

**Aus der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor**

in Zusammenarbeit mit dem

**Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Medizinische Genetik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. O. Rieß**

**Mutationsanalyse des HFE-Genes mittels DHPLC bei
Hämochromatose-Patienten und
Parkinson-Patienten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Nilgün Akbas
aus Reutlingen

2007

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Lauer

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Berg

Für Behzat und Ayse Akbas

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis _____	IV
Abbildungsverzeichnis _____	V
Abkürzungsverzeichnis _____	VI

1 Einleitung _____ **1**

1.1.	A+B ¹	Aufbau.....	3
1.2.	A+B	Eisen.....	4
1.2.1.	A+B	Eisen im menschlichen Organismus.....	4
1.2.2.	A+B	Regulierung des Eisenbestandes.....	6
1.2.3.	A+B	Die Eisenresorption.....	9
1.2.4.	A+B	Oxidativer Stress als Schädigungsmechanismus von Eisen...	15
1.3.1.	A	Die HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose.....	17
1.4.1.	B	Der idiopathische M. Parkinson.....	21
1.4.2.	B	Die Ätiologie des idiopathischen M. Parkinson.....	24
1.4.3.	B	Eisenhaushalt im Gehirn.....	28
1.5.	A+B	Das HFE-Protein.....	32
1.6.	A+B	Zielsetzung der Arbeit.....	36

2 Material _____ **37**

2.1.	A+B	Chemikalien.....	37
2.2.	A+B	Puffer und Lösungen	38
2.2.1.	A+B	Puffer für Enzyme.....	38
2.2.2.	A+B	Allgemeine Puffer.....	38
2.2.3.	A+B	Sonstige Lösungen.....	38
2.3.	A+B	Zusammenstellung der DNA-Proben.....	39
2.4.	A+B	Quelle der Referenzsequenz.....	39
2.5.	A+B	Übersicht der Primer.....	39
2.6.	A+B	DNA-Größenstandard.....	40
2.7.	A+B	Kits.....	41
2.8.	A+B	Geräte.....	41
2.9.	A+B	Verbrauchsmaterialien.....	42

¹ Anmerkung: die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile, deren Bindeglied die Untersuchung von Störungen im Eisenhaushalt darstellt; Teil A befasst sich dabei mit den entsprechenden Störungen bei der HFE-assoziierten Hereditären Hämochromatose (A), Teil B beim M. Parkinson (B).

3 Methoden **44**

3.1.1.	A	Zusammenstellung des Hämochromatose-Kollektives und der DNA-Proben.....	45
3.1.2.	A	Anlegen von Patientenbögen zur Erfassung der Klinik	47
3.2.	B	Zusammenstellung des Parkinson-Kollektives.....	50
3.3.1.	A	Vorbereiten der Arbeitsplatten im HH1-Kollektiv.....	52
3.3.2.	B	Konzentrationsbestimmung und Vorbereiten der Arbeitsplatten im Parkinson-Kollektiv.....	52
3.3.3.	A+B	Bestimmung der DNA-Konzentration und Fertigstellung der Arbeitsplatten.....	52
3.4.1.	A+B	Qualitätskontrolle der DNA mit Hilfe der PCR.....	54
3.4.2.	A+B	Agarosegelelektrophorese zur Qualitätskontrolle der Amplifikate.....	56
3.4.3.	A+B	Heteroduplex-Bildung für die DHPLC-Analyse.....	57
3.4.4.	A+B	Mutationsscreening mit Hilfe der DHPLC.....	58
3.5.1.	A+B	Primer-Design und Etablierung der PCR-Bedingungen.....	60
3.5.2.	A+B	DHPLC-Methodenoptimierung.....	61
3.5.3.	A+B	Vorbereiten der Proben für die DHPLC.....	63
3.5.4.	A+B	Interpretation eines Elutionsprofils.....	64
3.5.5.	A+B	Zyklische Sequenzierung zur Absicherung einer Mutation.....	65
3.6.1.	A	Deskriptive Statistik zu erhobenen Daten des HH1-Kollektives	71
3.6.2.	B	Statistische Auswertung am Parkinson-Kollektiv.....	72
3.6.3.	B	Strukturgleichheit von Patienten und Kontrollkollektiv.....	73
3.6.4.	B	Genotypverteilung und genotypische Homogenität beider Kollektive.....	74
3.6.5.	B	Überprüfung auf genotypische und allelische Assoziation zwischen den Loci.....	76

4 Ergebnisse **78**

4.1.	A+B	Zusammenstellung von Patienten- und Kontrollpersonen anhand der klinischen Symptomatik.....	79
4.2.1.	A+B	Qualitätsüberprüfung der DNA.....	80
4.2.2.	A+B	Optimierung der PCR-Bedingungen.....	81
4.3.1.	A+B	Screening auf Mutationen des HFE-Genes mittels DHPLC.....	83
4.3.2.	A+B	DHPLC-Bedingungen für die Analyse des HFE-Genes.....	85
4.3.3.	A+B	Ergebnis des Screenings auf HFE-Mutationen	86
4.3.4.	A+B	Stammbaumanalyse zum Nachweis der Kopplung der H63D-Mutation mit der intronischen Sequenzvariation.....	101
4.3.	A	Deskriptive Statistik anhand der erhobenen Ergebnisse am Hämochromatose-Kollektiv.....	103

4.3.1.	A	Darstellung der Genotypverteilung innerhalb der einzelnen Gruppen.....	104
4.3.2.	A	Darstellung der Werte für Ferritin und Transferrinsättigung innerhalb der einzelnen Gruppen.....	109
4.3.3.	A	Zusammenfassung der Patientenbögen.....	114
4.4.	B	Statistische Auswertung des M. Parkinson-Kollektives	121
4.4.1.	B	Strukturgleichheit von Patienten- und Kontroll-Kollektiv.....	121
4.4.2.	B	Genotypverteilung und genotypische Homogenität der beiden Kollektive.....	125
4.4.3.	B	Überprüfung der Assoziation verschiedener Loci.....	127

5 Diskussion _____ **129**

5.1.1.	A	Ergebnisse des Mutationsscreenings im HH1-Kollektiv.....	131
5.1.2.	A	Mögliche Zusammenhänge der Mutationen im HFE-Gen mit der klinischen Manifestation der HH1.....	133
5.1.3.	A	Deskriptive statistische Auswertung der Ergebnisse im HH1-Kollektiv.....	136
5.2.1.	B	Ergebnisse des Mutationsscreenings im MP- und Kontrollkollektiv.....	138
5.2.2.	B	Mögliche Zusammenhänge der Mutationen im HFE-Gen mit der klinischen Manifestation des MP.....	139
5.2.3.	B	Statistische Auswertung der Ergebnisse beim MP	141

6 Zusammenfassung _____ **145**

6	A	HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose.....	145
6	B	Idiopathischer M. Parkinson.....	147

7 Literatur _____ **150**

Danksagung _____ **170**

Lebenslauf _____ **171**

Tabellenverzeichnis

1.1.	Übersicht des Eisenhaushaltes im menschlichen Organismus.....	4
1.2.	Überblick der Änderungen in der Syntheserate der Moleküle bei Eisenmangel bzw. -überschuss.....	9
1.3.	Übersicht über die verschiedenen Formen der Hereditären Hämochromatose.....	14
1.4.	Übersicht der Häufigkeit der Symptome bei manifester HFE-assoziiierter HH und deren zugrundeliegender Pathomechanismus...	19
2.1.	Übersicht der einzelnen als Primer eingesetzten Oligonucleotide des HFE-Genes mit Angabe des GC-Gehaltes und der Schmelztemperatur.....	40
3.1.	Auflistung der Kriterien zur Einteilung der Patienten in Gruppen.....	46
3.2.	Muster eines Patientenbogens zur Erhebung relevanter Patientenbezogener Daten.....	47
3.3.	Übersicht der Einzelkomponenten in der PCR für die Amplifikation der 6 Exons des HFE-Genes.....	55
3.4.	Reaktionsbedingungen für die PCR im Thermocycler für die Amplifikation der 6 Exons des HFE-Genes.....	55
3.5.	Ansatz für die Sequenzierreaktion.....	67
3.6.	Bedingungen am Thermocycler für die Sequenzierreaktion.....	68
3.7.	Darstellung der einzelnen Waschschrte für die Sequenzierung.....	69
4.1.	PCR-Bedingungen für die Amplifikation der 6 Exons des HFE-Genes	82
4.2.	DHPLC-Bedingungen zur Analyse der 6 Fragmente des HFE-Genes.....	85
4.3.	DHPLC-Elutionsprofile von <i>Pooling</i> -Proben unauffälliger PCR-Fragmente.....	86
4.4.	Elutionsprofile der Fragmente 1,5 und 6.....	89
4.5.	Auffällige Elutionsprofile der Exons 2 und 4 mit Sequenzierung.....	94
4.6.	Überblick der sequenzierten Proben.....	100
4.7.	Einzeldarstellung der Verteilung der Genotypen innerhalb der Gruppen.....	105
4.8.	Darstellung der Ferritinwerte in $\mu\text{g}\%$	110
4.9.	Darstellung der Werte für die Transferrinsättigung in %.....	111
4.10.	Darstellung der Verteilung der Ferritin- und Transferrinsättigungswerte für die Patienten mit den drei Hauptmutationen.....	113
4.11.	Zusammenfassung der Patientenbögen für die Männer.....	114
4.12.	Zusammenfassung der Patientenbögen für die Frauen.....	117
4.13.	Ergebnisse der Allelfrequenz, des Hardy-Weinberg-Tests und des Tests auf genotypische Homogenität in den zwei Kollektiven.....	126
4.14.	Auflistung der gefundenen Haplotypen mit maximal einem heterozygoten Locus.....	127
4.15.	Auflistung der Haplotypenhäufigkeit im Vergleich.....	128

Abbildungsverzeichnis

3-1	Schema zur Vorgehensweise.....	44
3-2	Schmelzprofile zur Ermittlung der Analysetemperatur von Exon 4..	62
3-3	Ermittlung des Startgradienten.....	63
3-4	Kontingenztafel zur Überprüfung der homogenen Genotypverteilung.....	75
4-1	Schema zur Vorgehensweise.....	78
4-2	Qualitätsüberprüfung der DNA.....	80
4-3	Gradienten-PCR für die Amplifikation von Intron 2.....	81
4-4	Diagramm zur Veranschaulichung des Vorgehens.....	84
4-5	Gegenüberstellung einer <i>Pooling</i> -Probe mit den Einzelproben von Fragment 4.....	92
4-6	Stammbaumanalyse der Ceph-Familie Nr. 1413.....	102
4-7	Schema zur Vorgehensweise mit den erhobenen Daten und Ziel der Auswertung.....	103
4-8	Übersicht über die Genotypen und deren Verteilung innerhalb der Gruppen.....	106
4-9	Vergleich der Geschlechterverteilung innerhalb der Kollektive.....	121
4-10	Darstellung der Altersverteilung innerhalb der Kollektive als Boxplots.....	122
4-11	Darstellung der Ort-Herkunft der Studienteilnehmer.....	123
4-12	Vergleichende Darstellung der Echogenität zwischen den Kollektiven.....	124

Abkürzungsverzeichnis

aqua bidest.	Doppelt destilliertes, vollentsalztes Wasser
bp	Basenpaar(e)
Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphtalein
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm ²	Zentimeter im Quadrat
DHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'triphosphat
DTCS	Dye terminator cycle sequencing
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere Mitarbeiter
g	Gramm
h	Stunde
HCl _(aq)	Salzsäure
k	Kilo-
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat-Tetrahydrat
l	Liter
m	Milli-, Meter
M	molar
min.	Minute(n)
μ	Mikro-
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology
n	Nano-
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
p	Pico-

sec.	Sekunde(n)
SLS	Sample Loading Solution
SN	Substantia nigra
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEAA	Triethylammoniumacetat
T _m	Schmelztemperatur
Tris-	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen, Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent, ml/100ml Lösung
w/v	Gewichtsprözent, g/100ml
z.B.	Zum Beispiel

Purin-/Pyrimidinbasen:

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Aminosäuren:

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

1. Einleitung

Die Suche nach der Vererbbarkeit bestimmter Merkmale und Eigenschaften nahm ihren Anfang bereits im Jahre 1865 mit den Arbeiten des Augustiner-Mönchs Gregor Mendel. Dieser stellte Regeln bezüglich der Vererbung gut abgrenzbarer Merkmalspaare auf, welche er aus seinen Kreuzungsversuchen an Erbsen ableitete. In Analogie zu den Arbeiten Mendels befasste sich die noch unausgereifte Genetik des frühen 20. Jahrhunderts zunächst ebenfalls nur mit Krankheiten, deren Erbgang monogen und damit einfach herzuleiten war. Von Bedeutung war außerdem, dass das Vorliegen dieser Erkrankungen mit den Mitteln der zeitgenössischen Medizin eindeutig abgegrenzt werden konnte. Zu dieser Art der monogen vererbten, gut abgrenzbaren Erkrankungen wird auch die in dieser Arbeit untersuchte HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose (Abkürzung: HFE-assoziierte HH oder HH1) gezählt, bei der eine Eisenüberladung des Organismus aufgrund einer Störung im Eisenstoffwechsel vorliegt. Obwohl bereits im Jahre 1936 eine genetische Grundlage dieser Erkrankung vermutet wurde, konnten Veränderungen im HFE-Gen als Ursache für den Großteil der Hereditären Hämochromatosen erst im Jahre 1996 identifiziert werden und sind seitdem Gegenstand intensiver Forschung. Auch ein Teil der vorliegenden Arbeit widmet sich der Erforschung von Veränderungen im HFE-Gen bei dieser Erkrankung und den mit der Eisenüberladung assoziierten klinischen Symptomen.

Im Gegensatz zur monogen vererbten HH1 ist die Ätiologie des ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Morbus Parkinson (MP) noch weitgehend ungeklärt. Es ist aber von einer multifaktoriell bedingten Genese auszugehen, bei der die Abgrenzung des Einflusses der genetischen Komponente von der Beeinflussung durch diverse Umweltfaktoren nicht immer einfach ist. Zu den möglichen Einflussfaktoren wird dabei u.a. eine Störung im Eisenhaushalt gezählt. Hinweisend hierfür war der mittels post-mortem Studien geführte Nachweis eines erhöhten Eisengehalts in der Substantia nigra (SN) durch Lhermitte et al. im Jahre 1924. Diese Beobachtung konnte in mehreren folgenden Studien bestätigt werden. Demnach scheint eine Untersuchung der

Gene, welche die Eisenaufnahme und -speicherung im Körper regulieren, bei der Suche nach möglichen Einflussfaktoren bezüglich der Ätiologie der Erkrankung sinnvoll, wobei auch das HFE-Gen zu dieser Gruppe von Genen gezählt wird. Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich aus diesem Grund mit der Erforschung von Veränderungen im HFE-Gen beim idiopathischen MP. Dabei ist anzumerken, dass im Falle multifaktoriell bedingter Erkrankungen eine Aussage über den Stellenwert diverser Einflussfaktoren sehr viel schwieriger ist als bei den monogen vererbten Krankheiten und damit eine neue Herausforderung an die moderne Genetik darstellt.

1.1..A+B **Aufbau**

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei sehr unterschiedliche Krankheitsbilder, die HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose (HH1) und der M. Parkinson (MP), im Hinblick auf das Vorliegen von Sequenzvariationen im HFE-Gen und einer daraus folgenden Eisenstoffwechselstörung hin untersucht. Die Störung im Eisenhaushalt bildet demnach die gemeinsame Grundlage dieser zwei hier untersuchten Krankheitsbilder. Daher scheint es sinnvoll, das Kapitel über die Bedeutung des Eisens im menschlichen Organismus und über die Folgen einer Eisenstoffwechselstörung für den Körper den Abschnitten über die beiden Krankheitsbilder voranzustellen. Diese werden sodann separat voneinander besprochen, wobei zur besseren Übersicht die Zugehörigkeit des jeweiligen Kapitels mit Hilfe von Großbuchstaben kenntlich gemacht wird (A steht für HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose, B für den M. Parkinson). In Anlehnung an diese Vorarbeit wird schließlich ein Überblick über die Rolle des HFE-Genes gegeben, welches eine wichtige Funktion in der Regulierung der Eisenresorption erfüllt und dessen molekulargenetische Untersuchung Thema der vorliegenden Arbeit ist.

1.2.A+B Eisen

1.2.1.A+B Eisen im menschlichen Organismus

Der Gesamtbestand an Eisen im menschlichen Organismus beträgt 3-4 g. Davon entfallen 80 % als sog. „Funktionseisen“ auf das Hämoglobin, Myoglobin und eisenhaltige Enzyme, 20 % werden als Depoteisen vorwiegend in Leber, Knochenmark, Milz und Darmmukosa in Form von Ferritin oder Hämosiderin gespeichert und nur 0,1-0,2 % sind als Transporteisen für die aktuelle Versorgung der Organe frei verfügbar.

Die Aufnahme des Eisens erfolgt im Duodenum und oberen Jejunum und beträgt durchschnittlich 1-2 mg pro Tag. Dieser Wert ist abhängig vom Eisen-gehalt der Nahrung, der Art der aufgenommenen Eisenverbindungen, dem Gehalt der Nahrung an verschiedenen Zusätzen, der Azidität des Magensafts sowie von der Darmmotilität und nicht zuletzt von den Bedürfnissen des Organismus. Die gleiche Menge wird täglich ausgeschieden, wobei dem Stuhl und der Galle hierbei die entscheidenden Rollen zukommen (Chemnitz et al., 2000).

Tab. 1.1. Übersicht des Eisenhaushaltes im menschlichen Organismus (nach Ohlsen, 1982)

Gesamtbestand an Eisen	Frauen	3,5-4 g
	Männer	4-5 g
Funktionseisen	insgesamt	80 %
	Hämoglobin	70 %
	Eisenhaltige Enzyme, Myoglobin, Hämine	10 %
Depoteisen	Ferritin, Hämosiderin	20 %
Transporteisen	An Transferrin gebunden	0,1-0,2 %
Tägliche Aufnahme	Mukosa im Duodenum und oberem Jejunum	1-2 mg
Tägliche Ausscheidung	insgesamt	1-2 mg
	Stuhl	0,6 mg
	Galle	0,5 mg
	Schweiß	0,3 mg
	Urin	0,1 mg

Das bei den in der Tabelle 1.1. aufgeführten Prozessen benötigte Eisen wird aber nicht nur mit der Nahrung aufgenommen. Dies wird augenscheinlich, wenn man bedenkt, dass der tägliche Eisenbedarf allein für die Erythropoese bereits 25 mg beträgt, aber nur 1-2 mg pro Tag resorbiert werden. In der Tat stammt der Großteil dieses Eisens aus dem Recycling spezialisierter Makrophagen, welche alte oder geschädigte Erythrocyten phagozytieren und das hierbei freiwerdende Eisen wieder der Erythropoese zur Verfügung stellen (Brittenham, 1994). Neben diesem Recycling-Mechanismus besitzen bestimmte Organe außerdem schnell mobilisierbare Eisenspeicher, so dass ein nahrungsbedingter Eisenmangel zumindest kurzfristig gut kompensiert werden kann.

Kommt es allerdings im Falle einer langfristigen Eisenrestriktion zu größeren Abweichungen vom Normwert für Eisen, so ist mit schweren Störungen zu rechnen, welche durch den Ausfall der eisenabhängigen Reaktionsvorgänge bedingt werden. Geht man dabei vom Extremfall aus, so wird eine übermäßige Reduktion von Eisen durch Verursachung einer schweren Anämie und dem Stillstand der Zellproliferation zum Tode führen. Aber auch die Übersättigung mit Eisen ist auf längere Sicht durch die Schädigung und den dadurch bedingten Ausfall zahlreicher Organe tödlich (Hentze et al., 2004).

1.2.2.A+B Regulierung des Eisenbestandes

Aus dem bisher Gesagten ist leicht ersichtlich, dass die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Eisenaufnahme und -ausscheidung von enormer Bedeutung ist. Aber auch die Regulierbarkeit dieser Mechanismen ist entscheidend, um auf veränderte Bedürfnisse des Organismus adäquat und schnell reagieren zu können.

Bevor nun auf die komplexen Mechanismen dieser Regulierung eingegangen wird, sollen zum besseren Verständnis vorab einige Proteine und deren Funktion innerhalb dieses Systems erklärt werden. Auch im Hinblick auf den Ergebnisteil dieser Arbeit scheint dies sinnvoll, da einige der folgenden Proteine im Rahmen dieser Arbeit als Marker für das Vorliegen der entsprechenden Krankheit dienen.

Transferrin (Tf): Tf ist ein Glykoprotein mit zwei Eisenbindungsstellen für dreiwertiges Eisen (Crichton, 1990). Es wird in der Leber synthetisiert, wobei die Syntheserate durch den jeweiligen Eisenbedarf reguliert wird: Sie steigt bei Eisenmangel und wird reduziert bei Eisenübersättigung (Heilmann, 1981; Seligmann et al., 1988). Tf dient dem Großteil der Zellen des Organismus als Eisenlieferant und wird nach Bindung an den Transferrinrezeptor in die Zelle aufgenommen (Young et al., 1981; Cole et al., 1983; Morgan et al., 1986), wo es nach Abgabe der Eisenatome als Apotransferrin wieder freigesetzt wird (Neutra et al., 1985). Dabei besitzt Transferrin mit zwei gebundenen Eisenatomen die höchste Affinität zum Transferrinrezeptor, gefolgt von Transferrin mit einem Eisenatom und schließlich dem Apotransferrin (Young et al., 1984; Hueber et al., 1985).

Transferrinsättigung (TfS): Das zirkulierende Transferrin ist unter normalen Bedingungen nur zu durchschnittlich 30 % mit Eisen beladen, während der Rest als Apotransferrin vorliegt. Dieser Wert richtet sich nach dem Eisenbestand im Organismus und steigt bei Eisenüberschuss bzw. sinkt bei Eisenmangel (Heilmann, 1981; Seligmann et al., 1988). Während das Verhältnis von

Transferrin mit zwei Eisenatomen zum Transferrin mit einem Eisenatom bei einer TfS von 30 % bei 1:2 liegt, wird es bei einer TfS von 15 % auf das Verhältnis von 1:5 herabgesetzt (Young et al., 1984; Huebers et al., 1985). Die TfS ist darüber hinaus ausschlaggebend bei der Regulation der Eisenresorption aus der Nahrung (vgl. 1.1.3.A+B).

Transferrinrezeptor (TfR): Der Rezeptor besteht aus zwei identischen Untereinheiten, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Trowbridge et al., 1984). Er bindet eisenhaltiges Transferrin und versorgt so die Zellen mit Eisen. Hierzu wird der nach Bindung des Transferrins an seinen Rezeptor entstandene Komplex durch Endocytose in die Zelle aufgenommen und durch Ansäuerung des Inhalts die Konformation der Moleküle im Endosom verändert (Neutra et al., 1985). Die Bindung des Eisens wird dabei so weit gelockert, dass es nach der Reduktion zu zweiwertigem Eisen durch eine noch nicht genau identifizierte Ferrireduktase mit Hilfe des Eisentransporters DMT1 aus den Vesikeln heraus und in das Zytoplasma exportiert werden kann (Fleming et al., 1998; Cheng et al., 2004). Das nunmehr zytoplasmatische Eisen wird verschiedenen Syntheseprozessen in der Zelle zugeführt, in Ferritin sequestriert (Torti et al., 2002) oder, wenn es sich um Hepatocyten handelt, an neu synthetisiertes Transferrin gebunden und wieder freigesetzt. Das nach der Eisenabgabe entstandene Apotransferrin bleibt zunächst noch an seinen Rezeptor gebunden und wird erst nach seinem Transport an die Zelloberfläche freigegeben (Chemnitz et al., 2000).

Wichtig ist auch zu wissen, dass zwei Arten dieses Rezeptors existieren: TfR1 und TfR2. Dabei ist der ubiquitär vorkommende TfR1 für die Eisenaufnahme und damit Eisenversorgung der meisten Zellarten des Körpers verantwortlich (Anmerkung: der TfR1 besitzt eine höhere Affinität zum Tf als TfR2) (Heilmann, 1981; Seligmann et al., 1988). Die Syntheserate dieses Rezeptors wird auf der Stufe der mRNA reguliert. Das 3'-Ende der mRNA beinhaltet hierzu vier Eisenregulatorische Elemente (IRE), welche nach Bindung eines IRE-bindenden Proteins bei Eisenmangel den Abbau der mRNA supprimieren und damit zu

einer vermehrten Synthese führen (Casey et al., 1989; Koeller et al., 1989; Leibold et al., 1990).

Der TfR2 wiederum wird hauptsächlich von Hepatocyten sowie duodenalen Kryptenzellen und Zellen der Hämatopoese exprimiert, wobei die mRNA keine Bindungsstellen für IRE-bindende Proteine besitzt. Damit scheint die Syntheserate unabhängig vom aktuellen Eisenbestand zu sein (Kawabata et al., 1999; Hentze et al., 2004). Der Rezeptor soll außerdem bei der Aufnahme von Eisen in Hepatocyten und bei der Regulation der Eisenresorption aus der Nahrung beteiligt sein (vgl. auch unten) (Camaschella et al., 2000; Roetto et al., 2003; Fleming et al., 2002).

Obwohl die hier beschriebene TfR-vermittelte Aufnahme von Eisen den wohl wichtigsten Vorgang zur Eisenversorgung der Zellen darstellt, existieren auch andere, nicht-Transferrin-gebundene Aufnahmemechanismen, auf die hier allerdings nicht näher eingegangen werden soll.

Ferritin: Ferritin ist ein sphärisches Molekül bestehend aus 24 H- und L-Untereinheiten, welches bis zu 4500 Eisenatome in einem mikrokristallinen Kern als polymeres Eisenoxyhydroxidphosphat inkorporieren kann. Das Verhältnis der H- zur L-Untereinheit variiert je nach Zelltyp (Harrison, 1977; Munro et al., 1978; Theil, 1987). Dabei besitzt die H-Untereinheit eine Ferroxidase-Aktivität, so dass zweiwertiges Eisen vor der Sequestrierung oxidiert werden kann (Hentze et al., 2004). Ferritin findet sich in allen Zellen des menschlichen Organismus, wobei der Hauptteil in Leber und Milz vorliegt (Munro et al., 1978; Theil, 1987). Sein Abbau erfolgt in Proteasomen oder sekundären Lysosomen, wo mitunter auch Hämosiderin, ein heterogenes Aggregat aus Eisen, partiell abgebautem Ferritin, Proteinen, Fetten und Zuckern entstehen kann (Zähringer et al., 1980; Drews et al., 1980; Halliday et al., 1988). Die Elimination erfolgt dann vorrangig durch Fusion der Lysosomen mit den Canaliculismembranen und durch Freisetzung ihres Inhalts (Hentze et al., 2004).

Auch die Syntheserate dieses Moleküls wird auf der Stufe der Translation der Ferritin-mRNA reguliert (Torti et al., 2002): An der 5'-Region der nicht-

translatierten mRNA befindet sich ein Eisen-regulatorisches Element (IRE), wobei es sich um eine haarnadelförmige Struktur aus hochkonservierten, unpaaren Nukleotiden handelt (Aziz et al., 1987; Rouault et al., 1988; Haile et al., 1989). Bei Eisenmangel setzt sich ein IRE-bindendes Protein auf diese Struktur und supprimiert die Translation der mRNA und somit auch die Ferritinsynthese (Rouault et al., 1988).

Die bisher genannten Moleküle sind demnach als Variablen des Eisenbestands im Körper anzusehen. Tabelle 1.2. gibt hierzu einen Überblick der jeweils stattfindenden Veränderungen. Mit Hilfe von Messungen der Menge dieser Moleküle kann man somit Aussagen über aktuelle Verhältnisse bezüglich des Eisengehaltes des Organismus machen (vgl. 1.2.1.A).

Tab. 1.2. Überblick der Änderungen in der Syntheserate der Moleküle bei Eisenmangel- bzw. -überschuss

Abkürzungen: Tf: Transferrin; TfS: Transferrinsättigung; TfR: Transferrinrezeptor

	Tf	TfS [%]	TfR	Ferritin
Bei Eisenmangel	↑	↓	↑	↓
Bei Eisenüberschuss	↓	↑	↓	↑

1.2.3.A+B Die Eisenresorption

a. Aufbau

Bei der Regulierung des Eisenbestandes im menschlichen Organismus kommt der Eisenresorption die eigentliche Schlüsselfunktion zu, da der Körper nur eingeschränkte Ausscheidungsmechanismen für dieses Metall besitzt. Die Eisenresorption wiederum kann sowohl durch externe Faktoren, wie Zusammensetzung der Nahrung, als auch durch gastrointestinale Verhältnisse, wie z.B. durch die Darmmotilität, beeinflusst werden. Darüber hinaus wird die Resorption mittels einer komplexen Signalkaskade diverser Botenstoffe

reguliert, welche die aktuellen Bedürfnisse des Körpers signalisieren (Chemnitz et al., 2000).

Bezüglich dieser Mechanismen existieren bis dato viele verschiedene, sich durchaus auch widersprechende Modelle. Im Folgenden soll auf einige dieser näher eingegangen werden, wobei das Modell von Frazer et al. (2003) eine sehr gute Übersicht der Eisenstoffwechselregulation unter normalen Bedingungen sowie bei den verschiedenen Subtypen der Hereditären Hämochromatosen (HH) zu bieten scheint. Daher soll dieses als Grundlage für die folgende Übersicht dienen und dabei fallweise durch anderweitige Quellen ergänzt werden.

b. Modell zur Regulierung der Eisenresorption

In der Nahrung liegt Eisen vor allem in der dreiwertigen Form vor und muss, um resorbiert werden zu können, zunächst zu zweiwertigem Eisen reduziert werden. Diese Reduktion findet mittels eines Enzyms, der Ferrireduktase Dcytb (McKie et al., 2001), an der luminalen Enterocytenmembran statt. Der Eisen-transporter DMT1 ermöglicht als einer der wohl wichtigsten Importkanäle im Darm sodann die Aufnahme des reduzierten Eisens, welches in den intrazellulären Eisenpool gelangt (Fleming et al., 1997; Gunshin et al., 1997). Dies unterscheidet die Eisenaufnahme im Darm von den restlichen Körperzellen, die das Eisen vorwiegend über das Transferrin-Transport-System erhalten (Young et al., 1981; Cole et al., 1983; Morgan et al., 1986). Der Mechanismus für den anschließenden Transport aus der Zelle heraus ist noch nicht genau geklärt. Neben anderen Molekülen wird eine Vermittlung von Seiten des Ferroportinmoleküls vermutet. Dieser mit Ireg1 identische Transporter ist das bislang am genauesten untersuchte zelluläre Exportsystem für Eisen. Es konnte in duodenalen Enterocyten, Makrophagen, Hepatocyten, plazentaren Syncytiotrophoblastzellen und in einigen Gehirnzellarten nachgewiesen werden (Abboud et al., 2000; Donovan et al., 2000; McKie et al., 2000). Da es nur zweiwertiges Eisen transportieren kann, ist die Beteiligung einer Ferroxidase für die Beladung von Apotransferrinmolekülen nötig, da Transferrin wiederum nur dreiwertiges Eisen binden kann. Im Duodenum wird die Funktion der Ferroxidase durch das Molekül Hephaestin (Vulpe et al., 1999), in den restlichen Geweben durch

Coeruloplasmin (Harris et al., 1999) erfüllt. Neben seiner Funktion als Eisen-transporter scheint das Ferroportin außerdem von Bedeutung bei der Regulierung der Eisenaufnahme aus der Nahrung zu sein. Bei Eisenmangel wird es hochreguliert und exportiert vermehrt Eisen aus der Zelle, was wiederum einen Reiz für die Erhöhung der Syntheserate der vorangehenden Moleküle darstellt. Da aber die Hochregulation der Ferroportinsynthese selber hierzu verschiedener Signale zur Aktivierung bedarf, scheint es damit kein Messfühler für den Eisenbestand und -bedarf des Organismus zu sein (Frazer et al., 2003), sondern eher auf Signale anderen Ursprungs zu reagieren.

Neuere Untersuchungen weisen dabei darauf hin, dass es sich bei diesen Signalen um Botenstoffe aus der Leber handelt, womit dieses Organ als primärer Regulator des Eisenbestands angesehen werden kann. Bestimmte Störungen in der Exprimierung dieser hepatischen Botenstoffe sollen entsprechend zur Ausbildung von Krankheitsbildern wie den HH-Subtypen mit ihrer Eisenakkumulation führen können (Frazer et al., 2003).

Eines der wichtigsten hepatischen Proteine scheint hierbei das Hepcidin zu sein, welches vom HAMP-Gen codiert wird (Nicolas et al., 2001; Fleming et al., 2001). Es führt über noch nicht genau definierte Veränderungen an den Enterocyten zu einer Hemmung der Resorption von Eisen im Darm und zu einer Reduktion der Eisenabgabe aus Makrophagen und Syncytiotrophoblastzellen (Frazer et al., 2002). Bei bestimmten Mutationen in diesem Gen tritt eine schwere Hämochromatose bei relativ jungen Patienten auf (Roetto et al., 2003). Die Syntheserate dieses Proteins ist im Normalfall abhängig von der Transferrinsättigung (Frazer et al., 2002) und damit der Eisenkonzentration im Körper und kann gemäß dem Modell von Frazer et al. auf zweierlei Arten erhöht werden: Über das HFE-Protein und den TfR2. Im Folgenden sollen diese beiden Mechanismen näher erläutert werden.

c. Das hepatische Regulierungsmodell nach Frazer et al.

Bei einer Eisenüberladung des Körpers steigt zunächst die Transferrinsättigung als eine Variable des Eisenbestandes im Organismus an, wobei das Tf unter diesen Umständen vermehrt als Molekül mit zwei Eisenatomen vorliegt. Im

Gegensatz hierzu wird die Syntheserate des TfR1 reduziert, so dass eine geringere Anzahl an Rezeptoren für eine Bindung mit dem Tf und dem HFE-Protein zur Verfügung steht. Bei letzterem handelt es sich um ein von der Leber synthetisiertes Protein (vgl. 1.4.A+B), dessen Bindungsstelle am TfR1 mit der Tf-Bindungsstelle überlappt. Da das vermehrt produzierte und überwiegend mit zwei Eisenatomen beladene Tf aber eine höhere Affinität zum TfR1 als das HFE-Protein besitzt (West et al., 2001), verdrängt es im Falle der Eisenüberladung letzteres kompetitiv aus der Bindung zum Rezeptor, welcher aufgrund der reduzierten Syntheserate in insgesamt geringerer Gesamtmenge vorliegt. Das demnach vermehrt frei liegende HFE-Protein sendet sodann Signale an die Hepatocytenkerne und stimuliert dadurch die Synthese von Heparin (Bridle et al., 2003).

Alternativ hierzu kann die Synthese dieses Moleküls auch durch Vermittlung über das TfR2 erhöht werden. Durch den relativ hohen Anteil von Tf mit zwei Eisenatomen bei Eisenüberladung und der reduzierten Anzahl der TfR1 wird nämlich vermehrt Tf auch an TfR2 gebunden, was ebenfalls zur Signaltransduktion an den Zellkern über noch nicht genau erforschte Mechanismen führt und somit die Heparinsynthese erhöht (Deaglio et al., 2002).

Durch einen Eisenmangel werden die jeweils hierzu gegensätzlichen Mechanismen in Gang gesetzt. Die TfS und entsprechend der Anteil an Tf mit zwei Eisenatomen ist erniedrigt, wohingegen für das TfR1 eine erhöhte Syntheserate vorliegt. Demnach kann das HFE-Protein an den vermehrt frei liegenden TfR1 binden und sendet somit keine Signale an den Zellkern zur Erhöhung der Heparinsynthese mehr. Auch die Bindung von Tf an den TfR2 wird entsprechend reduziert, so dass auch dieser Signaltransduktionsweg nicht aktiviert und die Eisenresorption im Darm nicht über das Heparin gehemmt wird.

d. Störungen im hepatischen Regulierungsmodell

Bei Störungen in der hepatischen Signalkaskade mit der Folge der gestörten oder verminderten Heparinsynthese, kann es zur Eisenüberladung kommen, wobei Störungen auf verschiedenen Ebenen zustande kommen können.

Bei Veränderungen im HFE-Protein kann die Hepcidinsynthese nicht mehr auf diesem Wege erhöht werden und es kommt zur Eisenüberladung. Das gleiche geschieht bei Veränderungen im Tfr2 (Camaschella et al., 2000). Da aber in beiden Fällen der jeweils zweite Mechanismus noch intakt ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Eisenüberladung nicht ganz so gravierend ausfällt wie bei einer Veränderung im HAMP-Gen oder dem Hemojuvelin-Gen (HJV oder HFE2; moduliert nach gegenwärtigem Kenntnisstand die Expression von Hepcidin) (Papanikolaou et al., 2004). Bei einem Vergleich der den verschiedenen Subtypen der HH zugeordneten Phänotypen, wie er in Tabelle 1.3 vorgenommen wurde, bestätigt sich diese Hypothese.

e. Hierarchie der Regulierung

Beim Subtyp 4 der HH handelt es sich um eine Erkrankung, bei welcher Veränderungen im Ferroportinmolekül eine systemische Eisenakkumulation bedingen. Auch bei diesem Subtyp fällt die Eisenüberladung nicht ganz so gravierend aus wie bei Veränderungen im HAMP-Gen, wobei noch nicht abschließend geklärt ist, inwieweit alternative Mechanismen die ausgefallene Funktion ersetzen können (Pietrangelo, 1999). Das Eisen befindet sich bei dieser Erkrankung vor allem in Zellen des Reticulo-endothelialen Systemes, wo es aufgrund einer Störung im Eisenrecycling länger verbleibt und dadurch in nicht ausreichendem Maße der Hämatopoese zur Verfügung gestellt werden kann. Dieser „Pseudo“-Eisenmangel stimuliert so die Eisenresorption im Darm (Montosi et al., 2001). Interessanterweise scheint die Hepcidinsynthese durch die Leber diesen Regelkreis nicht durchbrechen zu können, da die Eisenresorption fortlaufend erhöht ist, obwohl viele Organe bereits eine Eisenüberladung aufweisen. Daher wird von einer hierarchischen Beziehung bei der Regulation der Eisenresorption ausgegangen, wobei die Signale aus den hämatopoetischen Zellen die hepatischen Botenstoffe aufwiegen, wie anhand mehrerer Untersuchungen an Mäusen mit Hypotransferrinämie und gestörter Hämatopoese gezeigt werden konnte (Trenor et al., 2000; Buys et al., 1991).

In der folgenden Tabelle 1.3. soll eine Übersicht über die unterschiedlichen Formen der Hereditären Hämochromatosen gegeben werden, wobei die Zuordnung des Schweregrades des jeweiligen Phänotyps bei entsprechendem Gendefekt mit Hilfe dieser Vorarbeit besser verständlich wird. Der Subtyp 1 als häufigster Vertreter dieser Erkrankungsformen ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird unter 1.2. näher erklärt.

Tab. 1.3. Übersicht über die verschiedenen Formen der Hereditären Hämochromatose
Abkürzungen: HH: Hereditäre Hämochromatose; OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
(Pietrangelo, 2004)

	HFE-assoziierte HH	Juvenile HH		TfR2-assoziierte HH	Ferroportin-gebundene HH
OMIM-Klassifikation	Typ 1	Typ 2A	Typ 2B	Typ 3	Typ 4
Betroffenes Gen	HFE	HJV	HAMP	TfR2	SLC40A1
Genprodukt	HFE-Protein	Hemojuvelin	Hepcidin	TfR2	Ferroportin
Funktion des Genprodukts	Regulation der Hepcidinsynthese; Interaktion mit dem TfR1 (dadurch bedingter Effekt noch nicht geklärt);	Unbekannt, möglicherweise Expression von Hepcidin beeinflussend	Hemmung der Eisenresorption im Darm; Hemmung der Eisenfreisetzung aus Enterocyten und Makrophagen	Regulation der Hepcidinsynthese; möglicherweise Eisenaufnahme in Hepatocyten;	Export von Eisen aus Enterocyten, Hepatocyten und Makrophagen
Eisenablagerung	parenchymal	parenchymal	parenchymal	parenchymal	Reticulo-endothelial
Vererbungs-Modus	Autosomal rezessiv	Autosomal-rezessiv	Autosomal rezessiv	Autosomal rezessiv	Autosomal dominant
Alter bei Erstdiagnose	4. – 5. Lebensdekade	2. – 3. Lebensdekade	2. – 3. Lebensdekade	4. – 5. Lebensdekade	4. – 5. Lebensdekade

1.2.4.A+B Oxidativer Stress als Schädigungsmechanismus von Eisen

Den Kapiteln bezüglich der zwei Krankheitsbilder soll hier ein kurzer Abschnitt über den Hauptmechanismus der durch eine Eisenüberladung hervorgerufenen Schädigung vorangestellt werden. Dabei ist anzumerken, dass dieser zwar wohl den wichtigsten, aber bei weitem nicht den einzigen Mechanismus hierfür darstellt. Auf die anderen Schädigungsprozesse soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Entstehung höherer Lebensformen war der Erwerb der Fähigkeit zur Oxidation von Nährstoffen und damit maximal effektiven biologischen Energieversorgung. Auch die Fähigkeit der Bildung von Radikalen war hierbei von großer Bedeutung.

Davon abgesehen birgt allerdings der Umgang mit Sauerstoff und v.a. auch mit seinen besonders reaktionsfähigen Radikalen beträchtliche Gefahren. So sind letztere imstande, nahezu alle Verbindungen im tierischen Organismus oxidativ zu verändern und dadurch deren Funktion schwer zu beeinträchtigen. Die wichtigsten Radikale sind hierbei das Superoxid-Radikal, das Perhydroxylradikal, das Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal sowie Oxyradikale, welche bei der Lipidoxidation entstehen. Diese Radikale können zu Strangbrüchen und Änderungen in der Basensequenz der DNA sowie zu Modifikationen an den Aminosäuren in Proteinen und damit zu deren Funktionsverlust führen. Von besonderer Bedeutung ist auch die Membranschädigung durch Lipidperoxidation, welche eine Lipidperoxidationskaskade in Gang setzt. Diese Membranschädigungen führen sodann zur Reduktion der Fluidität der Lysosomenmembran, zur Abnahme der CytP450-Enzymaktivität im Endoplasmatischen Retikulum sowie zu einer geringeren Oxidationsrate von Glutamat und Succinat bei gleichzeitigem Abfall der Calciumsequestrierungskapazität und erniedrigtem ATP- und ADP-Spiegel durch Schädigungen an der Mitochondrienmembran. Diese Änderungen können sodann zur Nekrose oder Apoptose der betroffenen Zelle führen.

Zur Entgiftung dieser Radikale hat der Organismus spezielle Mechanismen entwickelt, die antioxidativ wirksam sind. Diese können mittels eines

enzymatischen oder nicht-enzymatischen Reaktionsweges die Bildung der Radikale hemmen, ihre Wirkung aufheben oder aber die bereits entstandenen Schäden beseitigen und reparieren. α -Tocopherole (Vitamin E), Ascorbat, Glutathion, Superoxiddismutasen und Glutathionperoxidasen und nicht zuletzt die Enzyme für die Reparatur von DNA- und Membranschäden sind einige Beispiele für Antioxidantien.

Von großer Bedeutung ist dabei, dass ein Hauptteil der Radikale bei Metall-katalysierten, vor allem aber auch bei Eisen-katalysierten Reaktionen entstehen kann. Die gleichen Reaktionen, welche essentiell für das Überleben des Organismus sind, können also durch eine Eisenüberladung und Erschöpfung der antioxidativen Ressourcen über die Fenton-Reaktion zu oxidativem Stress mit allen oben genannten Folgen führen und machen das Eisen so zu einer potentiell schädigenden Noxe (Löffler et al., 1998).

1.3.1.A Die HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose

Die HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose (HH1) ist, abgesehen vom Gilbert-Syndrom, die häufigste vererbte Lebererkrankung in Nordeuropa (Chemnitz et al., 2000). Sie wird autosomal-rezessiv vererbt, wobei die Substitution von Cystein durch Tyrosin auf Position 282 (C282Y) im HFE-Gen (positioniert auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6) (vgl. 1.4.A+B) die wichtigste Mutation darstellt (Feder et al., 1996). Diese Mutation führt über komplexe Mechanismen zu einer vermehrten Eisenresorption im Darm. Mangels effizienter Ausscheidungsmechanismen kommt es durchschnittlich innerhalb der 5. Lebensdekade zu einer Eisenüberladung des Organismus und schließlich zu einer damit assoziierten Schädigung lebenswichtiger Organe (Chemnitz et al., 2000).

Die Prävalenzen für diese Mutation sind in Nordeuropa insgesamt sehr hoch und betragen für die homozygote Mutation 1:300 bis 1:400, für die heterozygote 1:10 bis 1:20. Dabei weisen völkerkundliche Studien auf eine keltische Abstammung dieser Mutation hin, was durch die erhöhte Prävalenz in Ländern keltischen Ursprungs wie Irland, Schottland und England und einem Nord-Süd-Gefälle der Prävalenzen noch erhärtet wird (Merryweather-Clarke et al., 1997; Rochette et al., 1999). Den Grund für den Erhalt dieses genetischen Defekts in der Evolution vermutet man in einem mit der vermehrten Eisenaufnahme assoziierten Überlebensvorteil in Regionen mit Eisenarmut (Motulsky, 1979). Für die Frauen könnte außerdem die Auffüllung der Eisenspeicher des Körpers von Vorteil gewesen sein, welche aufgrund der Menstruation, Laktation und nicht zuletzt aufgrund der damals üblichen zahlreichen Schwangerschaften in starkem Maße beansprucht wurden (Datz et al., 1998). Der dadurch erhöhte Eisenbedarf wird auch heute noch zur Erklärung für das durchschnittlich höhere Lebensalter bei Krankheitsausbruch und der im Vergleich zum männlichen Geschlecht sehr viel selteneren Manifestation der Erkrankung bei Frauen (Frauen erkranken 5 bis 10mal seltener) herangezogen (Chemnitz et al., 2000). Aber auch bezüglich des männlichen Geschlechts kann davon ausgegangen werden, dass die Krankheit in vielen Fällen gar nicht erst manifest wurde, da

einerseits die damalige Lebenserwartung der Menschen geringer war und andererseits, damals wie auch heute, die homozygote Mutation nur eine relativ niedrige Penetranz aufweist (Pietrangelo, 2004). Dieser Umstand wird auch zur Erklärung der Diskrepanz zwischen den Prävalenzen der manifesten HFE-assoziierten HH, welche 1:4000 bis 1:5000 beträgt, und der Häufigkeit der homozygoten Mutation herangezogen.

Im Falle der Krankheitsmanifestation konsultieren die Patienten den Arzt häufig zum ersten Mal wegen Müdigkeit oder Gelenkbeschwerden. Gleichzeitig liegt fast immer eine Leberschädigung vor. Diese weist ein breites Spektrum auf, das vom Auftreten leicht erhöhter Aminotransferasen bis zum Vorliegen eines Hepatocellulären Carcinoms reicht. Daneben können Schäden an endokrinen Organen, an den Gelenken und am Herzen, eine verstärkte Hautpigmentierung sowie Abdominalschmerzen vorliegen (Pietrangelo, 2004). Auch eine disseminierte Eisenakkumulation im Gehirn wurde bei einigen wenigen Patienten mit einer HFE-assoziierten HH beschrieben (Miyasaki et al., 1977), was vermutlich mit zu dem Schwächegefühl und der Abgeschlagenheit beiträgt. Um die Eisenakkumulation im Organismus und damit den Grad der Erkrankung bei diesen Patienten feststellen zu können, werden die Laborwerte für Transferrin, Ferritin, Eisen im Serum sowie die aus Eisen und Transferrin berechenbare Transferrinsättigung bestimmt. Diese Laborwerte können auch als Marker für das Vorliegen und den Verlauf einer Hämochromatose eingesetzt werden (Pietrangelo, 2004).

Tabelle 1.4. zeigt die Häufigkeitsverteilung der charakteristischen Symptome und den jeweils zugrundeliegenden Pathomechanismus.

Tab. 1.4. Übersicht der Häufigkeit der Symptome bei manifester HFE-assoziiertes HH und deren zugrundeliegender Pathomechanismus (nach Chemnitz et al., 2000)

Symptomatik	Häufigkeit	Zugrundeliegender Pathomechanismus
Schwäche, Abgeschlagenheit	73 %	• Möglicherweise noch nicht genau definierte Affektion im ZNS
Libidoverlust / Hodenatrophie	56 % / 50 %	• Eisenakkumulation in gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens mit der Entstehung eines sekundären hypothalamisch hypophysären Hypogonadismus
Abdominalschmerzen	50 %	• Möglicherweise im Rahmen der Hepatomegalie
Arthralgien	47 %	• Entwicklung unabhängig von der Krankheitsdauer und keine enge Korrelation zur Eisenakkumulation; daher kaum durch Aderlasstherapie beeinflussbar.
Zirrhosen / Hepatomegalie	94 % / 76 %	• Fibrosierung / Zirrhose • Parenchymzellnekrosen mit Anstieg der Laborparameter
Diabetes	53 %	• Zunächst Entstehung einer chronischen Hyperinsulinämie durch Verminderung des Insulinabbaus durch die Leber mit der Ausbildung einer Glucosetoleranzstörung; • Zusätzliche Zerstörung der Langerhans-Inseln durch Eisenakkumulation
Verstärkte Pigmentierung	82 %	• Vor allem in Axillen, Lenden, Genitalien und alten Narben; • Beruht im wesentlichen auf einer Ablagerung von Melanin;

Die Therapie der HFE-assoziierten HH ist rein symptomatisch und konzentriert sich auf eine Senkung des Eisenbestandes, da dieser ursächlich für das Auftreten der klinischen Symptomatik ist und der Körper nur eingeschränkte Möglichkeiten besitzt, den Eisenbestand auf natürliche Weise zu verringern. Hierbei wird künstlich mit Hilfe der prima vista mittelalterlich anmutenden Aderlasstherapie ein Eisenverlust erzeugt, dessen Effizienz durch Bestimmung der oben genannten Laborparameter überprüft wird. Eine Intensivierung dieser Therapie kann durch gleichzeitige Infusion des Eisen-Komplexbildners Deferoxamin (DFO) erreicht werden (Chemnitz et al., 2000). Dies ist ein aus *Streptomyces pilosus* gewonnener Chelatbildner für trivalente Kationen, der als Komplex renal eliminiert werden kann. Unter der Therapie können sich viele der klinischen Symptome bessern. Einige der bereits zum Behandlungsbeginn fixierten Schäden sind allerdings irreversibel, durch die Therapie kann hier lediglich eine Progression der Symptomatik verhindert werden. Durch früh-

zeitige Diagnose der Krankheit und frühzeitige Intervention können Symptome und Spätfolgen auch gänzlich verhindert werden (Pietrangelo, 2004).

Von Bedeutung ist auch zu wissen, dass seit der Entdeckung unterschiedlicher genetischer Grundlagen für eine Eisenüberladung die alte Bezeichnung der Hereditären Hämochromatose für dieses Krankheitsbild nunmehr als Überbegriff für eine Reihe von Krankheiten mit einer Eisenüberladung steht. Die hier behandelte HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose wird laut der Datenbank *Online Mendelian Inheritance in Man* als Subtyp 1 bezeichnet und stellt den Hauptvertreter der Hereditären Hämochromatosen dar (Pietrangelo, 2004).

1.4.1.B Der idiopathische M. Parkinson

Der idiopathische M. Parkinson (MP) ist ein durch Dopaminmangel verursachtes hypokinetisch-hypertones Syndrom.

Die Prävalenz der Erkrankung weist eine Steigerung in Abhängigkeit vom Lebensalter auf und wird mit 1 % weltweit und mit 1,6 % bei den über 60-jährigen angegeben (de Rijk et al., 1997; Zhang und Roman, 1993). Demnach manifestiert sich die Erkrankung vorwiegend nach dem 60. Lebensjahr. Allerdings gibt es auch Patienten, bei denen der MP bereits in der 3. oder 4. Lebensdekade diagnostiziert wird (Deuschl et al., 1999).

Erstmals beschrieben wurde das Krankheitsbild 1817 von James Parkinson, nach dem das Syndrom später benannt wurde. Parkinson publizierte eine Abhandlung unter dem Titel „An essay on the shaking palsy“, unter der Annahme, dass der Tremor das wesentliche Charakteristikum der Krankheit darstellt. Von dieser Bezeichnung leitete sich auch der lateinische Name „Paralysis agitans“ und die volkstümliche Bezeichnung „Schüttellähmung“ ab. Heute werden dem Parkinsonismus vier Kardinalsymptome zugeschrieben: die Akinese oder in milderer Ausprägung die Brady-/Hypokinese, der Rigor, der Ruhetremor sowie Störungen der posturalen Reflexe, welche die reflektorischen Ausgleichsbewegungen bei passiver Auslenkung aus der Gleichgewichtsposition bezeichnen. Diese Symptome beginnen in der Regel einseitig und breiten sich mit fortschreitender Krankheitsdauer auf die andere Körperhälfte aus, wobei die Seitendifferenz auch im Weiteren bestehen bleibt. Zu Beginn der Erkrankung sind diese Symptome allerdings oft noch nicht sehr gut abgrenzbar. So konsultieren viele Patienten ihren Arzt erstmals aufgrund von Lumbago oder einem Arm-Schulter-Syndrom. Nicht selten wird vor der Feststellung des MP eine Depression diagnostiziert, da die Patienten über einen Mangel an Energie und Schlaflosigkeit klagen. Nur ein Drittel aller Patienten kommt mit dem Tremor als Initialsymptom zum Arzt, wobei die Abgrenzung zum essentiellen Tremor bei Fehlen der anderen Kardinalsymptome nicht immer einfach ist (Deuschl et al., 1999).

Der Pathomechanismus für einen Großteil der bei dieser Krankheit beobachteten Bewegungsstörungen liegt, wie oben bereits erwähnt, in einem Dopaminmangel, welcher durch die fortschreitende Degeneration melaninhaltiger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra (PcSN) verursacht wird (Hirsch et al., 1988). Dabei wird vermutet, dass die Neurodegeneration ihren Anfang bereits Jahre vor dem Krankheitsausbruch nimmt. Da aber die Dopaminsynthese in den noch vorhandenen Zellen kompensatorisch erhöht wird, kommt es zunächst zu keiner klinischen Symptomatik. Erst nach einem Verlust von durchschnittlich 60 % der Zellen der PcSN und einer Reduktion des Dopaminbestands auf 80 % machen sich die ersten Symptome bemerkbar (Deuschl et al., 1999).

Um die Bedeutung der PcSN im Rahmen dieser Erkrankung besser aufzeigen zu können, soll hier zunächst auf die Funktion dieser Struktur eingegangen werden:

Die Substantia nigra ist eine mesencephale Ansammlung von Neuronen mit einem hohen Melaningehalt, was eine gute Abgrenzung dieses Kerngebietes auf Querschnitten ermöglicht. Sie stellt eine wichtige Komponente innerhalb des komplexen Regelkreises der Basalganglien dar, welche sich aus fünf subkortikalen Kerngebieten zusammensetzen: dem Globus pallidus, dem Ncl. caudatus, dem Putamen (die beiden letzteren werden auch als Striatum zusammengefasst), dem Ncl. subthalamicus sowie der Substantia nigra.

Innerhalb des Schaltkreises zwischen diesen fünf Strukturen werden die im Assoziationskortex entworfenen Bewegungsimpulse hinsichtlich Durchführbarkeit und Sinn geprüft und dementsprechend unterdrückt oder gebahnt. Dabei entscheidet letztendlich der Erregungszustand des Globus pallidus, ob ein Impuls zur Bewegungsinitiation führt oder nicht. Wird der Globus pallidus vom Striatum gehemmt, so wird der Impuls unterdrückt und der Bewegungsentwurf verebbt. Daher wird dem Striatum auch vereinfacht eine inhibitorische Funktion hinsichtlich der Motorik zugesprochen. Die PcSN wiederum kann mittels des Neurotransmitters Dopamin das Striatum hemmen. Dadurch erhält der Globus pallidus keine unterdrückenden Signale mehr und der Bewegungsimpuls kann ausgeführt werden (Trepel, 1999).

Durch den Ausfall dieser dopaminergen Neurone der PcSN beim MP kann das Striatum allerdings nicht mehr gehemmt werden und es resultiert eine Überfunktion des Globus pallidus. Die Überfunktion eben dieser Struktur wird zur Erklärung wichtiger motorischer Symptome wie Rigor und Akinese beim MP herangezogen (Ehringer et al., 1960).

Die oben beschriebene Degeneration der dopaminhaltigen Neurone ist auf histologischen Schnitten erkennbar, wobei der Nachweis von sog. Lewy-Körperchen ein charakteristisches histologisches Merkmal der Krankheit darstellt. Bei diesen handelt es sich um eosinophile, intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen, welche in den degenerierenden Zellen auffindbar sind. Da diese aber auch bei anderen Krankheitsbildern vorhanden sein können, ist ihr Nachweis nicht pathognomonisch für das Vorliegen eines MP.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Strukturschäden in der PcSN, können besagte Degenerationen und Lewy-Körperchen allerdings auch in anderen pigmentierten Hirnarealen vorliegen und erklären zumindest teilweise die zusätzlichen Symptome beim MP. Der Nachweis von Degenerationen im noradrenergen Locus coeruleus und im serotonergen N. raphe dorsalis wird demnach mit dem häufigeren Auftreten von Depressionen bei MP-Patienten in Zusammenhang gebracht. Ebenfalls von der Degeneration betroffen sind der dorsale Vagus Kern, der cholinerge N. basalis Meynert, dessen Läsion zur Erklärung der kognitiven Störungen beim MP herangezogen wird, sowie Neuronen, die weder Melanin noch Katecholamine enthalten (Deuschl et al., 1999).

Gemäß den Studien von Del Tredici et al. (2002) wird diese diffuse Verteilung der Läsionen durch eine Aszension des Krankheitsprozesses im ZNS erklärt. Dieses in letzter Zeit am meisten diskutierte Modell postuliert, dass die Erkrankung ihren Anfang im dorsalen motorischen Kern des N. vagus nimmt und im weiteren Verlauf über den Hirnstamm mit der PcSN und den basalen Anteilen des Großhirns bis zum cerebralen Cortex voranschreitet. Abhängig von der Höhe der Läsionsareale wird die Krankheit in sechs Schweregrade eingeteilt (Braak et al., 2003; Del Tredici et al., 2004). Neuere Studien weisen auf eine gewisse Korrelation zwischen der Höhe der Läsionsareale und der

kognitiven Leistungsfähigkeit der Patienten hin. Allerdings konnte dieser Zusammenhang nicht bei allen Probanden festgestellt werden, so dass es weiterer Untersuchungen bedarf, um mögliche individuelle Einflussfaktoren zu identifizieren (Braak et al., 2005).

Die Therapie des idiopathischen MP ist rein symptomatisch und beinhaltet die Verabreichung der Transmitter, die aufgrund der Reduktion der entsprechenden Neurone nicht mehr ausreichend zur Verfügung gestellt werden können. Auch neurochirurgische Therapieansätze gewinnen zunehmend an Bedeutung. Die Langzeitergebnisse dieser Therapieoptionen sind allerdings nicht immer zufriedenstellend, so dass man sich aus der Aufklärung der Ätiologie u.a. auch effektivere Therapieansätze erhofft (Deuschl et al., 1999).

Wichtig ist auch zu wissen, dass eine analoge Degeneration der oben genannten Kerngebiete mit der zugehörigen Symptomatik auch im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen, wie bspw. der Multisystematrophie, stattfinden kann. Ebenso können diese Neurone unter der Einwirkung von Umwelttoxinen (CO, Mangan) schwer geschädigt werden oder daran zugrunde gehen. Durch die folgenden Änderungen im Transmitterhaushalt kommt es dann ebenfalls zum Auftreten von entsprechenden Parkinson-Symptomen. Diese ätiologisch gut abgrenzbaren Erkrankungen mit Parkinson-typischen Symptomen müssen vom idiopathischen M. Parkinson abgegrenzt werden, der mit einem Anteil von 80 % am häufigsten vertreten ist und dessen Ätiologie bislang noch nicht geklärt werden konnte.

1.4.2.B Die Ätiologie des idiopathischen M. Parkinson

Obwohl die Ätiologie des idiopathischen M. Parkinson nach derzeitigem Stand der Forschung noch nicht genau definiert werden kann, gibt es doch einige wegweisende Entdeckungen bezüglich der Genese dieser Erkrankung.

1. Hinweisend auf das Vorliegen einer genetischen Komponente war die positive Familienanamnese bei ca. 20 % der MP-Patienten, deren Alter bei

Erstdiagnose vor dem 40. Lebensjahr und damit unter dem Durchschnittsalter bei dieser Erkrankung lag (Deuschl et al., 1999). Im Rahmen von Zwillingsstudien wurden außerdem deutlich erhöhte Konkordanzraten nachgewiesen (bei eineiigen Zwillingen: 75 %, bei zweieiigen Zwillingen: 22 %), was auf eine von Umweltfaktoren weitgehend unabhängige genetische Ätiologie hindeutet (Piccini et al., 1999). Diesen Beobachtungen entsprechend wurden mittels molekulargenetischer Untersuchungen innerhalb der letzten 8 Jahre 6 Gene und 8 Genorte identifiziert, die mit dem MP assoziiert zu sein scheinen (Gasser, 2005). Die in den Genen für monogenetische Parkinsonsyndrome nachweisbaren Mutationen werden dabei teils autosomal-rezessiv (PARK 2, 6, 7 und 9), teils autosomal-dominant (PARK 1, 3-5, 8, 10) vererbt. Das DJ-1-Gen (PARK 7) ist für ca. 2 % der Parkinsonsyndrome bei den unter 50-jährigen Patienten verantwortlich (Abou-Sleiman et al., 2003; Bonifati et al., 2002, 2003; Hedrich et al., 2001, 2002; van Duijn et al., 2001). Kürzlich wurden noch weitere Mutationen im Synphilin-1-Gen (Marx et al., 2003) und im NR4A2-Gen (Le et al., 2003; Marx et al., 2003) entdeckt.

Dem Großteil dieser Genprodukte ist eine wichtige Rolle beim Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau gemeinsam, wobei die PARKIN-Proteine als Ubiquitinligase dienen (Cookson, 2003; De Silva et al., 1996; Lansbury et al., 2002; Marx et al., 2003; Mouradian et al., 2002). Darüber hinaus wird einigen (α -Synuklein, Parkin, DJ-1) eine wichtige Funktion bei der Antwort auf oxidativen Stress zugeschrieben (Bonifati et al., 2003; Hashimoto et al., 2002; Hyun et al., 2002). Unter oben genannten Mutationen scheinen vor allem die autosomal-rezessiv-vererbten Mutationen eine wichtige Bedeutung innezuhaben. Im Rahmen großer Studien konnte nämlich das mehrheitliche Vorliegen von nur einem mutierten Allel bei symptomatischen Patienten nachgewiesen werden (Foroud et al., 2003; Hedrich et al., 2001, 2002; Hoenicka et al., 2002; Illarioshkin et al., 2003; Kann et al., 2002; Klein et al., 2003; Lohmann et al., 2003; Lücking et al., 2000; Nichols et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Periquet et al., 2003; van Duijn et al., 2001). Bei einigen klinisch-asymptomatischen Trägern eines solchen Allels wurde außerdem ein auffälliges Ergebnis bei der [F]-Dopa-Aufnahmemessung mittels Positronenemissionstomographie ermittelt, was auf eine

kompensierte Neurodegeneration hinweisend ist (Hilker et al., 2001, 2002). Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine zumindest erhöhte Suszeptibilität der Gen-träger vermuten, wenn auch das Vorliegen des Genes allein nicht zum Ausbruch der Krankheit führen muss. Die unterschiedliche klinische Symptomatik müsste man dann entweder mit dem gleichzeitigen Vorkommen des rezessiven Allels mit bislang unbekanntem Mutationen oder mit einer unterschiedlichen Exposition bezüglich verstärkender oder protektiv wirksamer Umweltfaktoren in Zusammenhang bringen.

Mittels Studien von Zimprich et al. (2004) konnten kürzlich auch Mutationen im autosomal-dominant vererbten PARK8 identifiziert werden, welchen eine gewisse Bedeutung bei der Entstehung des MP zugesprochen wird. Demnach müssen neben den autosomal-rezessiven auch die autosomal-dominant vererbten Gene bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden.

Abschließend ist anzumerken, dass oben genannte Mutationen nur bei einem kleinen Anteil der Parkinson-Patienten nachgewiesen werden konnten. Für den Großteil der idiopathischen Parkinsonfälle ist die Frage nach einer genetischen Beeinflussung der Krankheitsmanifestation demnach noch nicht abschließend geklärt. Unter Berücksichtigung des Umstands, dass Personen mit positiver Familienanamnese aber ein drei- bis vierfach erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweisen, muss auch hier von einer zumindest erhöhten Vulnerabilität für diese Krankheit ausgegangen werden (Marder et al., 1996; Semchuk et al., 1993).

2. Auch bestimmten Umweltfaktoren wird eine gewisse Bedeutung in der Ätiologie des idiopathischen MP zugesprochen, wobei von einem Zusammenwirken der genetisch veranlagten Suszeptibilität und dem Umweltgift ausgegangen wird. Allerdings sollten Umweltstoffe in ihrer Bedeutung für dieses Krankheitsbild nicht auf rein additiv wirksame Faktoren reduziert werden. So kann nämlich eine übermäßige Exposition gegenüber Mangan und Kohlenstoffmonoxid auch bei Personen ohne augenscheinliche genetische Prädisposition zum Auftreten der charakteristischen Symptomatik führen (Ceballos-Baumann, 1999). Ebenso verhält es sich mit dem Neurotoxin Methyl-Phenyl-Tetrahydropyridin (MPTP). Durch eine Inhibition des mitochondrialen Komplexes I führt

dieses zum Zelluntergang in der Substantia nigra und damit zu einer Reduktion der Dopaminkonzentration mit allen dazugehörigen Folgen (Langston et al., 1983).

Im Jahre 1924 stellte Lhermitte et al. mittels post mortem Studien einen erhöhten Eisengehalt in der PcSN von Parkinson-Patienten fest. Diese Beobachtung konnte in den folgenden Jahrzehnten durch unabhängige Arbeiten bestätigt werden (Earle, 1968; Riederer et al., 1985; Dexter et al., 1987). Seitdem wird auch dem Eisen und dessen Fähigkeit zur Radikalbildung eine bestimmte Bedeutung als Umweltgift in der Ätiologie dieser Erkrankung zugesprochen. Mit Hilfe von diversen speziellen Magnetresonanzuntersuchungen kann heute der erhöhte Eisengehalt in der PcSN auch beim Lebenden nachgewiesen werden (Bartzokis et al., 1999; Hutchinson et al., 2000; Mondino et al., 2002; Atasoy et al., 2004;). Eine wichtige Neuentwicklung in Bezug auf die Bestimmung des Eisengehalts der PcSN und damit der Möglichkeit der Früherkennung dieser Krankheit beim Lebenden stellt die Durchführung der transkraniellen Sonographie (TCS) bei MP-Patienten dar (Becker et al., 1995; Berg et al., 2001b; Walter et al., 2002; Berg et al., 2002). Normalerweise bildet sich der mesencephale Hirnstamm in der transkraniellen Sonographie als homogen echoarme Struktur ab. Studien unterschiedlicher Gruppen belegen jedoch, dass bei Patienten mit MP im anatomischen Bereich der Substantia nigra eine vermehrte Echogenität nachweisbar ist. Die Ausdehnung dieser Fläche kann umfahren und planimetrisch vermessen werden. Bei über 90 % der Patienten mit MP ist sie $> 0.20 \text{ cm}^2$, welches der oberen Standardabweichung der Normalbevölkerung entspricht (Berg et al., 2001a). Etwa 10 % der klinisch Gesunden weisen eine ebenso große Fläche auf. PET-Untersuchungen dieser z.T. jungen Menschen belegen dabei, dass diese Ultraschallauffälligkeit auch bei Gesunden Hinweis auf eine subklinische Alteration des nigrostriatalen Systems sein kann. Mittels post mortem Untersuchungen konnte eine enge Korrelation zwischen der Höhe der gemessenen Echogenität und dem Eisengehalt nachgewiesen werden (Berg et al., 1999, 2002), was demnach hinweisend auf eine Eisenüberladung dieser Struktur bei MP-Patienten ist. Die TCS stellt demnach eine Methode dar, mit welcher Screeninguntersuchungen

zur Früherkennung des MP auf effiziente und einfache Art durchgeführt werden können.

Zusammenfassend lässt sich schließlich sagen, dass sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren den Ausbruch der Krankheit beeinflussen können. Da allerdings beim idiopathischen MP, der immerhin 80 % der Krankheitsfälle ausmacht, bislang weder eine spezifische genetische Mutation noch ein hierfür ursächliches Umweltgift identifiziert werden konnte, geht man gegenwärtig von einer multifaktoriellen Genese dieser Erkrankung aus (Foltynie et al., 2002; Klein, 2001). Dabei verdient die Hypothese der gegenseitigen Beeinflussung von Mutationen in verschiedenen Suszeptibilitätsgenen sowie das Eingreifen von Umweltfaktoren in diesen vulnerablen Zustand besondere Beachtung und muss bei der Interpretation jeglichen Ergebnisses berücksichtigt werden.

1.4.3.B Eisenhaushalt im Gehirn

Aufgrund seiner herausragenden Rolle im Energiestoffwechsel der Zellen und bei der Katalyse wichtiger Reaktionsvorgänge ist Eisen essentiell für das Überleben des Organismus. Im Gehirn ist Eisen außerdem an der Synthese von Neurotransmittern beteiligt (Tyrosinhydroxylase, Tryptophanhydroxylase), welche unentbehrlich für kognitive und motorische Vorgänge im Körper sind (Moos et al., 2004). Um diese Funktionen im Gehirn erfüllen zu können, muss das Eisen zunächst allerdings die Blut-Hirn-Schranke passieren. Hierzu wird es entweder an Transferrin als einem der wichtigsten Eisentransportsysteme gebunden und mittels Transferrinrezeptor internalisiert oder mittels anderer Eisentransportproteine, möglicherweise über Metalltransporter, aufgenommen (Moos et al., 2002). Das im Hirngewebe in der zweiwertigen Form vorliegende Eisen wird durch die Ferroxidase Coeruloplasmin zu dreiwertigem Eisen oxidiert und der Bindung an Apotransferrin zugeführt (Qian et al., 2001). Die Aufnahme in die Neurone erfolgt sodann entsprechend der Internalisierung in die Endo-

thelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Sturrock et al., 1990). Für den intrazellulären Transport des Eisens aus dem Endosom in das Zytoplasma ist vermutlich der Einsatz des divalenten Metalltransporters 1 (DMT1) nötig (Gunshin et al., 1997; Moos et al., 2000, 2003; Burdo et al., 2001), wobei Eisen hierfür als zweiwertiges Metall vorliegen muss. Im Cytoplasma wird das Eisen schließlich entweder direkt bei eisenabhängigen Reaktionen bzw. Synthesen verbraucht oder Eisen-speichernden Molekülen zugeführt.

Die Speicherung von Eisen im Gehirn erfolgt dabei je nach Zelltyp durch Bindung an Ferritin oder Neuromelanin. In Oligodendrocyten, Astrocyten und Mikrogliazellen herrscht Ferritin als Speichermolekül vor (Connor et al., 1990; Zecca et al., 2001). In einigen Neuronen findet sich zusätzlich zum Ferritin das Neuromelanin (Jellinger et al., 1992, 1993). Bei letzterem handelt es sich um einen Pigmentstoff mit zwei Bindungsstellen für Eisen (Ben Shachar et al., 1991; Double et al., 2003), das in der SN und im Locus coeruleus synthetisiert wird und Unterschiede zum epidermalen Melanin aufzuweisen scheint (Double et al., 2000). Dieses Molekül ist im Normalfall nur zu 50 % gesättigt und besitzt daher eine freie Bindungskapazität für Dopaminoxidationsprodukte, kationische Moleküle und auch freie Metallionen (Götz et al., 2004). In vitro Studien konnten außerdem die Fähigkeit zur direkten Interaktion und damit Inaktivierung von freien Radikalen nachweisen (Ben Shachar et al., 1991; Double et al., 1999). Diese Eigenschaften erklären am wahrscheinlichsten die vermutete neuroprotektive Wirkung des Moleküls. Es gibt aber auch Untersuchungen, die auf eine eher neurotoxische Wirkung dieses Moleküls, v.a. bei Eisenüberladung, hinweisen. Demnach soll an Neuromelanin gebundenes Eisen noch Redox-Aktivität besitzen (Castellani et al., 2000). Auch auf die Möglichkeit der Freigabe von Eisen aus der Bindung mit Ferritin und nachfolgender toxischer Wirkung bei Eisenüberladung wird hingewiesen (Halliwell et al., 1986; Götz et al., 1994).

Bei MP-Patienten ist die Ferritinkonzentration in der SN deutlich erhöht (Jellinger et al., 1990, 1992; Riederer et al., 1988), während die Neuromelaninkonzentration um durchschnittlich 50 % reduziert ist (Zecca et al., 2002). Dabei ist noch nicht geklärt, ob Neuromelanin in geringerer Menge oder aber in veränderter Form mit gestörter Funktion synthetisiert wird (Aime et al., 2000;

Lopiano et al., 2000). Ebenso wäre es möglich, dass die verminderte Konzentration durch den Verlust an dopaminergen Neuronen in der SN beim MP zustande kommt. Neben der verminderten Neuromelaninkonzentration konnte mittels post mortem Studien eine Verschiebung des Verhältnisses von zweiwertigem zu dreiwertigem Eisen zu Gunsten des letzteren in der SN, ein vermehrtes Auftreten von Metaboliten der Lipidperoxidation sowie eine verminderte Glutathionkonzentration ermittelt werden. Diese Befunde sind hinweisend auf das Vorliegen von oxidativem Stress in der Zelle, wobei die Vermutung nahe liegt, dass der Eisenüberschuss eine Schlüsselfunktion erfüllt. Das vermehrt vorliegende dreiwertige Eisen wiederum spricht möglicherweise für ein gehäuftes Ablaufen der den oxidativen Stress fördernden Fenton-Reaktion (Götz et al., 2004). Die Reduktion von Neuromelanin und der gleichzeitige Nachweis von vermehrtem oxidativem Stress bei MP-Patienten ist demnach, im Gegensatz zu der Hypothese der neurotoxischen Wirkung des Neuromelanins, hinweisend auf eine eher neuroprotektive Wirkung dieses Moleküls (Götz et al., 2004).

Abgesehen von der beschriebenen oxidativen Wirkung scheint das Eisen allerdings noch weitere schädigende Reaktionsmechanismen bewirken zu können, welche im Folgenden besprochen werden sollen.

Demnach soll Eisen (neben anderen Molekülen) an der Umwandlung von Synuklein-Proteinen von der α -helikalen in die β -Faltblattstruktur beteiligt sein, welche in dieser Form auch in den Lewy-Körperchen nachweisbar sind (Hashimoto et al., 1999, 2003; Paik et al., 1999, 2003). Eine wichtige Rolle bei der Aggregation eben dieser α -Synukleinproteine erfüllt auch das vermehrte Vorkommen von *Advanced glycation end products* (AGE-Products) (Münch et al., 2000). Da die Bildung dieser AGE-Strukturen eisenabhängig verläuft, kann ein vermehrtes Eisenvorkommen somit indirekt die Aggregatbildung von α -Synuklein beeinflussen. Eisen kann auch selber mit dem gleichen Effekt an dieses Protein binden (Wolozin et al., 2002; Kim et al., 2002; Youdim et al., 2004). Aus diesem Aggregationsprozess scheint vor allem bezüglich der dopaminergen Neurone eine selektive Toxizität zu resultieren (Forloni et al., 2001; Lo Bianco et al., 2002; Volles et al., 2001, 2002, 2003). Das α -Synuklein

soll allerdings auch ohne vorangehende Aggregation in der Lage sein, in Anwesenheit von zweiwertigem Eisen Hydroxylradikale zu bilden (Turnbull et al., 2001; Tabner et al., 2002), welche die entsprechenden Zellen schädigen können.

Einen weiteren Mechanismus stellt wahrscheinlich die Fähigkeit des Eisens zur Oxidation von Katecholaminen dar (Conway et al., 2001), welche im Normalfall die Oligomere des Synukleinproteins durch eine kovalente Bindung stabilisieren. Durch den vermehrten Abbau der Katecholamine bei Eisenüberschuss bilden diese Oligomere Protofibrillen aus und interagieren mit den Membranen der Zellorganellen. Dies wiederum kann zu einer Freisetzung bestimmter Mediatoren führen, welche möglicherweise an der Einleitung der zellulären Apoptose beteiligt sind (Tabrizi et al., 2001; Hsu et al., 2001; Saha et al., 2001). Diesen Eigenschaften des Eisens entsprechend scheint eine vermehrte Eisenkonzentration allein oder als zusätzliche Noxe bei Vorliegen anderer Risikofaktoren ausreichend, um einen Funktionsverlust bzw. Zelltod von Neuronen in der PcSN mit dem Auftreten einer Parkinson-Symptomatik bewirken zu können (Dexter et al., 1989; Griffiths et al., 1999). Trotzdem muss zunächst die Frage nach dem Auslöser dieser Eisenüberladung beantwortet werden, um eine abschließende Aussage bezüglich der Bedeutung der beobachteten Eisenakkumulation für den MP treffen zu können. Im Falle einer sekundären Eisenakkumulation nach vorangegangener Neurodegeneration würde es sich nämlich um eine rein physiologische Reaktion des Körpers handeln, welche ohne jegliche Bedeutung für die Ätiologie des MP wäre. Ganz anders würde es sich hingegen beim Nachweis des Vorliegens einer genetischen Veränderung mit der Folge einer lokalen Eisenstoffwechselstörung verhalten, wobei besagte genetische Veränderung am ehesten in Proteinen zu erwarten wäre, welche den Eisenstoffwechsel im Organismus regulieren. Zu diesen Regulatormolekülen wird auch das HFE-Protein gezählt, welches aufgrund eben dieser Überlegung im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll.

1.5.A+B Das HFE-Protein

Das HFE-Protein ist ein Transmembranprotein, welches zur Familie der MHC-Klasse-I-Proteine gezählt wird (Lebron et al., 1998) und nahezu in allen Gewebearten nachgewiesen werden kann. Es besteht aus 343 Aminosäuren und wird vom HFE-Gen codiert, welches auf Chromosom 6p21.3 distal der Gene für die MHC-Proteine lokalisiert ist. Das Protein besitzt eine Signalsequenz aus 22 Aminosäuren, eine Peptidbindungsregion (α 1- und α 2-Region), eine α 3-Domäne, die Ähnlichkeiten zu Immunglobulinen aufweist, ein transmembranöses Areal sowie einen kurzen intrazytoplasmatischen Abschnitt.

Für die regelhafte Oberflächenexpression ist die Aminosäure Cystein an der Position 282 innerhalb der α 3-Domäne von herausragender Bedeutung. Diese Aminosäure bindet über eine Disulfidbrücke an β 2-Mikroglobulin, wobei diese Bindung die Voraussetzung für die Oberflächenexpression dieses nun als Heterodimer vorliegenden Moleküls darstellt (Feder et al., 1996). An der Oberfläche bilden dann die α 1- und die α 2-Domäne eine Plattform, welche aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen und zwei darüber positionierten Helices besteht. Diese Struktur überlagert die α 3-Domäne sowie das daran gebundene β 2-Mikroglobulin (Bennett et al., 2000).

Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten mit den MHC-Molekülen bestehen doch einige wichtige Unterschiede. Der bedeutendste Unterschied zwischen den beiden Molekülen ist dabei die Unfähigkeit des HFE-Moleküls zur Peptidbindung und -präsentation. Der Grund hierfür ist die Einwärts-Orientierung einer α 1-helikalen-Struktur, welche die Spalte zwischen α 1- und α 2-Domäne stark einengt und damit eine den MHC-Klasse I-Molekülen analoge Peptidbindung unmöglich macht (Lebron et al., 1998).

Allerdings ist das HFE-Molekül in der Lage, über andere Struktureinheiten als die MHC-Klasse I-Moleküle an den membranösen Transferrinrezeptor (TfR) zu binden (Feder et al., 1998; Parkkila et al., 1997). Dies ist ein aus zwei identischen Untereinheiten bestehendes Homodimer, welches entweder je zwei HFE-Protein-Moleküle oder zwei eisenbeladene Transferrin-Moleküle binden kann. Die Bindung des HFE-Proteins erfolgt dabei über die α 1- und α 2-Domäne

mit zwei helikalen Strukturen des TfR-Moleküles. Das Kernstück der Interaktionsfläche bilden die $\alpha 1$ -Domäne des HFE-Proteins und die Helices 1 und 3 des TfR-Moleküles. Hierbei verläuft die $\alpha 1$ -Domäne des HFE-Proteins über seine ganze Länge antiparallel zur Helix 3 des TfR-Moleküles, während die Helix 1 mit der C-terminalen Region der $\alpha 1$ -Domäne des HFE-Proteins interagiert. Dieser kleine Abschnitt beinhaltet einen hydrophoben Kern, der von den Aminosäuren Valin, Leucin und Tryptophan gebildet wird und bei deren Mutation Änderungen in der Affinität der zwei Moleküle zueinander entstehen. Ebenso können auch Änderungen in allen anderen Arealen, welche an der Interaktionsfläche zwischen den beiden Molekülen beteiligt sind, zu einer Reduktion der Affinität und damit zu Störungen in der Funktion dieser Moleküle führen (Bennett et al., 2000). Von Bedeutung ist auch, dass die Bindung der zwei Moleküle abhängig vom pH-Wert ist (Lebron et al., 1998, 1999a), wobei man davon ausgehen kann, dass milieuhängige Konformationsänderungen an Aminosäuren im TfR-Molekül, v.a. hinsichtlich der Arealen mit Histidin, Einfluss hierauf nehmen. So bindet HFE bei einem physiologischen pH, wie er an der Zelloberfläche zu messen ist (\sim pH 7,4), mit hoher Affinität an den Rezeptor, während die Bindung bei erniedrigtem pH (z.B. in Endosomen mit pH=6) nur schwer oder gar nicht zustande kommt (Bennett et al., 2000).

Im Gegensatz hierzu ist die Bindung des eisenbeladenen Tf-Moleküles an den TfR1 relativ unabhängig vom pH, die Affinität zum Tf steigt aber mit dem Sättigungsgrad an Eisen (Apotransferrin bindet so gut wie nie an den Rezeptor, während zweifach beladenes Eisen eine hohe Rezeptoraffinität aufweist) (Young et al., 1984; Huebers et al., 1985). Das Tf bindet dabei mittels der Aminosäuren 646-648 an der Helix 3 des TfR1-Moleküls. Die gleichen Aminosäuren sind auch an der Interaktion mit dem HFE-Molekül beteiligt. Aufgrund dieser Überlappung der Bindungsstellen wurde vermutet, dass eine Bindung von HFE an den Rezeptor die Bindung von eisenbeladenem Tf in einem kompetitiven Verdrängungsmechanismus verhindern und so die Transferrinvermittelte Eisenaufnahme in die Zellen reduzieren kann (Lebron et al., 1999b). Das bedeutet auch, dass Änderungen im HFE-Molekül, welche diese Bindung beeinflussen, zur unkontrollierten Eisenaufnahme der Zellen führen würden.

Tatsächlich ergaben Untersuchungen an *HFE-knockout* Mäusen biochemische und histopathologische Befunde, welche mit den Ergebnissen von Patienten mit Hereditärer Hämochromatose übereinstimmen und damit diese Hypothese zunächst stützen (Zhou et al., 1998; Bahram et al., 1999). Nachdem aber aktuellere Untersuchungen teils widersprüchliche Ergebnisse hierzu aufwiesen (Montosi et al., 2000; Drakesmith et al., 2002), teils Signalkaskaden mit Beteiligung des HFE-Moleküls aufdeckten (Muckenthaler et al., 2003; Nicolas et al., 2003), muss nun davon ausgegangen werden, dass der Regulationsmechanismus nicht auf einer einfachen rein kompetitiven Verdrängung beruht, sondern der Eisenregulation durch das HFE-Molekül sehr viel komplexere Mechanismen zugrunde liegen, die noch näher untersucht werden müssen.

Bislang konnten einige Mutationen im HFE-Molekül nachgewiesen werden, welche eine Änderung in der molekularen Struktur des Proteins bedingen und damit zu einer Beeinträchtigung seiner Funktion führen. Die wichtigsten und auch häufigsten Änderungen bzw. Mutationen sind dabei der Austausch von Cystein zu Tyrosin an der Position 282 (C282Y) in der α 3-Domäne und von Histidin zu Aspartat an der Position 63 (H63D) in der α 1-Domäne. Bei Vorliegen der C282Y-Mutation kann das HFE-Molekül mangels einer Disulfidbrücke kein β 2-Mikroglobulin mehr binden und das Molekül wird erst gar nicht exprimiert. Diese Mutation bedingt demnach einen vollständigen Ausfall der HFE-Funktion und ist für den Großteil der HFE-assoziierten HH-Fälle als ursächlich anzusehen (ca. 83 %) (Feder et al., 1997; Waheed et al., 1997). Da allerdings auch das Vorliegen der homozygoten Mutation nicht immer zum Ausbruch der Krankheit führt, muss von einem möglichen modifizierenden Einfluss ausgegangen werden. Dabei kann es sich um eine unvollkommene Penetranz der Mutation handeln. Es ist aber auch möglich, dass bestimmte Umweltfaktoren oder zusätzliche Mutationen an anderen Loci des HFE-Genes bzw. in anderen Eisen-regulierenden Genen modifizierend wirksam sind (Pietrangelo, 2004).

Bei der H63D-Mutation wird, im Gegensatz zur C282Y-Mutation, das Molekül als Heterodimer zwar exprimiert, ist in seiner Funktion aber aufgrund des Verlustes einer Histidin-Aspartat-Brücke (Waheed et al., 1997) gestört und kann somit in der homozygoten Form ebenfalls zu Hämochromatose-spezifischen

Symptomen führen. Außerdem entwickeln durchschnittlich 1-2 % aller Individuen mit einer sog. Compound-Heterozygotie (heterozygot sowohl für die C282Y als auch für die H63D) eine HFE-assoziierte HH. Die klinische Relevanz der H63D-Mutationen sowie der Compound-Heterozygotie ist letztendlich aber noch nicht abschließend geklärt (Pietrangelo, 2004).

1.6.A+B Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit sollten zunächst die sechs Exons des HFE-Genes im HH1-Kollektiv auf Veränderungen in ihren Sequenzen hin untersucht werden. Das Kollektiv setzt sich hierbei aus Patienten zusammen, deren HFE-Gen bezüglich des Vorliegens der zwei Hauptmutationen C282Y und H63D aufgrund des Verdachts auf eine HFE-assoziierte HH bereits untersucht wurde. Ein größerer Anteil dieser Patienten wies allerdings keine der zwei für diese Krankheit begünstigenden Mutationen auf. Entsprechend gab es Anlaß zu vermuten, dass bei diesen Patienten genetische Veränderungen vorliegen konnten, welche über andere Mechanismen an der Regulation des Eisenstoffwechsels beteiligt sein könnten. Gleichermäßen konnte aber auch postuliert werden, dass in den routinemäßig üblicherweise nicht mit untersuchten HFE-Exons 1, 3, 5 und 6 sowie an den nicht untersuchten Loci der HFE-Exons 2 und 4 Mutationen vorliegen, welche allein oder im Sinne additiv wirksamer Faktoren an der HH-Pathogenese beteiligt sein könnten. Demnach schien es sinnvoll, die gesamte HFE-Gensequenz dieser Patienten zu bestimmen, um so möglicherweise modifizierend wirkende Mutationen in anderen Loci des gleichen Genes identifizieren zu können. Zusätzlich sollte die Erhebung der zum Diagnosezeitpunkt bekannten Krankengeschichte der Patienten dieses Kollektives dazu verwendet werden, in einer deskriptiven statistischen Auswertung die Zusammenhänge zwischen der jeweiligen klinischen Symptomatik/dem jeweiligen Phänotyp und dem zugrundeliegenden Genotyp darzulegen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten sodann mittels einer multizentrischen Fall-Kontroll-Studie mögliche Zusammenhänge zwischen Veränderungen im HFE-Gen und dem idiopathischen MP untersucht werden. Hierbei schien das HFE-Protein als einer der Hauptregulatoren des Eisenstoffwechsels aufgrund der auffällig hohen Eisenwerte in der SN von MP-Patienten ein geeigneter Kandidat für eine Screening-Untersuchung mit dem Ziel der weiteren Aufklärung der MP-Ätiologie zu sein.

2 Material

2.1.A+B Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

Acetonitril	Merck, Darmstadt
Agarose, NuSieve 3:1	Biowhittaker Molecular Applications, Taufkirchen
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure, Na ₂ -Salz (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ficoll Typ 400 20 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (NaOAc)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Salzsäure (HCl _(aq))	Merck, Darmstadt
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Crewe (Großbritannien)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Für das Abstoppen der zyklischen Sequenzierung:

Stop-Lösung	1,5 M NaOAc, pH 5,2
	50 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0

Sonstige:

dNTPs	GeneCraft, Münster
Ethidiumbromidlösung 0,5µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.3.A+B Zusammenstellung der DNA-Proben

Es wurden je 100 µl der DNA-Proben mit einer Konzentration von 50ng/µl auf Masterarbeitsplatten pipettiert (vgl. 3.1.6.A+B).

2.4.A+B Quelle der Referenzsequenz

Die Referenzsequenzen für das humane HFE-Gen wurden von NCBI unter der Internetadresse www.ncbi.nlm.nih.gov bezogen.

Genomische DNA-Sequenz: NT_007592

mRNA: NM_000410.2

2.5.A+B Übersicht der Primer (Oligonukleotide)

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer wurden alle von der Firma Metabion GmbH, Martinsried synthetisiert, wobei die Konzentration dieser Primer 100 pmol/l betrug. Einige der Primer wurden aus Gründen der längeren Haltbarkeit als lyophilisierte Salze bestellt. Um auch hier die gleiche Endkonzentration zu erhalten, wurde die vom Hersteller angegebene Menge an Ampuwa-Wasser hinzugefügt. Tabelle 2.1. gibt einen Überblick über die eingesetzten Primer.

Tab. 2.1. Übersicht der einzelnen als Primer eingesetzten Oligonucleotide des HFE-Genes mit Angabe des GC-Gehaltes und der Schmelztemperatur

Die Zahlen in der Bezeichnung der Oligonucleotide sind laborintern vergebene Nummern. Ex: Exon; FP: Vorwärtsprimer; RP: Rückwärtsprimer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	GC-Gehalt	Schmelztemperatur
1108_HFE_Ex1_FP	GGT GAC TTC TGG AGC CAT CC	60	72
2318_HFE_Ex1_neu	CCC AAG CGC AAA GAA AAA G	47,4	54,5
1110_HFE_Ex2_FP	CTA CAC ATG GTT AAG GCC TG	50	66
1111_HFE_Ex2_RP	ACC TCA GAC TTC CAG CTG TT	50	66
1112_HFE_Ex3_FP	GGT TGC AGT TAA CAA GGC TG	50	69
1113_HFE_Ex3_RP	TCC TCC ACT CTG CCA CTA GA	55	68
1863_HFE_Ex4_FP	AGA TCC CCT CTC CTC ATC CT	55	59,06
1864_HFE_Ex4_RP	TTT TCT CAG CTC CTG GCT CT	50	59,31
1116_HFE_Ex5_FP	AGT GAG ATG AGG ATC TGC TC	50	64
1117_HFE_Ex5_RP	CAC AGT GAC TTC TCA ACC TC	50	62
2424_HFE_Ex5_RP	AGA GAC TTC CCC CTT GTT CC	55	59,4
1118_HFE_Ex6_FP	AGA GAA GAG GCA AGA TGG TG	50	67
1119_HFE_Ex6_RP	CAA GGA GTT CGT CAG GCA AT	50	70

2.6.A+B DNA-Größenstandard

100 bp DNA-Leiter 1 µg/µl

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Fragmentlängen [bp]: 2072,

1500, 1400, 1300, 1200, 1100,

1000, 900, 800, 700, 600, 500,

400, 300, 200, 100

2.7.A+B Kits

CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit	Beckman Coulter GmbH, Krefeld Pyrosequencing AB, Uppsala (Schweden)
QIAquick Gel-Extraktions-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy-MIDI-Kit	Qiagen GmbH, Hilden

2.8.A+B Geräte

CEQ 8000 Zyklussequenzierer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Elektrophoresekammer 40-0708	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer 40-1214	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophorese Spannungsgeber Consort E 835	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Ultrospec 3100 pro	amersham pharmacia biotech
Eppendorf Zentrifuge 5417 C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5804	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Fotodokumentationsanlage Transilluminator	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Gene-Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City (USA)

Magnetrührer IKAMAG REO	Bachofer Laboratoriumsgeräte Reutlingen
Milli-Q	Millipore GmbH, Eschborn
Thermocycler MJ Research PTC 200	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
Thermomixer HBT 130-2	HLC-Haep Labor consult, Bovenden
pH-Meter MP 230	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
UV-Tisch	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vakuumzentrifuge	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Concentrator 5301	
Vortexer REAX control	Heidolph Instruments GmbH + Co, Schwabach
Waage Precisa XT 6200C-FR	PESA Waagen GmbH; Bissingen- Steinhofen
WAVE HT 3500	Transgenomic, Crewe
Nukleinsäure-Fragmentanalyse-System	(Großbritannien)

2.9.A+B Verbrauchsmaterialien

Beckman 96-well Platten	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Easy Peel Klebefolie	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen
Easy Pierce Strong Klebefolie	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Microwell 96 U-Platten	Nunc GmbH + Co KG, Wiesbaden

Multi 96 well PCR-Platten

PEQLAB, Biotechnologie GmbH,
Erlangen

PCR Softstrips

Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch
Oldendorf

Pipettenspitzen

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH,
Hamburg

3 Methoden

Abbildung 3-1 soll zur Veranschaulichung der Vorgehensweise in dieser Arbeit dienen. In diesem Kapitel werden zunächst die Prinzipien der dabei angewandten Untersuchungsmethoden erklärt.

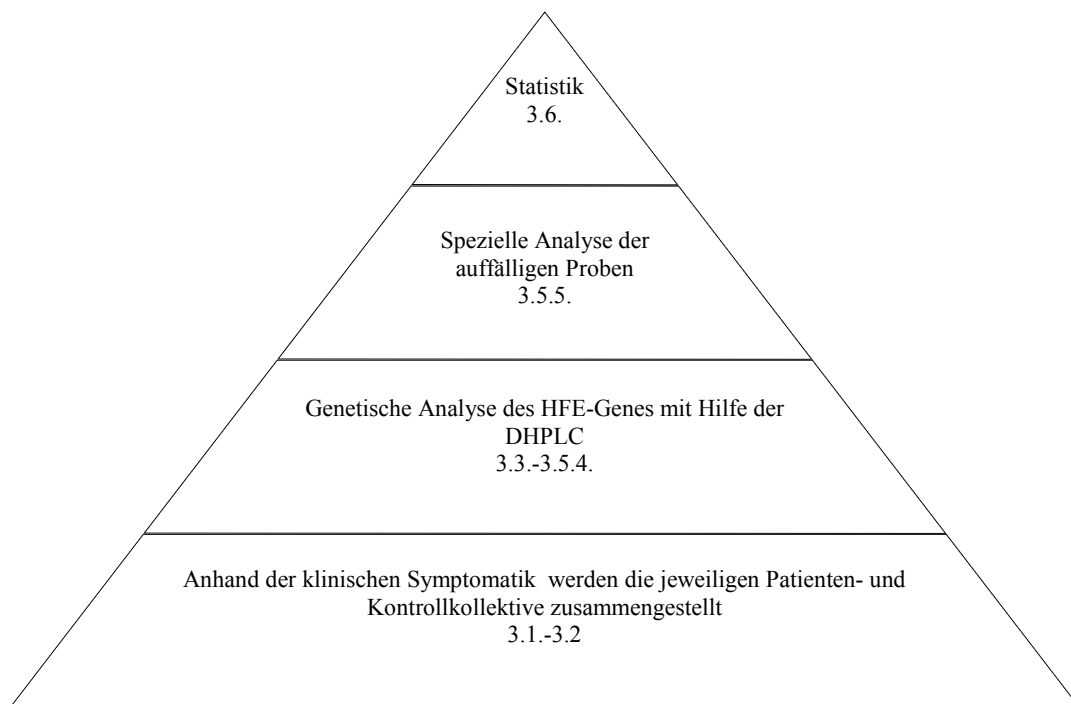


Abbildung 3-1 Schema zur Vorgehensweise

Die Zahlenangaben am Ende beziehen sich auf die jeweiligen Kapitel im folgenden Methodenteil. Durch die entsprechenden Angaben in Abbildung 4-1 können die hier besprochenen Methoden parallel zum folgenden Ergebnisteil eingesehen werden.

3.1.1.A Zusammenstellung des Hämochromatose-Kollektives und der DNA-Proben

Zur genetischen Analyse des HFE-Genes wurde die DNA aller Patienten eingesetzt, welche aufgrund des Verdachts auf eine Hämochromatose bzw. zur Genotypenanalyse aufgrund der Verwandtschaft mit einem an der HH1 erkrankten Patienten mit auffälligem Genotyp im Institut für Humangenetik, Abteilung Medizinische Genetik der Universitätsklinik Tübingen auf die zwei Hauptmutationen in Exon 2 (H63D) und Exon 4 (C282Y) hin untersucht worden waren. Nachdem von einigen dieser Patienten nicht mehr genug DNA-Probe zur Verfügung stand und durch das Versenden von Briefen an die jeweiligen Hausärzte mit der Bitte um Aufklärung des Patienten über den Inhalt dieser Arbeit und Zusendung von Blut, nur wenig weitere DNA gewonnen werden konnte, waren es insgesamt 116 Patienten, wobei die jeweiligen Proben im Zeitraum vom 30.01.2001 bis 07.11.2003 an das Institut gesendet worden waren. Bei diesen Patienten bestand dabei ein jeweils unterschiedlich begründeter Verdacht auf das Vorliegen einer HH1. Daher schien es angebracht, die Patienten je nach Klinik und Angabe auf dem Einsendeschein in vier Gruppen einzuteilen. Tabelle 3.1. zeigt die Kriterien, anhand welcher die Gruppeneinteilung erfolgte.

Tab.3.1. Auflistung der Kriterien zur Einteilung der Patienten in Gruppen
 Abkürzungen: HH1=HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose.

		Einschlusskriterien für die jeweilige Gruppe
Gruppe 1	Dringender klinischer Verdacht auf HH1	<ul style="list-style-type: none"> • Der Patient hat auffällige Laborwerte für einfache Eisen–Stoffwechsel-Parameter wie Eisen, Transferrin, Ferritin oder Transferrinsättigung, gleichzeitig ist auf dem Einsendeschein „Dringender V.a. HH1“ vermerkt; • Auf dem Einsendeschein ist „Dringender V.a. HH1“ vermerkt; Es existieren keine vorbekannten Laborwerte; • Auf dem Einsendeschein ist nichts vermerkt, jedoch legen vorbekannte pathologische Eisen-Stoffwechselfparameter das Vorliegen einer HH1 nahe.
Gruppe 2	Kranker Verwandter	<ul style="list-style-type: none"> • Der Patient ist verwandt mit einem anderen Patienten, der sowohl die Klinik einer HH1 als auch den dazu passenden Genotyp hat, und zeigt selbst bereits die klinischen Symptome einer HH1.
Gruppe 3	Gesunder Verwandter	<ul style="list-style-type: none"> • Der Patient selbst zeigt keinerlei klinische Symptomatik. Aufgrund der engen Verwandtschaft zu einem Patienten, der sowohl die Klinik einer HH1 als auch den dazu passenden Genotyp hat, schien eine Genanalyse angebracht;
Gruppe 4	HH1 als Differential-Diagnose	<ul style="list-style-type: none"> • Auf dem Einsendeschein ist nichts vermerkt, der Patient hat im Normbereich liegende Eisen-Stoffwechsel-Parameter; • Auf dem Einsendeschein ist „Hepatopathie unklarer Genese“ vermerkt, die HH1 ist lediglich eine Differentialdiagnose;

3.1.2.A Anlegen von Patientenbögen zur Erfassung der Klinik

Um die in den archivierten Patientenakten niedergelegten klinischen Angaben besser erfassen und ordnen zu können, wurde für jeden Patienten ein Patientenbogen angelegt. Auf diesen wurden alle Daten gesammelt, welche für die in dieser Arbeit geplante Auswertung relevant sind. Tabelle 3.2. zeigt einen solchen Bogen und dessen jeweilige Inhaltspunkte.

Tab. 3.2. Muster eines Patientenbogens zur Erhebung relevanter Patienten-bezogener Daten

Die „ID“ ist eine in dieser Arbeit willkürlich vergebene Nummer und hat keinerlei Bedeutung für die Einteilung der Patienten. Die „DNA-Nummer“ ist die von der Humangenetik vergebene interne Laboruntersuchungsnummer. Das „DNA-Ergebnis 1“ bezieht sich auf die vorangegangene Analyse der Exons 2 und 4 im Institut für Humangenetik, Abteilung Medizinische Genetik, während alle weiteren Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden. Die Gruppenzugehörigkeit wurde nach den Kriterien, welche in Abbildung 3.1 aufgelistet sind, ermittelt. Die Rubrik „verwandt mit“ bezieht sich auf eine etwaige Verwandtschaft mit Patienten, die ebenfalls in der Humangenetik Tübingen untersucht wurden. Die darauffolgende Spalte enthält Angaben zum Verwandtschaftsgrad dieses Patienten mit dem anderen hier aufgeführten Patienten. Die „Aufnahme“ bezieht sich auf die Unterscheidung eines stationären oder ambulanten Aufenthalts bzw. Einweisung von extern. Der „Phänotyp“ bezieht sich auf „Krank“ oder „Gesund“ und ist als Zusatz zur Gruppeneinteilung anzusehen. Die folgenden Laborparameter sind jeweils so angeordnet, dass der erste Wert den gemessenen Wert in der üblicherweise angegebenen Messeinheit angibt, während die zweite Spalte für die Einschätzung des Wertes in „erhöht“, „erniedrigt“ und „normal“ dient. Bei der Aufzählung der einzelnen Symptome wurde jeweils ein „ja“ oder „nein“ eingetragen, wobei das „nein“ nicht unterscheidet, ob überhaupt auf diese Frage hin untersucht worden ist. Diese Problematik bei Erhebung und Darstellung der Patienten-bezogenen Daten wird im Ergebnisteil noch einmal aufgegriffen und diskutiert. Abkürzungen: Verwandtsch.grad= Verwandtschaftsgrad; BE f DNA= Blutprobeneingang für DNA-Analyse; Transferrinsätt.=Transferrinsättigung; Sonst.= Sonstiges; Sek.= sekundär

Patientenbogen				
ID	DNA-Nr.	Geburtsdatum	Alter	Nationalität
Geschlecht	DNA-Ergebnis 1		Exon 2	
Polymorphismen	Exon 4		Endergebnis	
Gruppe				
Blutsverwandtschaft der Eltern	Verwandt mit		Verwandtsch.Grad	
Datum der Vorstellung	Aufnahme			

Aufnahmegrund				
Aufnahmestatus				
Sonstiges zur Aufnahme				
Datum BE f DNA				
Indikation DNA-Unters				
Phänotyp	Transferrin(mg%)	Transferrin	Ferritin(µg%)	
Ferritin	Eisen i S (µg%)	Eisen	Transferrinsätt.(%)	
Transferrinsätt.	GOT(U/l)	GOT	GPT(U/l)	GPT
γ-GT (U/l)	γ-GT	Quick (%)	Quick	
Bilirubin ges.(mg%)	Bilirubin		Albumin (g%)	
Albumin	Ges.Eiweiß (g%)		Ges.Eiweiß	
Leber-Sono				
Leber-Biopsie				
Leber-Veraschung				
Hepatitis				
Sonst. Ursachen für Leberschäden				
Hautcolorierung	Ikterus		Müdigkeit	
Lebervergrößerung	Leberzirrhose		HCC	

Milzvergrößerung	Gallenblasensteine	Diabetes mellitus Typ II
Abdominalschmerz	Herzrhythmusstörungen	Herzinsuffizienz
Sek. Kardiomyopathie	Hypothyreose	Osteoporose
Arthropathie		
Sonstiges an Klinik		
Comorbiditäten 1		
Comorbiditäten 2		
Sonstiges		

3.2.B Zusammenstellung des Parkinson-Kollektives

Um Aussagen über den Einfluss bestimmter Merkmale auf ein Krankheitsbild machen zu können, müssen zunächst zwei sich möglichst nur bezüglich der Erkrankung unterscheidende Kollektive zusammengestellt werden. Das eine Kollektiv setzt sich dabei aus Patienten mit dieser Erkrankung zusammen, während das Kontroll-Kollektiv aus Probanden besteht, die als gesund erklärt wurden.

Die Zusammenstellung der zwei im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektive erfolgte anhand der klinischen Untersuchungen durch die Neurologischen Universitätskliniken in Dresden, Homburg, Biskirchen, Rostock und Würzburg unter der Leitung von Frau PD Dr. Berg, Universitätsklinik Tübingen und Herrn Prof. Dr. Becker, Universitätsklinik Homburg.

Hierzu wurde neben der Erhebung einer Anamnese eine ausführliche neurologische Untersuchung durchgeführt. Wenn ein Patient eindeutige klinische Symptome für das Vorliegen der Parkinsonschen Erkrankung aufwies, wurde zusätzlich der Schweregrad der Erkrankung mittels der Stadien-Einteilung von Hoehn und Yahr (1967) sowie der UPDRS (Unified parkinsons disease rating scale) (Fahn S et al., 1987) bestimmt.

So entstanden ein Patientenkollektiv aus 281 Probanden und ein Kontrollkollektiv aus 280 Personen.

Die untere Altersgrenze im Patientenkollektiv betrug hierbei 29 Jahre, die obere Grenze wurde bei 88 Jahren angesetzt. Demnach wurden also auch Patienten in das Kollektiv aufgenommen, deren Alter weit unter dem Durchschnittsalter für diese Krankheit liegt. Der Grund hierfür ist die Annahme, dass die genetisch determinierten Formen der Parkinsonschen Erkrankung sehr viel früher als durchschnittlich erwartet auftreten, wie es bspw. auch bei Mutationen im Parkin-Gen der Fall ist (Lücking et al., 2000), und im Rahmen dieser Arbeit eben diese genetisch modifizierten Formen untersucht werden sollen.

Zusätzlich zu der klinischen Anamnese wurde außerdem bei allen Probanden der zwei Kollektive die Echogenität der Substantia nigra (SN) mit Hilfe der

transkraniellen Sonographie (TCS) bestimmt. In mehreren Studien wurde nämlich bei über 90 % der Parkinson-Patienten eine im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhte Echogenität der SN nachgewiesen (Becker et al., 1995; Berg et al., 2001; Walter et al., 2002). In anschließenden post mortem Studien konnte sodann ein erhöhter Eisengehalt in der SN als Ursache für die beobachtete Echogenitätserhöhung festgestellt werden (Berg et al., 1999; Berg et al., 2002).

In Anlehnung an diese Studien wurde auch hier eine entsprechende Messung an beiden Kollektiven durchgeführt. Dabei wurde eine Echogenitätsfläche von $\geq 0,20\text{cm}^2$, welche der 75. Perzentile in der Normalbevölkerung entspricht, als auffällig gewertet.

3.3.1.A Vorbereiten der Arbeitsplatten im HH1-Kollektiv

Der Großteil der DNA-Proben mit Angabe der jeweiligen Konzentration lag bereits zu Beginn der Studie in ausreichender Menge isoliert vor. Nach Anfrage an die entsprechenden Hausärzte wurde von einigen Patienten zusätzlich EDTA-Blut für diese Studie eingesendet, da in diesen Fällen nicht mehr genug Probe vorhanden war. Hier erfolgte eine standardisierte Isolierung der DNA („Vollsalzmethode“, Miller et al., 1988) mit anschließender photometrischer Konzentrationsbestimmung (Sambrook J et al., 1989).

3.3.2.B Konzentrationsbestimmung und Vorbereiten der Arbeitsplatten im Parkinson- Kollektiv

Nach schriftlichem Einverständnis von Seiten der Patienten erfolgte die Blutentnahme und standardisierte Isolierung der DNA („Vollsalzmethode“, Miller et al., 1988). Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Proben mittels photometrischer Messungen (Sambrook J et al., 1989) bestimmt. Die so aufgearbeiteten Ansätze lagen zu Beginn der vorliegenden Studie bereits auf Masterarbeitsplatten pipettiert vor.

3.3.3.A+B Bestimmung der DNA-Konzentration und Fertigstellen der Arbeitsplatten

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mittels photometrischer Messungen in Quarzküvetten mit einer Wellenlänge von 260nm, bei welcher das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) einer Konzentration von 50µg/ml (Sambrook J et al., 1989).

Für das anschließende Fertigstellen der Arbeitsplatten wurden sodann je 100µl der entsprechenden DNA-Probe mit einer Konzentration von 50ng/µl in 96-*well* Platten (Microwell 96U, Nunc GmbH) überführt.

Beim HH1-Kollektiv waren die Konzentrationen der einzelnen Ausgangslösungen allerdings sehr uneinheitlich. Um hier eine Endkonzentration von 50ng/µl zu erhalten, musste für jede Probe einzeln berechnet werden, wie viel Ampuwa-Wasser hinzupipettiert werden musste, um die benötigten 100µl einer DNA-Stammlösung mit entsprechender Konzentration zu erhalten.

Die DNA-Lösungen der Parkinson-Patienten und der Kontrollen hingegen lagen bereits zu Beginn der Studie mit einer Konzentration von 500ng/µl vor. Durch die entsprechend benötigte Zugabe von Ampuwa-Wasser (1:10 Verdünnung) wurden sie auf die gewünschte Konzentration von 50 ng/µl verdünnt.

Das jeweils letzte *well* der Platten wurde mit Ampuwa-Wasser als Negativkontrolle gefüllt. Die so fertiggestellten Platten dienten sodann als Ausgangsbasis für alle weiteren Analyseschritte.

3.4.1.A+B Qualitätskontrolle der DNA mit Hilfe der PCR

Um die Qualität der DNA-Proben zu überprüfen, wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) von jeder einzelnen Probe durchgeführt. Das Prinzip dieser Untersuchungsmethode soll im Folgenden näher erklärt werden.

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) ist ein *in vitro* Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung eines zwischen zwei bekannten DNA-Sequenzen liegenden Abschnitts.

Das Verfahren gliedert sich dabei in drei Hauptabschnitte: Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Durchgeführt wird die PCR in speziell hierzu entwickelten Heizblöcken bzw. Thermocyclern, welche für die jeweils angegebene Zeit die angegebenen Temperaturen gewährleisten.

Der erste Schritt hierbei ist die initiale Denaturierung, welche zu einer Trennung der Doppelstränge der Ausgangs-DNA („template-DNA“) führt. Dies ist meist zwischen 92-98 °C der Fall. Anschließend wird auf ca. 55 °C abgekühlt, so dass die in den Reaktionsansatz zugefügten Primer in Form von Oligonukleotiden an die nun als Einzelstrang vorliegende Ausgangs-DNA binden können. Anschließend wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, wobei dies dem Temperaturoptimum der thermostabilen Taq-Polymerase entspricht, welche durch den Einbau von einzelnen freien Nucleotiden die Primer verlängert und damit einen zum Einzelstrang komplementären Strang produziert.

Dieser Vorgang wird 20-40mal wiederholt, wobei die Denaturierungszeit in den folgenden Zyklen verkürzt wird, da die hohen Temperaturen auch nachteilige Effekte wie eine Depurinierung von Primern oder der Template-DNA aufweisen. Schließlich wird nach dem letzten Zyklus eine finale Elongation bei 72 °C und einer Dauer von 5-10 Minuten eingeleitet, welche sicherstellen soll, dass die Polymerase ihre Arbeit vollständig beendet.

Als mehrheitliches Endprodukt erhält man schließlich den zu untersuchenden DNA-Abschnitt, welcher zwischen den zwei eingesetzten Primern positioniert war.

Tabelle 3.3. zeigt einen PCR-Ansatz mit einem Volumen von 25µl, wie er im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde. Die angegebenen Einzelkomponenten

wurden hierzu mit der jeweiligen DNA-Probe in einem tube zusammengeführt. Anschließend wurde soviel Ampuwa-Wasser zugefügt bis ein Ansatz von 25 μ l entstanden war. Um die Komponenten möglichst zu schonen, wurde der Vorgang auf Eis durchgeführt.

Tab. 3.3. Übersicht der Einzelkomponenten in der PCR für die Amplifikation der 6 Exons des HFE-Genes

Komponente	Menge oder Endkonzentration	Stammlösung
DNA-Matrize	250ng	50ng/ μ l
Primer 1	0,4 μ M	100 μ M
Primer 2	0,4 μ M	100 μ M
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,1mM	je 10mM
DNA-Polymerase	2U	5U/ μ l
Reaktionspuffer	2,5x	10x
MgCl ₂	1,5mM	15mM
Ampuwa-Wasser	Auffüllen auf 25 μ l	
Endansatz	25 μ l	

Danach wurde das tube mit dem fertigen Ansatz in einen Thermocycler, hier in einen MJ Research PTC200, gestellt und gemäß der in Tabelle 3.4. angegebenen Zeiten und Temperaturen einer PCR unterzogen.

Tab. 3.4. Reaktionsbedingungen für die PCR im Thermocycler für die Amplifikation der 6 Exons des HFE-Genes

Schritt	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min.]
1	Initiale Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	0,5
3	<i>Annealing</i>	55	1
4	Elongation	72	1
	Wiederholung der Schritte 2-4 29mal		
5	Finale Elongation	72	10

Das Endprodukt wurde sodann bis zur weiteren Verarbeitung bei +4 °C oder -20 °C aufbewahrt. Der Erfolg und die Qualität der durchgeführten PCR konnte mittels Agarosegelelektrophorese überprüft werden.

3.4.2.A+B Agarosegelelektrophorese zur Qualitätskontrolle der Amplifikate

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente, die einer PCR unterzogen wurden, voneinander getrennt, identifiziert und anhand des Vergleichs mit einem Referenz-Basenpaarleiter bezüglich ihrer Länge eingeschätzt werden. Das dieser Methode zu Grunde liegende Prinzip ist die Wanderung der negativ geladenen DNA-Fragmente in einem Spannungsfeld in Richtung der Anode, wobei längere Fragmente langsamer wandern als die kürzeren und damit eine Trennung der Fragmente nach deren Größe möglich ist (Sambrook, J et al., 1989).

Für die Herstellung eines 2 %igen Gels wird dabei zunächst die entsprechend benötigte Menge an Agarose durch Aufkochen in 1xTBE gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 45 °C wird soviel Ethidiumbromid zugefügt bis eine Endkonzentration von 30µg/ml erreicht ist, wobei Ethidiumbromid ein in die DNA interkalierender Farbstoff ist, welcher unter Anregung durch UV-Licht (Wellenlänge:254-366nm) ein orange-rotes Licht (Wellenlänge:590nm) emittiert. Nach dem Einsetzen von Kämmen und Abkühlen des Gels werden je 5µl des PCR-Produkts mit 2µl Ladepuffer in die 2mm dicken und 3-8mm breiten Probetaschen eingefüllt. Pro Reihe wird außerdem noch ein Basenpaarleiter als Referenz für die spätere Längeneinschätzung hinzugefügt, von dem zuvor eine 5 %ige Lösung in Blaupuffer hergestellt worden war.

Sowohl der eingesetzte Ladepuffer als auch der Blaumarker werden dabei zur Erhöhung der Dichte des PCR-Produkts bzw. des Basenpaarleiters eingesetzt. Dies soll einem Entweichen des Ansatzes aus der Probetasche in den Elektrophoresepuffer vorbeugen. Darüber hinaus weisen diese Farbstoffe eine negative Ladung auf, so dass sie in Analogie zur DNA als sichtbare Farbstreifen

in Richtung Anode wandern und somit einer groben Orientierung der bereits zurückgelegten Wanderstrecke der DNA dienen können.

Für die Untersuchung der PCR-Produkte wurde im Rahmen dieser Arbeit je nach Anzahl der Einzelproben ein Mini-Gel (ca. 6-8cm lang) oder ein Midi-Gel (ca. 20cm lang) hergestellt und unter einer Spannung von 80V bzw. 115V für die Dauer von ca. 30 Minuten in die Gelkammer gestellt. Als Elektropheresebuffer diente dabei 1xTBE.

Das fertige Gel wurde schließlich mit Hilfe einer digitalen Farbdokumentationsanlage visualisiert und dokumentiert.

3.4.3.A+B Heteroduplex-Bildung für die DHPLC-Analyse

Nach der Qualitätsprüfung der Amplifikate mittels Agarosegel wurde jeweils ein definiertes Volumen zweier Amplifikate in ein neues *well* überführt, so dass beide Proben nun zu gleichen Teilen im selben Ansatz vorlagen.

Diese Mischung wurde anschließend der Heteroduplexbildung im Thermocycler (Gene-Amp PCR System 9700) unterzogen. Hierbei wird der Ansatz zur Denaturierung für 2 Minuten auf 94 °C erhitzt. Danach wird die Renaturierung durch langsames Abkühlen auf 10 °C über einen Zeitraum von 30 Minuten eingeleitet.

Dem jeweiligen Ansatz kann auch zur Volumenerhöhung Ampuwa-Wasser zugefügt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies lediglich bei Amplifikaten mit sehr hohem Elutionspeak am DHPLC-Gerät vorgenommen, da dies auf eine sehr hohe Konzentration im Ansatz hinweisend ist.

3.4.4.A+B Mutationsscreening mit Hilfe der DHPLC

Die denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) ist ein automatisiertes Verfahren mit hohem Probendurchsatz, welches zur schnellen Auffindung von Veränderungen in der DNA-Sequenz eingesetzt wird (Underhill et al., 1996).

Hierzu werden je zwei PCR-Produkte zu gleichen Volumenanteilen gemischt und der Heteroduplexbildung unterzogen, indem sie zunächst auf 95 °C erhitzt und dann langsam wieder abgekühlt werden. Beim Abkühlen lagern sich die durch die hohen Temperaturen erzeugten Einzelstränge wahllos aneinander, was bedeutet, dass sich im Falle der Heterozygotie oder Homozygotie für eine Mutation bei einer der Proben Doppelstränge bilden, welche keine durchgehend komplementäre Sequenz mehr aufweisen. Unter solchen Bedingungen können demnach 4 unterschiedlich konfigurierte Doppelstränge entstehen.

Nach der Heteroduplexbildung wird der Ansatz in das DHPLC-Gerät gestellt, wo mit Hilfe einer Injektionsnadel eine vorgegebene Menge der Probe auf eine Säule überführt wird. Hier wird die negativ geladene DNA der Hetero- und Homoduplices über ihre Phosphatgruppen an den hydrophilen Arm des Triethylammonium-Kations (TEAA) gebunden, welcher aus Ammoniumkationen besteht und die mobile Phase der Chromatographie darstellt. Über die Alkylgruppen am anderen Ende des TEAA-Moleküls wird die DNA an der hydrophoben, neutralen Polymermatrix aus Polystyrol-Divinylbenzol (DNASep™ HAT, 6,5mmØx37mm lang, Transgenomic) fixiert, welches die stationäre Phase darstellt. Nach diesem initialen Bindungsvorgang findet die Ionen-Umkehrphasenchromatographie statt. Hierzu wird bei einer vorgegebenen Temperatur das Acetonitril in kontinuierlich ansteigender Konzentration über die Säule mit der daran gebundenen DNA geleitet, welches die Lösung der DNA-Moleküle von der stationären Phase bewirkt. Dabei lösen sich die heterozygoten Stränge im Vergleich zu den homozygoten Strängen schneller von der Säule ab.

Der Grund hierfür ist die Freilegung eines hydrophilen Kerns in der DNA im Falle einer fehlerhaften Aneinanderlagerung zweier Nucleotide. Dieser Kern

interagiert mit der wässrigen Komponente der mobilen Phase und führt so zu einem schnelleren Ablösen des DNA-Strangs von der Säule. Durch die Wahl der geeigneten Analysetemperatur wird dieser Kern noch vergrößert und damit der Vorgang noch weiter beschleunigt. Dies führt schließlich zu einem signifikant schnelleren Ablösen der Heteroduplices im Vergleich zu den Homoduplices, was anhand der Registrierung eines Elutionsprofils visualisiert werden kann.

Sowohl die hierfür optimale Temperatur als auch der geeignete Gradient werden von der WAVEMAKER-Software nach Eingabe der jeweiligen Sequenz berechnet und vorgeschlagen (vgl. 3.3.3.A+B).

Nach der Messung der Elutionsvorgänge mit einer UV-Lampe bei 260nm und der Erstellung eines Chromatogramms mit Hilfe einer Software, kann sodann eine Aussage über das mögliche Vorliegen von Veränderungen in der DNA-Sequenz getroffen werden.

3.5.1.A+B Primer-Design und Etablierung der PCR-Bedingungen

Um eine PCR durchführen zu können, müssen zunächst die passenden Primerpaare zur Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts für jedes Fragment einzeln ausgewählt und bei einer entsprechenden Firma bestellt werden.

Da im Institut für Humangenetik, Abteilung Medizinische Genetik die jeweiligen Primerpaare zur Amplifikation der sechs Exons des HFE-Genes allerdings bereits vorlagen, wurden diese lediglich hinsichtlich der Durchführbarkeit und Qualität in Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit geplanten Analysemethoden geprüft.

Dabei erwies sich der Rückwärts-Primer für Exon 1 als nicht einsetzbar, da hier zusätzlich zum exonischen Bereich ein sehr großer Abschnitt des Introns 1 im Produkt vertreten war und dies zu fast durchgängig auffälligen Elutionsprofilen am DHPLC-Gerät führte.

Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des Online-Computer-Programms Primer 3 ein neuer Primer bestellt, welcher näher am Ende von Exon 1 liegt und damit weniger intronische Sequenz beinhaltet (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3_www.cgi). Bei der Auswahl des Primers wurde außerdem auf eine Sequenzlänge zwischen 15-27bp, auf einen GC-Gehalt zwischen 20-80 % sowie auf ein ausgeglichenes Verhältnis von G/C zu A/T geachtet. Darüber hinaus war es wichtig, dass die Schmelztemperatur zwischen 55-80 °C lag, um unter ausreichend hohen *Annealing*-Temperaturen arbeiten zu können. Für die Amplifikation aller anderen Exons konnten die im Institut bereits vorhandenen Primerpaare eingesetzt werden.

Nachdem alle Primer vorlagen, wurde für die Exons 1-6 je eine PCR bei einer *Annealing*-Temperatur von 55 °C durchgeführt (vgl. Tabelle 3.1 und 3.2). Da jedoch die Qualität der Banden der Exons 1 und 4 nach Auftragen auf ein 2 %iges Agarosegel nicht zufriedenstellend war, wurde für diese Exons zur Ermittlung der optimalen *Annealing*-Temperatur eine Gradienten-PCR durchgeführt (vgl. Abb. 4-3 unter 4.1.2.A+B). Auch hierzu wurde der Standard-PCR-Ansatz, wie in Tabelle 3.1 gezeigt, verwendet und der fertige Ansatz in

den Thermocycler gestellt. Als *Annealing*-Temperatur wurde nunmehr aber kein einzelner Wert definiert, sondern ein Temperaturintervall mit entsprechenden Gradienten für die einzelnen *tubes* angegeben. Anhand des Ergebnisses im Agarosegel konnte sodann die optimale *Annealing*-Temperatur ermittelt werden.

3.5.2.A+B DHPLC-Methodenoptimierung

Die optimale Analysetemperatur am DHPLC-Gerät wird nach Eingabe der jeweiligen Sequenz des PCR-Amplifikates mittels Wavemaker-Software 4.1 ermittelt. Die Software berechnet hierzu ein Schmelzprofil für die angegebene Sequenz, welche auf dem Poland Algorithmus nach Fixman und Freire (1977) basiert.

Anhand des so berechneten Schmelzprofils können nun die Temperaturen bestimmt werden, bei denen die eingesetzte DNA zu 100 % oder zu 0 % helikal vorliegt. Für die Analyse ist die Temperatur von Bedeutung, bei der ca. 99 % der DNA helikal vorliegt. Bei dieser Temperatur denaturiert die Heteroduplex-DNA und löst sich von der Säule, während die Homoduplex-DNA vergleichsweise etwas länger an der Säule haften bleibt.

Für manche Sequenzen sind zwei oder mehr Analysetemperaturen nötig, da Schmelzunterschiede zwischen zwei Bereichen in einem Amplifikat vorliegen können. Dies ist dann der Fall, wenn der Temperaturunterschied zwischen 0 % und 100 % helikalen Anteils mehr als 5 °C beträgt.

Abbildung 3-2 zeigt das Vorgehen zur Ermittlung der geeigneten Temperatur, welche sodann für die folgenden Analysen des jeweiligen Fragments eingesetzt wird.

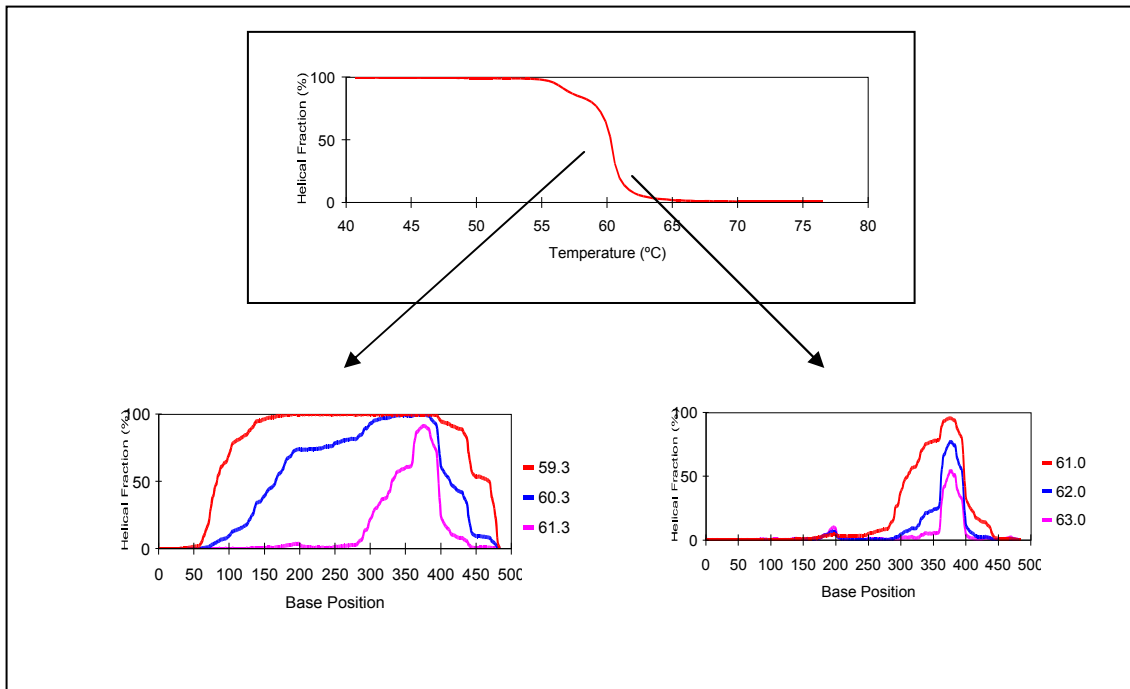


Abbildung 3-2 Schmelzprofile zur Ermittlung der Analysetemperatur von Exon 4

Der obere Teil der Abbildung zeigt das von der Wavemaker-Software berechnete Schmelzprofil. Die unteren zwei Grafiken veranschaulichen das Schmelzverhalten des Fragments bei zwei verschiedenen Temperaturen. Anhand dieser wurde die Analyse bei zwei Temperaturen beschlossen. Für den linken Exonabschnitt wurde eine Temperatur von 59,3 °C, für den rechten Schlussteil eine Temperatur von 61,0 °C gewählt.

Die Analyse am DHPLC-Gerät gliedert sich in vier Abschnitte, welche sich in der Zusammensetzung der Puffer A und B in der mobilen Phase unterscheiden. Der so erzeugte Gradient dient dabei der unterschiedlich schnellen Ablösung der DNA von der Säule, welche wiederum von der Homogenität der DNA-Stränge abhängt.

Im ersten Schritt erfolgt hierzu die Injektion von 5µl Amplifikat über 0,1 Minuten. In dieser Zeitspanne wird der Anteil an Puffer B um 3 % erhöht, wobei die Erhöhung um 1 % an Puffer B den Acetonitrilgehalt um 0,25 % erhöht.

Der Gradient zu Beginn des nächsten Abschnitts wird dann so gewählt, dass der Elutionspeak bei ca. 1,6 Minuten auftritt. Dieser als Startgradient bezeichnete Wert wird empirisch bestimmt, indem man Amplifikate unter verschiedenen Gradienten analysiert und dann denjenigen daraus wählt, bei welchem der Elutionspeak bei 1,6 Minuten auftritt.

Abbildung 3-3 zeigt die unterschiedlichen Elutionsprofile von Fragment 1 unter Einsatz von verschiedenen Gradienten.

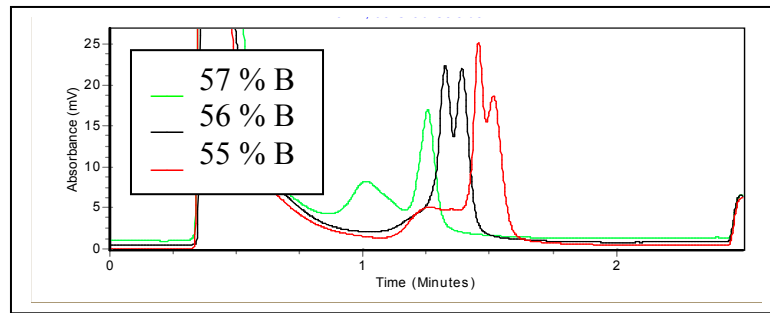


Abbildung 3-3 Ermittlung des Startgradienten

Elutionsprofile von Fragment 1 unter Einsatz verschiedener Gradienten. Es ist nicht nur eine Verschiebung nach rechts durch Erniedrigung des Anteils an Puffer B erkennbar, sondern auch ein deutlicheres Hervortreten von Doppelpeak-Mustern, welche auf eine Auffälligkeit im Amplifikat hinweisen. Das hier vorliegende Muster zeigt das Elutionsprofil von Fragment 1, wie es unter dem Einsatz des alten Rückwärtsprimers mit großem intronischen Abschnitt erhalten wurde.

3.5.3.A+B Vorbereitung der Proben für die DHPLC

Nach Durchführung der PCR in Multi 96-well PCR-Platten (Peqlab) wurden die Amplifikate zunächst einer Qualitätsprüfung mittels Agarosegelelektrophorese unterzogen. Daraufhin wurden je zwei Amplifikate der Exons 1,3,5 und 6 zu gleichen Anteilen gemischt und im Thermocycler der Heteroduplexbildung unterzogen. Die Amplifikate der Exons 2 und 4 wurden zunächst nach demselben Prinzip gemischt. Da aber anhand der Ergebnisse am DHPLC-Gerät und der darauffolgenden Einzelanalyse und Sequenzierung auf eine hohe Homozygotenfrequenz geschlossen werden konnte, wurden die Amplifikate dieser Exons mit CEPH-DNA-Amplifikaten gemischt. Diese als Referenz-DNA dienende Probe ist die DNA eines Probanden, dessen Genom innerhalb des CEPH (Centre d'Etudes des Polymorphismes Humaines) als ein Mitglied von einer der untersuchten Familien analysiert wurde (Dausset et al., 1990). Für die Heteroduplexanalyse der Exons 2 und 4 wurde die Probe CEPH-2801 verwendet, welche bei der Sequenzierung keinerlei Mutationen in Exon 2 und 4 aufwies und damit als Wildtyp für das Poolen mit Proben-DNA geeignet war. Bei allen anderen Exons wurde auf die Mischung mit einer Wildtyp-DNA verzichtet, da anhand der Analyse am DHPLC-Gerät und dem darauffolgenden Sequenzieren einzelner Stichproben auf keine hohe Homozygotenfrequenz

geschlossen werden konnte, und so das Mischen der Proben untereinander als hinreichend sicher angesehen werden konnte.

3.5.4.A+B Interpretation eines Elutionsprofils

Anhand der Elutionsprofile am DHPLC-Gerät können bereits erste Aussagen über das Vorhandensein von Sequenzunterschieden gemacht werden. Im Idealfall entsteht hierbei ein Elutionsprofil mit vier Peaks. In der Praxis hingegen ist das Vorkommen von zwei oder in Einzelfällen auch drei Peaks sehr viel häufiger. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Schmelzverhalten der bei der Heteroduplexbildung entstandenen vier unterschiedlichen Helices sehr ähnlich ist und damit auch ähnliche Retentionszeiten erhalten werden. Dies wiederum kann dazu führen, dass jeweils zwei der insgesamt vier Peaks bei der Analyse sehr nah beieinander auftreten und im Chromatogramm nur noch zwei Peaks zu erkennen sind. In manchen Fällen kann das so weit gehen, dass statt der vier Peaks nur noch eine „Schulter“ vor dem zweiten Peak auftritt. Diese „Schulter“ kann dann allerdings sowohl durch einen Sequenzunterschied als auch durch eine Verunreinigung oder durch ein PCR-Artefakt bedingt sein. Deswegen ist es von enormer Wichtigkeit, die Elutionsprofile der verschiedenen Proben immer untereinander abzugleichen und erst dann das vorliegende Muster als auffällig bzw. unauffällig zu bewerten.

Wenn ein Elutionsprofil als auffällig bewertet wurde, wurden die zwei Proben, welche zuvor als Pool dieses Muster bedingt hatten, nach der Heteroduplexbildung im Thermocycler nun jeweils als Einzelprobe am DHPLC-Gerät analysiert.

Dadurch konnte die Zuordnung der Auffälligkeit auf die einzelne Probe erfolgen und diese der weiteren Analyse durch Sequenzieren zugeführt werden. Die Exons 2 und 4 bildeten hierbei eine Ausnahme. Es zeigten sich einige Fälle, bei denen die Einzelproben nur geringe Auffälligkeiten am DHPLC-Gerät aufwiesen, wie bspw. die Änderung der Retentionszeit, nachdem dieselben Proben im Pool eindeutig auffällige Elutionsprofile in Form von Doppel- oder

Dreierpeaks aufwiesen. Hier wurde das Vorliegen von homozygoten Mutationen vermutet und auch durch weitere Analysen bestätigt. Daher wurden alle Proben der Exons 2 und 4 nunmehr im Pool mit einer CEPH-DNA, die nachweislich keinerlei Mutationen in diesen Exons enthielt, am DHPLC-Gerät analysiert sowie als Einzelprobe nochmals untersucht.

Gemäß den erhaltenen Elutionsprofilen wurden die Proben sodann in Gruppen zusammengefasst. Den Beobachtungen in einigen Arbeiten von O'Donovan et al. (1998) und Gross et al. (2000) kann nämlich bereits anhand der unterschiedlichen Elutionsprofile eine erste Zuordnung zur jeweils vorliegenden Auffälligkeit vorgenommen werden. Hierbei entstanden sowohl Gruppen mit nur einem Vertreter als auch sehr umfangreiche Gruppen.

3.5.5.A+B Zyklische Sequenzierung zur Absicherung einer Mutation

Nach der Gruppenzuordnung anhand der am DHPLC-Gerät erhaltenen Elutionsprofile wurden je zwei Proben aus den einzelnen Gruppen (bzw. bei Gruppen mit nur einem Vertreter die entsprechende Einzelprobe) sequenziert. Beim Nachweis einer exonischen bzw. exonnahen Variation (≤ 10 Basenpaare nach dem Exonende) wurden sodann, falls vorhanden, weitere Vertreter der gleichen Gruppe näher analysiert.

Die Sequenzierung der Proben erfolgte dabei nach den Prinzipien der Sanger-Sequenzierung mit Taq-Polymerase (Sanger et al., 1977). Die zu analysierende DNA wird hierbei zunächst denaturiert und mit einem Primer hybridisiert. Da nur ein Primer (Vorwärts- oder Rückwärts-Primer) eingesetzt wird, erhält man hierbei allerdings eine lineare und keine exponentielle Amplifikation, wie sie bei der PCR zu erwarten wäre. Nach der Hybridisierung des Templates mit diesem Primer beginnt die Elongationsphase durch den Einbau von Nucleotiden mittels Taq-Polymerase. Im Falle des Einbaus von einem der vier 2', 3'-Didesoxynucleotide, welche ebenfalls dem Ansatz beigefügt und je nach Art des Nucleotids mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt sind, erfolgt ein

Kettenabbruch, da die Hydroxylgruppe am 3'C-Atom fehlt und somit kein weiteres Nucleotid angehängt werden kann.

Der Einbau dieser zum Kettenabbruch führenden Nucleotide erfolgt dabei nach den Gesetzen der Statistik. Dementsprechend liegen am Ende der Sequenzierreaktion Fragmente unterschiedlicher Länge vor. Diese werden durch Zugabe von Formamid einer Denaturierung unterzogen und anschließend auf ein denaturierend wirkendes Sequenziergel aufgetragen. Nach Anlegen der benötigten Spannung durchlaufen diese Fragmente das Gel in Abhängigkeit von ihrer Länge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Denaturierung ist hierfür entscheidend, da sie den Einfluss von intra- bzw. intermolekularen Einflüssen verhindert und so die Länge des Fragments die einzige Einflussgröße auf die Laufgeschwindigkeit im Gel darstellt. Beim Passieren einer definierten Stelle des Gels werden dann die mit Fluorochromen markierten Didesoxynucleotide zur Fluoreszenz angeregt. Dabei wird das emittierte Licht elektronisch gemessen und mit Hilfe einer Software den einzelnen Nucleotiden zugeordnet. Die zeitliche Abfolge dieser Messungen stellt somit die zu analysierende Sequenz dar.

Bevor die DNA allerdings der Sequenzierung zugeführt werden kann, muss sie nach der Amplifikation mittels PCR aufgereinigt werden, um alle sonstigen Strukturen wie freie Primer und Nucleotide zu entfernen, welche ansonsten die Qualität der Sequenzierung beeinträchtigen würden. Hierzu wird das PCR-Amplifikat wie gewohnt der Agarosegelelektrophorese unterzogen und die resultierende Bande mit Skalpell-Messer herausgeschnitten. Die folgende Aufreinigung und Gewinnung des DNA-Amplifikates aus diesem Gelstück erfolgt dann gemäß einem Standardprotokoll mit dem QIAquick™-Gelextraktions-Kit (Quiagen) über Anionen-Austauschsäulen.

Das hieraus gewonnene Eluat wird anschließend einer zweiten Agarosegelelektrophorese unterzogen, um aus der Intensität der dabei entstehenden Bande einen Rückschluss auf die Konzentration der DNA im Eluat ziehen und somit das für die folgende Sequenzierreaktion erforderliche Volumen des Eluats bestimmen zu können. Der Ansatz für die Sequenzierreaktion setzt sich demnach aus 1,5-2,5 µl Eluat und dem CEQ-

DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) zusammen. Dieses Kit enthält die DNA-Polymerase, den Sequenzierreaktions-Puffer sowie ein Nucleotid-Gemisch, welches sowohl die Desoxynucleotide als auch die für den Kettenabbruch benötigten, farbstoffmarkierten Didesoxynucleotide beinhaltet. Es muss demnach nur noch der für die Reaktion benötigte Primer zugefügt werden, wobei es sich um denselben Primer handelt, der bereits für die PCR eingesetzt wurde.

Tabelle 3.5. zeigt die hierzu benötigten Einzelkomponenten und deren Konzentration im fertigen Ansatz, welcher auf Eis zusammenpipettiert wird.

Tab. 3.5. Ansatz für die Sequenzierreaktion

Die Menge des benötigten aufgereinigten Produkts wurde entsprechend der Bandenintensität in der Agarosegelelektrophorese festgelegt (bei schwacher Intensität wurde mehr Produkt eingesetzt). Mit Ampuwa-Wasser wurde schließlich auf 10 µl aufgefüllt.

Komponente	Menge/Endkonzentration	Stammlösung
Aufgereinigtes Produkt	1,5-2,5µl	-
Vorwärts- oder Rückwärts-Primer	1,4µM	100µM
DTCS Quick Start Mastermix	3µl	-
Ampuwa-Wasser	Ad 10 µl	-
Endvolumen	10µl	

Die Sequenzierreaktion an sich wird sodann im Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems) in PCR-Softstrips (Biozym) durchgeführt. Tabelle 3.6. zeigt die hierfür erforderlichen Bedingungen.

Tab. 3.6. Bedingung am Thermocycler für die Sequenzierreaktion

Insgesamt werden 30 Zyklen durchlaufen, die Schritte 2 bis 4 werden somit 29mal wiederholt.

Schritt	Ablaufende Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit
1	Denaturierung	94	90 s
2	Denaturierung	96	20 s
3	Primer- <i>Annealing</i>	50	20 s
4	Polymerisation	60	4 min.

Nach Beendigung der Sequenzierreaktion im Thermocycler wird die Reaktion gestoppt. Hierzu wird gemäß dem Protokoll von Beckman Coulter für das Quick Start Kit ein Stop-Mix angefertigt, indem man je ein Volumenanteil 3-Molarer Natriumacetatlösung, ein Volumenanteil 100-Millimolarer Natrium-EDTA-Lösung sowie ein Viertelvolumenanteil Glykogen miteinander mischt. Je 5 μ l dieser Lösung werden sodann mit den 10 μ l Produkt aus der Sequenzierreaktion in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diesem Ansatz werden weitere 10 μ l Ampuwa-Wasser hinzugefügt, mit welchem zuvor das leere Sequenzierreaktionsgefäß gespült worden war. Anschließend erfolgt das Waschen dieses Ansatzes gemäß den Angaben in Tabelle 3.7..

Tab. 3.7. Darstellung der einzelnen Waschschrirte für die Sequenzierung

Die Einzelschritte werden in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nach Zugabe von Ethanol wird der Ansatz bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig verworfen, so dass die DNA schließlich am Boden des Gefäßes als aufgereinigtes Pellet vorliegt. Der letzte Schritt dient zur Verflüchtigung des Ethanols von der DNA.

Schritt	Maßnahmen	Zeit [Minuten]
1	60µl 100 %iges Ethanol	
2	Zentrifugieren mit 1400rpm	30
3	220 µl 70 %iges Ethanol	
4	Zentrifugieren mit 1400rpm	15
5	90 µl 70 %iges Ethanol	
6	Zentrifugieren mit 1400rpm	15
7	Trocknen im abgedunkelten Eppendorf Concentrator	12

Nach dem Trocknen in der abgedunkelten Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) liegt die DNA schließlich als Pellet vor und wird in 40µl SLS (Sample Loading Solution) resuspendiert. SLS enthält u.a. Formamid, welches einer Denaturierung im Ansatz vorbeugt, indem es selbst stabilisierende Wasserstoffbrücken mit der DNA ausbildet.

Im letzten Schritt wird der Ansatz sodann gemäß den Angaben des Herstellers in den CEQ 8000 Sequenzierer (Beckman Coulter) gestellt. Hier werden die Fragmente mittels Kapillargelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Dieses Polyacrylamid-Gel wird nach jeder Messung erneuert und enthält zusätzlich denaturierend wirkenden Harnstoff. Der zu untersuchende Ansatz gelangt in einem Zeitraum von 15 Sekunden und einer Spannung von 2kV in die Kapillaren dieses Gels, wo durch eine Erhitzung auf 90 °C für 120 Sekunden eine Denaturierungsreaktion abläuft und durch anschließendes Abkühlen auf 50 °C die Renaturierung erfolgt. Bei dieser Temperatur und einer Spannung von 4,2kV werden die vorliegenden Fragmente sodann entsprechend ihrer Länge in einem Zeitraum von 85 Minuten aufgetrennt. Nach

Eingabe der Referenzsequenz kann schließlich die analysierte Sequenz mittels CEQ DNA Analysesoftware Version 5 (Beckman Coulter) beurteilt werden.

Um möglichst zuverlässige Ergebnisse bei der Sequenzierreaktion zu erhalten, wurden für alle zu analysierenden Proben jeweils ein Ansatz mit dem Vorwärtsprimer und ein zweiter Ansatz mit dem Rückwärtsprimer hergestellt. Bei Vorliegen einer Variation konnte diese somit in zwei Richtungen gezeigt und damit abgesichert werden.

3.6.1.A Deskriptive Statistik zu erhobenen Daten des HH1-Kollektives

Das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse bezüglich der HH1 war die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Variationen im HFE-Gen (Genotyp) und des jeweiligen klinischen Befundes (Phänotyp).

Daher wurde neben der genetischen Analyse mittels DHPLC für jeden Patienten ein Patientenbogen mit dessen jeweiliger Klinik bei Diagnosestellung angelegt. Die erhaltenen Daten wurden anschließend einer deskriptiven statistischen Auswertung unterzogen, deren Aufgabe darin besteht, die vorliegenden Ergebnisse zu ordnen, tabellarisch und graphisch darzustellen und durch Angabe bestimmter Kennzahlen, wie z. B. dem Mittelwert, der Gesamtsumme, dem Minimum, dem Maximum oder dem Streubereich zusammenzufassen (Harms, 1998).

Demgemäß wurden die Patienten des HH1-Kollektives zunächst anhand der unter 3.1.1.A genannten Kriterien in vier Gruppen aufgeteilt, da diese bezüglich der vorliegenden Klinik eine sehr inhomogene Zusammensetzung aufwiesen. Diese Gruppierung bildete sodann die Grundlage für alle weiteren statistischen Analysen, auf welche im Ergebnisteil näher eingegangen werden soll.

Auf eine Auswertung mittels eines mathematischen statistischen Testverfahrens wurde hierbei verzichtet. Die Daten zur jeweils vorliegenden Klinik wurden nämlich retrospektiv anhand der archivierten Patientenakten der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen erhoben. In diesen war allerdings eine Reihe von interessierenden Einflussgrößen nicht dokumentiert worden und konnte aufgrund des retrospektiven Charakters der Erhebung auch nicht mit vertretbarem Aufwand ergänzt werden. Diese unzureichende Datenqualität ließ eine Auswertung anhand eines mathematischen statistischen Testverfahrens als nicht zulässig erscheinen.

3.6.2.B Statistische Auswertung am Parkinson-Kollektiv

Für die statistische Auswertung der für das Parkinson-Kollektiv erhaltenen Ergebnisse wurden verschiedene mathematische Testverfahren durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein Vergleich zwischen dem Patientenkollektiv, bestehend aus als krank erklärten Personen, und dem Kontrollkollektiv, welches sich aus als gesund erklärten Personen zusammensetzt, in Bezug auf das untersuchte Merkmal durchgeführt. Anschließend konnte mit Hilfe eines entsprechenden Testverfahrens berechnet werden, inwieweit der im untersuchten Patientenkollektiv beobachtete Effekt auf nicht erfassbare Störgrößen zurückgeführt und damit als ein Produkt des Zufalls betrachtet werden konnte.

Vor Durchführung dieses Tests wurde jeweils die sog. Nullhypothese aufgestellt, d.h. der postulierte Merkmalsunterschied zwischen den zwei Kollektiven wurde verneint. Mit Hilfe des statistischen Testverfahrens konnte sodann die Wahrscheinlichkeit berechnet werden, mit der sich die vorliegenden Ergebnisse bzw. der beobachtete Effekt trotz Richtigkeit der Nullhypothese efinden könnten. War diese Wahrscheinlichkeit gering, so wurde die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

Wichtig ist hierbei allerdings, dass auch im Falle eines signifikanten Ergebnisses eine gewisse Restunsicherheit bestehen bleibt, welche zu zwei Fehlerarten führen kann: dem Fehler 1. Art und dem Fehler 2. Art. Beim Fehler 1. Art bzw. α -Fehler wird dabei die Nullhypothese verworfen, obwohl das Ergebnis nur für die Stichprobe, nicht aber für deren Grundgesamtheit Gültigkeit besitzt, also die Nullhypothese eigentlich richtig wäre. In dieser Arbeit wurde der Wert für den α -Fehler auf 0,05 festgelegt, was bedeutet, dass in durchschnittlich 5 % der Fälle die Nullhypothese trotz Richtigkeit verworfen wurde.

Von Bedeutung ist hierbei auch der mit Hilfe eines statistischen Programms berechnete p-Wert bzw. die Überschreitungswahrscheinlichkeit. Dieser gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich unter der Nullhypothese die gefundenen bzw. noch extremere Ergebnisse einstellen können. Demnach muss der

berechnete p-Wert im Falle der Signifikanz kleiner sein als der α -Fehler bzw. die Wahrscheinlichkeit, dass sich trotz Richtigkeit der Nullhypothese signifikant erscheinende Ergebnisse einstellen, kleiner sein als die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese trotz Richtigkeit zu verwerfen (Harms, 1998).

3.6.3.B Strukturgleichheit von Patienten- und Kontrollkollektiv

Bei der Testung auf Strukturgleichheit wird überprüft, ob zwei Kollektive, welche in Bezug auf das Vorliegen eines definierten Merkmals untersucht werden sollen, vergleichbare Werte für wesentliche Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und ethnischen Hintergrund aufweisen. Das Ziel einer solchen Überprüfung ist dabei, möglichen Fehlinterpretationen bezüglich des untersuchten Merkmals, welche durch ungleiche Ausgangsbedingungen innerhalb der einzelnen Gruppen entstehen können, vorzubeugen. Auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kollektive wurden bezüglich der oben genannten Faktoren auf eine Strukturgleichheit hin getestet. Zusätzlich wurden die Werte für die Ausdehnung der Echogenitätsfläche im Bereich der SN untereinander verglichen, um so einen möglichen Zusammenhang zwischen der Parkinsonschen Erkrankung und der gemessenen Echogenitätsfläche zu überprüfen.

Für die numerischen Merkmale Alter und Echogenität bedeutete dies, dass zunächst deren Häufigkeit und Median, d.h. der Punkt, vor bzw. hinter welchem jeweils die Hälfte der erhobenen Messwerte liegen, bestimmt sowie das 1. und 3. Quartil bzw. die 25. und 75. Perzentile für diese Werte definiert wurden.

Mit Hilfe des Levene's Tests für intervallskalierte Merkmale wurde anschließend überprüft, ob die zwei miteinander verglichenen Kollektive einer gemeinsamen normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Im Falle eines negativen Ergebnisses wurde für die gleichen Werte der U-Test nach Mann und Whitney als approximatives Verfahren für nicht-normalverteilte Varianzen durchgeführt. Hiermit konnte überprüft werden, ob die erhaltenen Werte nicht doch als Stichprobe aus Verteilungen mit gleichem Median aufgefasst werden können.

Bei der Auswertung auf Strukturgleichheit bezüglich der nominalskalierten Merkmale Geschlecht und Ortsherkunft wurde in einem ersten Schritt eine Kontingenztafel erstellt. Um auch hier die Nullhypothese und damit die Herkunft der beiden Kollektive aus der gleichen Grundgesamtheit zu überprüfen, wurde sodann der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Bei diesem Test werden die Randsummen der angelegten Vierfeldertafel als vorgegeben angenommen und hieraus die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der die beobachtete Besetzung dieser Tafel oder aber eine noch weniger wahrscheinliche Besetzung rein zufällig zustande kommen kann.

Sowohl die oben erwähnten Testverfahren als auch die sich daraus ergebenden Grafiken wurden für diese Arbeit mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 11.0 erstellt.

3.6.4.B Genotypverteilung und genotypische Homogenität beider Kollektive

Um beurteilen zu können, ob die vorliegende Genotypverteilung innerhalb der untersuchten Kollektive einer Hardy-Weinberg-Verteilung genügt, wurde zunächst mit Hilfe des Statistikprogramms Genepop Version 3.1 der exakte Hardy-Weinberg-Test nach Haldane (1954), Weir (1990), Guo und Thompson (1992) u.a. durchgeführt. Dieser Test arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie der exakte Test nach Fisher (vgl. 3.4.1). Nach Erstellung einer Kontingenztafel wird bei festgelegten Randsummen die Wahrscheinlichkeit p berechnet, mit der die beobachtete Besetzung der Tafel oder eine noch weniger wahrscheinliche Besetzung rein zufällig zustande kommen könnte. Man erhält dadurch Auskunft darüber, ob die Genotypverteilung im untersuchten Kollektiv rein zufällig zustande gekommen ist oder ob gerichtete Einflüsse wie bspw. Fitnessunterschiede, Inzucht oder Verwandtenehen zu Unterschieden in der Genotypverteilung innerhalb des Kollektives geführt haben.

Anschließend wurden die Patienten und Kontrollpersonen in Bezug auf eine genotypische Homogenität hinsichtlich der gefundenen *missense*-Mutationen in überprüft.

Auch hierzu wurde eine Kontingenztabelle, wie in Abbildung 3-4 gezeigt, erstellt und ein exakter Test nach Fisher mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS durchgeführt. Eine in diesem Testverfahren erhaltene Signifikanz ist dabei hinweisend auf einen Zusammenhang zwischen der gefundenen Mutation und der Parkinsonschen Krankheit.

Kontingenztabelle mit möglichen Genotypkombinationen bei einem Locus mit zwei Allelen

	AA	AB	BB	
Patienten	a	b	c	a+b+c
Kontrollen	d	e	f	d+e+f
	a+d	b+e	c+f	a+b+c+d+e+f

Abbildung 3-4 Kontingenztabelle zur Überprüfung der homogenen Genotypverteilung

Um den exakten Test nach Fisher auf genotypische Homogenität durchführen zu können, bedarf es der Darstellung der Genotypen der einzelnen Loci in einer Kontingenztabelle. Die Genotypen lauten AA homozygot, AB heterozygot und BB homozygot. Die Kleinbuchstaben stehen für die Anzahl der Personen mit jeweiligem Genotyp aus den zu vergleichenden Kollektiven. Der Test arbeitet mit den hierbei ermittelten Randsummen und berechnet daraus die Wahrscheinlichkeit p .

Bei der Überprüfung auf genotypische Homogenität erschien es dabei sinnvoll, den exakten Test nach Fisher zweimal vorzunehmen, wobei der zweite Test mit selektierten Daten durchgeführt wurde. Diese Selektion bezog sich einerseits auf Patienten mit einem Echogenitätsbefund von $\leq 0,2 \text{ cm}^2$ auf beiden Seiten und andererseits auf Kontrollpersonen, welche einen auffälligen Echogenitätsbefund ($\geq 0,2 \text{ cm}^2$ auf einer Seite) aufwiesen und bei denen daher nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, dass sie in höherem Alter ebenfalls an

Parkinson erkranken. Personen, bei denen aufgrund anatomischer Besonderheiten kein Ultraschall möglich war, wurden ebenfalls aus der Auswertung rausgenommen. Der Grund für diese Selektion war, mögliche Zusammenhänge zwischen den genotypischen Gegebenheiten und dem auffälligen Echogenitätsbefund aufzudecken, welche ohne diese Selektion möglicherweise nicht so deutlich zu sehen wären.

3.6.5.B Überprüfung auf genotypische und allelische Assoziation zwischen den Loci

Die Überprüfung auf das Vorliegen einer genotypischen und allelischen Assoziation basiert auf der Überlegung, dass eine Veränderung in der Protein-Struktur und eine damit assoziierte Funktionseinbuße durchaus erst durch eine Kombination zweier Loci bedingt werden kann, wobei der Begriff Locus hier für die genomische Position der gefundenen Mutation in ein und demselben Gen steht.

Hierzu wurde bezüglich der Überprüfung auf eine mögliche genotypische Assoziation eine Kontingenztafel aus jeweils zwei Loci eines Kollektives erstellt und anschließend der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Je nach erhaltener Signifikanz wurde sodann eine genotypische Assoziation gemäß der Nullhypothese angenommen bzw. abgelehnt und entsprechende Aussagen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Genotypenkonstellation und dem Krankheitsbild getroffen.

Dieses Testverfahren wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Statistikprogramms Genepop 3.1 durchgeführt.

Zur Überprüfung auf die allelische Assoziation wurden zunächst die Haplotypen ausgezählt und deren Häufigkeit innerhalb der zwei Kollektive miteinander verglichen, wobei Haplotyp für zwei gekoppelte Loci auf einem der zwei Chromosomen (dem väterlichen oder dem mütterlichen) steht. Da die Genotypisierung der einzelnen Personen hierbei mehrere Loci miteinbezog, wurde die Haplotypenbestimmung allerdings nur an Personen vorgenommen,

die an maximal einem Locus heterozygot sind. Anhand dieser Daten konnte sodann eine Kontingenztafel erstellt und auch hier der exakte Test nach Fisher durchgeführt werden.

4 Ergebnisse

Zur Veranschaulichung der Vorgehensweise dient Abbildung 4-1, welche bereits zur Orientierung im Methodenteil aufgeführt war und hier in gleicher Weise beibehalten wird. Abgesehen von der Statistik werden die Ergebnisse im HH1-Kollektiv gemeinsam mit den Ergebnissen aus dem MP-Kollektiv aufgelistet.

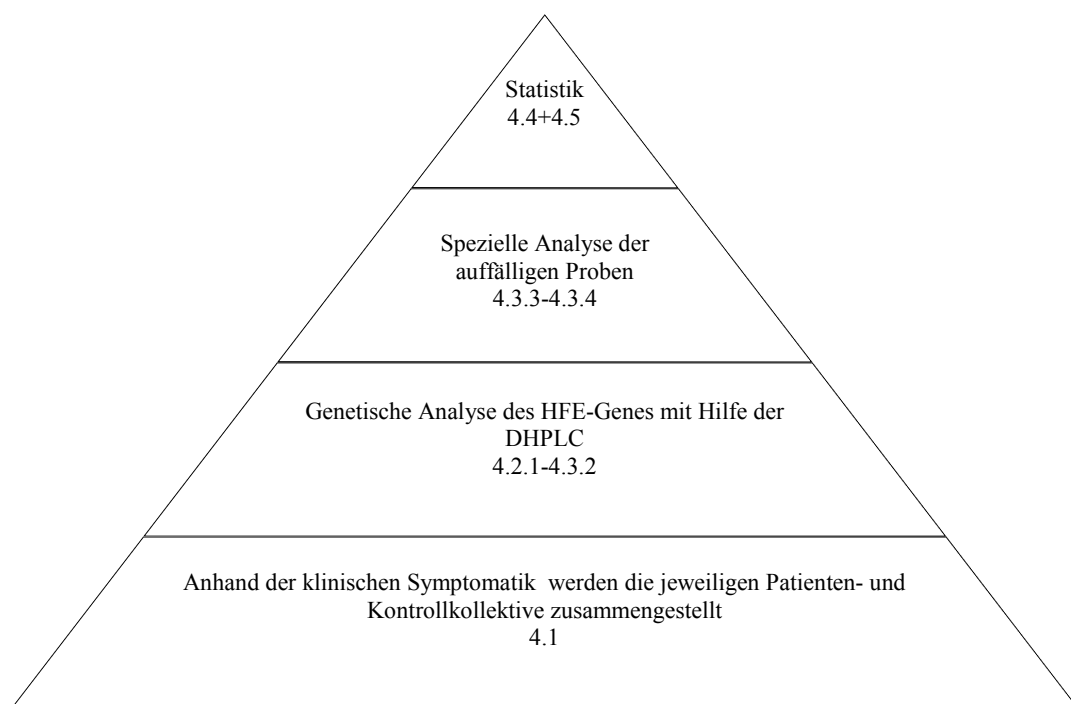


Abbildung 4-1 Schema zur Vorgehensweise

Die Zahlenangaben am Ende beziehen sich auf die jeweiligen Kapitel im folgenden Ergebnisteil. Durch die entsprechenden Angaben in Abbildung 3-1 (S.44) können die hier angewandten Methoden und deren Grundprinzipien nachgelesen werden.

4.1.A+B Zusammenstellung von Patienten- und Kontrollpersonen anhand der klinischen Symptomatik

4.1.1.A

Die genetische Analyse wurde anhand der isolierten DNA von insgesamt 116 Patienten durchgeführt.

Dabei wurde die DNA-Konzentration der jeweiligen Grundstocklösung aller Patienten mittels photometrischer Messungen bestimmt.

4.1.2.B

Für die genetische Analyse am M. Parkinson-Kollektiv stand die isolierte DNA von insgesamt 281 Patienten und 280 Kontrollpersonen zur Verfügung.

4.1.3.B

Die Analyse der DNA der 280 Kontrollpersonen erfolgte für die PCR-Fragmente 2 und 4 unter den gleichen Bedingungen wie für die Patienten. Die restlichen Exons (1, 3, 5 und 6) wurden nicht auf Veränderungen hin untersucht, da in diesen keinerlei genetische Auffälligkeit innerhalb des Patientenkollektives beobachtet wurde.

4.2.1. A+B Qualitätsüberprüfung der DNA

Um die Qualität der auf 50 ng DNA/ μ l eingestellten Grundstocklösung zu überprüfen, wurde für jede Probe eine PCR durchgeführt. Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese konnte man dann anhand der Stärke und Schärfe der erzeugten Bande auf die Integrität der eingesetzten DNA schließen. Die Abbildung 4-2 zeigt ein Beispiel für ein repräsentatives Ergebnis dieser Qualitätskontrolle.

Allerdings ist anzumerken, dass nicht alle Proben im MP-Kollektiv mittels PCR erfolgreich amplifiziert werden konnten. Diese Proben wurden einer zweiten PCR und in manchen Fällen einer dritten PCR unterzogen. Trotzdem konnten einige Proben nicht amplifiziert werden und wurden aus der Auswertung herausgenommen (Näheres S. 100, Tabelle 4.6).

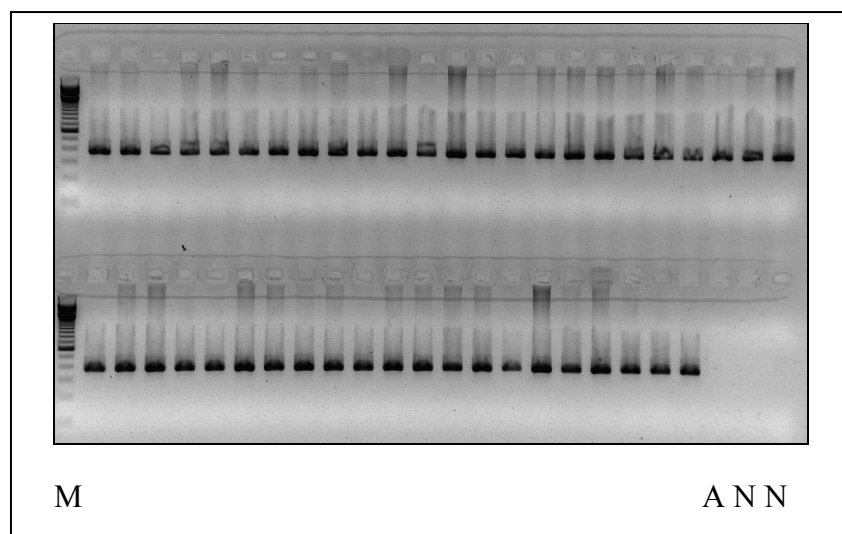


Abbildung 4-2 Qualitätsüberprüfung der DNA

PCR-Amplifikate der DNA von Exon 2 der Reihen E-H der Kontrollplatte 3 nach Auftrennung in einem 2 %-igen Agarosegel. Abkürzungen: M: 100 bp Längenstandard; N: 2 PCR-Ansätze ohne DNA (Negativkontrolle); A: Ausfall, das heißt trotz Einsatz einer ausreichenden Menge an DNA konnte hier keine Bande nachgewiesen werden; diese Proben wurden einer zweiten PCR unterzogen;

4.2.2.A+B Optimierung der PCR-Bedingungen

Zur Ermittlung der optimalen PCR-Bedingungen wurde für die Fragmente (Fragment: zwischen zwei PCR-Primern liegender und mittels PCR amplifizierter DNA-Abschnitt; es beinhaltet das jeweilige Exon, entspricht diesem aber nicht; vgl. auch S.85) 2, 3, 4, 5 und 6 eine PCR bei einer *Annealing*-Temperatur von 55 °C und für das Fragment 1 eine PCR bei einer *Annealing*-Temperatur von 64 °C nach dem Standard-PCR-Protokoll durchgeführt. Dem Ergebnis der anschließend vorgenommenen Agarosegelelektrophorese entsprechend wurde für die Fragmentamplifikate, welche nur schwache Banden aufwiesen, eine Gradienten-PCR zur Ermittlung der jeweils optimalen *Annealing*-Temperatur angesetzt.

Abbildung 4-3 zeigt ein Beispiel für eine Gradienten-PCR und veranschaulicht die Wirkung verschiedener *Annealing*-Temperaturen auf die Qualität der erzeugten Bande.

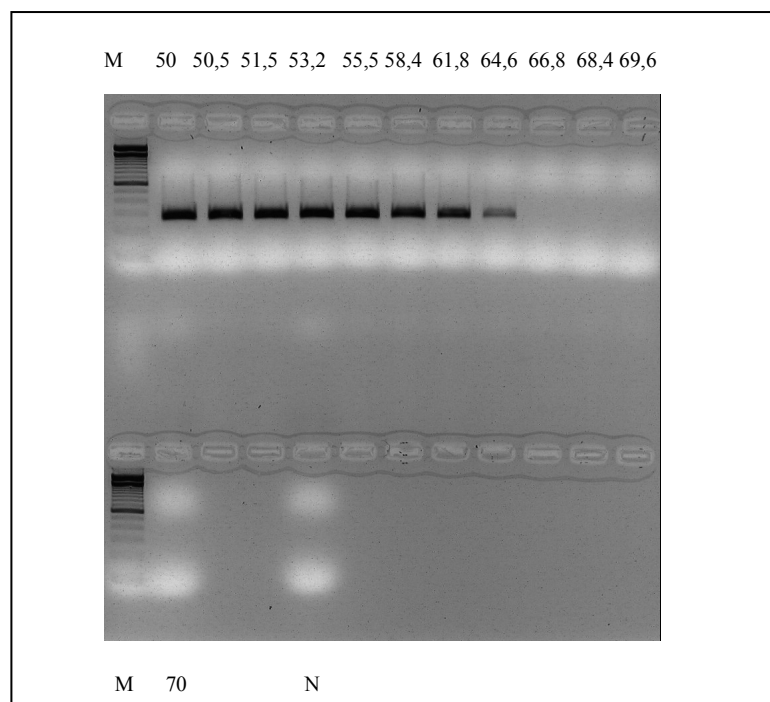


Abbildung 4-3 Gradienten-PCR für die Amplifikation von Intron 2

Aufgetrennte PCR-Amplifikate von Intron 2_kurzes Fragment aus Ceph DNA_2801 für verschiedene *Annealing*-Temperaturen. Die jeweilige *Annealing*-Temperatur in °C ist über der Gelspur angegeben. Als optimale *Annealing*-Temperatur wurde hier eine Temperatur um 55 °C angesehen. Abkürzungen: N: PCR-Ansatz ohne DNA bei 56 °C durchgeführt (Negativkontrolle); M: 100 bp Längenstandard.

In Tabelle 4.1. sind die ermittelten optimalen *Annealing*-Temperaturen aufgeführt. Für alle Fragmente mit Ausnahme des Fragments 1 wurde das Standard-PCR-Protokoll beibehalten.

Tab. 4.1. PCR-Bedingungen für die Amplifikation der 6 Exons des HFE-Genes

Neben den PCR-Bedingungen für die 6 Fragmente ist die jeweilige Fragmentgröße sowie die entsprechende Exongröße angegeben. Fragment 6 nimmt dabei eine Sonderstellung ein. Hier ist das Fragment nämlich kürzer als das entsprechende Exon. Dies liegt daran, dass zum Exon 6 eine Reihe von Nucleotiden gezählt werden, welche sich dem Stopcodon anschließen und demnach nicht translatiert werden. In dieser Arbeit wurden diese Nucleotide allerdings als irrelevant betrachtet, da sie nicht im Protein vertreten sind und demnach die Primer so gewählt wurden, dass diese Abschnitte nicht amplifiziert wurden. Die hier angegebenen optimalen PCR-Bedingungen basieren auf Optimierungstests ausgehend von einem PCR-Standardprotokoll. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich alle im weiteren Verlauf dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Exons des HFE-Genes auf Tabelle 4.1.

Exon	Exon-Größe [bp]	Primer-Bezeichnung	<i>Annealing</i> -Temperatur [°C]	Denaturierungstemperatur [°C]	Zeiten für <i>Annealings</i> - und Extensionsphase [s]	Größe des PCR-Fragments [bp]
1	297	1108_HFE_Ex01FP 1109_HFE_Ex01RP	55	95	120	339
2	263	1110_HFE_Ex02FP 1111_HFE_Ex02RP	55	95	120	389
3	275	1112_HFE_Ex03FP 1113_HFE_Ex03RP	55	95	120	360
4	275	HFE_WAVE_Ex4_F HFE_WAVE_Ex4_R	55	95	120	484
5	113	1116_HFE_Ex5FP 1117_HFE_Ex05RP	55	95	120	457
5	113	1116_HFE_Ex05FP 2424_HFE_Ex5_RP	55	95	120	222
6	1055	1118_HFE_Ex06FP 1119_HFE_Ex06RP	55	95	120	235

4.3.1.A+B Screening auf Mutationen des HFE-Genes mittels DHPLC

Die Proben von je zwei Masterarbeitsplatten wurden nach erfolgreicher Amplifikation mittels PCR in einer neuen 96-*well* Platte zusammengeführt („*Pooling*“). Hierzu wurde jeweils die Hälfte des einen Amplifikates entnommen und mit der gleichen Menge eines anderen Amplifikates in ein *well* der neuen Platte gefüllt. Die neue Platte wurde sodann der Heteroduplexbildung unterzogen und gemäß den Angaben in Abbildung 4-4 mittels DHPLC-Gerät analysiert. Dem Ergebnis des jeweiligen *Poolings* im DHPLC-Gerät entsprechend wurde das in den Ausgangsplatten verbliebene restliche Einzelprobenamplifikat sodann ebenfalls der Heteroduplexbildung unterzogen und weiter analysiert.

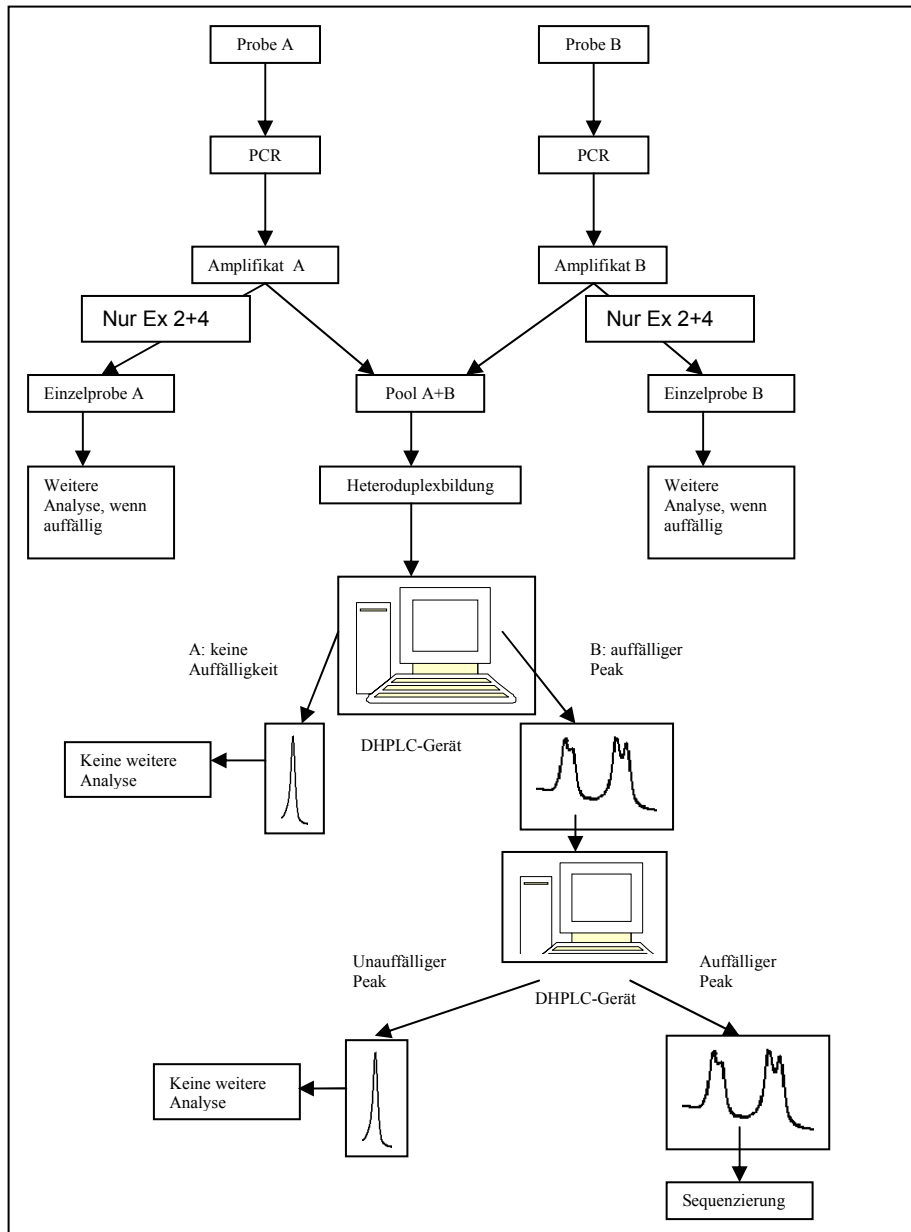


Abbildung 4-4 Diagramm zur Veranschaulichung des Vorgehens

Zwei DNA-Proben, Probe A und Probe B, werden nach erfolgreicher PCR miteinander in jeweils gleicher Menge in einer neuen Platte zusammengeführt und dann der Heteroduplexbildung unterzogen. Dabei wird nur eine Hälfte des Amplifikates verwendet; die andere Hälfte wird für mögliche weitere Untersuchungen aufbewahrt. Nach der Analyse am DHPLC-Gerät entscheidet sich das weitere Vorgehen: Wenn die Probe unauffällig war, so wird keine weitere Untersuchung durchgeführt. Wenn die Probe aber auffällig war, dann werden die noch unverarbeiteten Hälften der jeweiligen Proben nach der Heteroduplexbildung einer Einzelanalyse am DHPLC-Gerät unterzogen. Nach der Bestimmung der auffälligen Einzelprobe wird diese einer Sequenzierung unterzogen. Eine Sonderstellung nehmen Exon 2 und Exon 4 ein. Hier wurden bereits in der ersten Phase jeweils eine Einzelprobe und eine *Pooling*-Probe untersucht (näheres unter 4.3.3.A+B).

Abkürzungen: Ex=Exon

4.3.2.A+B DHPLC-Bedingungen für die Analyse des HFE-Genes

In Tabelle 4.2. sind die optimalen DHPLC-Bedingungen in Bezug auf die Analysetemperatur und Pufferzusammensetzung aufgelistet. Da es sich bei den eingesetzten PCR-Amplifikaten nicht ausschließlich um den exonischen Teil des Genes handelt, sondern immer auch intronische Randbezirke, die innerhalb der jeweiligen Primerpaare liegen, berücksichtigt werden müssen, wird in der Tabelle nicht von Exons, sondern von PCR-Fragmenten gesprochen.

Tab. 4.2. DHPLC-Bedingungen zur Analyse der 6 Fragmente des HFE-Genes

Angegeben ist der Anteil an Puffer A und B für den gesamten Analysezeitraum von 2,5 Minuten sowie die dabei verwendete Analysetemperatur für jedes PCR-Fragment. Dabei kann der Analysezeitraum in vier verschiedene Intervalle eingeteilt werden. Das Mischungsverhältnis aus den beiden Puffern A und B hängt vom gewählten Startgradienten (0,1 min. nach Analysebeginn) ab.

PCR-Fragment	Zeitpunkt [min.]										Analysetemperatur [°C]
	Laden		Gradient				Waschen		Equilibrieren		
	0,0		0,1		2,1		2,2		2,4		
	%A	%B	%A	%B	%A	%B	%A	%B	%A	%B	
1	45	55	42	58	38	62	45	55	45	55	65.3
2	42	58	39	61	29	71	42	58	42	58	59.7
3	42	58	39	61	29	71	42	58	42	58	59.0
	44	56	41	59	31	69	44	56	44	56	61.5
4	43	57	40	60	30	70	43	57	43	57	59.3
	44	56	41	59	31	69	44	56	44	56	61.0
5	43	57	40	60	30	70	43	57	43	57	57.0
	44	56	41	59	31	69	44	56	44	56	59.0
6	51	49	48	52	38	62	51	49	51	49	61.5

4.3.3.A+B Ergebnis des Screenings auf HFE-Mutationen

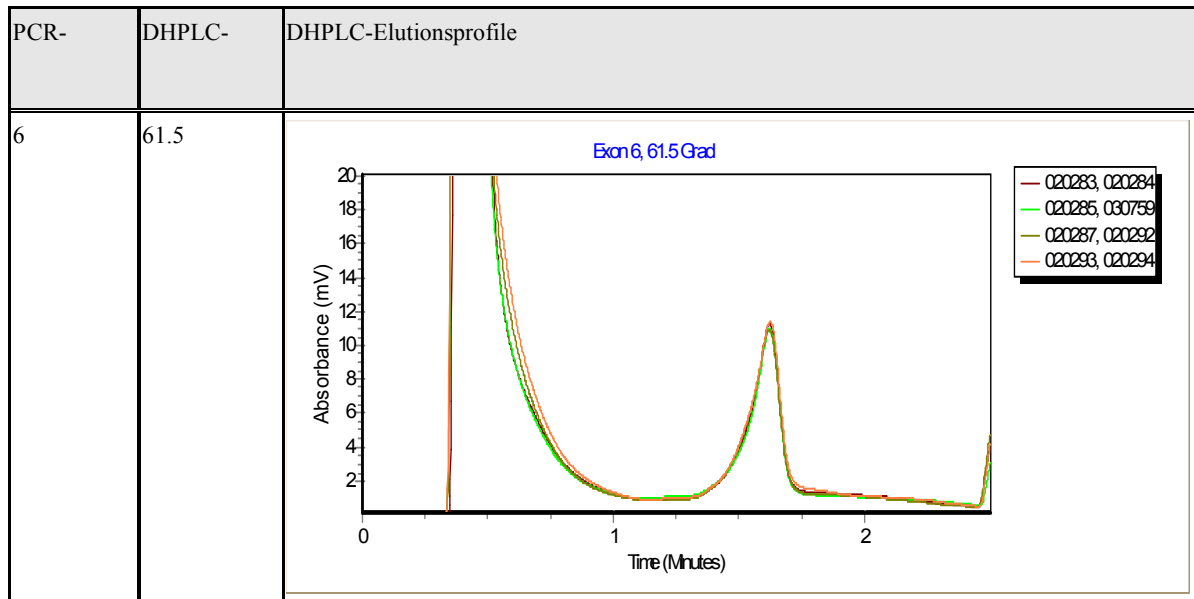
In der folgenden Tabelle 4.3. sind die als unauffällig gewerteten Elutionsprofile der Fragmente 1, 3, 5 und 6 bei den jeweiligen Analysetemperaturen abgebildet.

Tab. 4.3. DHPLC-Elutionsprofile von Pooling-Proben unauffälliger PCR-Fragmente

Dargestellt sind übereinander gelegte unauffällige DHPLC-Elutionsprofile von jeweils vier *Pooling*-Proben für jedes PCR-Fragment bei der jeweiligen Analysetemperatur. Die Höhe der Peaks ist auf unterschiedliche DNA-Konzentration der *Pooling*-Proben zurückzuführen. In der Legende sind die Nummern der Personen dokumentiert, aus deren DNA die PCR-Fragmente hergestellt und für die DHPLC-Analyse zusammengeführt wurden.

PCR-	DHPLC-	DHPLC-Elutionsprofile
1	65,3	<p style="text-align: center;">Exon 1, 65,3 Grad</p>
3	57	<p style="text-align: center;">Exon 3, 59 Grad</p>

PCR-	DHPLC-	DHPLC-Elutionsprofile
3	59	<p style="text-align: center;">Exon 3, 61.5 Grad</p>
5	57	<p style="text-align: center;">Exon 5 bei 57 Grad Celsius</p>
5	59	



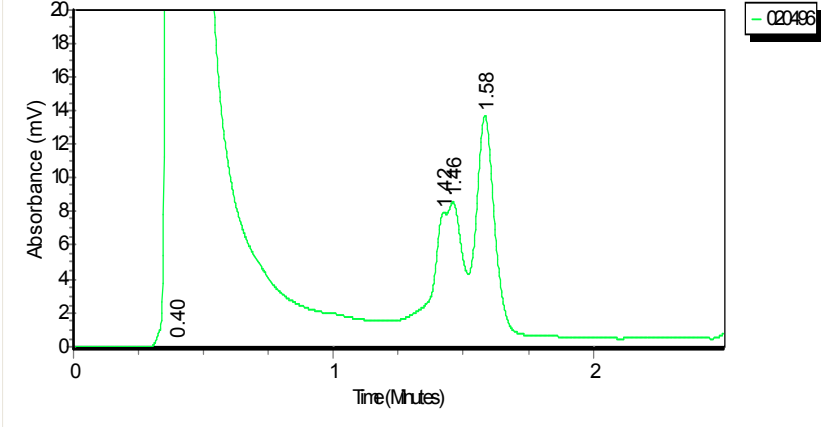
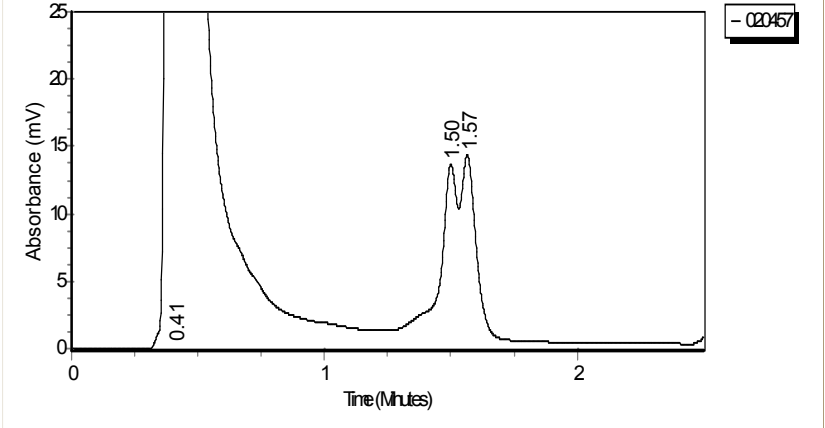
In Tabelle 4.4. sind die Elutionsprofile einiger Proben für die Fragmente 1 und 6 aufgeführt, welche trotz weitgehend unauffälligem Profil doch kleine Unterschiede im Vergleich zu den anderen Proben aufwiesen. Hier wurde sicherheitshalber eine Sequenzierung durchgeführt, bei welcher sich allerdings keinerlei Auffälligkeiten nachweisen ließen und demgemäß explizit davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei lediglich um Artefakte handelte.

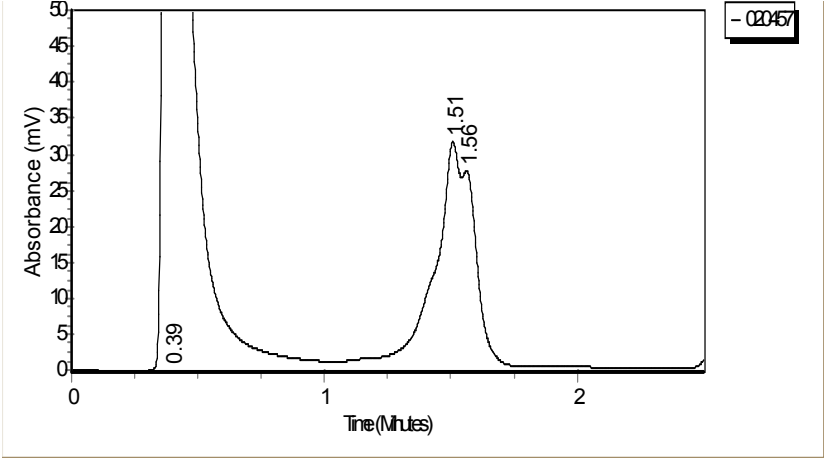
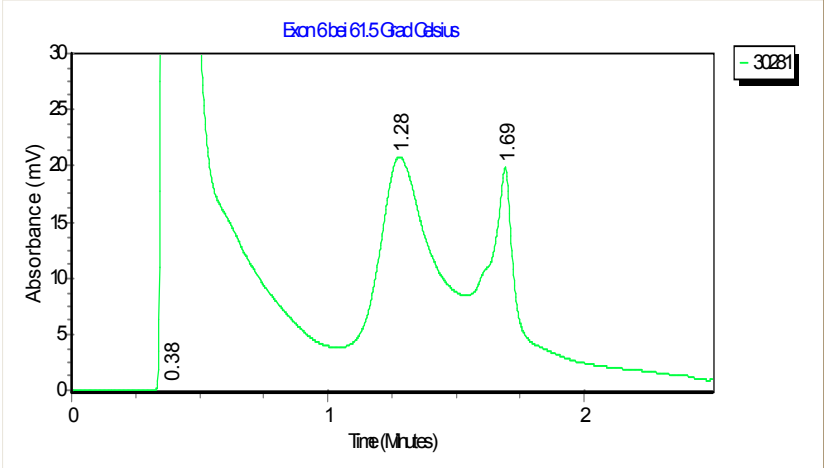
Das PCR-Fragment 5 nahm unter den untersuchten Fragmenten allerdings eine Sonderstellung ein. In der Analyse am DHPLC-Gerät zeigten sich einige auffällige Elutionsprofile, welche in der folgenden Tabelle 4.4. abgebildet sind. Beim anschließenden Sequenzieren konnte allerdings keinerlei Variation im exonischen Teil bzw. der unmittelbaren Umgebung des Exons 5 (≤ 10 bp nach Exonende) gefunden werden. Hier handelt es sich möglicherweise um Sequenzunterschiede im intronischen Abschnitt, der aufgrund der Lage des reversen Primers relativ groß ausfiel und daher aufgrund von Signalüberlagerungen nicht auswertbar war.

Tab. 4.4. Elutionsprofile der Fragmente 1, 5 und 6

Die Höhe der Peaks ist auf unterschiedliche DNA-Konzentration der Proben zurückzuführen. In der Legende sind die Nummern der Personen dokumentiert, aus deren DNA die PCR-Fragmente hergestellt wurden. Diese Proben waren in der DHPLC als *Pooling*-Proben aufgefallen und daher einer Einzelanalyse unterzogen worden.

PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm
1	65,3	<p>Exon 1 bei 65,3 Grad Celsius</p> <p>Absorbance (mV)</p> <p>Time (Minutes)</p> <p>0,41 1,30 1,70</p> <p>10249</p>
5	57	<p>Exon 5 bei 59 Grad Celsius</p> <p>Absorbance (mV)</p> <p>Time (Minutes)</p> <p>0,41 1,55</p> <p>020238</p>

PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm								
5	57	<p data-bbox="804 454 975 479">Exon 5 bei 57 Grad Celsius</p>  <p data-bbox="1257 479 1337 517">- 020496</p> <table border="1"><caption>Peak Data for Run 020496</caption><thead><tr><th>Retention Time (min)</th><th>Approximate Absorbance (mV)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.40</td><td>19</td></tr><tr><td>1.46</td><td>8</td></tr><tr><td>1.58</td><td>14</td></tr></tbody></table>	Retention Time (min)	Approximate Absorbance (mV)	0.40	19	1.46	8	1.58	14
Retention Time (min)	Approximate Absorbance (mV)									
0.40	19									
1.46	8									
1.58	14									
5	57	<p data-bbox="804 981 975 1005">Exon 5 bei 57 Grad Celsius</p>  <p data-bbox="1257 1005 1337 1043">- 020457</p> <table border="1"><caption>Peak Data for Run 020457</caption><thead><tr><th>Retention Time (min)</th><th>Approximate Absorbance (mV)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.41</td><td>24</td></tr><tr><td>1.50</td><td>14</td></tr><tr><td>1.57</td><td>13</td></tr></tbody></table>	Retention Time (min)	Approximate Absorbance (mV)	0.41	24	1.50	14	1.57	13
Retention Time (min)	Approximate Absorbance (mV)									
0.41	24									
1.50	14									
1.57	13									

PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm
5	59	 <p>Absorbance (mV)</p> <p>Time (Minutes)</p> <p>0.39</p> <p>1.51</p> <p>- 020457</p>
6	61,5	 <p>Exon6 bei 61.5 Grad Celsius</p> <p>Absorbance (mV)</p> <p>Time (Minutes)</p> <p>0.38</p> <p>1.28</p> <p>1.69</p> <p>- 30281</p>

Bei der Analyse der Fragmente 2 und 4 konnten mehrere Elutionsprofile mit jeweils unterschiedlichem Aussehen am DHPLC-Gerät beobachtet werden. Entsprechend den Elutionsprofilen aus der anschließenden Einzelanalyse konnten die Proben sodann in verschiedene Gruppen eingeteilt und anschließend einzelne Vertreter dieser Gruppen unter Verwendung der gleichen Primerpaare wie für die PCR sequenziert werden. Dabei wurden immer auch einige der als unauffällig gewerteten Proben der Einzelanalyse unterzogen, um so einen Vergleich zu den auffälligen Proben zu haben. Außerdem wurden alle Proben sequenziert, deren Zugehörigkeit mittels ihrer Elutionsprofile nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Abbildung 4-5 zeigt beispielhaft das Elutionsprofil einer auffälligen Poolprobe in Gegenüberstellung zu den Elutionsprofilen der zwei Proben aus dem Pool als Einzelpeaks.

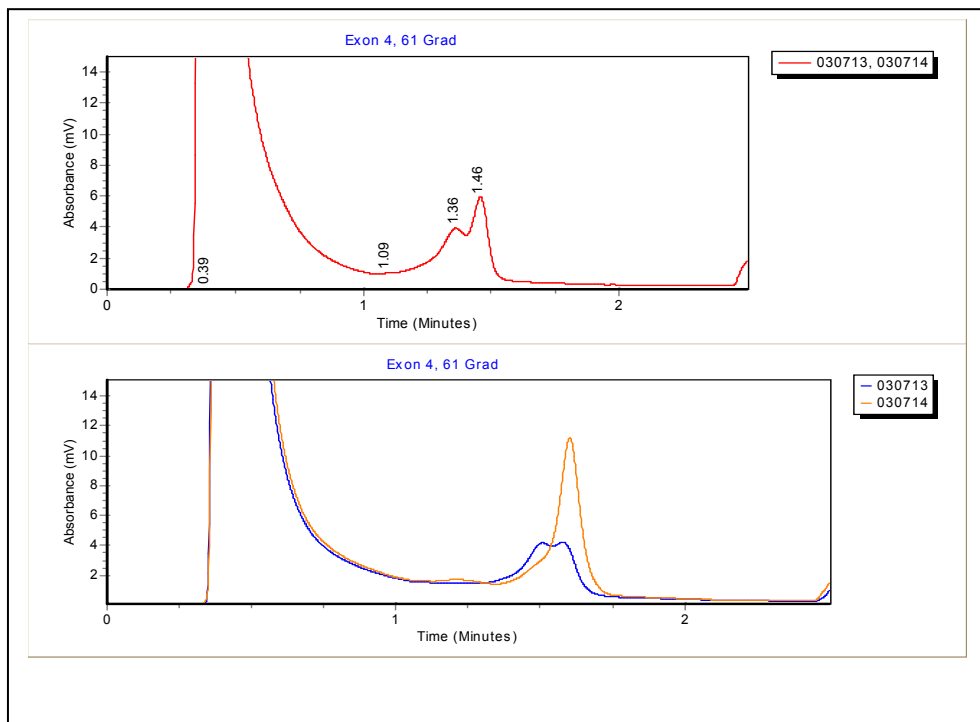


Abbildung 4-5 Gegenüberstellung einer *Pooling*-Probe mit den Einzelproben von Fragment 4

Wenn das Elutionsprofil einer *Pooling*-Probe, hier der Proben 030713 und 030714, einen auffälligen Peak wie in der oberen Abbildung aufwies, so wurden die einzelnen Proben nochmals am DHPLC-Gerät analysiert, damit bestimmt werden konnte, welche der Einzelproben auffällig ist. Im vorliegenden Beispiel ist es die Probe 030713, wie man am unteren Teil der Abbildung sehen kann.

Das PCR-Fragment 2 bereitete anfangs allerdings Schwierigkeiten bei der Gruppenteilung. So konnte öfter beobachtet werden, dass zwei Proben, welche im Pool ein eindeutig auffälliges Elutionsprofil gezeigt hatten, in der Einzelanalyse am DHPLC-Gerät beide ein nunmehr unauffälliges Profil aufwiesen. Daher wurden stichprobenartig einige dieser Proben einer Sequenzierung unterzogen, wobei sich eine Homozygotie für die jeweilige Mutation zeigte. Dementsprechend wurde daraus geschlossen, dass aufgrund der hohen Homozygotenfrequenz für diese Mutation auch die Wahrscheinlichkeit, dass zwei homozygote Proben zusammengeführt werden und dann ein unauffälliges Elutionsprofil aufweisen, sehr groß ist. Dies ist dadurch zu erklären, dass am DHPLC-Gerät keine Unterscheidung zwischen dem Peak einer Poolprobe zweier Wildtypen und dem Peak einer Poolprobe zweier homozygot mutierter Proben möglich ist. Daher wurde beschlossen, alle in dieser Arbeit untersuchten Proben für das Fragment 2 nur noch mit der DNA Ceph_2801 am DHPLC-Gerät zu analysieren. Das Fragment 2 dieser DNA-Probe war nämlich im Voraus bereits sequenziert worden und wies keinerlei Mutation in diesem Fragment auf. Mit Hilfe der anschließenden Einzelanalyse am DHPLC konnte so für jede Probe auf den Genotyp geschlossen werden, wobei einzelne Proben zur Absicherung des Ergebnisses sequenziert wurden. Hierbei konnten die anhand des Elutionsprofils vermuteten Auffälligkeiten durchgehend bestätigt werden.

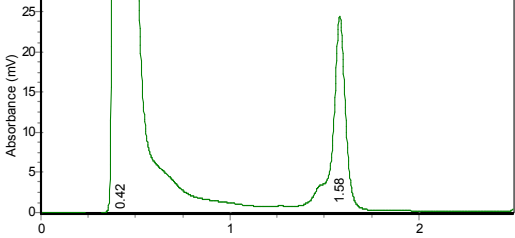
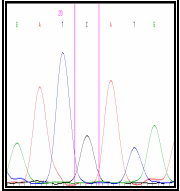
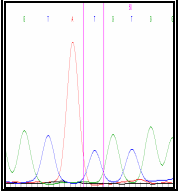
Das gleiche Vorgehen wurde auch für das PCR-Fragment 4 des Hämochromatose-Kollektives gewählt, da bei diesem Krankheitsbild von vornherein angenommen werden konnte, dass eine relativ hohe Homozygotenhäufigkeit für dieses Fragment vorliegt. Auf ein analoges Vorgehen für das Parkinson-Kollektiv wurde allerdings verzichtet, da hier im Gegensatz zu Fragment 2 keine Schwierigkeiten bei der DHPLC-Analyse entstanden.

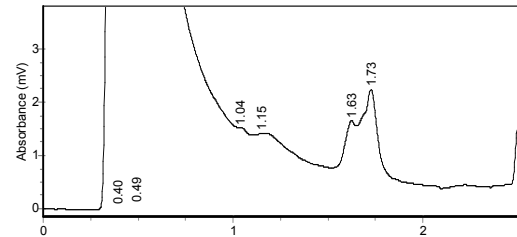
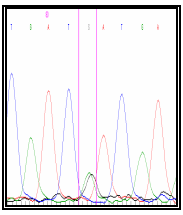
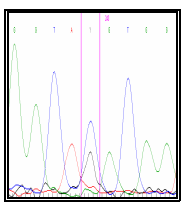
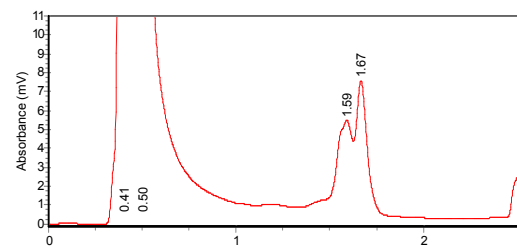
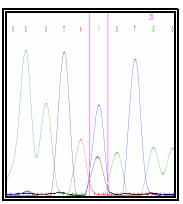
In Tabelle 4.5. sind die jeweiligen Elutionsprofile mit ihrer zugehörigen Sequenzvariation abgebildet.

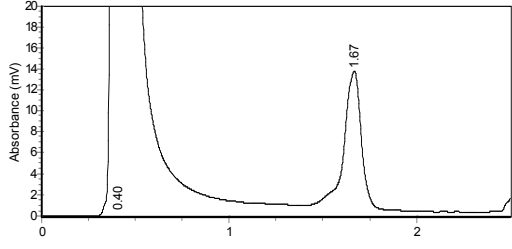
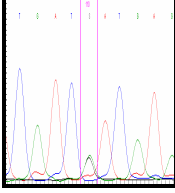
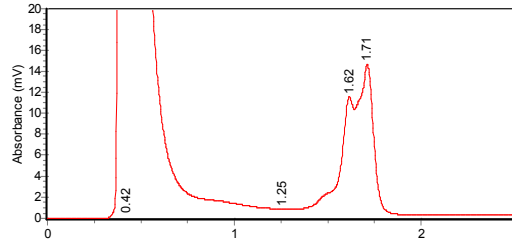
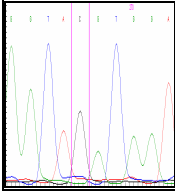
Tab. 4.5. Auffällige Elutionsprofile der Exons 2 und 4 mit Sequenzierung

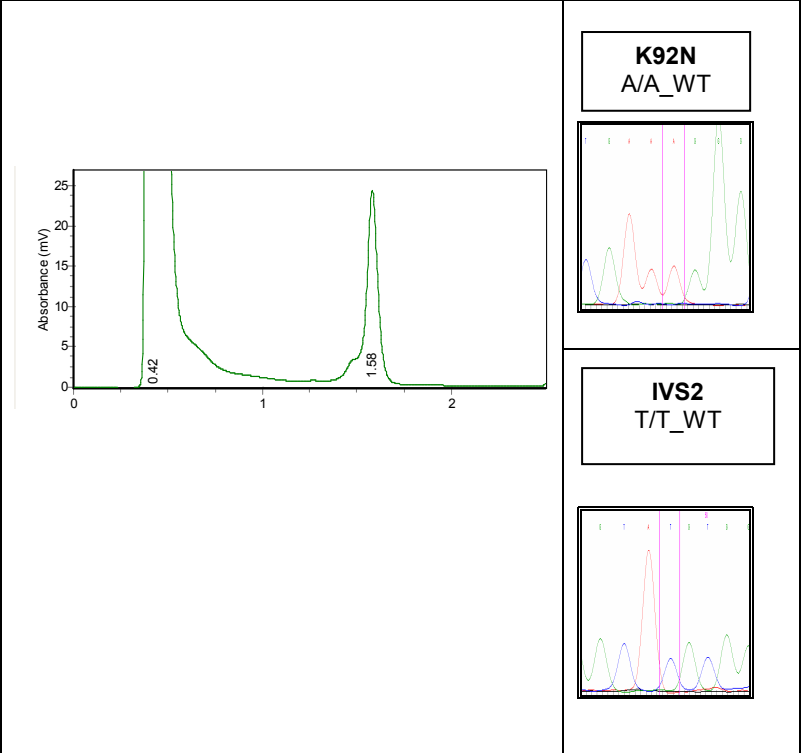
Oberhalb der Elutionsprofile sind die jeweiligen Proben angegeben. Oberhalb des Chromatogramms der Sequenzangaben ist der Locus zu der jeweiligen Mutation angegeben. Unter dieser Angabe sind die jeweils vorliegende Sequenz und die damit assoziierte Genotypisierung vermerkt.

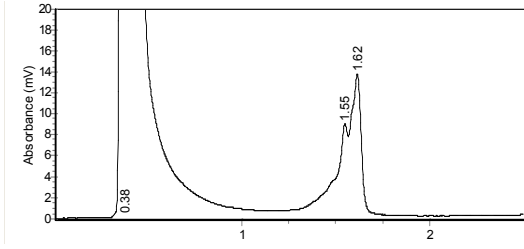
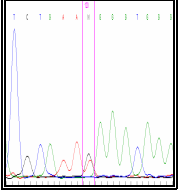
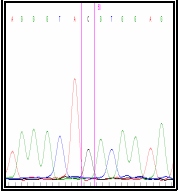
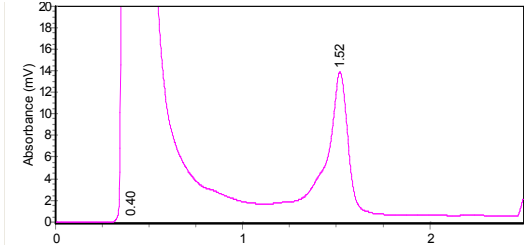
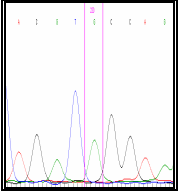
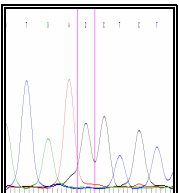
Abkürzungen=A:Adenin; T:Thymin; C=Cytosin; G=Guanin; WT:Wildtyp; HT:Heterozygotie;
HM:Homozygotie; IVS2=IVS2/3889*T>C;

PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm
2	59 Wildtyp	<div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">Ceph_1413_F</div>  <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start; margin-top: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; width: 150px;"> H63D G/G_WT </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start; margin-top: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; width: 150px;"> IVS2 T/T_WT </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>

PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm	
2	59 H63D/- IVS2/-	<p style="text-align: center;">021124_F</p> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> H63D G→A_HT </div>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> IVS2 T→C_HT </div> 
2	59 IVS2/-	<p style="text-align: center;">020416 F</p> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> IVS2 T→C_HT </div> 

PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm	
2	59 H63D/- IVS2/IVS2	<p style="text-align: center;">020437_F</p> 	<p style="text-align: center;">H63D G→A_HT</p> 
		<p style="text-align: center;">020437 und Ceph_F</p> 	<p style="text-align: center;">IVS2 T→C_HM</p> 

PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm
2	59 Wildtyp	 <p>The figure displays DHPLC elution profiles and sequencing chromatograms for two samples. The main plot shows Absorbance (mV) on the y-axis (0 to 25) versus time on the x-axis (0 to 2). Two peaks are labeled with retention times: 0.42 and 1.58. To the right, two smaller plots are shown. The top plot is titled 'K92N A/A_WT' and shows a sequencing chromatogram with peaks corresponding to the elution profile. The bottom plot is titled 'IVS2 T/T_WT' and shows a similar sequencing chromatogram.</p>

PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm	
2	59 K92N- IVS2/IVS2	<p style="text-align: center;">020305_R</p> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> K92N A→C_HT </div>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> IVS2 T→C_HM </div> 
4	61 Wildtyp	<p style="text-align: center;">020422 F</p> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> C282Y G/G_WT </div>  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> I217T C/C_WT </div> 

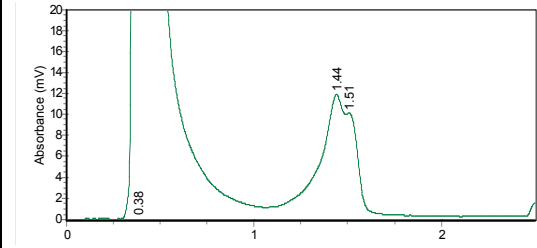
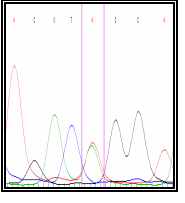
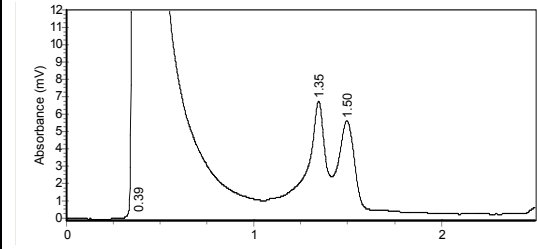
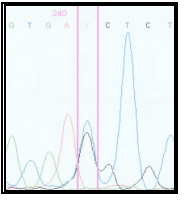
PCR-Fragment	DHPLC-Analyse-Temperatur [°C]	DHPLC-Elutionsprofile mit Sequenzierungschromatogramm	
4	61 C282Y/-	<p style="text-align: center; border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">020295_R</p> 	<p style="text-align: center; border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">C282Y G→A_R</p> 
4	61 I217T/-	<p style="text-align: center; border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">020138_R</p> 	<p style="text-align: center; border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">I217T T→C_HT</p> 

Tabelle 4.6. gibt einen Überblick über die Gesamtzahl der sequenzierten Proben von Exon 2 und Exon 4 für beide untersuchte Kollektive an. Von jedem detektierten Genotyp wurde eine bestimmte Anzahl an Proben sequenziert, während die restlichen Proben anhand ihrer Elutionsprofile dem jeweiligen Genotyp zugeordnet werden konnten.

Tab. 4.6. Überblick der sequenzierten Proben

Die jeweils erste Zahl gibt die Gesamtzahl der sequenzierten Proben wieder. Die zweite Zahl gibt die Gesamtzahl der diesem Genotyp zugeordneten Proben an (mittels Sequenzierung und Elutionsprofil an der DHPLC).

Die Differenz der Gesamtanzahlen im Parkinson- und Kontrollkollektiv bei Exon 2 und Exon 4 ist durch die unterschiedliche Anzahl der Ausfälle zu erklären;

Abkürzungen: n=Gesamtzahl der Proben; (): Anzahl der Proben, die nicht mittels PCR für dieses Exon amplifiziert werden konnten.

Exon	Genotyp	Parkinson-Kollektiv n=278 (3)	Hämochromatose-Kollektiv n=116 (0)	Kontrollpersonen n=257 (23)
Exon 2	WT	4/114	1/55	1/122
	IVS2/-	2/70	3/25	1/54
	IVS2/IVS2	1/12	0/4	0/13
	H63D/- IVS2/-	5/63	2/26	1/50
	H63D/- IVS2/IVS2	7/12	1/3	2/12
	H63D/H63D IVS2/IVS2	2/6	0/3	0/6
	K92N/- IVS2/IVS2	1/1	0/0	0/0
Exon	Genotyp	Parkinson-Kollektiv n=269 (12)	Hämochromatose-Kollektiv n=116 (0)	Kontrollpersonen n=255 (25)
Exon 4	Wildtyp	2/244	1/72	1/232
	C282Y/-	7/23	2/33	1/20
	C282Y/C282Y	0/1	1/11	0/5
	I217T	1/1	0/0	0/0
Exon 2/4	C282Y/- H63D/-	0/5	0/10	0/0

4.3.4.A+B Stammbaumanalyse zum Nachweis der Kopplung der H63D-Mutation mit der intronischen Sequenzvariation

Bei der genetischen Analyse des PCR-Fragmentes 2 fiel auf, dass die H63D-Mutation in Exon 2 immer in Assoziation mit der Sequenzvariation IVS2/3889*T>C in Intron 2 auftrat, welche 4 Basenpaare hinter dem Ende von Exon 2 liegt und bei welcher die Base Thymin durch die Base Cytosin ausgetauscht ist. Hieraus wurde die Überlegung abgeleitet, dass für diese Mutation eine Kopplung mit der beobachteten Variation vorliegen muss

Um die vermutete Kopplung der H63D-Mutation mit der intronischen Sequenzvariation zu überprüfen, wurde beschlossen, eine Stammbaumanalyse anhand von Ceph-DNA (Ceph=**C**entre d'**E**tude du **P**olymorphisme **H**umain) durchzuführen. Hierzu wurde das PCR-Fragment 2 mehrerer Elternpaare aus dem Ceph-Stock auf das Vorliegen einer Heterozygotie für beide Sequenzvarianten hin analysiert, wobei außerdem auf eine zahlreiche Nachkommenschaft der zu untersuchenden Paare geachtet wurde. Da die Mutter der Familie Ceph-Nr. 1413 mit insgesamt 13 Kindern heterozygot für beide Varianten war, wurde die Stammbaumanalyse mit den Vertretern dieser Familie vorgenommen.

In der Tat konnte hierbei festgestellt werden, dass die H63D-Mutation gemeinsam mit der IVS2/3889*T>C an die Nachkommen vererbt wird und beide Varianten demnach auf dem gleichen Chromosom vorliegen müssen. Abbildung 4-6 zeigt die bei der Stammbaumanalyse erhobenen Ergebnisse.

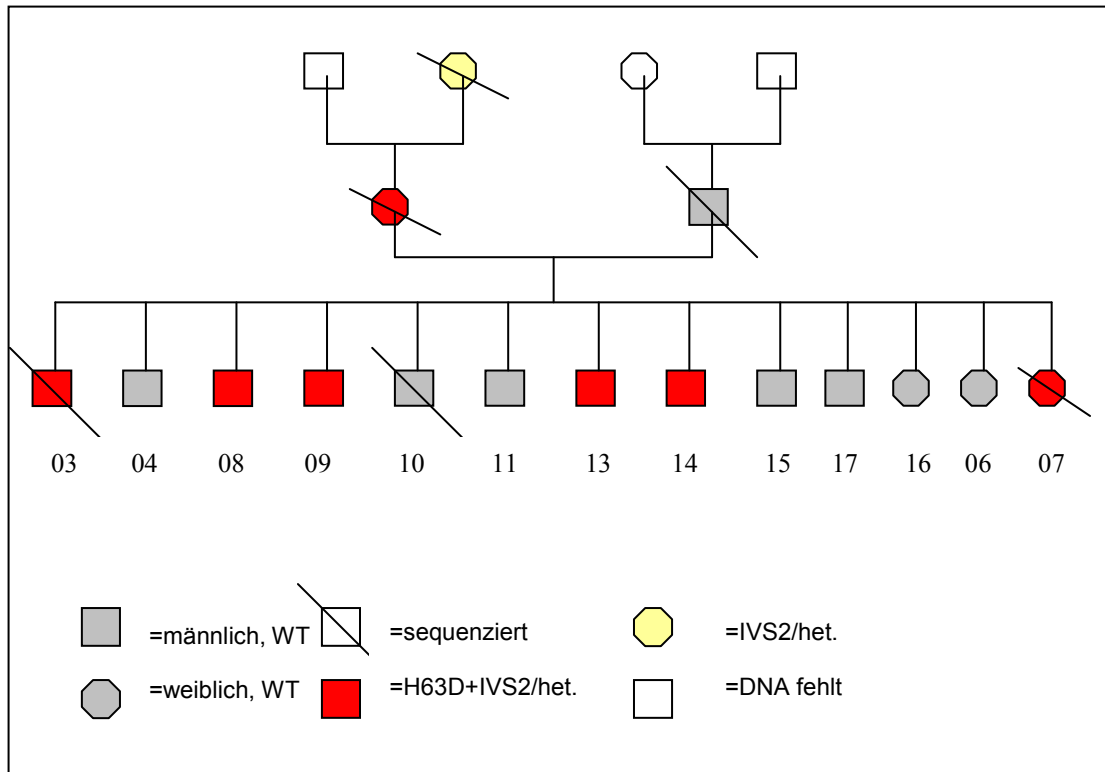


Abbildung 4-6 Stammbaumanalyse der Ceph Familie Nr. 1413

Wie man der Abbildung entnehmen kann, weißt die Großmutter die intronische Sequenzvariation heterozygot ohne die H63D-Mutation auf. Da die DNA des Großvaters fehlt, ist vorerst nicht auszuschließen, dass die Mutter die H63D-Mutation vom Großvater und die intronische Sequenzvariation von der Großmutter vererbt bekommen hat. Wenn man aber die Vererbung der zwei Variationen an die Kinder betrachtet, so haben diese immer beide Variationen gemeinsam, was nicht möglich wäre, wenn die zwei Variationen bei der Mutter auf zwei verschiedenen Allelen liegen würden. Daher kann man annehmen, dass die Großmutter der Tochter ihr Wildtyp-Allel weitergegeben hat und die zwei Variationen vom Großvater an die Tochter weitervererbt wurden, die diese dann wiederum einem Teil ihrer Nachkommenschaft vererbt hat. Abkürzungen: WT=Wildtyp; H63D+IVS2/het.=heterozygoter Genotyp für die H63D-Mutation und die intronische Sequenzvariation IVS2/3889*T>C; IVS2/het.=heterozygoter Genotyp für die intronische Sequenzvariation IVS2/3889*T>C.

4.3.A Deskriptive Statistik anhand der erhobenen Ergebnisse am Hämochromatose-Kollektiv

Die Auswertung der für das HH1-Kollektiv erhaltenen Daten wurde anhand einer deskriptiven Statistik durchgeführt, wobei die Gründe für die Ablehnung eines mathematischen statistischen Testverfahrens unter 3.4.1.A aufgeführt sind.

Hierzu wurden die Patienten in Abhängigkeit von der jeweils vorliegenden Untersuchungsindikation (vgl. 3.1.2.A) zunächst in vier Gruppen eingeteilt, welche sodann die Grundlage für alle weiteren Analysen bildete. Ziel der Auswertung war hierbei die Darstellung der Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp.

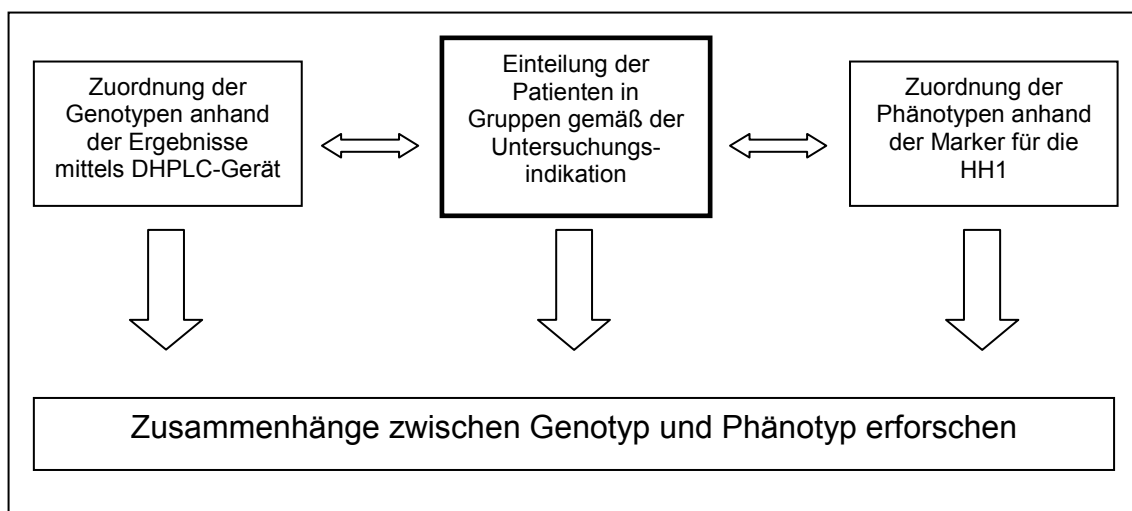


Abbildung 4-7 Schema zur Vorgehensweise mit den erhobenen Daten und Ziel der Auswertung

Die Einteilung der Patienten gemäß der Untersuchungsindikation erfolgte gemäß den Angaben in 3-1 unter Kapitel 3.1.1.A

Abkürzungen: HH1= HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose

4.3.1.A Darstellung der Genotypenverteilung innerhalb der einzelnen Gruppen

Mittels DHPLC-Gerät konnten im HH1-Kollektiv verschiedene Kombinationen der H63D-Mutation, der C282Y-Mutation und dem Wildtyp ermittelt werden. Um die Verteilung dieser Genotypen zu veranschaulichen, wurden zwei Formen der graphischen Darstellung gewählt, welche im Folgenden aufgelistet sind. Tabelle 4.7. soll hierbei einer ersten Orientierung bezüglich der Gruppengrößen und Genotypenverteilung mit Angabe der jeweiligen absoluten Patientenzahl dienen. In Abbildung 4-8 ist sodann die relative Verteilung der Genotypen innerhalb der Gruppen dargestellt. Dabei ist anzumerken, dass zugunsten der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der intronischen Sequenzvariation IVS2/3889*T>C verzichtet wurde, da mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methoden keinerlei signifikantes Ergebnis bezüglich dieses Polymorphismus erhoben werden konnte und dieser hier demnach von niederrangigem Interesse war. Weitere Anmerkungen zu dieser Variation finden sich unter 3.4.2. und 5.2.2.A.

Tab. 4.7. Einzeldarstellung der Verteilung der Genotypen innerhalb der Gruppen

Dabei steht n/n für den homozygoten Wildtyp, H63D/- und C282Y/- für die heterozygote Form der jeweiligen Mutation, C282Y/H63D für die Compound-Heterozygotie, sowie H63D/H63D bzw. C282Y/C282Y für die homozygote Mutante der jeweiligen Mutation; HH1=HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose; Gruppeneinteilung: vgl. Tab. 3.1.;

Gruppe und nähere Bezeichnung	Gesamt-Anzahl	Diagramm														
Gruppe 1 Dringender klinischer Verdacht auf HH1	54	<table border="1"> <caption>Genotype Distribution for Group 1</caption> <thead> <tr> <th>Genotype</th> <th>Count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>n/n</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>H63D/-</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>H63D/H63D</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>C282Y/H63D</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>C282Y/-</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>C282Y/C282Y</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Genotype	Count	n/n	23	H63D/-	10	H63D/H63D	3	C282Y/H63D	5	C282Y/-	3	C282Y/C282Y	10
Genotype	Count															
n/n	23															
H63D/-	10															
H63D/H63D	3															
C282Y/H63D	5															
C282Y/-	3															
C282Y/C282Y	10															
Gruppe 2 Symptomatische Patienten mit erkranktem Verwandten	19	<table border="1"> <caption>Genotype Distribution for Group 2</caption> <thead> <tr> <th>Genotype</th> <th>Count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>n/n</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>H63D/-</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>H63D/H63D</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>C282Y/H63D</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>C282Y/-</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>C282Y/C282Y</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	Genotype	Count	n/n	0	H63D/-	2	H63D/H63D	0	C282Y/H63D	2	C282Y/-	13	C282Y/C282Y	2
Genotype	Count															
n/n	0															
H63D/-	2															
H63D/H63D	0															
C282Y/H63D	2															
C282Y/-	13															
C282Y/C282Y	2															
Gruppe 3 Symptomlose Patienten mit erkranktem Verwandten	6	<table border="1"> <caption>Genotype Distribution for Group 3</caption> <thead> <tr> <th>Genotype</th> <th>Count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>n/n</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>H63D/-</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>H63D/H63D</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>C282Y/H63D</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>C282Y/-</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>C282Y/C282Y</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Genotype	Count	n/n	2	H63D/-	0	H63D/H63D	0	C282Y/H63D	2	C282Y/-	2	C282Y/C282Y	0
Genotype	Count															
n/n	2															
H63D/-	0															
H63D/H63D	0															
C282Y/H63D	2															
C282Y/-	2															
C282Y/C282Y	0															
Gruppe 4 Patienten mit einer Hepatopathie unklarer Genese, HH1 als Differentialdiagnose	37	<table border="1"> <caption>Genotype Distribution for Group 4</caption> <thead> <tr> <th>Genotype</th> <th>Count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>n/n</td> <td>22</td> </tr> <tr> <td>H63D/-</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>H63D/H63D</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>C282Y/H63D</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>C282Y/-</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>C282Y/C282Y</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Genotype	Count	n/n	22	H63D/-	8	H63D/H63D	1	C282Y/H63D	1	C282Y/-	6	C282Y/C282Y	1
Genotype	Count															
n/n	22															
H63D/-	8															
H63D/H63D	1															
C282Y/H63D	1															
C282Y/-	6															
C282Y/C282Y	1															

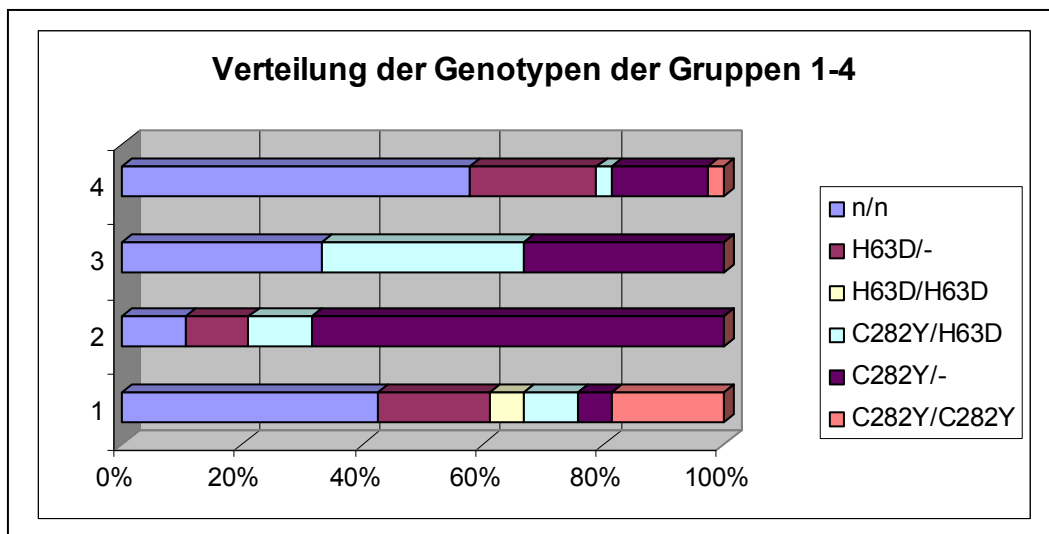


Abbildung 4-8 Übersicht über die Genotypen und deren Verteilung in den Gruppen

Auf der Ordinate sind die jeweiligen Gruppen eingetragen, auf der Abszisse der Anteil der Patienten mit jeweiligem Genotyp in Prozent. Abkürzungen: n/n=homocygoter Wildtyp; H63D/-=heterocygoter Genotyp für die H63D-Mutation; H63D/H63D=homocygoter Genotyp für die H63D-Mutation; C282Y/H63D=Compound-Heterocygotie für die H63D- und C282Y-Mutation; C282Y/-=heterocygoter Genotyp für die C282Y-Mutation; C282Y/C282Y=homocygoter Genotyp für die C282Y-Mutation;

Im Folgenden soll näher auf die obigen Graphiken eingegangen werden.

Gruppe 1 stellt zahlenmäßig die größte Gruppe dar und beinhaltet die Patienten, welche aufgrund einer HH1-typischen Symptomatik molekulargenetisch untersucht wurden. Demgemäß waren im Vergleich zu den anderen Gruppen die für die HH1 prädisponierenden drei Genotypen (H63D homozygot, C282Y homozygot, Compound-Heterozygotie für die H63D und C282Y) in Gruppe 1 am häufigsten repräsentiert. Um diesen Umstand besser darstellen und einen adäquaten Vergleich zwischen den sehr unterschiedlich großen Gruppen vornehmen zu können, wurde zusätzlich die relative Verteilung der Genotypen in Abbildung 4.8. gewählt, welche diese Aussage bestätigt.

In Gruppe 2 wies ein Großteil der Patienten eine Heterozygotie für die Mutation C282Y auf, während bei den restlichen Vertretern dieser Gruppe eine Heterozygotie für die H63D-Mutation, eine Compound-Heterozygotie für die C282Y- und die H63D-Mutation oder ein Wildtyp nachgewiesen wurde. Diese Gruppe setzt sich aus Patienten mit klinischen Symptomen zusammen, welche möglicherweise hinweisend auf eine beginnende HH1-Manifestation waren. Die molekulargenetische Untersuchungsindikation bei den Vertretern dieser Gruppe

wurde dabei vorrangig aufgrund des Vorliegens einer Verwandtschaft zu einem an der HH1 erkrankten Patienten mit entsprechend charakteristischem Genotyp gestellt. Da es sich bei diesen erkrankten Patienten oftmals um ein Elternteil oder ein Geschwister der hier untersuchten Patienten handelte, wurden letztere im Hinblick auf das Vorliegen der gleichen Variationen untersucht. Daher verwundert es nicht weiter, dass ein Großteil der untersuchten Patienten eine Heterozygotie für die H63D- oder C282Y-Mutation aufwies und auch die anderen Genotypen entsprechend vertreten waren. Diese Varianten wurden entweder vom ebenfalls untersuchten Elternteil an den Patienten weitervererbt oder sie stammten im Falle des erkrankten Geschwisters von einem gemeinsamen Elternteil.

Gruppe 3 wiederum wurde aus Patienten zusammengestellt, welche aufgrund einer Verwandtschaft zu einem an der HH1 erkrankten Patienten mit entsprechend charakteristischem Genotyp molekulargenetisch untersucht wurden, selber aber keinerlei klinische Symptomatik aufwiesen. Je ein Drittel dieser Patienten wies den Genotyp Wildtyp, eine H63D-Heterozygotie und eine Compound-Heterozygotie für die H63D und die C282Y auf. Diese Verteilung der Genotypen lässt sich zwanglos in Analogie zu den Ergebnissen in Gruppe 2 aufgrund der bestehenden Verwandtschaftsverhältnisse zu erkrankten Patienten erklären.

Gruppe 4 schließlich beinhaltet Patienten, bei denen eine Lebererkrankung unklarer Genese vorliegt und bei denen die molekulargenetische Untersuchung zur Ausschlussdiagnose einer HH1 durchgeführt wurde. Demgemäß wies der Großteil der Vertreter dieser Gruppe keinerlei Mutation in diesem Gen auf. Bei ungefähr einem Drittel der Patienten konnte eine Heterozygotie für die H63D- oder C282Y-Mutation nachgewiesen werden, wobei diese Genotypen nicht ausreichend als Erklärung für die vorliegende Klinik erscheinen und möglicherweise als reine Zufallsbefunde innerhalb einer Population mit insgesamt hoher Heterozygotenfrequenz zu werten sind. Anders verhält es sich mit der beobachteten Homozygotie für die C282Y-Mutation. Dieser Genotyp prädisponiert den Anlageträger in hohem Maße für eine HH1. Allerdings ist anzumerken, dass besagter Anlageträger eine Frau von erst 39 Jahren ist und keinerlei Hinweise

auf das Vorliegen einer HH1 zeigt. Dies kann einerseits mit der weit unter dem Manifestations-Durchschnittsalter liegenden Altersstufe der Patientin erklärt werden; andererseits könnte eine bekanntermaßen starke Regelblutung (bei Vorliegen eines bis dato unbehandelten intracavitären Myoms) einer Eisenüberladung gegenregulativ wirksam sein. Daher muss hier von einem zufälligen Vorkommen dieses Genotyps innerhalb der Gruppe 4 ausgegangen werden, da diese eher in Gruppe 1 zu erwarten gewesen wäre.

4.3.2.A Darstellung der Verteilung der Werte für Ferritin und Transferrinsättigung innerhalb der einzelnen Gruppen

Unter Beibehaltung der obigen Gruppeneinteilung soll nun näher auf die Verteilung der Werte für die Laborparameter Ferritin und Transferrinsättigung eingegangen werden, welche bezüglich des Krankheitsbildes der HH1 eine sehr hohe klinische Aussagekraft besitzen und dementsprechend in dieser Arbeit als spezifische Marker für diese Erkrankung dienen. Außerdem sollen in einer zweiten Darstellung die Ferritin- und Transferrinsättigungswerte der Patienten mit den drei für diese Krankheit typischen Genotypen untereinander verglichen werden, um einen Eindruck über den Einfluss des Genotyps auf die phänotypische Expression der HH1-Krankheit, hier repräsentiert durch die Höhe des Ferritinwertes und der Transferrinsättigung, zu erhalten. Die entsprechenden Graphiken sind in den Tabellen 4.8. und 4.9. aufgeführt. Um besser untereinander vergleichen zu können, sind in den Tabellen auch die jeweiligen Durchschnittswerte und Spannbreiten angegeben.

Tab. 4.8. Darstellung der Ferritinwerte in µg%

Da nicht für alle Patienten des HH1-Kollektives der entsprechende Laborwert vorlag, wird für jede Gruppe getrennt angegeben, wie viele Patientendaten verfügbar waren. Dahinter ist die Anzahl der Patienten angegeben, für die kein entsprechender Wert vorlag.

Auf der oberen Abbildung werden die Ferritinwerte der einzelnen Gruppen, d.h. je nach zur HH1 mehr oder weniger passender Klinik verglichen, unabhängig vom vorliegenden Genotyp. Die Normwerte für Ferritin sind für Männer (m) und Frauen (w) unterschiedlich festgelegt. Daher sind die Mittelwerte für die Gruppen für Männer und Frauen getrennt aufgelistet, während diese Einteilung für den Mutationsvergleich unten nicht gemacht wurde, weil die Gesamtzahlen hier insgesamt sehr niedrig sind.

Im unteren Teil sind die Ferritinwerte getrennt nach dem Vorliegen der jeweiligen Hauptmutation abgebildet. Um eine bessere Übersichtlichkeit der unteren Abbildung zu erhalten, wurden zwei Werte von Patienten mit dem homozygoten Genotyp C282Y nicht in die Graphik aufgenommen (die Werte betragen 1943 µg % und 1746 µg %). Diese beiden Werte wurden auch bei der Berechnung des Mittelwertes nicht mit einberechnet.

Gesamtzahl der untersuchten Patienten/ Anzahl der fehlenden Daten	Graphiken	Durchschnittswert (Minimum-Maximum) in µg% Normwerte=3-30m/2-20w
Gr.1=7/54 Gr.2=2/6 Gr.3=12/19 Gr.4=13/37	<p style="text-align: center;">Ferritinwerte in µg% der einzelnen Gruppen</p> <p style="text-align: center;">Legende: ■ Gruppe 1 ◆ Gruppe 2 ▲ Gruppe 3 ✕ Gruppe 4</p>	Gr.1m=263,9 (19-1943) Gr.2w=297,5 (33-1078) Gr.2m=70,7 (38-132) Gr.2w=473 (473) Gr.3m=41,2 (7-97) Gr.3w=10,5 (2-19) Gr.4m=97,1 (5-403) Gr.4w=44 (1-219)
H/H=1/3 H/C=3/9 C/C=0/11	<p style="text-align: center;">Ferritin in µg% der Patienten mit den 3 Hauptmutationen</p> <p style="text-align: center;">Legende: ■ H63D/H63D ■ H63D/C282Y ■ C282Y/C282Y</p>	H/H=93,5 (41-146) H/C=54,2 (21-109) C/C=408,6 (9-1943)

Tab. 4.9. Darstellung der Werte für die Transferrinsättigung in %

Da nicht für alle Patienten des HH1-Kollektives der entsprechende Laborwert vorlag, wird für jede Gruppe getrennt angegeben, wie viele Patientendaten verfügbar waren. Dahinter ist die Anzahl der Patienten angegeben, für die kein entsprechender Wert erhoben werden konnte. Auf der oberen Abbildung werden die Werte für die Transferrinsättigung der einzelnen Gruppen, d.h. je nach zur HH1 mehr oder weniger passender Klinik verglichen, unabhängig vom vorliegenden Genotyp. Die Mittelwerte für die Gruppen für Männer (m) und Frauen (w) sind getrennt aufgelistet, während diese Einteilung für den Mutationsvergleich unten nicht gemacht wurde, weil die Gesamtzahlen hier insgesamt sehr niedrig sind. Im unteren Teil sind die Werte für die Transferrinsättigung getrennt nach dem Vorliegen der jeweiligen Hauptmutation abgebildet.

Gesamtzahl der untersuchten Patienten / Anzahl der fehlenden Daten	Graphiken	Durchschnittswert (Minimum-Maximum) in % Normwerte=16-45 %
Gr.1=44/10 Gr.2=4/2 Gr.3=7/12 Gr.4=23/14	<p style="text-align: center;">Transferrinsättigung in % der einzelnen Gruppen</p> <p style="text-align: center;">Werte in %</p> <p style="text-align: center;">Anzahl der Patienten</p> <p style="text-align: center;">◆ Gruppe 1 ■ Gruppe 2 ▲ Gruppe 3 ✕ Gruppe 4</p>	Gr.1m=72 (21-111) Gr.1w=81,9(37-126) Gr.2m=45,7(32-53) Gr.2w=50(50) Gr.3m=31,8(20-54) Gr.3w=48,5(40-57) Gr.4m=39,8(18-103) Gr.4w=36,6(20-71)
H/H=1/3 H/C=3/9 C/C=1/11	<p style="text-align: center;">Transferrinsättigung in % der Patienten mit den 3 Hauptmutationen</p> <p style="text-align: center;">Werte in %</p> <p style="text-align: center;">1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</p> <p style="text-align: center;">■ H63D/H63D ■ H63D/C282Y ■ C282Y/C282Y</p>	H/H=62,5(54-71) H/C=51,8(30-90) C/C=73,3(2-105)

Beim Vergleich der Werte innerhalb der einzelnen Gruppen fällt auf, dass Gruppe 1 fast durchgehend höhere Werte für Ferritin und Transferrinsättigung aufweist als die anderen Gruppen. Dies wird durch die entsprechend berechneten Durchschnittswerte bestätigt, welche auf eine bestimmte Tendenz innerhalb der einzelnen Gruppen hinweisen. Demgemäß weist Gruppe 1 die höchsten Werte auf, gefolgt von den Gruppen 2 und 4, während in Gruppe 3 die niedrigsten Werte erhoben wurden. Dies deckt sich auch mit der Gruppeneinteilung, welche anhand der vorliegenden Untersuchungsindikation erfolgte. Eine Ausnahme zu dieser Beobachtung bildet der hohe Einzelwert von 473 µg% für das Ferritin in Gruppe 2. Da dieser solitär vorliegende Wert allerdings nicht ohne Vorbehalt als Durchschnittswert akzeptiert werden kann, erscheint jegliche Aussage hierzu als inadäquat.

Der im zweiten Teil der Graphiken durchgeführte Vergleich zwischen den Patienten mit den für die HH1 charakteristischen Genotypen lässt ebenfalls eine bestimmte Tendenz in Bezug auf die erhobenen Werte vermuten. Demgemäß wiesen die Patienten mit einer Homozygotie für die C282Y-Mutation, welche in hohem Maße für eine HH1 prädisponiert, auch die höchsten Werte für das Ferritin und die Transferrinsättigung auf, gefolgt von den Patienten mit einer Homozygotie für die H63D-Mutation und schließlich den Patienten mit einer Compound-Heterozygotie für die H63D- und die C282Y-Mutation. Diese Beobachtung ist auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem vorliegenden Genotyp und Phänotyp hinweisend.

Tabelle 4.10. soll entsprechende Beobachtung nochmals in tabellarischer Form verdeutlichen.

Tab. 4.10. Darstellung der Verteilung der Ferritin- und Transferrinsättigungswerte unter den Patienten mit den drei Hauptmutationen

Unterhalb der Mutation sind die Gesamtzahlen (n) der Patienten angegeben, wiederum darunter die jeweilige Verteilung innerhalb der Gruppen. Die Laborparameter sind nach unterschiedlichen Grenzbeträgen aufgeteilt, wobei unten jeweils die Anzahl der Patienten (fehlende Daten) angegeben ist, für die keine Werte vorlagen. Abkürzungen: n=Gesamtzahl der Patienten;

	C282Y/H63D	H63D/H63D	C282Y/C282Y
	n=9	n=3	n=11
Gruppe 1	5	3	10
Gruppe 2	2	0	0
Gruppe 3	2	0	0
Gruppe 4	0	0	1
<hr/>			
Ferritin in µg%			
<120	6	1	6
121-199	0	1	3
200-999	0	0	0
>1000	0	0	2
Fehlende Daten	3	1	0
<hr/>			
Tf-Sättigung in %			
<50	3	0	2
>50	3	2	8
Fehlende Daten	3	1	1

4.3.3.A Zusammenfassung der Patientenbögen

Abschließend soll hier mit Hilfe der Tabellen 4.11. (männliche Patienten) und 4.12. (weibliche Patienten) versucht werden, alle anhand der Patientenbögen erhobenen klinischen Angaben zusammenzufassen.

Tab. 4.11. Zusammenfassung der Patientenbögen für die Männer

Die Tabelle soll zu einem Gesamtüberblick der Patientenbögen beitragen. Für das Alter und die Laborparameter sind die jeweils errechneten Mittelwerte angegeben, in Klammern die Spannweite der Werte, hinter der Klammer die Anzahl der fehlenden Werte. Für die Leberbiopsie und die Angabe einer Siderose bzw. erhöhtem Eisenwert gilt, dass die Anzahl der für die HH1-typischen Ergebnisse angegeben sind und nach dem Schrägstrich die Gesamtzahl der Leber-biopsierten Patienten. Für den Rest der Angaben gilt, dass die positiven Ergebnisse vermerkt sind, bei allen anderen Patienten dazu keinerlei Angaben gemacht waren, wobei unklar bleibt, ob eine Untersuchung durchgeführt wurde und negativ war oder ob keinerlei Untersuchung dazu durchgeführt wurde. Abkürzungen: n=Gesamtzahl; NW=Normalwerte; p=positiv; Fe↑=erhöhter Eisenwert aus der Veraschung; sek.=sekundär;

Parameter	Gruppe 1m / n=38	Gruppe 2m / n=4	Gruppe 3m / n=11	Gruppe 4m / n=25
Alter	53,2 (26-80) 0	48,5 (29-77) 0	34,5 (11-59) 0	47,8 (20-73) 0
Transferrin (NW=200-360 mg%)	184,5 (57-339) 6	213,7 (176-247) 1	235,8 (202-270) 6	214 (88-375) 11
Ferritin (NW=3-30m/2-20w)	263,9 (19-1943) 4	70,7 (38-132) 1	41,2 (7-97) 6	97,1 (5-403) 10
Eisen (NW=60-160 µg%)	167,1 (7-295) 4	134,3 (113-162) 1	102 (77-153) 6	109,4 (47-221) 7
Transferrinsättigung (NW=16-45%)	72 (21-111) 8	45,7 (32-53) 1	31,8 (20-54) 6	39,8 (18-103) 11
GOT (NW<18 U/L)	70,6 (11-584) 4	11,7 (10-13) 1	15,8 (34-79) 6	83,2 (7-854) 5
GPT (NW<22 U/L)	130,1 (10-1980) 3	17,3 (13-24) 1	22,2 (7-43) 6	120,5 (9-1519) 3
y-GT (NW<28m/<18w)	157,1 (7-823) 3	21 (11-35) 1	19,75 (10-29) 7	109,6 (13-586) 3
Quick (NW= 75-120%)	86 (18-120) 8	106 (103-109) 2	96,7 (80-106) 8	84,5 (26-120) 5
Albumin (3,4-4,8 g/dl)	4,46 (2,3-5,2) 11	4,6 (4,3-4,9) 2	4,7 (4,5-4,8) 7	3,6 (1,8-4,7) 12

Parameter	Gruppe 1m / n=38	Gruppe 2m / n=4	Gruppe 3m / n=11	Gruppe 4m / n=25
Ges.Eiweiß (NW=6,5-8,5 g/dl)	7,8 (4,9-8,7) 5	7,5 (7,2-8,1) 1	7,8 (7-8,3) 7	7,1 (5,8-8,5) 6
LB: typisch für HH1	3p/19	1p/1	0	1p/6
Siderose/Fe↑	14p/19	1p/1	0	2p/6
Autoimmunhepatitis	2	0	0	1
chron. HBV	3	0	0	0
chron. HCV	3	0	0	2
Alkoholkonsum	12	1	1	8
Müdigkeit	12	0	0	6
auffällige Hautpigmentierung	4	0	0	1
Lebervergrößerung	10	1	0	6
Leberzirrhose	12	0	0	4
HCC	2	0	0	1
Splenomegalie	12	1	0	8
Gallenblasensteine	5	0	0	5
Diabetes mellitus Typ II	8	0	0	2
Abdominalschmerz	3	0	0	2
Herzrhythmusstörungen	2	0	0	0

Parameter	Gruppe 1m / n=38	Gruppe 2m / n=4	Gruppe 3m / n=11	Gruppe 4m / n=25
Herzinsuffizienz	1	0	0	1
sek. Kardiomyopathie	0	0	0	1
Hypothyreose	5	1	1	1
Osteoporose	2	0	0	0
Arthropathie	5	0	1	5

Tab. 4.12. Zusammenfassung der Patientenbögen für die Frauen

Die Tabelle soll zu einem Gesamtüberblick der Patientenbögen beitragen. Für das Alter und die Laborparameter sind die jeweils errechneten Mittelwerte angegeben, in Klammern die Spannweite der Werte, hinter der Klammer die Anzahl der fehlenden Werte. Für die Leberbiopsie gilt, dass die Anzahl der für die HH1 typischen Ergebnisse angegeben sind und nach dem Schrägstrich die Gesamtzahl der Leberbiopsierten Patienten. Für den Rest der Angaben gilt, dass die positiven Ergebnisse vermerkt sind, bei allen anderen Patienten dazu keinerlei Angaben gemacht waren, wobei unklar bleibt, ob eine Untersuchung durchgeführt wurde und negativ war oder ob keinerlei Untersuchung dazu durchgeführt wurde. Abkürzungen: n=Gesamtzahl; NW=Normalwerte; p=positiv; Fe=erhöhter Eisenwert aus der Veraschung; sek.=sekundär;

Parameter	Gruppe 1w/n=16	Gruppe 2w / n=2	Gruppe 3w / n=8	Gruppe 4w/n=12
Alter	57,7 (37-73) 0	49 (45-53) 0	34,3 (18-47) 0	56,5 (20-82) 0
Transferrin (NW=200-360 mg%)	179,5 (104-264) 5	194 (194) 1	224,5 (210-239) 6	212,4 (94-293) 2
Ferritin (NW=3-30m/2-20w)	297,5 (33-1078) 3	473 (473) 1	10,5 (2-19) 6	44 (1-219) 3
Eisen (NW=60-160 µg%)	187,2 (108-263) 4	136 (136) 1	123,7 (59-192) 5	104,9 (46-243) 1
Transferrinsättigung (NW=16-45%)	81,9 (37-126) 4	50 (50) 1	48,5 (40-57) 6	36,6 (20-71) 3
GOT (NW<18 U/L)	158,2 (11-1547) 2	10 (10) 1	15 (5-25) 6	41,7 (7-185) 1
GPT (NW<22 U/L)	180,8 (11-1811) 3	21 (21) 1	12 (6-22) 5	32,4 (11-125) 1
γ-GT (NW<28m/<18w)	70,8 (7-339) 4	9 (9) 1	9,7 (6-12) 5	183,6 (10-807) 2
Quick (NW= 75-120%)	81,2 (15-120) 5	0	97 (97) 7	93,8 (46-120) 1
Albumin (3,4-4,8 g/dl)	3,9 (1,8-5,3) 7	0	4,9 (4,9) 7	3,9 (2,6-5) 7
Ges.Eiweiß (NW=6,5-8,5 g/dl)	7,3 (5,2-10,5) 4	0	8,2 (8,2) 7	7,6 (6,3-9,6) 2
LB: typisch für HH1	1p/7	0	0	0p/6
Siderose/FE	4p/7	0	0	2p/6
Autoimmunhepatitis	0	0	0	1p

Parameter	Gruppe 1w/n=16	Gruppe 2w / n=2	Gruppe 3w / n=8	Gruppe 4w/n=12
chron. HBV	1	0	0	0
chron. HCV	0	0	0	0
Alkoholkonsum	3	0	0	1
Müdigkeit	5	0	0	1
auffällige Hautpigmentierung	2	0	0	1
Lebervergrößerung	6	0	0	1
Leberzirrhose	3	0	0	2
HCC	0	0	0	1
Splenomegalie	6	0	0	2
Gallenblasensteine	2	0	0	1
Diabetes mellitus Typ II	3	0	0	2
Abdominalschmerz	1	0	0	2
Herzrhythmusstörungen	1	0	0	1
Herzinsuffizienz	1	0	0	0
sek. Kardiomyopathie	0	0	0	0
Hypothyreose	3	0	0	6
Osteoporose	1	0	0	0

Parameter	Gruppe 1w/n=16	Gruppe 2w / n=2	Gruppe 3w / n=8	Gruppe 4w/n=12
Arthropathie	2	0	0	2

Bezüglich der Angaben in diesen Tabellen ist einschränkend anzumerken, dass keinerlei Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden kann. Für eine Reihe von Patienten waren nämlich nicht alle der im Rahmen dieser Untersuchung interessierenden Daten in den entsprechenden Patientenakten dokumentiert und konnten aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie auch nicht mit vertretbarem Aufwand ergänzt werden. Aufgrund dieser unzureichenden Datenqualität musste zwangsläufig auf die Auswertung mittels mathematischer Testverfahren verzichtet werden und die Zusammenfassung der in den Tabellen 4.11. und 4.12. aufgelisteten Parameter im Folgenden in einer rein deskriptiven Form durchgeführt werden.

Die Gruppen 1, 2 und 4 wiesen vergleichbare Werte in Bezug auf das Durchschnittsalter auf, während der Wert in Gruppe 3 sehr viel niedriger ausfiel und demnach jeglichen Vergleich mit den anderen Gruppen als inadäquat erscheinen ließ. Da die Gruppe 2 mit ihrer niedrigen Zahl an Patienten ohne jegliche Klinik aber von nur niederrangigem Interesse für die vorliegende Auswertung ist, soll hier nicht näher auf diesen Unterschied eingegangen werden.

Die Werte für Eisen und Transferrin im Serum wiesen die gleiche Tendenz auf, wie sie bereits für Ferritin und Transferrinsättigung beobachtet wurde. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die Transferrinsättigung unter Einsatz der Werte für Eisen und Transferrin im Serum berechnet wird. Aus diesem Grund wurde auf eine separate Besprechung dieser Werte verzichtet.

Die übrigen in den Tabellen aufgeführten Laborparameter stellen eine Reihe von in der Leber synthetisierten Molekülen dar, welche den Grad einer evtl. vorliegenden Leberschädigung widerspiegeln, ohne dass sie pathognomonisch für ein bestimmtes Krankheitsbild wären. Demgemäß fielen die Werte für diese Moleküle sowohl in Gruppe 1 als auch in Gruppe 4 pathologisch aus. Ein

Vergleich mit den Gruppen 2 und 3 erschien dabei aufgrund der niedrigen Gesamtzahl der erhobenen Daten in diesen Gruppen nicht sinnvoll.

In Bezug auf die Ergebnisse der teils durchgeführten Leberbiopsien und Lebergewebe-Veraschungen kann aufgrund der unzureichenden Datenlage ebenfalls keine Aussage getroffen werden. In den Gruppen 1 und 4 wurde nur ein Teil der Patienten biopsiert. Unter diesen fanden sich wenige mit einem für die HH1-typischen Befund, während die Lebergewebe-Veraschung auffallend häufig pathologisch ausfiel. In den Gruppen 2 und 3 wiederum war bei keinem der Patienten eine Leberbiopsie durchgeführt worden, was verständlich ist, da diese Patienten keine bzw. keine für HH1 pathognomonische Symptomatik aufwiesen und die molekulargenetische Untersuchung nur aufgrund des Vorliegens einer Verwandtschaft mit einem an HH1 erkrankten Patienten durchgeführt worden war.

Die restlichen Angaben in den Tabellen beziehen sich auf das Vorliegen klinischer Symptome, welche häufig mit einer HH1 assoziiert sind. Auch hier konnte nur für einen Teil der Patienten das Vorliegen einer entsprechenden Klinik erhoben werden. Für den Rest der Patienten ist aufgrund der mangelhaften Dokumentation hingegen unklar, ob besagter Patient überhaupt auf das Vorliegen der jeweiligen Symptomatik hin untersucht wurde.

4.4.B Statistische Auswertung des M. Parkinson-Kollektives

4.4.1.B Strukturgleichheit von Patienten- und Kontroll-Kollektiv

Die Untersuchung auf Strukturgleichheit im Patienten- und Kontroll-Kollektiv mit den im Methodenteil beschriebenen statistischen Tests ergab die im Folgenden aufgelisteten Ergebnisse.

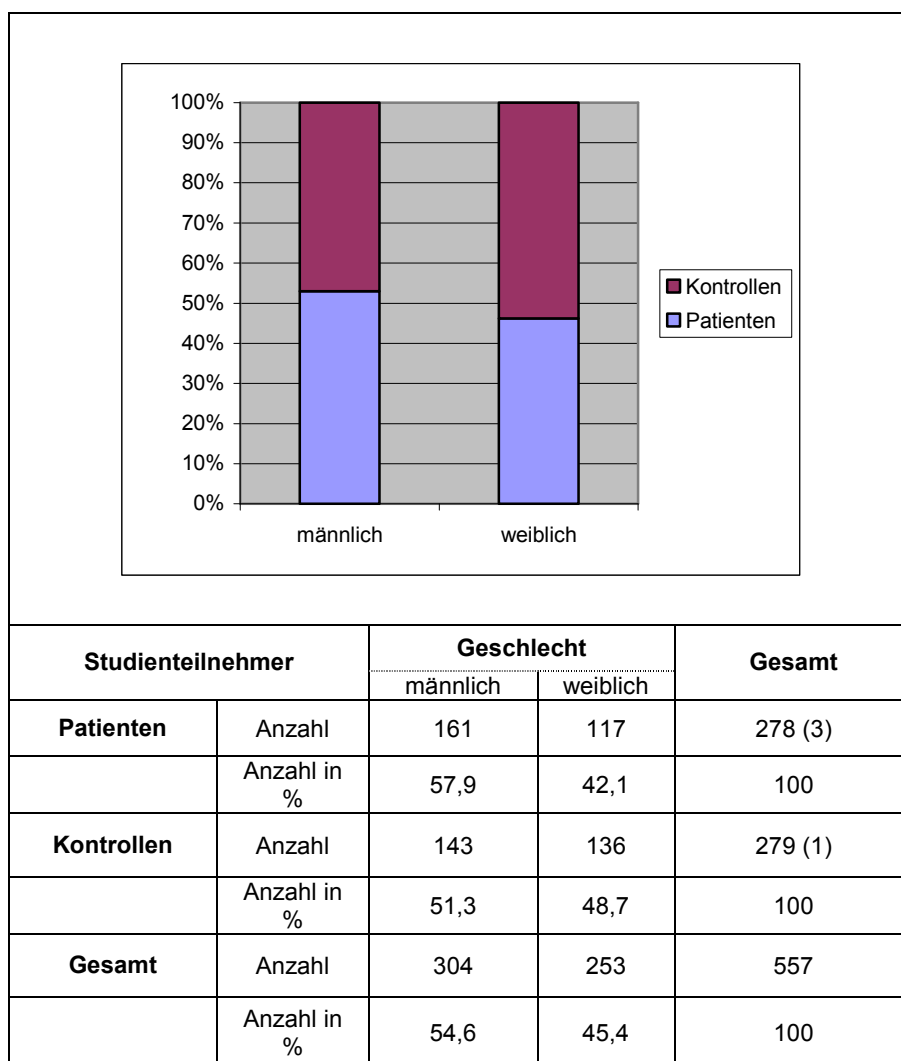


Abbildung 4-9 Vergleich der Geschlechterverteilung innerhalb der Kollektive

Im oberen Teil der Abbildung ist die Verteilung graphisch dargestellt. Im unteren Teil ist die absolute und relative Häufigkeit innerhalb der Gruppen angegeben. (): Drei Personen im Patienten-Kollektiv und 1 Person im Kontrollkollektiv konnte kein Geschlecht zugeordnet werden.

Die graphische Darstellung der Geschlechterverteilung in Abbildung 4-9 deutet bereits auf eine einheitliche Geschlechtsverteilung innerhalb der Kollektive hin. Diese Vermutung ließ sich anhand des Ergebnisses beim exakten Fisher Test bestätigen ($p > 0,05$).

Anders verhält es sich mit der Altersverteilung (U-Test nach Mann-Whitney: $p = 0,00$) der Studienteilnehmer. Das Alter der Patienten lag im Durchschnitt höher als das Alter im Kontrollkollektiv. Es ist demnach möglich, dass sich bei einigen Probanden im Kontrollkollektiv, die bislang als gesund erklärt waren, in höherem Lebensalter Parkinson-Symptome entwickeln. Da diese Arbeit aber primär die Korrelation der Echogenität in der PcSN mit einer vererbten genetischen Prädisposition für dieses Krankheitsbild untersucht, welche unabhängig vom Lebensalter besteht, wird dieser Unterschied nicht weiter beachtet.

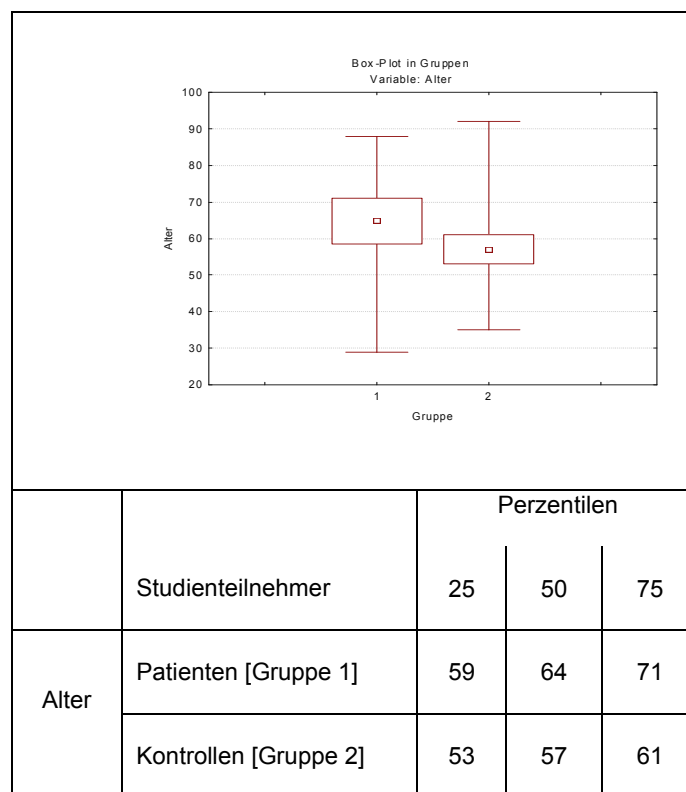


Abbildung 4-10 Darstellung der Altersverteilung innerhalb der Kollektive als Boxplots

Zu sehen ist die Altersverteilung innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektives. Der Inhalt der Boxen entspricht dabei der Altersverteilung von der 25. bis 75. Perzentile. Die Grenzstriche oberhalb und unterhalb der Boxen markieren das maximal und minimal vorkommende Alter. Die Symbole innerhalb der Boxen markieren den Median bzw. die 50. Perzentile.

Die folgende Abbildung soll einen Überblick der Ortsherkunft der Studienteilnehmer geben. Da diese allerdings alle gleicher ethnischer Herkunft sind, ist die inhomogene Verteilung als irrelevant anzusehen.

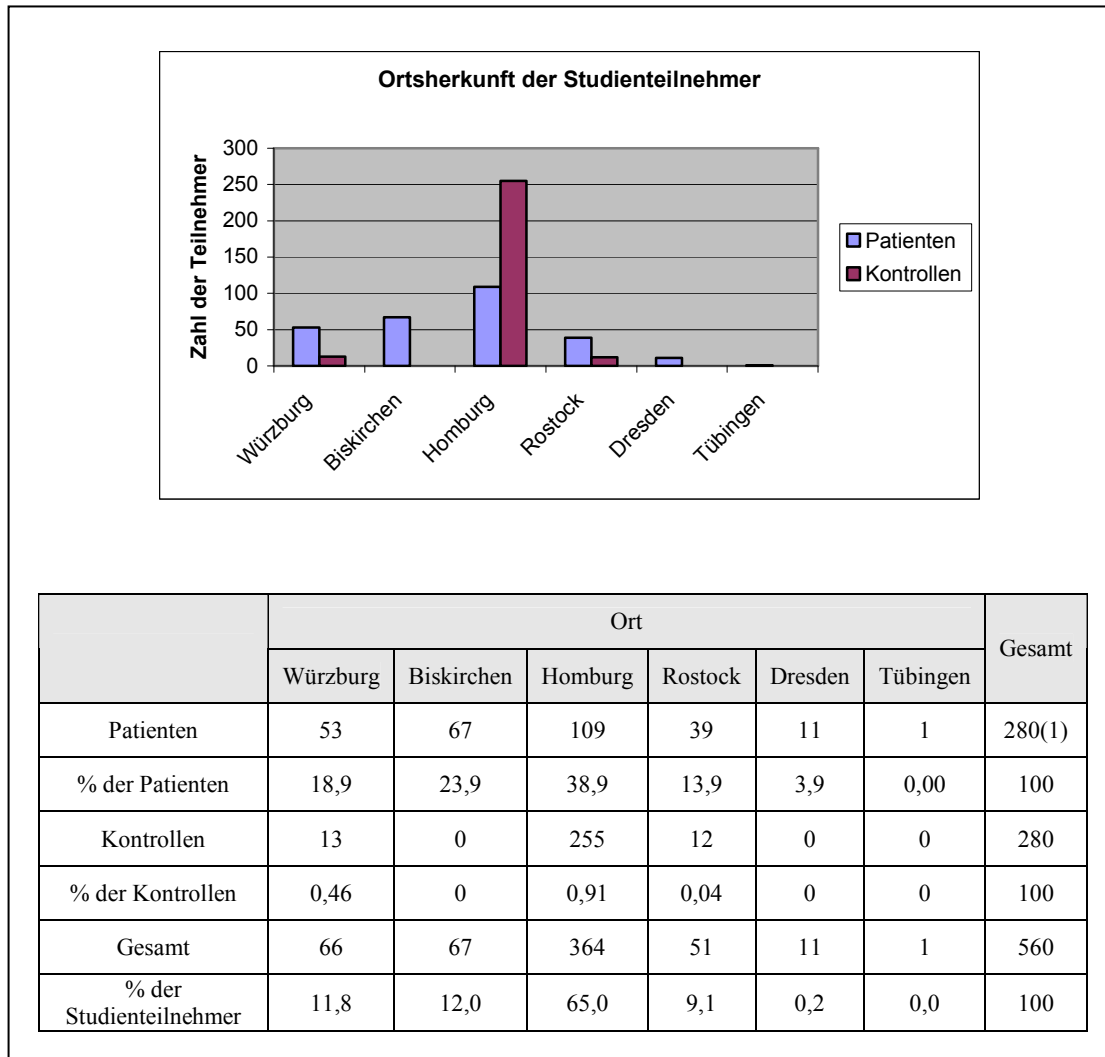


Abbildung 4-11 Darstellung der Ort-Herkunft der Studienteilnehmer

Im oberen Teil der Abbildung ist die Ortsverteilung graphisch dargestellt. Im unteren Teil sind die Verteilungen innerhalb der einzelnen Gruppe und der Gesamtheit aufgelistet. (): Für eine Person aus dem Patienten-Kollektiv konnte keine Ortszugehörigkeit erfasst werden.

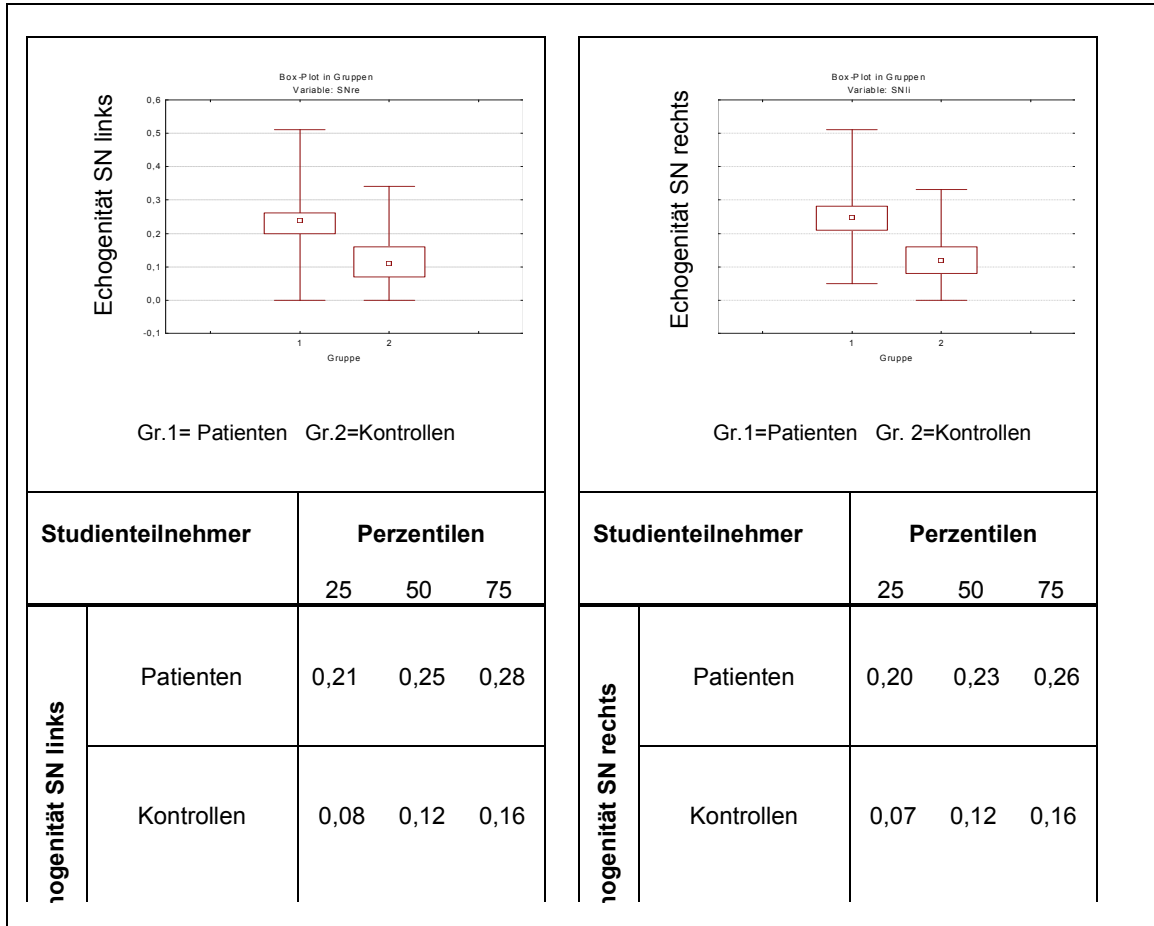


Abbildung 4-12 Vergleichende Darstellung der Echogenität zwischen den Kollektiven

Dargestellt sind die Boxplots bezüglich der Echogenität in der Substantia nigra im Vergleich zwischen Kontrollen und Patienten. Dabei repräsentieren die Boxen die 25. bis 75. Perzentile, während die oberen und unteren Striche die maximalen bzw. minimalen Werte anzeigen. Das Symbol innerhalb der Box markiert den Median bzw. die 50. Perzentile.

Ein Unterschied zwischen den in der SN gemessenen Echogenitätswerten innerhalb der beiden Kollektive ließ sich bereits graphisch feststellen. Diese Vermutung konnte anhand des U-Tests sowohl für die rechte Seite ($p=0.000$) als auch für die linke Seite ($p=0.000$) der SN bestätigt werden. Demgemäß wiesen die Vertreter im Patientenkollektiv höhere Werte in Bezug auf dieses Merkmal auf als das Kontrollkollektiv.

4.4.2.B Genotypverteilung und genotypische Homogenität der beiden Kollektive

Um Aussagen bezüglich der Genotypverteilung und genotypischen Homogenität innerhalb der zwei untersuchten Kollektive treffen zu können, wurden zunächst die Allelfrequenzen der entsprechenden Sequenzvariation in beiden Kollektiven bestimmt.

Bei Vorliegen einer hinreichend großen Allelfrequenz für den zu untersuchenden Genotyp konnte anschließend überprüft werden, ob die Genotypverteilung einer Hardy-Weinberg-Verteilung genügt. Abgesehen vom Locus Ex4/5694*G>A im Kontrollkollektiv, welcher die C282Y-Mutation bedingt, war der Hardy-Weinberg-Test durchgehend nicht signifikant ($p > 0,05$). Daraus ließ sich schließen, dass in den untersuchten Kollektiven kein Selektionsdruck besteht. Das oben erwähnte signifikante Ergebnis im Hardy-Weinberg-Test für die C282Y-Mutation wiederum wurde in dieser Arbeit als irrelevant betrachtet, da aufgrund der fehlenden Signifikanz beim Vergleich der beiden Kollektive keinerlei Aussage bezüglich dieser Mutation und dem MP getroffen werden konnte. Aus diesem Grunde wurde auch auf weitere Untersuchungen hierzu verzichtet.

In Anlehnung an die ermittelte Allelfrequenz wurde außerdem festgelegt, ob es sich bei der Variation um einen polymorphen oder monomorphen Locus handelte. Von einem polymorphen Locus ist definitionsgemäß immer dann die Rede, wenn die Frequenz des einen Allels $< 95\%$ bzw. die Frequenz des anderen Allels $> 5\%$ beträgt. Trifft dies nicht zu, spricht man von einem monomorphen Locus.

Auch die statistischen Tests zur Überprüfung auf genotypische Homogenität ergaben keinerlei signifikantes Ergebnis. Diese Tests wurden je zweimal durchgeführt, beim zweiten Durchgang mit selektierten Daten (vgl. 3.5.4.B). Hierzu wurden nur noch Patienten mit Echogenitätswerten von $\geq 0,19 \text{ cm}^2$ auf einer Seite bzw. Kontrollpersonen mit Werten $\leq 0,19 \text{ cm}^2$ auf beiden Seiten der SN in die Auswertung mit reingenommen. Auch nach dieser Selektion wurden keine signifikanten Ergebnisse erhalten ($p > 0,05$).

Die Ergebnisse der Allelfrequenzbestimmung, des Hardy-Weinberg-Tests für jedes Kollektiv und des Genotypenvergleichs zwischen den Kollektiven (Fisher's exact test) sind in folgender Tabelle 4.13. aufgelistet.

Tab. 4.13. Ergebnisse der Allelfrequenz, des Hardy-Weinberg-Tests und des Tests auf genotypische Homogenität in den zwei Kollektiven

Die Allelfrequenzen sind für insgesamt 5 Loci angegeben, wobei die Gesamtzahl der getesteten Personen (N) in Klammern dahinter steht. Das Signifikanzniveau für die p-Werte des Hardy-Weinberg-Tests war auf $\alpha=0,05$ festgelegt. In der letzten Spalte ist das Ergebnis des Tests auf genotypische Homogenität verzeichnet. Auch hier war ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ vorgegeben. Dabei bezieht sich das erste Ergebnis auf die Testung ohne Selektion, der zweite Wert auf die Testung nach der Selektion anhand der Echogenitätswerte.

Mutation		Patienten		Kontrollpersonen		Genotypische Homogenität Nicht-selektiert/ selektiert
Locus	Aminosäure-Position	Allelfrequenz	Hardy-Weinberg	Allelfrequenz	Hardy-Weinberg	
Ex2/3732*C>G	H63D	0,160 (N=278)	1	0,141	0,6177	0,574/0,471
Ex2/3821*A>C	K92N	0,002 (N=273)	*	0	*	*
IVS2/3889*T>C	-	0,356 (N=278)	0,4357	0,317	0,1962	0,151/0,161
Ex4/5499*C>T	I217T	0,002 (N=268)	*	0	*	*
Ex4/5694*G>A	C282Y	0,047 (N=268)	0,4419	0,058	0,0005	0,229/0,355

4.4.3.B Überprüfung der Assoziation verschiedener Loci

Zur Überprüfung der Assoziation zweier Loci wurden verschiedene Tests hinsichtlich einer genotypischen und allelischen Assoziation zwischen den gefundenen Loci des HFE-Genes durchgeführt.

Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Anzahl an Haplotypen in den zwei zu vergleichenden Kollektiven bestimmt. In Tabelle 4.14. sind alle gefundenen Haplotypen, die an maximal einem Locus heterozygot sind, aufgelistet.

Tab. 4.14. Auflistung der gefundenen Haplotypen mit maximal einem heterozygoten Locus

In der Tabelle sind alle gefundenen 8 Haplotypen mit maximal einem heterozygoten Locus dargestellt. In der Tabelle steht die Null für das Wildtypallel, die Eins für das mutierte Allel.

Haplotyp	Locus		
	IVS2/3889*T>C	Ex2/3732*C>G	Ex4/5694*G>A
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0	1	0
4	0	0	1
5	1	1	0
6	1	0	1
7	0	1	1
8	1	1	1

Anschließend wurde die Haplotypenverteilung innerhalb der zwei Kollektive auf Homogenität hin geprüft. Hierbei konnte für den Haplotypen 5, bei welchem das mutierte Allel Ex2/3732*C>G mit der Variation IVS2/3889*T>C gekoppelt vorliegt, sowohl im Patienten als auch im Kontrollkollektiv ein signifikantes Ergebnis ($p=0.000$) erhoben werden. Die anhand der Stammbaumanalyse (vgl. 4.2.3.A+B) postulierte allelische Assoziation konnte demnach mit Hilfe dieses Testverfahrens bestätigt werden.

Da diese Kopplung allerdings in beiden Kollektiven gleichermaßen nachgewiesen wurde, konnte keinerlei Aussage bezüglich eines Zusammenhangs zwischen dieser Kopplung mit dem Krankheitsbild des MP getroffen werden.

Für alle anderen paarweise durchgeführten Locivergleiche konnte keinerlei signifikante genotypische Assoziation ermittelt werden.

Tabelle 4.15. zeigt die Haplotypenhäufigkeiten innerhalb der einzelnen Kollektive.

Tab. 4.15. Auflistung der Haplotypenhäufigkeit im Vergleich

Haplotyp	Patienten	Kontrollen	Gesamt
1	268	279	547
2	100	84	184
3	0	0	0
4	15	19	34
5	24	24	48
6	1	2	3
7	0	0	0
8	0	0	0

5 Diskussion

A HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose

Bei der HH1 handelt es sich um ein autosomal-rezessiv vererbtes Krankheitsbild, bei welchem sich aufgrund von molekulargenetischen Veränderungen im HFE-Gen eine Eisenüberladung des Organismus entwickelt. Die wichtigsten für diese Erkrankung prädisponierenden Genotypen sind dabei die homozygote C282Y-Mutation in Exon 4, die H63D-Mutation in Exon 2 und die Compound-Heterozygotie dieser zwei Mutationen. Demgemäß wird bei Patienten mit einem Verdacht auf eine HH1 auf das Vorliegen der oben genannten Mutationen hin untersucht. Daneben existieren einige seltenere Mutationen im HFE-Gen, welche ebenfalls mit diesem Krankheitsbild in Verbindung gebracht werden. Aufgrund der niedrigen Gesamtzahl werden diese selteneren Varianten bei den routinemäßig durchgeführten Analysen allerdings normalerweise nicht berücksichtigt.

Auch für das im Rahmen dieser Arbeit zusammengestellte HH1-Kollektiv waren im Voraus entsprechende molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt worden. Für eine Reihe von Patienten mit der charakteristischen Symptomatik einer HH1 konnte hierbei allerdings keine entsprechende Mutation in den Exons 2 oder 4 nachgewiesen werden. Daher wurde beschlossen, bei diesen Patienten gezielt nach Veränderungen in den nicht untersuchten Genabschnitten des HFE-Genes zu suchen. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit die 6 Exons des HFE-Genes mittels der DHPLC-Analytik untersucht.

Neben dieser molekulargenetischen Untersuchung wurde mittels eines Patientenbogens retrospektiv die Klinik dieser Patienten zum Datum der Untersuchungsanordnung erhoben, um anhand einer deskriptiven statistischen Auswertung Aussagen über mögliche Zusammenhänge zwischen Genotyp und gleichzeitig bestehendem Phänotyp treffen zu können. Unter den klinischen Angaben dienten dabei die Laborwerte Transferrin, Transferrinsättigung, Ferritin und Eisen im Serum als Marker für das Vorliegen einer HH1.

B Idiopathischer Morbus Parkinson

Beim idiopathischen Morbus Parkinson (MP) handelt es sich um ein durch Dopaminmangel hervorgerufenenes neurologisches Krankheitsbild, dessen Ätiologie noch weitgehend ungeklärt ist. Mehrere Studien weisen allerdings auf ein multifaktoriell bedingtes Geschehen hin, bei welchem auch eine Störung im Eisenstoffwechsel mit einer vermehrten Eisenspeicherung von Bedeutung zu sein scheint. Die transkranielle Sonographie (TCS) stellt dabei neben anderen Methoden eine Möglichkeit dar, den Grad der Eisenspeicherung in der Substantia nigra (SN) von MP-Patienten auf einfache Weise zu bestimmen. Mit Hilfe dieser Neuentwicklung konnte eine signifikant erhöhte Echogenität in der SN bei Patienten mit MP ermittelt werden, wobei die Echogenitätsdichte proportional zu der in der SN gespeicherten Eisenmenge war, wie anhand mehrerer post mortem Studien nachgewiesen werden konnte (Berg et al., 1999, 2002). Den Grund hierfür vermutet man in einer genetisch bedingten Störung des durch multiple Proteine regulierten Eisenstoffwechsels, wobei auch eine Störung im HFE-Protein hierfür als geeigneter Kandidat erscheint.

Demgemäß wurden im Rahmen dieser Arbeit alle 6 Exons des HFE-Genes in einem Patienten- und Kontroll-Kollektiv mittels DHPLC und Sequenzierung auf Veränderungen hin untersucht. Die mittels TCS gemessene Echogenität bei den Vertretern beider Kollektive diente neben der Klinik als Marker für das Vorliegen dieser Erkrankung. Anhand der ermittelten Daten konnte anschließend im Rahmen einer multizentrischen Fall-Kontroll-Studie die Relevanz dieser Mutationen unter Beachtung der Echogenitätswerte im Patienten- und Kontroll-Kollektiv anhand statistischer Testverfahren überprüft werden.

5.1.1.A Ergebnisse des Mutationsscreenings im HH1-Kollektiv

Im HH1-Kollektiv wurden mittels DHPLC und nachfolgender Sequenzierung insgesamt zwei exonische *missense*-Mutationen und eine intronische Sequenzvariation gefunden.

Die zwei exonischen Mutationen H63D und C282Y waren bereits vorbeschrieben und können auf der Homepage des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) unter der SNP-ID rs1799945 und rs1800562 eingesehen werden. Bei diesen Mutationen handelt es sich um die zwei am häufigsten mit der HH1 assoziierten Mutationen in Exon 2 und Exon 4 (Feder et al., 1996; Aguilar-Martinez et al., 1997; Beutler et al., 1997a; Ramrakhiani et al., 1998). Auch die oben erwähnte intronische Sequenzvariation (in NCBI unter SNP-ID rs2071303 abgelegt), welche vier Basenpaare hinter dem Exon 2 positioniert ist, war bereits aus früheren Studien bekannt (Beutler et al., 1997b). Bezüglich der Relevanz dieser Sequenzvariation für das Krankheitsbild der HH1 herrscht noch Uneinigkeit (Villiers et al., 1999). Mittels Stammbaumanalyse an einer CEPH-Familie konnte allerdings eine Kopplung der H63D-Mutation mit dieser intronischen Sequenzvariation IVS2/3889*T>C festgestellt werden, welche im Parkinson-Kollektiv anhand eines statistischen Testverfahrens bestätigt wurde. Auf eine mögliche Bedeutung dieser ebenfalls vorbeschriebenen Kopplung soll unter 5.1.2.A näher eingegangen werden.

In allen anderen untersuchten Exons konnte keine Sequenzvariation nachgewiesen werden. Trotzdem sollen im Folgenden die mittels DHPLC-Analytik und Sequenzierung erhobenen Ergebnisse für die anderen Exons und die weitere Vorgehensweise anhand einer kurzen Zusammenfassung dargestellt werden.

Für das PCR-Fragment 5 wurde bei einigen Proben ein auffälliges Ergebnis am DHPLC-Gerät beobachtet, wobei das Ergebnis der anschließenden Sequenzierung keine exonische bzw. exonnahe (≤ 10 bp hinter dem Exonende) Sequenzvariation ergab. Allerdings ist anzumerken, dass besagte Sequenz aufgrund der Lage des Rückwärts-Primers einen sehr großen intronischen Abschnitt beinhaltete, welcher nicht mit zufriedenstellender Qualität dargestellt werden konnte und vermutlicherweise die gesuchte Variation enthielt. Da eine Variation, die so

weit im Intron positioniert ist, aber mit größter Wahrscheinlichkeit keine Bedeutung für die Proteintranslation hat, wurde auf weitere Untersuchungen dieser Auffälligkeit verzichtet.

Für die Exons 1 und 6 wurde ebenfalls bei einigen Proben ein auffälliges Elutionsprofil beobachtet. Trotz ausreichender Datenqualität konnte mittels Sequenzierung kein entsprechendes Korrelat für diese Auffälligkeiten gefunden werden. Demnach handelte es sich hierbei am ehesten um eine „Schulter“, welche durch ein bei der PCR entstandenes Artefakt oder durch eine Verunreinigung bedingt wurde.

In Exon 3 konnte keinerlei Auffälligkeit mittels DHPLC ermittelt werden.

Bezüglich der hier eingesetzten Methode der DHPLC ist noch anzumerken, dass kein einziges Mal ein falsch negatives Ergebnis erhoben wurde, was durch die hohe Sensitivität von 96 % dieses Untersuchungsverfahrens erklärbar ist (Xiao et al., 2001). Eine Eigenart dieser Methode ist auch, dass für einige der Exons bei Messungen mit zwei unterschiedlichen Temperaturen in der DHPLC die Auffälligkeit nur bei einer der Temperaturen nachgewiesen wurde, während die gleiche Probe bei der entsprechend anderen Temperatur völlig unauffällig erschien. Dies lässt sich allerdings sehr einfach anhand des Zusammenhangs zwischen der Lokalisation der jeweiligen Sequenzvariation mit der entsprechenden Schmelzdomäne erklären. Demnach muss die Messung bei der jeweils idealen Analysetemperatur erfolgen, um einen klaren Unterschied in den Retentionszeiten zwischen Hetero- und Homoduplex ermitteln zu können.

5.1.2.A Mögliche Zusammenhänge der Mutationen im HFE-Gen mit der klinischen Manifestation der HH1

Der Zusammenhang zwischen der HH1 und molekulargenetischen Veränderungen im HFE-Gen wurde bereits im Jahre 1996 durch Feder et al. beschrieben. Die wichtigsten für diese Krankheit prädisponierenden Genotypen sind dabei die homozygote C282Y-Mutation in Exon 4 (Feder et al., 1996; Beutler et al., 1997a; Ramrakhiani et al., 1998), die H63D-Mutation in Exon 2 und die Compound-Heterozygotie dieser zwei Mutationen (Feder et al., 1996; Aguilar-Martinez et al., 1997; Beutler et al., 1997a). Im Folgenden soll näher auf die Veränderungen in der Proteintranslation bei Vorliegen dieser Mutationen und auf die damit assoziierten klinischen Folgen eingegangen werden.

Die homozygote C282Y-Mutation in Exon 4 prädisponiert den Anlageträger in höchstem Maße für eine HH1. Dementsprechend wird dieser Genotyp bei molekulargenetischen Untersuchungen an Patienten mit einem Verdacht auf eine HH1 am häufigsten nachgewiesen. Der Grund für die erhöhte Vulnerabilität bei Anlageträgern dieser Mutation ist dabei die ausgetauschte Aminosäure an der Position 282 innerhalb der $\alpha 3$ -Domäne, welche im Normalfall für die Bindung des $\beta 2$ -Mikroglobulins zuständig ist und die anschließende Oberflächenexpression ermöglicht. Aufgrund der fehlenden Expression bei Vorliegen dieses Genotyps kann das HFE-Molekül seine Funktion innerhalb des Regelkreises für die Regulation des Eisenhaushaltes nicht erfüllen, was schließlich zu einer unkontrollierten Eisenaufnahme des Organismus mit allen dazugehörigen Folgen führt (Feder et al., 1996). Da allerdings auch Fallberichte von gesunden Anlageträgern dieser Mutation existieren, muss davon ausgegangen werden, dass dieser Krankheitsprozess von zusätzlichen Faktoren abhängig ist und demnach in Bezug auf diese Mutation von einer hohen, aber nicht vollständigen Penetranz ausgegangen werden kann (Pietrangelo, 2004).

Bei Vorliegen der H63D-Mutation wiederum wird das Molekül zwar exprimiert, ist in seiner Funktion aufgrund des Verlusts einer Histidin-Aspartat-Brücke aber gestört (Waheed et al., 1997). Auf eine klinische Relevanz dieser Störung weisen dabei mehrere genetische Untersuchungen mit einem signifikant ver-

mehrten Auftreten dieses Genotyps bei Patienten mit einer HH1 hin (Feder et al., 1996; Beutler, 1997c; Fairbanks et al., 1998). Demnach muss von einer zumindest modifizierenden Wirkung dieses Genotyps auf das Krankheitsbild der HH1 ausgegangen werden, auch wenn diese Mutation keine so große Bedeutung für die HH1 aufweist wie die homozygote C282Y-Mutation.

Ähnlich verhält es sich mit dem Genotyp der Compound-Heterozygotie für die C282Y- und H63D-Mutation. Auch hierzu existieren entsprechende Fallberichte (Aguilar-Martinez et al., 2001), wobei allerdings von einem noch geringeren Erkrankungsrisiko (1-2 %) bei Anlageträgern dieser Mutationen ausgegangen wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keiner dieser drei Genotypen obligat mit dem Krankheitsbild der HH1 assoziiert ist und der Ausprägungsgrad der Eisenüberladung von Patient zu Patient variiert. Auf der anderen Seite kann nicht bei jedem Patienten mit der typischen Klinik einer HH1 die jeweils zugrundeliegende genetische Veranlagung im HFE-Gen gefunden werden. Demgemäß besteht noch Unklarheit sowohl bezüglich der Bedeutung der drei wichtigsten Genotypen und deren Relevanz für den Phänotyp als auch in Bezug auf das Vorhandensein genetischer Varianten anderer Lokalisation und dem Mitwirken diverser Umweltfaktoren. Dabei kann es sich bei den möglicherweise modifizierend wirksamen genetischen Varianten um exonische oder intronische Polymorphismen sowie Mutationen im jeweils gleichen oder in anderen Genen handeln, welche ebenfalls an der Regulation des Eisenhaushalts beteiligt sind (Aguilar-Martinez et al., 2001). Bisher konnten solche modifizierenden genetischen Varianten allerdings noch nicht identifiziert werden und bedürfen daher weiterer Suche.

Auch die Bedeutung des intronischen Polymorphismus, der vier Basenpaare hinter dem Exon 2 positioniert ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Villiers et al. (1999) stellten aber eine im Vergleich zum Kontrollkollektiv erhöhte Allelfrequenz dieser Sequenzvariation in einem HH1-Kollektiv fest, wobei auf eine möglicherweise milde oder auch fehlende phänotypische Relevanz dieses Polymorphismus hingewiesen wurde. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die H63D-Mutation niemals solitär, sondern immer in

Assoziation mit dieser intronischen Variation nachgewiesen wurde, so dass von einer Kopplung dieser beiden Varianten ausgegangen wird. Demgemäß scheint es durchaus naheliegend, dass die bislang beobachtete klinische Relevanz der H63D-Mutation erst durch die additive Wirkung dieser zwei Varianten bedingt wurde.

In letzter Zeit wird außerdem dem alternativen *splicing* des HFE-Genes eine bestimmte klinische Relevanz zugesprochen. Bislang konnten insgesamt 11 aus diesem alternativen *splicing* entstehende Isoformen des HFE-Proteins nachgewiesen werden, welche auf der NCBI-Homepage unter der Referenznummer NT007592.14 eingesehen werden können. Während bei einigen dieser Isoformen die zugrunde liegenden Mutationen bekannt sind, welche das alternative *splicing* bedingen (z.B. Isoformen 2 und 5), besteht noch weitgehend Unklarheit bezüglich des *splicing*-Mechanismus der restlichen Isoformen. Darunter befinden sich auch lösliche Varianten des HFE-Proteins, bei denen die Exons 5 und 6 fehlen, welche im Normalfall für die regelhafte Verankerung des Proteins in der Zellmembran zuständig sind. Es existieren aber auch Isoformen, bei denen bestimmte Areale für Glykosylierungsvorgänge fehlen. Diese sind wichtig für den zellulären Transport sowie den *turn-over* dieses Moleküls (Furnham et al., 2004).

Auch über die Bedeutung des in den bisherigen Untersuchungen eher vernachlässigten Exons 7 besteht noch weitgehend Unklarheit. Dieses mit 1944 bp längste Exon des HFE-Genes wird nicht translatiert, da dessen Stopcodon innerhalb des Exons 6 gelegen ist. Damit scheint es zunächst belanglos für das HFE-Protein zu sein. Allerdings konnten zwei Polyadenylierungs-Stellen innerhalb des Exons 7 identifiziert werden, welche möglicherweise ein entsprechendes alternatives *splicing* bewirken können (Sanchez et al., 2001). Auch existieren einige wenige HFE-Genvarianten, die kein Exon 7 aufweisen, wobei deren Bedeutung durch weitere Studien abzuklären ist (Thénié et al., 2000; Feder, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, ungeachtet des Vorliegens modifizierender Umweltfaktoren bzw. Varianten in anderen Genen, die üblicherweise nicht analysierten Genabschnitte des HFE-Genes untersucht, um dadurch möglicher-

weise eine Erklärung für die HH1-typische Klinik bei Patienten ohne entsprechendem Nachweis von einem der drei Genotypen zu erhalten. Außerdem wurde die phänotypische Relevanz der drei wichtigsten, mit HH1-assoziierten Genotypen untersucht und mit Hilfe einer deskriptiven Statistik ausgewertet. Als Marker für das Vorliegen und den Schweregrad der entsprechenden Klinik wurden die Eisenstoffwechselfparameter Eisen, Transferrin, Transferrinsättigung sowie Ferritin definiert.

5.1.3.A Deskriptive Statistische Auswertung der Ergebnisse im HH1-Kollektiv

Nach der Gruppeneinteilung des Kollektives gemäß den Angaben des überweisenden Arztes wurde in einem ersten Schritt die Genotypen-Verteilung innerhalb der so entstandenen vier Gruppen bestimmt. Die Gruppe 1 beinhaltete dabei Patienten, deren HFE-Gen aufgrund pathologischer Eisenstoffwechselfparameter oder aufgrund eines vom einsendenden Arzt geäußerten Verdachtes auf das Vorliegen einer HH1 untersucht worden war. In den restlichen Gruppen wurden Patienten zusammengefasst, bei denen die Untersuchung aufgrund eines familiären Vorkommens der HH1 oder als Ausschlussdiagnose bei einer Lebererkrankung unklarer Genese durchgeführt wurde. Mit Hilfe dieser Gruppeneinteilung konnte dargestellt werden, dass in Gruppe 1 knapp die Hälfte der Patienten einen der drei charakteristischen Genotypen für diese Erkrankung aufwies und damit im Vergleich zu den anderen Gruppen den größten Anteil der Patienten mit entsprechender Veranlagung beinhaltete. Dies wiederum unterstreicht die Assoziation dieser drei Genotypen mit dem Krankheitsbild der HH1. Bei der zweiten Hälfte der Patienten in Gruppe 1 hingegen konnte keinerlei Mutationen im HFE-Gen nachgewiesen werden, was bedeutet, dass die vielen unerklärten Fälle von HH1 nicht auf Sequenzvariationen in den restlichen Abschnitten des HFE-Genes zurückgeführt werden können. Sie sind viel eher als ein Produkt von Umweltfaktoren oder aber von Veränderungen in nicht untersuchten Genen, welche ebenfalls an der Eisenregulierung beteiligt

sind, anzusehen. Demgemäß scheint es in der Tat nicht sinnvoll, beim Einsenden von Blutproben mit dem Verdacht auf eine HH1 neben der Überprüfung auf das Vorliegen der H63D- und C282Y-Mutation weitere Exons dieses Genes zu untersuchen. Die bislang mittels mehrerer Studien in den anderen Abschnitten des HFE-Genes nachgewiesenen Mutationen wiederum dürften nur bei einem verschwindend geringen Anteil der Patienten von Bedeutung sein und wurden in dem untersuchten Kollektiv nicht beobachtet.

Bei der anschließenden gesonderten Beobachtung des Phänotyps von Patienten mit den drei wichtigen Genotypen konnte die enge Korrelation der Eisenstoffwechselfparameter mit dem zugrundeliegenden Genotyp nachgewiesen werden. Dabei wiesen die Probanden mit der homozygoten C282Y-Mutation die höchsten Werte auf, während die Probanden mit den anderen Genotypen einen teilweise nur moderaten Anstieg dieser Parameter zeigten. Bezüglich der anderen HH1-typischen Symptome wurde keine statistische Auswertung vorgenommen, da aufgrund der retrospektiven Datenerhebung kein Anspruch auf Vollständigkeit der Angaben erhoben werden konnte.

Zusätzlich wurde mittels der in dieser Arbeit durchgeführten Stammbaumanalyse eine Assoziation der H63D-Mutation mit der intronischen Sequenzvariation festgestellt (der Polymorphismus wurde auch ohne diese Mutation beobachtet). Des Weiteren konnte hierbei nachgewiesen werden, dass beide Varianten auf dem gleichen Allel vorliegen müssen und dementsprechend gemeinsam weitervererbt werden. Auf weitere Untersuchungen bezüglich der Bedeutung dieser Variation musste aufgrund der fehlenden Relevanz allerdings verzichtet werden.

5.2.1.B Ergebnisse des Mutationsscreenings im MP- und Kontroll-Kollektiv

Im Parkinson- und Kontroll-Kollektiv konnten mittels DHPLC und Sequenzierung vier exonische und eine intronische Sequenzvariation gefunden werden. Dabei sind drei der exonischen Mutationen bereits vorbeschrieben und können auf der NCBI-Homepage (www.ncbi.nlm.nih.gov) unter der SNP-ID rs1799945, rs1800562 und rs4986950 eingesehen werden. Es handelt sich bei ihnen um die Mutationen H63D, C282Y (Feder et al., 1996; Aguilar-Martinez et al., 1997; Beutler et al., 1997a; Ramrakhiani et al., 1998) sowie T217I. Die beiden erstgenannten Mutationen stellen dabei die wichtigsten mit der HH1 assoziierten genetischen Veränderungen dar, während für die ebenfalls erstmals bei HH1-Patienten beschriebene T217I-Mutation noch nicht abschließend geklärt ist, welche Relevanz diese in Bezug auf das Krankheitsbild der HH1 aufweist. Bei der vierten gefundenen Mutation handelt es sich um die K92N-Mutation, welche in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben wird. Die intronische Sequenzvariation schließlich wurde bereits unter 5.1.1.A beschrieben und soll hier daher nicht noch einmal aufgegriffen werden.

In allen anderen Exons konnte keinerlei Sequenzvariation nachgewiesen werden. In Bezug auf einzelne auffällige DHPLC-Elutionsprofile, welche mittels Sequenzierung nicht zugeordnet werden konnten, wird hier auf Kapitel 5.1.1.A verwiesen.

5.2.2.B Mögliche Zusammenhänge der Mutationen im HFE-Gen mit der klinischen Manifestation des MP

Seit der Erkenntnis, dass bei MP-Patienten ein erhöhter oxidativer Stress innerhalb der Basalganglien bei gleichzeitig lokal erhöhter Eisenkonzentration vorliegt (Jellinger et al., 1990, 1992; Riederer et al., 1988), wird genetischen Veränderungen in den an der Regulation des Eisenstoffwechsels beteiligten Genen eine mögliche Relevanz in der Ätiologie dieses multifaktoriell bedingten Syndroms zugesprochen. Dabei wird von einer lokalen Störung im Eisenhaushalt ausgegangen, die zu pathologischen Veränderungen innerhalb der betroffenen Struktur führt. Eine in Analogie zum MP nachweisbare Eisenüberladung im ZNS konnte auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet werden und steht möglicherweise auch hier in kausalem Zusammenhang mit der jeweiligen Pathologie. Bei der Alzheimer Erkrankung (AD) bspw. wurde in den bei dieser Krankheit am stärksten betroffenen Regionen (Hippocampus, Amygdala, Cortex, Basalganglien) ein erhöhter Eisengehalt nachgewiesen (Connor et al., 1992; Deibel et al., 1996; Cornett et al., 1998; Bartzokis et al., 2000). In Anlehnung an die Studien von Moalem et al. (2000), Pulliam et al. (2003) und Robson et al. (2005) konnte in einigen Fällen ein Zusammenhang zwischen Mutationen im HFE-Gen und der AD entdeckt werden. Allerdings bedarf es noch weiterer Studien, um die Bedeutung dieser Befunde vollständig aufzuklären.

Diesen Beobachtungen entsprechend wurden auch in Bezug auf den MP mehrere Studien durchgeführt, um einen kausalen Zusammenhang zwischen Veränderungen in solchen Regulatorgenen und dem MP aufzudecken. Im Folgenden sind beispielhaft einige dieser Arbeiten aufgeführt.

Gemäß den an zwei relativ kleinen Kollektiven (137 und 60 Patienten mit MP) durchgeführten Studien von Dekker et al. (2003) soll das Vorliegen einer Homozygotie für die C282Y-Mutation im HFE-Gen das Risiko für den MP erhöhen. Die Studien von Borie et al. (2001) konnten einen solchen Zusammenhang nicht feststellen. Allerdings wurde eine signifikant höhere Allelfrequenz für einen Polymorphismus im ebenfalls an der Regulierung des Eisenstoffwechsels

beteiligten Transferrin-Gen identifiziert. Für die anderen, in dieser Arbeit untersuchten Moleküle (HFE, Frataxin, Lactoferrin, Transferrinrezeptor) konnte kein entsprechendes Ergebnis erhoben werden. Die Bedeutung von Veränderungen in den Genen IRP2, Ferritin und Coeruloplasmin ist ebenfalls noch nicht abschließend geklärt (Deplazes et al., 2003; Felletschin et al., 2003; Hochstrasser et al., 2005) und bedarf noch weiterer Untersuchungen. In Anlehnung an diese Vorarbeiten scheint das HFE-Gen demnach ein geeignetes Kandidatengen für eine entsprechende genetische Untersuchung an einem relativ großen Kollektiv, wie sie im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen wurde, zu sein.

Bestimmte Veränderungen in diesem Gen sind assoziiert mit dem Krankheitsbild der HH1, bei welchem es durch eine unkontrollierte Eisenresorption im Darm zu einer Eisenüberladung des Organismus mit allen dazugehörigen Folgen kommt. Bei diesen Patienten werden trotz nur selten nachweisbarer intrazerebraler Eisenablagerungen neurologische Symptome in Zusammenhang mit dieser Erkrankung beobachtet. Dabei handelt es sich vorwiegend um unspezifische Symptome wie Müdigkeit oder Verwirrtheit, aber auch psychomotorische Verlangsamung und Polyneuropathien wurden beschrieben (Berg et al., 2000). In diesen Fällen wird die Eisenablagerung vorrangig im Plexus choroideus, in der Epiphyse oder perivaskulär beobachtet (Miyasaki et al., 1977). Daneben existieren aber auch Fallberichte über das Auftreten von Parkinson-Symptomen bei HH1-Patienten mit einer bevorzugten intrazerebralen Eisenablagerung in den Basalganglien (Nielsen et al., 1995; Costello et al., 2004), was sich wiederum mit den Befunden bei MP-Patienten deckt und das HFE-Gen damit zu einem interessanten Kandidatengen für diese Krankheit macht.

Das HFE-Gen scheint in der Tat nicht nur mit dem Krankheitsbild der HH1 assoziiert. Es existieren nämlich auch Untersuchungen, bei welchen die Veränderungen in diesem Gen als additiv wirksame Suszeptibilitätsfaktoren für bestimmte Krankheitsbilder identifiziert werden konnten, zu welchen bspw. auch die Porphyrrien zählen. Diese sind gekennzeichnet durch eine Aktivitätsminderung der hepatischen Uroporphyrinogen-Decarboxylase. Ein Subtyp der

Porphyrien ist dabei die Familiäre Porphyria cutanea tarda (F-PCT), die mit Mutationen des URO-D-Genes assoziiert ist (Garey et al., 1990; McManus et al., 1996; 1999). Anlageträger dieser Mutation entwickeln allerdings keinen auffälligen Phänotyp, wenn nicht ein zusätzlich additiv wirksamer Vulnerabilitätsfaktor vorliegt. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die H63D- und C282Y-Mutationen im HFE-Gen eine additive Wirkung zu dieser Mutation aufweisen und damit eine erhöhte Vulnerabilität für die Entwicklung klinischer Symptome bei diesen Patienten darstellen (Bulaj et al., 2000). Auch beim MP scheint eine solche Beeinflussung des Krankheitsbildes durch entsprechende Veränderungen im HFE-Gen und nachfolgender Störung des Eisenstoffwechsels möglich.

Um einen Zusammenhang zwischen der Eisenüberladung der SN bei MP-Patienten mit Mutationen im HFE-Gen zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit eine multizentrische Fall-Kontroll-Studie unter dieser Fragestellung durchgeführt. Die Auswertung der Daten wurde jeweils zweimal, beim zweiten Durchgang mit selektierten Echogenitätswerten, durchgeführt.

5.2.3.B Statistische Auswertung der Ergebnisse beim MP

Bei der anhand von selektierten und nicht-selektierten Daten durchgeführten statistischen Auswertung der zwei exonischen Mutationen H63D und C282Y und der intronischen Variation IVS2/3889*T>C konnte für keine der Sequenzvariationen ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten- und Kontroll-Kollektiv erhoben werden. Trotzdem kann eine Assoziation des MP und Veränderungen im HFE-Gen nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Beim MP handelt es sich nämlich um ein multifaktoriell bedingtes Syndrom. Geht man dabei von einer ähnlichen Ätiologie wie bei der F-PCT aus, so müssen noch bestimmte zusätzliche Vulnerabilitätsfaktoren vorliegen, welche dann aufgrund ihrer additiven Wirkung die phänotypische Expression dieser Krankheit beeinflussen. Das Patienten-Kollektiv wurde aber allein anhand der klinischen Symptomatik und der erhöhten Echogenitätswerte der

SN ungeachtet des Vorliegens weiterer Faktoren zusammengestellt. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass entgegen der fehlenden Signifikanz bei Betrachtung des gesamten Kollektives durchaus eine Signifikanz bei der Betrachtung eines bestimmten Anteils dieses Kollektives erhalten werden könnte. Da aber bislang keinerlei Hinweise auf mögliche additive Faktoren bestehen, anhand derer eine solche Einteilung erfolgen könnte, ist eine solche Auswertung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Zwei der nachgewiesenen Mutationen konnten nur bei je einem MP-Patienten gefunden werden. Die Bedeutung der bereits vorbeschriebenen T217I-Mutation ist dabei noch nicht abschließend geklärt. Die Mutation liegt innerhalb der α 3-Domäne, ebenso wie die Aminosäure Cystein an Position 282, welche für die Bindung des β 2-Mikroglobulins an das HFE-Protein zuständig ist. Damit liegt die T217I-Mutation allerdings auch in einem Abschnitt des Moleküls, welcher keinerlei Interaktion zum TfR1 aufweist. Es scheint daher fraglich, ob die T217I-Mutation das HFE-Protein in seiner Funktion beeinträchtigen kann. Trotzdem muss davon ausgegangen werden, dass es die Tertiärstruktur des Proteins in einem bestimmten Grade verändert, da hierbei eine polare Aminosäure durch eine hydrophobe Aminosäure ersetzt wird. Aufgrund der engen Nachbarschaft zur Position 282, an welcher auch eine der Hauptmutationen für die HH1 liegt, kann eine Beeinflussung daher auch nicht ausgeschlossen werden.

Die K92N-Mutation, welche im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben wird, liegt innerhalb der α 1-Domäne. Diese bildet zusammen mit der α 2-Domäne eine Plattform, welche essentiell für die Interaktion mit dem Transferrinrezeptor ist (Bennett et al., 2000). Auch die H63D-Mutation liegt innerhalb dieser Domäne und beeinflusst nachweislich die Entstehung einer HH1. In diesem Fall wird beim Austausch von Lysin gegen Asparagin eine Aminosäure mit ungeladener polarer Seitenkette gegen eine Aminosäure mit geladener polarer Seitenkette ausgetauscht. Da bei der Entstehung der Tertiärstruktur von Proteinen auch ionische Wechselwirkungen bedeutend für die korrekte Faltung des Moleküls sind, muss hier ebenfalls von einer Veränderung innerhalb der Interaktionsfläche zum Transferrinrezeptor ausgegangen werden.

Ob und inwiefern letztendlich diesen zwei Mutationen eine Bedeutung beim MP zukommt, kann aufgrund der niedrigen Frequenz dieser Mutationen nicht mit Sicherheit ausgesagt werden. Allerdings könnte diese niedrige Allelfrequenz auch durch die Heterogenität des MP erklärt werden, welche aufgrund der fehlenden eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Ätiologie trotz großer Probandenzahlen und Studien angenommen werden muss.

Bei der Untersuchung der genotypischen Assoziation der gefundenen Mutationen konnte eine Kopplung der H63D-Mutation mit der IVS2/3889*T>C nachgewiesen werden, welche unter 5.1.1.A bereits beschrieben wurde. Für alle anderen Varianten konnte keinerlei signifikante Assoziation konstatiert werden.

Für eine abschließende Beurteilung der Mutationen im HFE-Gen und deren Bedeutung für den MP wäre es sicherlich noch sinnvoll, in weiteren Untersuchungen das oft vernachlässigte Exon 7 auf Veränderungen in einem MP-Kollektiv zu analysieren. Da die Translation an einem Stopcodon innerhalb von Exon 6 endet, wird eher von einer geringen Bedeutung dieses Exons ausgegangen und dieses dementsprechend eher vernachlässigt. Sanchez et al. (2001) konnten aber bei der Untersuchung des Exons 7 bei HH1-Patienten einen Polymorphismus innerhalb dieses Exons nachweisen, wobei allerdings noch nicht ausreichend geklärt ist, ob diesem Genabschnitt und dem gefundenen Polymorphismus eine Funktion zuzuschreiben ist. Darüber hinaus könnte man Untersuchungen bezüglich des Vorliegens der 11 Isoformen des HFE-Proteins, v.a. innerhalb des Gehirns, durchführen. Da diese *splicing*-Varianten aufgrund von Veränderung innerhalb des Genabschnitts bedingt werden und diese durchaus auch in Exon-fernen Bereichen innerhalb des Introns liegen können, müsste man sich Gedanken über den Nutzen des Screenings intronischer Abschnitte bei fehlendem Mutationsnachweis innerhalb der Exons machen.

Beim Vergleich der Echogenitätswerte in der SN zwischen MP-Patienten und Kontrollen konnte ein signifikant erhöhtes Ergebnis im Patientenkollektiv erhoben werden. Die Bedeutung der mittels TCS ermittelten Echogenitätswerte in der SN bei MP-Patienten konnte demnach bestätigt werden. Damit scheint

die TCS ein hinreichend sicheres Verfahren zur Feststellung der Veränderungen in der SN bei Parkinson-Patienten zu sein. Darüber hinaus stellt dieses ein nicht-invasives, im Vergleich zur Kernspintomografie kostengünstiges und einfaches Verfahren dar, bei Probanden mit positiver Familienanamnese Screening-Untersuchungen durchzuführen (Becker et al., 1995; Berg et al., 2001b; Valente et al., 2002; van Duijn et al., 2001).

6 Zusammenfassung

A HFE-assoziierte Hereditäre Hämochromatose

Bei der HH1 handelt es sich um ein monogen vererbtes Krankheitssyndrom, bei welchem es aufgrund von Sequenzvariationen im HFE-Gen zu einer exzessiven Eisenspeicherung mit folgender Schädigung diverser Organsysteme kommt. Die wichtigsten, mit dieser Erkrankung assoziierten Genotypen sind dabei die homozygote C282Y-Mutation in Exon 4, die homozygote H63D-Mutation in Exon 2 und die Compound-Heterozygotie für diese zwei Mutationen. Bei einem Verdacht auf das Vorliegen einer HH1 wird üblicherweise auf das Vorhandensein dieser Genotypen hin untersucht. Allerdings kann hierbei nur für einen Teil der Symptomträger das Vorliegen einer entsprechenden Mutation nachgewiesen werden, während bei einem beträchtlichen Teil der Patienten mit der gleichen Symptomatik keine dieser für die HH1 typischen Mutationen feststellbar ist. Hier wird der zugrundeliegende Defekt entweder in den normalerweise nicht untersuchten Genabschnitten des HFE-Genes oder innerhalb anderer Gene, welche an der Regulation des Eisenhaushalts beteiligt sind, vermutet.

Auch bei der routinemäßig durchgeführten molekulargenetischen Analyse des hier untersuchten Kollektives konnte nur für einen Teil der insgesamt 116 Patienten ein entsprechender Genotyp festgestellt werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit alle 6 Exons des HFE-Genes innerhalb dieses Kollektives mittels DHPLC und Sequenzierung untersucht. Hierbei konnte das Vorliegen der zwei Hauptmutationen der HH1 als exonische *missense*-Mutationen und eine intronische Sequenzvariation nachgewiesen werden, über deren Bedeutung noch keinerlei Klarheit besteht. Mit Hilfe einer Stammbaumanalyse konnte außerdem eine Kopplung der H63D-Mutation mit dieser intronischen Sequenzvariation festgestellt werden.

Neben der genetischen Untersuchung wurde retrospektiv für jeden Patienten die vorliegende Klinik anhand eines Patientenbogens erhoben. So konnten Vergleiche zwischen dem vorliegenden Genotyp und Phänotyp durchgeführt werden. Hierzu wurden die Patienten, bei denen die drei wichtigsten Genotypen

nachgewiesen worden waren, in drei Gruppen eingeteilt und deren Werte für die Eisenstoffwechselfparameter, welche als Marker für das Vorliegen und die Schwere der Eisenüberladung dienen, untereinander verglichen. Dabei wurden die höchsten Werte für die homozygote C282Y-Mutation festgestellt, wie bereits in Anlehnung an andere Studien zu vermuten war. Eine Korrelation zwischen dem zugrundeliegenden Genotyp und der Schwere der Eisenüberladung konnte somit nochmals an dem hier gewählten Kollektiv bestätigt werden.

Bezüglich der genetischen Untersuchung lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei Verdacht auf eine HH1 die Untersuchung auf die zwei Hauptmutationen hin ausreichend erscheint, da im HFE-Gen das Vorliegen anderer Mutationen nur bei einem verschwindend geringen Anteil der Patienten angenommen werden kann. Es scheint eher sinnvoll, bei negativen Ergebnissen im HFE-Gen trotz entsprechender Klinik andere Gene auf Veränderungen hin zu analysieren, welche ebenfalls an der Regulation des Eisenstoffwechsels beteiligt sind. In Bezug auf die klinischen Daten und die Korrelation zwischen Phänotyp und Genotyp konnten vorangegangene Studien bestätigt werden.

B Idiopathischer Morbus Parkinson

Bei der Entstehung des Morbus Parkinson (MP) wird von einer multifaktoriell bedingten Pathogenese ausgegangen, wobei noch nicht abschließend geklärt ist, ob es sich dabei um eine Wechselwirkung zwischen verschiedenen genetischen Vulnerabilitätsfaktoren oder aber um einen additiven Effekt von genetischer Veranlagung und Umweltfaktoren handelt. Seit der Erkenntnis, dass bei MP-Patienten erhöhte Eisenwerte in der SN vorliegen sowie vermehrt oxidativer Stress in diesem Gewebe nachweisbar ist, wird auch den Proteinen, welche den Eisenhaushalt regulieren, eine mögliche Bedeutung in der Pathogenese der MP-Erkrankung zugesprochen. Dabei scheint das HFE-Gen ein geeignetes Kandidatengen bei der Suche nach der Ätiologie dieses Krankheitsbildes zu sein.

Um einen möglichen Effekt von Mutationen im HFE-Gen bei der Entstehung des MP nachweisen zu können, wurden daher im Rahmen dieser Arbeit die 6 Exons des HFE-Genes bei einem Patienten- und einem Kontroll-Kollektiv mittels DHPLC und Sequenzierung untersucht. Außerdem wurde bei jedem Probanden der beiden Kollektive mittels transkranieller Sonographie (TCS) die Echogenität der Substantia nigra (SN) für den MP bestimmt. Die TCS ist ein nicht-invasives Verfahren zur Visualisierung der Veränderungen in der SN bei MP-Patienten, welche auf eine Eisenüberladung in dieser Struktur zurückzuführen sind. Die statistische Endauswertung wurde zweimal durchgeführt, beim zweiten Durchgang mit Kollektiven, die anhand der ermittelten Echogenitätswerte selektiert wurden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Echogenitätswert und dem Vorkommen von Veränderungen im HFE-Gen besser erkennen zu können.

Bei der genetischen Untersuchung konnten 4 exonische *missense*-Mutationen und eine intronische Sequenzvariation nachgewiesen werden.

Die gefundenen H63D-Mutation und die C282Y-Mutation stellen dabei die zwei wichtigsten mit der HH1 assoziierten Mutationen dar, wobei erstere die Interaktion des HFE-Proteins mit dem Transferrinrezeptor beeinflusst, während letztere die für die Oberflächenexpression obligate Bindung von β 2-Mikro-

globulin behindert. Diese Mutationen konnten in beiden Kollektiven in hoher Zahl nachgewiesen werden, ebenso wie die intronische Sequenzvariation IVS2/3889*T>C.

Die statistische Auswertung dieser Mutationen durch den Vergleich der beiden Kollektive einmal ohne selektierte Daten und beim zweiten Durchgang in Abhängigkeit der durch die Methode der TCS gemessenen Echogenitätswerte ergaben allerdings für diese zwei exonischen Mutationen und die intronische Sequenzvariation keine signifikante Assoziation mit dem MP. Bei der Untersuchung der Assoziation mutierter Allele zweier oder mehrerer Loci konnte anhand von statistischen Testverfahren festgestellt werden, dass die H63D-Mutation immer gemeinsam mit dem intronischen Polymorphismus vorliegt, wobei dieser Assoziation keine bedeutende Rolle zugeschrieben werden kann, da sie in beiden Kollektiven beobachtet wurde.

Obwohl diese Ergebnisse demnach gegen einen Einfluss von Veränderungen im HFE-Gen in Bezug auf den MP sprechen, kann dies ohne weitere Untersuchungen hinsichtlich additiv wirksamer Faktoren nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Das Wissen um solche Faktoren würde eine entsprechende Zusammenstellung der zu untersuchenden Kollektive erlauben, was durch eine unterschiedliche Gewichtung bestimmte Zusammenhänge möglicherweise besser zum Ausdruck bringen würde. Da bislang allerdings keine entsprechenden Faktoren identifiziert werden konnten, wurden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kollektive ohne vorhergegangene Selektion zusammengestellt und könnten unter Umständen so zu einer Verschleiern bestimmter Zusammenhänge geführt haben.

Die zwei anderen exonischen *missense*-Mutationen wurden nur bei je einem MP-Patienten beobachtet und konnten im Kontroll-Kollektiv nicht nachgewiesen werden. Bei der T217I-Mutation ist aufgrund der Lage der Mutation keine Störung der Interaktion zwischen dem HFE-Protein und dem Transferrinrezeptor zu erwarten. Allerdings muss beim Austausch einer polaren Aminosäure durch eine hydrophobe Aminosäure von einer, wenn auch möglicherweise unbedeutenden Änderung der Tertiärstruktur des HFE-Proteins ausgegangen werden.

Bei der K92N-Mutation wiederum kann eine Beeinflussung der Interaktion zwischen dem Transferrinrezeptor und dem HFE-Protein vermutet werden. Bei dieser in der α 1-Domäne gelegenen Mutation wird eine Aminosäure mit ungeladener polarer Seitenkette gegen eine Aminosäure mit geladener polarer Seitenkette ausgetauscht, wobei eine Änderung in der Tertiärstruktur erwartet werden kann, welche möglicherweise zu Störungen bei der regelhaften Interaktion dieses Moleküls zum Transferrinrezeptor führen kann.

Insgesamt ist durch die hier erhobenen Daten kein sicherer Zusammenhang zwischen Mutationen im HFE-Gen und dem idiopathischen MP zu erheben.

Aufgrund der niedrigen Gesamtzahl der beiden letztgenannten Mutationen kann allerdings keine Aussage bezüglich der Assoziation des MP mit diesen Sequenzvariationen getroffen werden.

7 Literatur

Abou-Sleiman, PM, Healy, DG, Quinn, N, Lees, AJ, Wood, NW (2003). The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**, 283-6.

Abboud, S., Haile, D.J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol. Chem.* **275**, 19906-19912.

Aguilar-Martinez, P., Biron, C., Blanc, F. et al. (1997). Compound heterozygotes for hemochromatosis gene mutations : may they help to understand the pathophysiology fo the disease? *Blood Cells Mol Dis* **23**, 269-276.

Aguilar-Martinez, P., Bismuth, M., Picot, M.C., Thelcide, C., Pageaux, G.P., Blanc, F., Blanc, P., Schved, J.F., Larrey, D. (2001). Variable phenotypic presentation of iron overload in H63D homozygotes: are genetic modifiers the cause. *Gut* **48**, 836-842.

Aime, S., Bergamasco, B., Casu, M. et al. (2000). Isolation and C13-NMR characterization of an insoluble proteinaceous fraction from substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **15**, 977-981.

Atasoy, H.T., Nuyan, O., Tunc, T., Yorubulut, M., Unal, A.E., Inan, L.E. (2004). T2-weighted MRI in Parkinson's disease; substantia nigra pars compacta hypointensivity correlates with clinical scores. *Neurol. India* **52**, 332-337.

Aziz, N., Munro, H.N. (1987). Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5'untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8478-8482.

Bahram, S., Gilfillan, S. Kühn, L.C. et al. (1999). Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13312-13317.

Bartzokis, G., Cummings, J.L., Markham, C.H. et al (1999). MRI evaluation of brain iron in earlier- and later-onset Parkison's disease and normal subjects. *Magn. Reson. Imaging* **17**, 213-222.

Bartzokis, G., Sultzer, D., Cummings, J., Holt, L.E., Hance, D.B., Henderson, V.W., Mintz, J. (2000). In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer disease using magnetic resonance imaging. *Arch. Gen. Psychiatry* **57(1)**, 47-53

- Becker, G., Seufert, J., Bogdahn, U., Reichmann, H., Reiners, K.** (1995). Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology* **45**, 182-184.
- Bennett, M.J., Lebron, J.A., Bjorkman, P.J.** (2000). Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* **403**, 46-53.
- Ben-Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B.H.** (1991). Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **57**, 1609-1614.
- Berg, D., Grote, C., Rausch, W.D., Maurer, M., Wesemann, W., Riederer P., Becker, G.** (1999). Iron accumulation in the substantia nigra in rats visualized by ultrasound. *Ultrasound Med.Biol.* **25**, 901-904.
- Berg, D., Gerlach, M. Youdim, M.B.H., Double, K.L., Zecca, L., Riederer, P., Becker, G.** (2001a). Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **79**, 225-236.
- Berg, D., Siefker, C., Becker, G.** (2001b). Echogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease and its relation to clinical findings. *J. Neurol.* **248**, 684-689.
- Berg, D., Roggendorf, W., Schroder, U., Klein, R., Tatschner, T., Benz, P., Tucha, O., Preier, M., Lange, K.W., Reiners, K., Gerlach, M. und Becker, G.** (2002). Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch.Neurol.* **59**, 999-1005.
- Beutler, E.** (1997a). Genetic irony beyond hemochromatosis: clinical effects of HLA-H mutations. *Lancet* **349**, 296-297.
- Beutler, E., West, C.** (1997b). New diallelic markers in the HLA region of Chromosome 6. *Blood Cells Mol. Dis.* **23**, 219-229.
- Beutler, E.** (1997c). The significance of the 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. *Am J Hum Genet* **61**, 762-764.
- Bonifati, V., Dekker, M.C., Vanacore, N. et al.** (2002). Autosomal recessive early onset parkinsonism is linked to three loci: PARK2, PARK6, and PARK7. *Neurol Sci* **23** Suppl 2, S59 - 60.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. et al.** (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* **299**, 256 – 259.

- Borie, C., Gasparini, F., Verpillat, P., Bonnet, A.M., Agid, Y., Hetet, G., Brice, A., Dürr, A., Grandchamp, B.** (2002). Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease. *J. Neurol.* **249**, 801-804.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Braak, E.** (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **24**, 197-210.
- Braak, H., Rüb, U., Jansen Steur, E.N.H., Del Tredici, K., de Vos, R.A.I.** (2005). Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology* **64**, 1404-1410.
- Bridle, K.R., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Dixon, J.L., Purdie, D.M., Crawford, D.H.G., Subramaniam, V.N., Powell, L.W., Anderson, G.J., Ramm, G.A.** (2003). Disrupted hepcidin upregulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* **361**, 669-673.
- Brittenham, G.M.** (1994). The red cell cycle. In *Iron Metabolism in Health and Disease*. J.H.Brock et al., eds. (London : W.B. Saunders Company Ltd.), 31-62.
- Bulaj, Z.J., Philips, J.D., Ajioka, R.S., Franklin, M.R., Griffen, L.M., Guinee, D.J., Edwards, C.Q., Kushner, J.P.** (2000). Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* **95** (5), 1565-1571.
- Burdo, J.R., Menzies, S.L., Simpson, I.A. et al.** (2001). Distribution of divalent metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J. Neurosci. Res.* **66**, 1198-1207.
- Buys, S.S., Martin, C.B., Eldridge, M., Kushner, J.P., Kaplan, J.** (1991). Iron absorption in hypotransferrinemic mice. *Blood* **78**, 3288-3290.
- Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totano, A., Gasparini, P.** (2000). The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat. Genet.* **25**, 14-15.
- Casey, J.L., Koeller, D.M., Ramin, V.C., Klausner, R.D., Harford, J.B.** (1989). Iron regulation of transferrin receptor m-RNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO J.* **8**, 3693-3699.

- Castellani, R., Siedlak, S., Perry, G. et al.** (2000). Sequestration of iron by Lewy bodies in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **100**, 111-114.
- Ceballos-Baumann, A.O.** (1999). Idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS). *Klinische Neurologie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 863-865.
- Chemnitz, G., Winkler, A., Schmidt, F.W.** (2000). Hereditäre Hämochromatose. *Leberkrankungen: Pathophysiologie-Diagnostik-Therapie*. Ein Zwischenbericht für Klinik und Praxis. Hrsg. Schmidt, Schmidt, Manns. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart mbH, 787-802.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C., Walz, T.** (2004). Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* **116**, 565-576.
- Cole, E.S., Glass, J.** (1983). Transferrin binding and iron uptake in mouse hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta* **762**, 102-110.
- Connor, H. Menzies, S., Martin, S.St. et al.** (1990). The cellular distribution of Transferrin, ferritin, and iron in the human brain. *J. Neurosci. Res.* **27**, 595-611.
- Connor, J.R., Snyder, B.S., Beard, J.L., Fine, R.E., Mufson, E.J.** (1992). Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging an Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **31(2)**, 327-335.
- Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M. et al.** (2001). Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine alpha-synuclein adduct. *Science* **294**, 1346-1349.
- Cookson, M.R.** (2003). Pathways to Parkinsonism. *Neuron* **37**, 7 – 10.
- Cornett, C.R., Markesbery, W.R., Ehmann, W.D.** (1998). Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicology* **19(3)**, 339-345.
- Costello, D.J., Walsh, S.L., Harrington, H.J., Walsh, C.H.** (2004). Concurrent hereditary haemochromatosis and idiopathic Parkinson's disease: a case report series. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**, 631-633.
- Crichton, R.R.** (1990). Proteins of iron storage and transport. *Adv. Protein Chem.* **40**, 281.
- Datz, C., Haas, T., Rinner, H. et al.** (1998). Heterozygosity for the C282Y mutation in the hemochromatosis gene is associated with increased serum iron, transferrin saturation, and hemoglobin in young women: a protective role against iron deficiency. *Clin. Chem.* **44**, 2429-2432.

- Dausset, J., Cann, H., Cohen, D., Lathrop, M., Lalouel, J.M., White, R.** (1990). Centre d'etude du polymorphisme humain (CEPH): collaborative genetic mapping of the human genome. *Genomics* **6**, 575-577.
- Deaglio, S., Capobianco, A., Cali, A., Bellora, F., Alberti, F., Righi, L., Sapino, C., Camaschella, C., Malavasi, F.** (2002). Structural, functional and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood* **100**, 3782-3789.
- Dekker, M.C.J., Giesbergen, P.C., Njajou, O.T., Swieten, J.C. van, Hofman, A., Breteler, M.M.B., Duijn, C.M. van** (2003). Mutations in the hemochromatosis gene (HFE), Parkinson's disease and parkinsonism. *Neuroscience Letters* **348**, 117-119.
- Deibel, M.A., Ehmann, W.D., Markesbery, W.R.** (1996). Copper, iron and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible reaction to oxidative stress. *J. Neurol. Sci.* **143(1-2)**, 137-142.
- Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Bohl, J.R.E., Braak, H.** (2002). Where does Parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 413-426.
- Del Tredici, K., Braak, H.** (2004). Idiopathic Parkinson's disease: staging α -synucleinopathy with a predictable pathoanatomy. In: Kahle, P., Haass, C., eds. *Molecular mechanisms in Parkinson's disease*. Georgetown, TX: Landes Bioscience, 1-32.
- Deplazes, J., Schöbel, K., Hochstrasser, H., Bauer, P., Walter, U., Behnke, S., Spiegel, J., Becker, G., Riess, O., Berg, D.** (2004). Screening for mutations of the IRP2 gene in Parkinson's disease patients with hyperechogenicity of the substantia nigra. *J Neural Transm* **111**, 515-521.
- De Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alperovitch, A., Rocca, W.A.** (1997). Prevalence of parkinsonism an Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **62**, 10-15.
- De Silva, D., Askwith, C., Kaplan, J.** (1996). *Physiol Rev* **76**, 31 – 47.
- Deuschl, G. Krack, P.** (1999). Morbus Parkinson. *Neurologie in Praxis und Klinik*. Georg Thieme Verlag **3**. Auflage, Band II, 49-69.

- Dexter, D.T., Wells, F.R. et al.** (1987). Increased nigral iron content in post-mortem parkinsonian brain. *Lancet* **341**, 1219-1220.
- Dexter, D.T., Wells, F.R., Lees, A.J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., Marsden, C.D.** (1989). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **52**, 1830-1836.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T.C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C., Zon, L.I.** (2000). Positional cloning of zebrafish *ferroportin1* identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**, 776-781.
- Double, K.L., Riederer, P., Gerlach, M.** (1999). The significance of Neuromelanin in Parkinson's disease. *Drug News Dev.* **12**, 333-340.
- Double, K.L., Zecca, L. et al.** (2000). Structural characteristics of human substantia nigra neuromelanin and synthetic dopamine melanins. *J. Neurochem.* **75**, 2583-2589.
- Double, K.L., Gerlach, M., Schünemann, V. et al.** (2003). Iron-binding Characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 489-494.
- Drakesmith, H., Sweetland, E., Schimanski, L. et al.** (2002). The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15602-15607.
- Drews, J., Düllmann, J., Hausmann, K., Kruse, R.** (1980). Die Serumferritinbestimmung in Diagnostik und Therapie der Eisenüberladung. In: Kaltwasser J.P., Werner, E. (Eds): Serumferritin. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 194-210.
- Earle, K.M.** (1968). Studies in Parkinson's disease including X-ray fluorescent spectroscopy of formalin-fixed tissues. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **27**, 1-14.
- Ehringer, H., Hornykiewicz, O.** (1960). Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Wiener Klin Wochenschrift* **38**, 1236-1239.

- Fahn, S., Marsden, C.D., Calne, D.B., Goldstein, M.** (1987). Unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS). In *Recent developments in Parkinson's disease*. 153-63-293-304. Macmillan Health Care Information, Florham Park, NJ.
- Fairbanks, V.F., Brandhagen, D.J., Thibodeau, S.N. et al.** (1998). H63D is an haemochromatosis associated allele. *Gut* **43**, 441-442.
- Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr., Ellis, M.C., Fullan, A. et al.** (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat. Genet.* **13**, 399-408.
- Feder, J.N. et al.** (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β 2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* **272**, 14025-14028.
- Feder, J.N. et al.** (1998). The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 1472-1477.
- Feder, J.N.** (1999). The hereditary hemochromatosis gene (HFE). A MHC class-I gene that functions in the regulation of iron homeostasis. *Immunol. Res.* **20**, 175-185.
- Felleitschin, B., Bauer, P., Walter, U., Behnke, S., Spiegel, J., Csoti, I., Sommer, U., Zeiler, B., Becker, G., Riess, O., Berg, D.** (2003). Screening for mutations of the ferritin light and heavy genes in Parkinson's disease patients with hyperechogenicity of the substantia nigra. *Neuroscience Letters* **352**, 53-56.
- Fixman, M., Freire, J.J.** (1977). Theory of DNA melting curves. *Biopolymers* **16**, 2693-2704.
- Fleming, M.D., Trenor III, C.C., Su, M.A., Foernzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F., Andrews, N.C.** (1997). Microcytic anemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* **16**, 383-386.
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., Andrews, N.C.** (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role of Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1148-1153.
- Fleming, R.E., Sly, W.S.** (2002). Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol.* **64**, 663-680.
- Foltynie, T., Sawcer, S., Brayne, C., Barker, R.A.** (2002). The genetic basis of Parkinson's disease. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* **73**, 363-370.

- Forloni, G., Bertani, I., Calella, A.M. et al.** (2001). α -Synuklein and Parkinson's disease: selective neurodegenerative effect of α -Synuklein Fragment on dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *Ann. Neurol.* **47**, 632-640.
- Foroud, T., Uniacke, S.K., Liu, L. et al.** (2003). Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology* **60**, 796 – 801.
- Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Becker, E.M., Vulpe, C.D., McKie, A.T., Trinder, D., Anderson, G.J.** (2002). Hcpidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* **123**, 835-844.
- Frazer, D.M., Anderson, G.J.** (2003). The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells Mol. Dis.* **30**, 288-297.
- Furnham, N., Ruffle, S., Southan, C.** (2004). Splice Variants: A Homology Modeling Approach. *Proteins* **54**, 596-608.
- Garey, J.R., Harrison, L.M., Franklin, K.F., Metcalf, K.M., Radisky, E.S., Kushner, J.P.** (1990). Uroporphyrinogen decarboxylase: a splice site mutation causes the deletion of exon 6 in multiple families with porphyria cutanea tarda. *J Clin Invest.* **86**, 1416-1422.
- Gasser, T.** (2005). Genetics of parkinsonism. In: *Neurodegenerative Diseases- Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics*. Flint Beal, M., Lang, A.E., Ludolph, A.C., 587-597.
- Gasser, T.** (2003). Overview of the genetics of parkinsonism. *Adv Neurol* **91**, 143 – 152.
- Götz, M.E., König, G., Riederer, P. et al.** (1994). Oxidative stress: free radical Production in neural degeneration. *Pharmacol. Ther.* **63**, 37-122.
- Götz, M.E., Double, K., Gerlach, M., Youdim, M.B.H., Riederer, P.** (2004). The Relevance of Iron in the Pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1012**, 193-208.
- Griffiths, P.D., Dobson, P.R., Jones, G.R., Clarke, D.T.** (1999). Iron in the basal ganlia in Parkinson's disease. An in vitro study using X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain* **122 (Pt 4)** 667-673.

- Gross, E., Arnold, N., Pfeifer, K., Bandick, K., Kiechle, M.** (2000). Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Hum.Mutat.* **16**, 345-353.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, J.L., Gollan, J.L., Hediger, M.A.** (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482-488.
- Guo, S.W., Thompson, E.A.** (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Haile, D.J., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Harford, J.B., Klausner, R.D.** (1989). Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron responsive RNA-elements. *Mol. Cell Biol.* **9**, 5055-5061.
- Haldane, J.B.S.** (1954). An exact test for randomness of mating. *J Genet* **52**, 631-635.
- Halliday, J.W., Powell, L.W.** (1988). Ferritin and cellular iron metabolism. *Ann. New York Acad. Sci.* **528**, 101-102.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.** (1986). Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends Biol. Sci.* **11**, 1372-1375.
- Harms, V.** (1998). *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*. Harms-Verlag, 7. Auflage
- Harris, Z.L., Durley, A.P., Man, T.K., Gitlin, J.D.** (1999). Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10812-10817.
- Harrison, P.M.** (1977). Ferritin: an iron-storage molecule. *Semin. Hematol.* **14**, 55-70.
- Hashimoto, M., Hsu, L.J., Xia, Y. et al.** (1999). Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/ α -Synuclein in vitro. *Neuroreport* **10**, 717-721.
- Hashimoto, M., Hsu, L.J., Rockenstein, E. et al.** (2002). α -Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem* **277**, 11465 – 11472.
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Masliah, E.** (2003). Transgenic models of α -Synuclein pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **991**, 171-188.

- Hedrich K., Kann M., Lanthaler A.J. et al.** (2001). The importance of gene dosage studies: Mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism. *Hum Mol Genet* **16**, 1649 – 1656.
- Hedrich, K., Marder, K., Harris, J. et al.** (2002). Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for parkin mutations. *Neurology* **58**, 1239 – 1246.
- Heilmann, E.** (1981). Die klinische Bedeutung von Transferrin. *Lab. Med.* **5**, 79-82.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Andrews, N.C.** (2004). Balancing Acts : Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* **117**, 285-297.
- Hilker, R., Klein, C., Ghaemi, M. et al.** (2001). Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. *Ann Neurol* **49**, 367 – 376.
- Hilker, R., Klein, C., Hedrich, K. et al.** (2002). The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the parkin gene: evidence for enzymatic parkin function in humans. *Neurosci Lett* **323**, 50 – 54.
- Hirsch, E.C., Graybiel, A.M., Agid, Y.A.** (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* **334**, 345-348.
- Hochstrasser, H., Bauer, P., Walter, U., Behnke, S., Spiegel, J., Csoti, I., Zeiler, B., Bornemann, A., Pahnke, J., Becker, G., Riess, O., Berg, D.** (2004). Ceruloplasmin gene variations and substantia nigra hyperechogenicity in Parkinson disease. *Neurology* **63(10)**, 1912-1917.
- Hoehn, M.M., Yahr, M.D.** (1967). Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* **17**, 427-442
- Hoenicke, J., Vidal, L., Morales, B. et al.** (2002). Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain. *Arch Neurol* **59**, 966 – 970.
- Hsu, L.J., Sagarra, Y., Arroyo, A. et al.** (2001). α -Synuklein promotes Mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am. J. Pathol.* **157**, 401-410.
- Huebers, H., Csiba, E., Huebers, E. Finch, C.A.** (1985) Molecular advantage of diferric transferrin in delivering iron to reticulocytes: a comparative study. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **179**, 222-226.

- Hutchinson, M., Raff, U.** (2000). Structural changes of the substantia nigra in Parkinson's disease as revealed by MR imaging. *Am. J. Neuroradiol.* **21**, 697-701.
- Hyun, D.H., Lee, M., Hattori, N. et al.** (2002). Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defences, and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **277**, 2852-57.
- Illarioshkin, S.N., Periquet, M., Rawal, N. et al.** (2003). Mutation analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Mov Disord* **18**, 914 – 919.
- Jellinger, K. Paulus, W. Grundke-Iqbal, I. et al.** (1990). Brain iron and ferritin Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Parkinson's Dis. Dementia Sect.* **2**, 327-340.
- Jellinger, K., Kienzl, E., Rumpelmair, G. et al.** (1992). Iron-melanin complex In substantia nigra of parkinsonian brains: an X-ray microanalysis. *J. Neurochem.* **59**, 1168-1171.
- Jellinger, K., Kienzl, E., Rumpelmaier, G. et al.** (1993). Iron and ferritin in substantia nigra in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, Raven Press New York **60**, 267-272.
- Kann, M., Vieregge, P., Jacobs, H. et al.** (2002). The role of parkin mutations in 111 community-derived patients with early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* **51**, 621 – 625.
- Kawabata, H., Yang, R., Hirma, T., Vuong, P.T., Kawano, S., Gombart, A.F., Koeffler, H.P.** (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* **274**, 28826-20832.
- Kim, K.S., Chot, S.Y., Kwon, H.Y. et al.** (2002). Aggregation of α -synuklein induced by the Cu, Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Free Radical Biol. Med.* **32**, 544-550.
- Klein, C.** (2001). [The genetics of Parkinson syndrome]. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* **90**, 1015-1023.
- Klein, C., Hedrich, K., Wellenbrock, C. et al.** (2003). Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**, 415 -416.
- Koeller, D.M., Casey, J.L., Hentz, M.W., Gerhardt, E.M., Chan, L.N.L.C., Klausner, R.D., Harford, J.B.** (1989). A cytosolic protein binds to Structural elements within the iron regulatory region of the transferrin Receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3574-3578.

- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I.** (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* **249**, 979-980.
- Lansbury, P.T. Jr, Brice, A.** (2002). Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 299 - 306.
- Le, W.D., Xu, P., Jankovic, J. et al.** (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson Disease. *Nat. Genet.* **33**, 85-89.
- Lebron, J.A., Bennett, M.J., Vaughn, D.E. et al.** (1998). Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* **93**, 111-123.
- Lebron, J.A., Bjorkman, P.J.** (1999a). The transferrin receptor binding site on HFE, the Class I MHC-related protein mutated in hereditary Hemochromatosis. *J. Mol. Biol.* **289**, 1109-1118.
- Lebron, J.A., West, A.P., Bjorkman, P.J.** (1999b). The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J. Mol. Biol.* **294**, 239-245.
- Leibold, E.A., Laudana, A. Yu, Y.** (1990). Structural requirements of iron-responsive elements for binding of the protein involved in both transferrin receptor and ferritin mRNA post-transcriptional regulation. *Nucl. Acids Res.* **18**, 1819-1824.
- Lhermitte, J., Kraus, W.M., McAlpine, D.** (1924). On the occurrence of abnormal deposits of iron in the brain in parkinsonism with special reference to its localisation. *J. Neurol. Psychopathol.* **5**, 195-208.
- Lo Bianco, C., Ridet, J.L., Schneider, B.L. et al.** (2002). α -Synukleinopathy and selective dopaminergic loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10813-10818.
- Löffler, G., Petrides, P.E.** (1998). Oxidativer Stress. *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer Verlag Berlin Heidelberg, **6.** Auflage, 512-515.
- Lohmann, E., Periquet, M., Bonifati, V. et al.** (2003). How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* **54**, 176 – 185.
- Lopiano, L., Chiesa, M., Digilio, D. et al.** (2000). Q-band EPR investigations of Neuromelanin in control and Parkinson's disease patients. *Biochim. Biophys. Acta* **1500**, 306-312.

- Lücking, C.B., Dürr, A., Bonifati, V. et al.** (2000). Association between early-onset Parkinson's Disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* **342**, 1560 – 1567.
- Marder, K.S., Tang, M.X., Mejia, H. et al.** (1996). Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: a community based study. *Neurology* **47**, 155 – 160.
- Mattis, Steven** (2001). *Dementia Rating Scale (DRS)*. 2 Edn. Psychological Assessment Resources, Inc, USA.
- Marx, F.P., Holzmann, C., Strauss, K.M. et al.** (2003). Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **12**, 1223 – 1231.
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W., Simpson, R.J.** (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell.* **5**, 299-309.
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hediger, M.A., Farzaneh, F., Simpson, R.J.** (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **292**, 1755-1759.
- McManus, J.F., Begley, C.G., Sassa, S., Ratnaike, S.** (1996). Five new mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene identified in families with cutaneous porphyria. *Blood* **88**, 3589-3600.
- McManus, J.F., Begley, C.G., Sassa, S., Ratnaike, S.** (1999). The new mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene in familial porphyria cutanea tarda. *Hum Mutat.* **13**, 412.
- Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, J.J., Shearman, J.D., Robson, K.J.H.** (1997). Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* **34**, 275-278.
- Miyasaki, K., Murao, S., Koizumi, N.** (1977). Hemochromatosis associated with brain lesions – a disorder of trace-metal binding proteins and / or polymers. *J Neuropathol Exp Neurol* **36**, 964-976.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. und Polesky, H.F.** (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215.

- Mondino, F., Filippi, P., Magliola, U., Duca, S.** (2002). Magnetic resonance relaxometry in Parkinson's disease. *Neurol. Sci.* **23**, 87-88.
- Montosi, G., Paglia, P., Garuti, C. et al.** (2000). Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis. *Blood* **96**, 1125-1129.
- Montosi, G., Donovan, A., Totaro, A., Garuti, C., Pignatti, E., Cassanelli, S., Trenor, C.C., Gasparini, P., Andrews, N.C., Pietrangelo, A.** (2001). Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in The ferroportin (SLC11A3) gene. *J. Clin. Invest.* **108**, 619-623.
- Moos, T. Trinder, D., Morgan, E.H.** (2000). Cellular distribution of ferric iron, Ferritin, transferrin, and divalent metal transporter 1 (DMT1) in substantia nigra and basal ganglia of normal and beta2-microglobulin deficient mouse brain. *Cell. Mol. Biol.* **46**, 549-561.
- Moos, T.** (2002). Brain iron homeostasis. *Dan. Med. Bull.* **49**, 279-301.
- Moos, T. Morgan, E.H.** (2003). How does mutation of divalent metal transporter (DMT1) explain the impaired transport of iron into the Belgrade rat brain? *J. Neurochem.* **88**, 233-245.
- Moos, T., Morgan, E.H.** (2004). Neuronal iron metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 14-26.
- Morgan, E.H., Baker, E.** (1986). Iron uptake and metabolism by hepatocytes. *Fed. Proc.* **45**, 2810-2816.
- Motulsky, A.** (1979). Genetics of hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.* **301**, 1291-1292.
- Mouradian, M.M.** (2002). Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* **58**, 179 – 185.
- Muckenthaler, M., Roy, C.N., Custodio, A.O. et al.** (2003). Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis. *Nat Genet* **34**, 102-107.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Münch, G., Lüth, H.J., Wong, A. et al.** (2000). Crosslinking of α -synuclein by advanced glycation endproducts – an early pathophysiological step in Lewy body formation? *J. Chem. Neuroanat.* **20**, 253-257.
- Munro, W.N., Linder, M.C.** (1978). Ferritin: Structure, biosynthesis and role iron metabolism. *Physiol. Rev.* **58**, 317-396.

- Neutra, M.R., Chiechanover, A. Owen, L.S., Lodish, H.F.** (1985). Intracellular transport of transferrin and asialoorosomucoid colloidal Gold conjugates to lysosomes after receptors-mediated endocytosis. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 1134-1144.
- Nichols, W.C., Pankratz, N., Uniacke, S.K. et al.** (2002). Linkage stratification and mutation analysis at the Parkin locus identifies mutation positive Parkinson's disease families. *J Med Genet* **39**, 489 – 492.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., Vaulont, S.** (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8780-8785.
- Nicolas, G., Viatte, L., Lou, D.Q. et al.** (2003). Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet* **34**, 97-101.
- Nielsen, J.E., Jensen, L.N., Krabbe, K.** (1995). Hereditary haemochromatosis: a case of iron accumulation in the basal ganglia associated with a parkinsonian syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **59**, 318-321.
- O'Donovan, M.C., Oefner, P.J., Roberts, S.C., Austin, J., Hoogendoorn, B., Guy, C., Speight, G., Upadhyaya, M., Sommer, S.S., McGuffin, P.** (1998). Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* **52**, 44-49.
- Ohlsen, J.** (1982). Eisen-Stoffwechselstörungen: Pathogenese, Diagnostik und Therapie. In: Testfibel Klinik. Boehringer Mannheim, Mannheim.
- Oliveira, S.A., Scott, W.K., Martin, E.R. et al.** (2003). Parkin mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* **53**, 624 – 629.
- Paik, S.R., Shin, H., Lee, J. et al.** (1999). Copper(II)-induced self oligomerization of α -synuklein. *Biochem. J.* **340**, 821-828.
- Paik, S.R., Lee, D.Y., Cho, H.J. et al.** (2003). Oxidized glutathione stimulated the amyloid formation of α -synuclein. *FEBS Lett.* **537**, 63-67.
- Papanikolaou, G., Samuels, M.E., Ludwig, E.H. et al.** (2004). Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* **36**, 77-82.
- Parkkila, S. et al.** (1997). Association of the transferrin receptor in human Placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13198-13202.

- Periquet, M., Latouche, M., Lohmann, E. et al.** (2003). Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* **126**, 1271 -1278.
- Piccini, P., Burn, D.J., Ceravolo, R. et al.** (1999). The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: Evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann Neurol* **45**, 577 – 582.
- Pietrangelo, A., Montosi, G., Totaro, A. et al.** (1999). Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* **341**, 725-732.
- Pietrangelo, A.** (2004). Hereditary Hemochromatosis-A new look at an Old Disease. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2383-2397.
- Qian, Z.M., Ke, Y.** (2001). Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron Metabolism. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**, 287-294.
- Ramrakhiani, S., Bacon, B.** (1998). Haemochromatosis-advances in Molecular genetics and clinical diagnosis. *J Clin Gastroenterol* **27**, 41-46.
- Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W.D. et al.** (1985). Dopaminforschung heute und morgen – L-Dopa in der Zukunft. *In L-Dopa Substitution der Parkinson-Krankheit, Geschichte-Gegenwart-Zukunft*, Springer-Verlag Wien, 127-144.
- Riederer, P., Rausch, W.D., Schmidt, B. et al.** (1988). Biochemical fundamentals in Parkinson's disease. *Mt. Sinai J. Med.* **55**, 21-28.
- Rochette, J., Pointon, J.J., Fisher, C.A. et al.** (1999). Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations. *Am J Hum Genet* **64**, 1056-1062.
- Roetto, A., Papanikolaou, G., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J., Loukopoulos, D., Camaschella, C.** (2003). Mutant antimicrobial peptide hepcidine is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* **33**, 21-22.
- Rouault, T.A., Hentze, M.W., Caughman, S.W., Harford, J.B., Klausner, R.D.** (1988). Binding of a cytosolic protein to the iron responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science* **241**, 1207-1210.
- Saha, A.R., Ninkina, N.N., Hanger, D.P. et al.** (2001). Induction of neuronal Death by α -synuclein. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 3073-3077.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T.** (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual.** Second Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, M., Bruguera, M., Rodés, J., Oliva, R.** (2001). Complete Characterization of the 3'Region of the Human and Mouse Hereditary Hemochromatosis HFE Gene and Detection of Novel Splicing Forms. *Blood Cells Mol Dis.* **27 (1)**, 35-43.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**, 5463-5467.
- Seligmann, P.A., Chitambar, C., Vostrejs, M., Moran, P.L.** (1988). The Effect of various transferrins of iron utilisation by proliferating cells. *Ann. New York Acad. Sci.* **526**, 135-140.
- Semchuk, K., Love, E.J., Lee, R.G.** (1993). Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology* **43**, 1173 – 1180.
- Sturrock, A., Alexander, J., Lamb, J., Craven, CM, Kaplan, J.** (1990). Characterization of a transferrin-independent uptake system for iron in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 3139-3145.
- Tabner, B.J., Turnbull, S., El-Agnaf, O.M.A. et al.** (2002). Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A β and α -synuklein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radical Biol. Med.* **32**, 1076-1083.
- Tabrizi, S.J., Orth, J.M., Wilkinson, J.M. et al.** (2001). Expression of mutant α -synuklein causes increased susceptibility to dopamine toxicity. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2683-2689.
- Theil, E.C.** (1987). Ferritin: Structure, gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 289-315.
- Thénié, A., Orhant, M., Gicquel, I. et al.** (2000). The HFE gene undergoes alternative splicing process. *Blood Cells Mol. Dis.* **26**, 155-162.
- Torti, F.M., Torti, S.V.** (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* **99**, 3505-3516.
- Trenor, C.C., 3rd, Campagna, D.R., Sellers, V.M., Andrews, N.C., Fleming, M.D** (2000). The molecular defect in hypotransferrinemic mice. *Blood* **96**, 1113-1118.

- Trepel, M.** (1999). Zusammenwirken der Basalganglien und zentrale Regulation der Motorik. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Urban & Fischer Verlag, 2. Auflage, 193-194
- Trowbridge, I.S., Newman, R.A., Domingo, D.L., Sauvage, C.** (1984). Transferrin receptors: structure and function. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 925-932.
- Turnbull, S., Tabner, B.J., El-Agnaf, O.M.A. et al.** (2001). α -Synuklein implicated in Parkinson's disease catalyses the formation of hydrogen peroxide in vitro. *Free Radical Biol. Med.* **30**, 1163-1170.
- Underhill, P.A., Jin, L., Zemans, R., Oefner, P.J., Cavalli-Sforza, L.L.** (1996). A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 196-200.
- Valente, E.M., Brancati, F., Ferraris, A. et al.** (2002). PARK6-linked parkinsonism occurs in several European families. *Ann. Neurol.* **51**, 14-18.
- van Duijn, C.M., Dekker, M.C., Bonifati, V. et al.** (2001). Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* **69**, 629 – 234.
- Villiers, J.N.P.de, Hillermann, R., Loubser, L., Kotze, M.J.** (1999). Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in haemochromatsis and porphyria. *Hum Mol. Genet.* **8 (8)**, 1517-1522.
- Volles, M.J., Lee, S.J., Rochet, J.-C. et al.** (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein : implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* **40**, 7812-7819.
- Volles, M.J., Lansbury, P.T.Jr.** (2002). Vesicle permeabilization by Protofibrillar α -synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linkes Mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* **41**, 4595-4602.
- Volles, M.J., Lansbury, P.T.Jr.** (2003). Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* **42**, 7871-7878.
- Vulpe, C.D., Kuo, Y., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G.J.** (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin Homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.* **21**, 195-199.

- Waheed, A. et al.** (1997). Hereditary hemochromatosis: effect of C282Y and H63D mutations on association with β 2-microglobulin, intracellular Processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12384-12389.
- Walter, U., Wittstock, M., Benecke, R., Dressler, D.** (2002). Substantia nigra echogenicity is normal in non-extrapyrmidal cerebral disorders but increased in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **109**, 191-196.
- Weir, B.S.** (1990). Genetic data analysis. Sinauer Publ., Sunderland, MA.
- West, A.P., Giannati, A.M., Herr, A.B., Bennett, M.J., Nangiana, J.S., Pierce, J.R., Weiner, L.P., Snow, P.M., Bjorkmann, P.J.** (2001) Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites. *J. Mol. Biol.* **313**, 385-387.
- Wolozin, B., Golts, N.** (2002). Iron and Parkinson's disease. *Neuroscientist* **8**, 22-32.
- Xiao, W., Oefner, P.J.** (2001). Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum. Mutat.* **17**, 439-474.
- Youdim, M.B.H., Stephensen, G., Ben Shachar, D.** (2004). Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1012**, 306-325.
- Young, S.P., Aisen, P.** (1981). Transferrin receptors and the uptake and Release of iron by isolated hepatocytes. *Hepatology* **1**, 114-119.
- Young, S.P., Bomford, A., Williams, R.** (1984). The effect of the iron Saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. *Biochem. J.* **219**, 505-510.
- Zähringer, J.** (1980). Struktur und Funktion von Ferritin. In: Kaltwasser, J.P., Werner, E. (Eds.): Serumferritin. Springer, Berlin-Heidelberg, 1-24.
- Zecca, L., Gallorini, M., Schünemann, V. et al.** (2001). Iron, neuromelanin, and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences für iron storage and neurodegenerative processes. *J. Neurochem.* **76**, 1766-1773.
- Zecca, L., Fariello, R., Riederer, P. et al.** (2002). The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* **510**, 216-220.

- Zhang, Z.X., Roman, G.C.** (1993). Worldwide occurrence of Parkinson's # disease: an updated review. *Neuroepidemiology* **12**, 195-208.
- Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Fleming, R.E. et al.** (1998). HFE gene knockout Produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2492-2497.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kacherguss, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., Stoessl, A.J., Pfeiffer, R.F., Patenge, N., Carbajal, I.C., Vieregge, P., Asmus, F., Müller-Myhsok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K., Gasser, T.** (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant Parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**, 601-607.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich M. Lauer danke ich für die interessante Themenstellung bezüglich der Hämochromatose und für seine Bereitschaft, bei schwierigen Fragestellungen ohne Verzögerung zu helfen.

Bei Frau PD Dr. med. Daniela Berg möchte ich mich für die Themenstellung bezüglich der Parkinsonerkrankung, für die stets freundliche und exzellente Betreuung bei der Durchführung der einzelnen Arbeitsmethoden sowie die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse ganz herzlich bedanken.

Frau Dr. med. Ulrike Mau danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung im Abschnitt bezüglich der Hämochromatose und ihre moralische Unterstützung.

Weiterer Dank gebührt außerdem allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, Abteilung Medizinische Genetik, der Universitätsklinik Tübingen, welche durch ihre freundliche Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen der vorliegenden Arbeit geleistet haben, im besonderen Herrn Prof. Dr. med. Olaf Rieß für neue Ideen, Helmine Hochstrasser und Joelle Deplazes für die vielen labortechnischen Hilfestellungen sowie Thomas Franck und Marc Niwar für die geduldige Einweisung zur Bedienung des Wave-Geräts.

Besonderer Dank gilt allen Ärzten, die die Studienteilnehmer untersucht und Blutproben zugesandt haben, sowie allen Patienten, die durch ihre Bereitschaft an genetischen Studien teilzunehmen, die Untersuchungen überhaupt erst ermöglicht haben.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. rer. nat. Karlheinz Holzmann und Herrn Prof. Jürgen Tomiuk für ihre geduldige und freundliche Hilfe bei Fragen bezüglich der Statistik.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung und die stete Bereitschaft, sich meine Probleme anzuhören.

Lebenslauf

Name: Nilgün Akbas

Geburtstag: 16.02.1980

Geburtsort: Reutlingen

Schulbildung: 1987-1991 Friedrich-Schiller-Schule, Eningen
1991-2000 Isolde-Kurz-Gymnasium, Reutlingen
2000 Abitur (Note: 1,0)

Studium: Oktober 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an
der Medizinischen Fakultät der Eberhard-
Karls-Universität zu Tübingen
Herbst 2002 Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,0)
Herbst 2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
Frühjahr 2006 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note:
1,66)
04.05.2007 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)