)
Exon 9/ nt.1632	c.1632 T>A	p.N525E	(Hochstrasser et al., 2004)
Intron 10	IVS10-2 A>G Akzeptorseite	vorzeitiges Stoppcodon	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 11/ nt.1874	c.1874 G>A	p.G606E	(Yomono et al., 2003)
Exon 11/ nt.1918	c.1918delG	Stoppcodon bei AS 662	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 11/ nt.1948	c.1948 G>A	p.G631R	(Hellman et al., 2002b) <sup>2)</sup>
Exon 11/ nt.2066	c.2066delC	Stoppcodon bei AS 690	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 11/ nt.2068	c.2068delG	Stoppcodon bei AS 690	(Kono et al., 2000)
Exon 11	2bp Deletion	Stoppcodon bei AS 632	(Loréal et al., 2002) <sup>5)</sup>
Exon 12/ nt.2131	c.2131 C>A	p.Q692K	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 12/ nt.2139	c.2139 T>A	p.Y694X	(Loréal et al., 2002)
Exon 12/ nt.2158	c.2158 C>T	p.R701W	(Kuhn et al., 2005)
Exon 13/ nt 2378	c.2378 G>A	p.R774H	(Hochstrasser et al., 2004)
Exon 13/ nt.2389	c.2389delG	Stoppcodon bei AS 789	(Harris et al., 1995)
Exon 14/ nt.2482	c.2482delG	Stoppcodon bei AS 878	(Haemers et al., 2004)

Lokalisation	Mutation auf DNA-Ebene	Mutation auf Protein-Ebene	Quelle
Exon 14/ nt.2512	c.2512insT	Stoppcodon bei AS 833	(Hellman et al., 2000)
Intron 14/ nt.2554+1	IVS14+1 G>T Akzeptorseite	Exon 14 wird rausgespleißt	(Finkenstedt et al., 2010)
Exon 15/ nt.2630	c.2630 G>A	p.W858X	(Miyajima et al., 2001) <sup>5)</sup>
Exon 15/ nt.2603	c.2603delG	Stoppcodon bei AS 879	(Haemers et al., 2004)
Exon 16/ nt.2684	c.2684 G>C	p.G876A	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 16/ nt.2701	c.2701 C>T	p.R882X	(Takeuchi et al., 2002) <sup>6)</sup>
Intron 16	IVS16-1 G>A	vorzeitiges Stoppcodon	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 17/ nt.2917	c.2917ins A	Stoppcodon bei AS 983	(Bosio et al., 2002) <sup>1)</sup>
Exon 17/ nt.2953	c.2953 A>G	p.M966V	(Kono und Miyajima, 2006)
Exon 17/ nt.2962	c.2962 G>A	p.G969S	(Kono et al., 2006)
Exon 17/ nt.2991	c.2991 T>G	p.H978Q	(Takeuchi et al., 2002) <sup>6)</sup>
Intron 17/ nt.2879- 1	IVS17-1 G>A Akzeptorseite	p.D991X	(Takeuchi et al., 2002)

<sup>1)</sup> c.436 C>G und c.2917insA traten „compound“ heterzygot auf (Bosio et al., 2002)

<sup>2)</sup> c.587 C>G und c.1948 G>A traten „compound“ heterzygot auf (Kono und Miyajima, 2006)

<sup>3)</sup> c.587 C>G trat heteroallel auf (Hellman et al., 2002a)

<sup>4)</sup> exon 11 (2bp Deletion) und c.2139 T>A traten „compound“ heterzygot auf (Loréal et al., 2002)

<sup>5)</sup> c.2630 G>A trat heteroallel auf (Miyajima et al., 2001)

<sup>6)</sup> c.2701 C>T und c.2991 T>G traten „compound“ heterzygot auf (Takeuchi et al., 2002)

Tabelle 17: Zusammenfassung der klinischen Symptome bei Morbus Wilson  
(aus Diener und Hermann, 2008)

Organsystem	Symptomatik
Leber	<p>Asymptomatische Hepatomegalie und Transaminasenanstieg</p> <p>Isolierte Splenomegalie, Hepatosplenomegalie,</p> <p>Abdominalschmerz</p> <p>Chronische Transaminasenanstieg</p> <p>Fettleber</p> <p>Akute Hepatitis</p> <p>Chronische Hepatitis</p> <p>Leberzirrhose, Aszites, Ikterus</p> <p>Fulminantes Leberversagen</p>
Nervensystem	<p>Tremor, Ataxie, Koordinationstörung</p> <p>Flapping Tremor</p> <p>Schreibstörung, Feinmotorikstörung</p> <p>Dysarthrie, Dysphagie</p> <p>Dyskinesie, Bradykinese, Rigidität, Dystonie</p> <p>Gangstörung</p> <p>Hypersalivation</p> <p>Selten Spastik</p> <p>Selten epileptische Anfälle</p>
Psyche	<p>Persönlichkeitsstörung (Affekt und Impulskontrolle)</p> <p>Kognitive Störung</p> <p>Soziale Störung</p> <p>Depression</p> <p>Psychosen</p>
Nieren	<p>Renal tubuläre Azidose</p> <p>Proximale und/oder distale tubuläre Dysfunktion (Aminoazidurie, Hyperphosphaturie, Hyperkalzurie, Glukosurie, K-Verlust, Urikosurie, Bikarbonatmangel)</p> <p>Urolithiasis</p> <p>Peptidurie, Proteinurie</p>

---

Organsystem	Symptomatik
Augen	Kayser-Fleischer-Kornealring Hemeralopie Selten Sonnenblumenkatarakt
Herz	EKG-Veränderungen Arrhythmie Kardiomyopathie Autonome Dysfunktion
Magen-Darm- Trakt	Exokrine Pankreasinsuffizienz, Pankreatitis Cholelithiasis Spontane bakterielle Peritonitis
Muskel/ Skelett	Kupferinduzierte Rhabdomyolyse Hypokaliämische Muskelschwäche Osteoporose/ Osteomalazie Osteochondritis dissecans Vitamin-D-resistente Rachitis Arthritis/ Arthralgie Degenerative Wirbelsäulenveränderungen
Endokrinium	Amenorrhä, testikuläre Dysfunktion Selten Hypoparathyreoidismus Fehlgeburt
Hämatologisch	Sekundärschäden der Lebererkrankung (Koagulopathie), des Hypersplenismus (Leukopenie, Thrombozytopenie) Coombs-negative-Hämolyse, Anämie
Haut	Selten azurblaue Lunulae Acanthosis nigrans Hyperpigmentation Spider-Nävie

---

---

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

### 7.2.1 Allgemein

A	Adenin
aCP	Aceruloplasminämie
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Aufl.	Auflage
b	Basen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre DNA
CP	Ceruloplasmin
CT	Computertomographie
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
Cu	Kupfer
del	Deletion
dest.	destilliert
D.m.	Diabetes mellitus
DNA	Desoxynucleotidacid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	2'3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et. al	Et alteri („und die anderen“)
ex	exon
F	Forward (vorwärts)
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HCMD	Hypoceruloplasminemia-related movement disorder
het	heterozygot

---

hom	homozygot
Ins	Insertion
IVS	Intervening Sequence
Kap.	Kapitel
Lbj.	Lebensjahr
Lsg.	Lösung
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Multisystematrophie
mut	Mutation
N	Normwert
NBIA	Neurodegeneration with Brain Iron Akkumulation
NCBI	National Center for Biotechnology Information
R	Reverse (rückwärts)
SNP	Single Nucleotide Polymorphismu
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymin-5'-Triphosphat
5'UTR	5'Untranslated Region
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Variante
WND	Wilson-Gen

### 7.2.2 Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
M	Molarität (Einheit mol/l)
min	Minute
s	Sekunde
V	Volt

### 7.2.3 Vorsätze

k	Kilo ( = $10^3$ )
c	Zenti ( = $10^2$ )
m	Milli ( = $10^{-3}$ )
$\mu$	Micro ( = $10^{-6}$ )
n	Nano ( = $10^{-9}$ )
p	Pico ( = $10^{-12}$ )

### 7.2.4 Buchstabencode für die Aminosäuren

Tabelle 18: Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutaminsäure	E	Glu
Glutamin	Q	Gln
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

## 7.3 Ethikvotum

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau Prof. Dr. Zühlke  
Institut für Humangenetik

im Hause



*im focus des Lebens*  
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

**Ethik-Kommission**

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzende:

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Ratzeburger, Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Dr. Angelika Hüppe

Tel.: +49 451 799 2518

Fax: +49 451 799 2522

angelika.hueppe@uk-sh.de

Aktenzeichen: 09-067

Datum 27.05.2009

Sitzung der Ethik-Kommission am 19. Mai 2009

Antragsteller: Fr. Prof. Dr. Zühlke

Titel: *Mutationssuche bei Patienten mit Ataxie und erniedrigtem Coeruloplasmin*

Sehr verehrte Frau Zühlke,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgenden **Hinweises** keine Bedenken: Die Aufklärung sollte auf die geplante Studie ausgerichtet sein und ist auf Instituts-Briefbogen zu drucken.

*Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden. Nach Abschluss des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind. Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.*

Mit freundlichem Gruß bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe  
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe

(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)

Prof. Dr. Schweiger

(Psychiatrie)

Prof. Dr. Dendorfer

(Pharmakologie)

Frau Prof. E. Stubbe

(Theologin)

Prof. Dr. Borck

(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller

(Pflege)

Dr. Kaiser

(Kinderchirurgie)

Herr Dr. Fieber

(Richter am Amtsgericht Ahrensburg)

Prof. Schwinger

(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Mönig

(Medizinische Klinik I)

Frau Prof. Dr. M. Schrader

(Plastische Chirurgie, Stellv. Vors.)

Herr Prof. Schultz

(Pädiatrie)

Herr D. Stojan

(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

## 8 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. G. Gillessen-Kaesbach, Direktorin des Instituts für Humangenetik, für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung in ihrem Institut bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Christine Zühlke, die mir in allen Phasen meiner Arbeit mit konstruktiver Kritik und wertvollen Ratschlägen zur Seite stand.

Ich danke auch Frau Dr. M. Minnerop aus der Klinik für Neurologie im Universitätsklinikum Bonn für die Bereitstellung der Proben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau V. Bernard bedanken, die mich in die labortechnischen Arbeiten eingearbeitet hat und mir auch danach zur Seite stand. Auch allen anderen Damen des Labors bin ich zu Dank verpflichtet. Durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre mir entgegen gebrachte Sympathie, habe ich mich im Institut sehr wohl gefühlt.

Aber ohne meine Familie und meine Freunde wäre ich nie so weit gekommen. Sie haben mir Zeit, Geduld und Kraft gegeben und dafür möchte ich ihnen danken.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:



Name: Dorothea Henkel  
Geburtsdatum: 06.07.1984  
Geburtsort: Halle (Saale)

### Schulbildung:

1991 – 1995: „Grundschule am Westerplan“ Magdeburg  
1995 – 2003: „Ökumenisches Domgymnasium“ Magdeburg  
2003 – 2005: „Nobertus Gymnasium“ Magdeburg  
Abschluss: Abitur

### Studium:

10/2005: Beginn Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
09/2007: 1. ärztlich Prüfung  
03/2009 : Beginn der experimentellen Doktorarbeit am Institut für Humangenetik an der Universität zu Lübeck  
04/2012: 2. ärztliche Prüfung

### Praktisches Jahr:

Aug. – Nov.2010: Neurologie: Schönklinik Neustadt  
Dez. – März 2011: Innere Medizin: Curshmann Klinik Timmendorfer Strand  
April – Juli 2011: Chirurgie: Klinikum Itzehoe

## 10 Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Quellen, Literatur und Hilfsmittel, die von mir benutzt wurden, sind als solche gekennzeichnet. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe.

Lübeck, den 5.12.2011

Dorothea Henkel