

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

---

**Albinismus:**  
**Das Tyrosinase-Gen in 78 Variationen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**  
vorgelegt von

Markus Kaufmann  
aus Uetersen

Lübeck, im September 2004

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Grabbe

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2006

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.11.2006

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	4
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1 Albinismus	5
1.1 Klinisches Erscheinungsbild	5
1.2 Biochemische Grundlagen	7
1.3 Molekulargenetische Klassifizierung	9
1.3.1 OCA 1: Tyrosinase-Gen-bezogener Albinismus	11
1.3.2 OCA 2: P-Gen-bezogener Albinismus	12
1.3.3 OCA 3: TYRP-1-bezogener Albinismus	13
1.3.4 OCA 4: AIM-1Gen-bezogener Albinismus	13
1.3.5 OA: Okulärer Albinismus	13
1.4 Aufgabenstellung	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Materialien	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Primer	17
2.1.3 Geräte und Gebrauchsartikel	18
2.1.4 Stammlösungen	19
2.2 Methoden	21
2.2.1 Patienten	21
2.2.2 Agarosegelelektrophorese	21
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.3.1 PCR für SSCP-Analysen	23
2.2.3.2 Restriktion von PCR-Produkten	23

Inhaltsverzeichnis	2
2.2.3.3 Primär-PCR für Sequenzierung	24
2.2.4 Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP)	24
2.2.5 DNA-Sequenzierung nach der Dideoxymethode	27
2.2.5.1 Primär-PCR für Sequenzierung	28
2.2.5.2 Aufreinigung	28
2.2.5.3 Sequenz-PCR	29
2.2.5.4 Acrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der Sequenz-PCR-Produkte	30
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1 DNA-Proben	32
3.2 SSCP-Analysen	33
3.2.1 Auswertung der SSCP-Analysen	35
3.3 DNA-Sequenzierung	35
3.3.1 Ergebnisse der DNA-Sequenzierung	36
<b>4 Diskussion</b>	<b>47</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>58</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>64</b>
<b>9 Lebenslauf</b>	<b>65</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Base Adenin
AIM-1	<i>engl.</i> : „altered in melanoma 1“
bp	Basenpaar
C	Base Cytosin
cDNA	<i>engl.</i> : copy-DNA (DNA-Kopie einer RNA-Sequenz)
DNA	<i>engl.</i> : deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>engl.</i> : double-strands, doppelsträngige DNA-Fragmente
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
G	Base Guanin
MSH	Melanozyten-Stimulierendes Hormon
OA	Okulärer Albinismus
OCA	Okulokutaner Albinismus Typ 1
OCA1MP	Minimal-Pigment Albinismus Typ 1
OCA1TS	Temperatur-sensitiver okulokutaner Albinismus
PCR	<i>engl.</i> : polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
rev	<i>engl.</i> : reverse, Sequenzdarstellung im Gegenstrang
rpm	<i>engl.</i> : rounds per minute
SDN	<i>engl.</i> : Sensory Defect Nystagmus, Sensorischer “kongenitaler” Nystagmus
SNP	<i>engl.</i> : single nucleotide polymorphism
ss	<i>engl.</i> : single-strands, einzelsträngige DNA-Fragmente
SSCP	<i>engl.</i> : “Single-strand Conformation Polymorphism”
T	Base Thymin
TRP-1	<i>engl.</i> : „tyrosinase-related protein 1“
TYRP-1	<i>engl.</i> : „tyrosinase-related protein 1“
wt	<i>engl.</i> : wildtype
xc	Xylencyanol

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1	Darstellung der verdünnten DNA-Proben auf Agarosegel	32
Abb. 3.2	Darstellung zweier Agarosegele	33
Abb. 3.2.1	Exon 2: Darstellung von PCR-Produkten	33
Abb. 3.2.2	Exon 1.1: Restriktion des PCR-Produktes mit Msp I	33
Abb. 3.3	Exon 1.2: Darstellung eines Polyacrylamidgels	34
Abb. 3.4	Sequenzdarstellung zweier Mutationen	36
Abb. 3.4.1	Substitution T>C	36
Abb. 3.4.2	Deletion G (Frameshift Mutation)	36
Abb. 3.5	Sequenzdarstellung zweier Mutationen	37
Abb. 3.5.1	Substitution T>C	37
Abb. 3.5.2	Insertion T (Frameshift Mutation)	37

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Übersicht der an der Melaninpigmentsynthese beteiligten Gene und Proteine und der assoziierten Erkrankungen	14
Tab. 2.1	Primermenge und Annealingtemperatur der Exons	24
Tab. 2.2	Abstand der xc-Farbstoffbande zur Gelunterkante	27
Tab. 3.1	Auffälligkeiten in den Exons 1-5 nach SSCP-Analysen	35
Tab. 3.2	Übersicht der Anzahl der Variationen/Patient im Tyrosinase-Gen	35
Tab. 3.3	DNA-Variationen und Auswirkung auf Protein-Ebene	37
Tab. 3.4	Polymorphismen im Tyrosinase-Gen	43
Tab. 3.5	Anzahl der Veränderungen auf cDNA- bzw. Aminosäure-Ebene	44
Tab. 3.6	Aminosäureveränderungen bei Patienten mit 3-5 DNA-Veränderungen im Tyrosinase-Gen	45
Tab. 3.7	Anzahl der Mutationen und Polymorphismen im Tyrosinase-Gen	47

# 1. Einleitung

Das Ziel des an der Universität Lübeck durchgeführten Projektes waren molekulargenetische Analysen von Personen, die von der klinisch und genetisch heterogenen Pigmentstoffwechselkrankheit Albinismus betroffen sind. In Kooperation mit Frau PD Dr. med. Käsmann-Kellner, Universitäts-Augenklinik, Homburg (Saar), die die Patienten und Familien betreut, wurden die Blutproben von 176 nicht-verwandten erkrankten Personen im Institut für Humangenetik gesammelt.

Bei den Teilnehmern diese Studie besteht ein sehr großes Interesse an der Aufklärung der individuellen genetischen Veränderungen, die bei ihnen zum Phänotyp Albinismus führen.

## 1. Albinismus

### 1.1 Klinisches Erscheinungsbild

Der Begriff Albinismus bezeichnet ein Gruppe genetisch heterogener Defekte im Melaninstoffwechsel, welche mit einer Verminderung von Melanin entweder in Haut, Haaren und Augen oder nur in den Augen einhergeht. Dabei unterscheidet man Formen mit generalisierter Beteiligung und autosomal-rezessiver Vererbung – okulokutaner Albinismus (OCA) – und nur okulärer Beteiligung und X-chromosomaler Vererbung – okulärer Albinismus (OA).

Albinismus ist keine auf den Menschen beschränkte Stoffwechselstörung, sondern kann prinzipiell bei allen Spezies im Tierreich in unterschiedlicher Form und Ausprägung auftreten und wurde erstmals 1908 in einer Arbeit von A. E. Garrod als genetische Stoffwechselerkrankung beschrieben (Garrod, 1908). Ein erster Hinweis auf die genetische Heterogenität bei Albinismus wurde in einer Arbeit aus dem Jahr 1952 dargelegt. Darin beschrieb P. D. Trevor-Roper zwei Patienten mit Albinismus mit unauffällig pigmentierten Kindern (Trevor-Roper, 1952).

Die beschriebene Familie ist ein Beispiel der klassischen Komplementation, bei der zwei verschiedene Defektmutanten ausgeglichen werden und zu unauffälligen Phänotypen führen, indem nicht-allele Gene oder solche mit unterschiedlich mutierten Einheiten kombinieren. Im beschriebenen Fall trugen die Eltern die für den Albinismus verantwortliche Genmutation homozygot, welche allerdings auf unterschiedlichen Genloci lag. Die Kinder waren phänotypisch nicht betroffen und trugen demnach die Anlagen heterozygot für beide Genloci.

Das klinische Bild der phänotypischen Manifestation des okulokutanem Albinismus (OCA) zeigt sich am deutlichsten in Haut- und Haarfarbe und ist sehr vielfältig. Es reicht vom „klassischen“ Aussehen mit weißen Haaren, sehr heller, lichtempfindlicher, nicht bräunender Haut, hellblauen, im Gegenlicht rötlichen Augen bis hin zu braunen Haaren und gut nachpigmentierender Haut. Bei wiederum anderen Patienten ist die Erkrankung lediglich auf die Augen und das optische System beschränkt, während die Pigmentbildung in Haut und Haaren völlig unbeeinträchtigt erscheint.

Durch biochemische Untersuchungen allerdings ist es möglich, Unterschiede auch bei phänotypisch ähnlichen Patienten festzustellen.

Die wesentliche Gemeinsamkeit aller an Albinismus erkrankten Patienten ist der Mangel an Melaninpigment. Das schwarz-braune Pigment Melanin dient dem menschlichen Körper vornehmlich zur Absorption von Licht und UV-Strahlen. Bei einigen Formen des okulokutanem Albinismus führt die Verminderung des Pigmentes zu einer Prädisposition maligner Hauttumoren, vor allem in Ländern mit hoher Sonneneinstrahlung. Zudem liegt die Inzidenz von Albinismus in Afrika deutlich höher (1:10.000 und höher) als bei Kaukasiern (1:17.000) (Lund et al., 1997).

Der okuläre Albinismus (OA) zeigt vergleichbare Veränderungen im optischen System wie der OCA, allerdings in der Regel keine makroskopischen Auffälligkeiten in der Haut und in den Haaren; die Haut zeigt jedoch mikroskopische Makromelanosomen (Schnur et al., 1994;1998).

Alle Formen von Albinismus sind aufgrund des Melaninmangels mit entwicklungsbedingten Veränderungen des visuellen Systems assoziiert, da sowohl die



postnatale Differenzierung der fovealen Strukturen, als auch die prä- und postnatale Differenzierung der primären visuellen Bahnverbindungen (Optikus - Corpus geniculatum laterale – primärer visueller Cortex) melaninabhängig sind (Creel et al., 1990).

Im Auge findet sich das Melanin vor allem im retinalen Pigmentepithel und in der Uvea reduziert. Der Melaninmangel in Iris und retinalem Pigment führt zu einer gesteigerten Blendungsempfindlichkeit und zu einer fehlerhaften Entwicklung des optischen Systems. Neben dem gehäuften Vorkommen von Refraktionsanomalien in Form von Kurz-/ und Weitsichtigkeit und einer meist deutlichen Einschränkung der zentralen Sehschärfe (10 %), bedingt durch eine Foveahypoplasie mit konsekutivem sensorischen „kongenitalem“ Nystagmus (SDN: Sensory Defect Nystagmus), finden sich auch atypische chiasmale Verschaltungen der Sehnervfasern. Diese führen in der Regel zu einer deutlichen Störungen des Binokularesehens und zum Strabismus. Zudem wird eine Beteiligung auditorischer Bezirke vermutet.

Die Veränderungen des optischen Systems sind bei allen Albinismusformen ähnlich und werden dem generalisierten Melaninmangel zugeschrieben.

Motorische Defizite und psychische Auffälligkeiten gehören nicht zum Bild des Albinismus. Nicht selten aber sind diese Patienten durch Reaktionen ihrer Umwelt einer psychischen Belastung ausgesetzt.

## **1.2 Biochemische Grundlagen**

Die Bildung von Melaninpigment ist ein komplexes Geschehen, bei dem etliche Enzyme und Proteine, sowie pigmenthaltige Zellorganellen (Melanosomen, Melaningranula) beteiligt sind. Bei der Maus wurden bislang über 65 Genloci gefunden, deren Alteration zur Beeinträchtigung der Pigmentsynthese führen (Boissy und Nordland, 1997; Spritz, 1994; Oetting und King, 1994).

Melanin wird in den Melanozyten aus der Aminosäure L-Tyrosin gebildet. Melanozyten findet man in der Haut, den Haarfollikeln, im Pigmentblatt der Iris und im retinalen Epithel. In den Melanozyten sind hierfür spezielle Zellorganellen, die Melanosomen,

vorhanden. Diese Organellen dienen darüber hinaus als Speicher und Transportvesikel für das Melanin.

Die Biosynthese des Melanins beginnt mit der Hydroxylierung der Aminosäure L-Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (Dopa) und der Oxidation von Dopa zu Dopaoquinon durch das kupferhaltige Enzym Tyrosinase. Dabei ist die Tyrosinase – deren Gen in dieser Arbeit analysiert wurde - das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der gesamten Reaktion. Der nächste Schritt führt entweder - unter dem Einfluss des Melanozyten-Stimulierenden Hormons (MSH) aus der Hypophyse - zur Bildung des biologisch bedeutsamen schwarzbraunen Eumelanins oder – in der Gegenwart von Sulfhydrylkomponenten – zum rotgelben Phäomelanin.

Für die Bildung des Eumelanins sind die Eumelanosomen mit weiteren Proteinen ausgestattet:

- Das „tyrosinase-related protein 1“ (TRP-1, TYRP-1-Protein) katalysiert zumindest bei der Maus einen weiteren wichtigen Reaktionsschritt in der Eumelaninbildung. Das TYRP-1-Protein scheint beim Menschen eine Bedeutung bei der Stabilisierung der Tyrosinase zu besitzen (Sarangarajan und Boissy, 2001).
- Das p-Protein, benannt nach dem homologen „pink-eye“- Protein der Maus, besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit bekannten Anionenkanälen und ist eventuell an der Regulation des intramelanosomalen pH-Wertes und somit wiederum an der Aktivität und Stabilität der Tyrosinase beteiligt. Außerdem gibt es Hinweise, daß das p-Protein für die Zuweisung von verschiedenen Proteinen zu melanosomalen Zellkompartimenten bedeutsam ist (Brilliant, 2001; Toyofuku et al., 2002).
- Das sogenannte „altered in melanoma 1“ (AIM-1)-Protein besitzt eine große Ähnlichkeit mit Transportern für Zuckermoleküle in Pflanzen. Es wird vermutet, dass die Regulation von TYRP-1 u. a. von der Glykosylierung des Proteins und damit indirekt von der AIM-1-Aktivität abhängig ist.
- Das OA1-Protein spielt eine Rolle in der strukturellen Organisation des Eumelanosoms, welches sich, abgesehen von den beschriebenen Stoffwechselprozessen, auch in Form, Größe und Ausstattung der

Glykoproteinmatrix von den Phaeomelanosomen unterscheidet. Es ähnelt G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist möglicherweise ein Sensor für die Größe der Melanosomen (Shen et al., 2001).

Das ausdifferenzierte, melaninbeladene Pigmentpolymer wird auf einer Proteinmatrix innerhalb der Melanosomen abgelegt. In der Haut und in den Haaren werden die Melanosomen dann über die Dendriten der Melanozyten zu den Keratinozyten transportiert. In den Keratinozyten werden die Melanosomen in Form einer Kappe auf der der Hautoberfläche zugewandten Seite des Zellkerns gelagert. Der Zellkern und die darin befindliche DNA werden somit vor den schädlichen Einflüssen der UV-Strahlung geschützt.

Die Melanozyten im Auge geben die Melanosomen nicht an andere Zellen ab, sondern speichern diese im Zytoplasma. Die zusammenhängenden Melanozyten in der Iris und im retinalen Pigmentblatt bilden somit im Auge eine dichte lichtabsorbierende Schicht. Veränderungen in den Genen, die für die oben aufgeführten Proteine kodieren, führen zum Phänotyp des Albinismus.

### **1.3 Molekulargenetische Klassifizierung**

Wie bereits erwähnt, lässt sich eine Albinismusklassifikation anhand genauer Beschreibung der klinischen Erscheinung als auch durch biochemische Untersuchungen durchführen. Diese wurden ergänzend in den Siebziger und Achtziger Jahren eingeführt, nachdem man zuvor den in den Sechziger Jahren von C. Witkop und R. King entwickelten Tyrosin-Haarwurzeltest zur Einteilung herangezogen hatte. Der Test beruht auf dem Nachweis der Tyrosinasefunktion und somit der Melaninbildung in den Haarwurzeln. Diese wurden in einer Lösung mit Tyrosin inkubiert. Bei fehlender Pigmentierung der Haarwurzel wurde der Test als „Tyrosinase-negativ“ (keine Melaninbildung) gewertet. Die Albinismusform wurde als „Tyrosinase-negativer okulokutaner Albinismus“ klassifiziert. Entsprechend erfolgte die Zuordnung in „Tyrosinase-positiv“ (Melaninbildung nachweisbar) (King und Olds, 1984; King et al., 1978). Spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Test weder sensitiv noch

spezifisch gut reproduzierbar war, so dass er aus der Albinismusdiagnostik gestrichen wurde.

Heute gilt die Klassifikation nach molekulargenetischen Aspekten als Standard in der Albinismusdiagnostik. Die molekulargenetische Einteilung ist umfassender als die phänotypischen Klassifikationsversuche. Durch molekulargenetische Analysen sind zur Zeit beim Menschen fünf Gene bekannt, bei denen Mutationen zum Krankheitsbild des Albinismus führen. Zum Teil handelt es sich um Gene, deren Proteine direkt an der Melaninbildung beteiligt sind, wie z. B. das in diesem Projekt untersuchte Tyrosinase-Gen oder das TYRP-1-Gen. Die übrigen Albinismus auslösenden Gene scheinen eher eine Bedeutung für den strukturellen Aufbau der Melanosomen zu haben. Die Erkrankung folgt in der Regel einem rezessiven Erbgang, d. h. das betroffene Gen muss auf beiden homologen Chromosomen eine Mutation tragen, um symptomatisch zu werden. Zudem ist - insbesondere beim Tyrosinase-Gen - bekannt, dass viele Individuen mit Albinismus nicht homozygot für eine Mutation, sondern „compound heterozygot“ sind. Diese Patienten haben zwei unterschiedliche Mutationen auf beiden Allelen eines Gens. Unterschiedliche Phänotypen sind somit nicht zwingend durch Veränderungen unterschiedlicher Genloci bedingt.

Bei einer molekulargenetischen Untersuchung für 2 Genloci (Passmore et al., 1999) bei 79 an Albinismus erkrankten Personen konnte die bereits zuvor in der Literatur beschriebene Vermutung bestätigt werden, dass weitere, bisher unbekannte Genloci, an der Pigmentsynthese beteiligt sind: So konnte bei 26 dieser 79 untersuchten Patienten keine genetische Veränderung festgestellt werden. Dies entspricht etwa 32 % der Erkrankten und stimmt mit den zuvor veröffentlichten Daten überein. (Oetting und King, 1992; Spritz, 1994). Hier besteht noch Forschungsbedarf an weiteren, bisher nicht entdeckten, an der Pigmentsynthese beteiligten Genloci.

Im folgenden werden einzelne Typen des Albinismus dargestellt. Dabei wird der Schwerpunkt auf eine ausführliche Charakteristik des für diese Arbeit im Mittelpunkt stehenden Tyrosinase-Gen-bezogenen Albinismus gelegt. Anschließend erfolgt jeweils eine kurze Beschreibung der übrigen Albinismusformen.

### 1.3.1 OCA 1: Tyrosinase-Gen-bezogener Albinismus

Das menschliche Tyrosinase-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 11q14-21 lokalisiert (Barton et al., 1988) und beinhaltet 5 Exons (Giebel et al., 1991), die ein Protein von 529 Aminosäuren kodieren. Das Tyrosinasepolypeptid enthält zwei Kupferbindungsstellen. Tyrosinase ist wesentlich an der Pigmentsynthese beteiligt. Das Tyrosinase-Gen ist das zur Zeit einzig bekannte Gen, das im Zusammenhang mit OCA 1 steht (Giebel et al., 1991). Mutationen in diesem Protein führen entsprechend der Funktion dieses Enzyms bei der Bildung von Eu- und Phaeomelanin zum OCA 1, der in Europa mit 30-40 % die häufigste aller OCA-Formen ist. Die Inzidenz beträgt 1:39.000 bei Kaukasiern und 1:28.000 im afrikanischen Raum. Bisher wurden über 100 Mutationen und Polymorphismen im Tyrosinase-Gen veröffentlicht. Ein Großteil der Mutationen wurde von Oetting und King (1992; 1993; Oetting et al., 1998; King et al., 2003) und Spritz (Fukai et al., 1995; Spritz et al., 1997; Park et al., 1997) veröffentlicht. Dabei handelt es sich im einzelnen um:

- 57 Missense-Mutationen
- 15 Frameshift-Mutationen
- 13 Nonsense-Mutationen
- 2 Splice-Site-Mutationen.

Bei den meisten Betroffenen lagen die Mutationen „compound heterozygot“ vor. Compound-Heterozygotie ist definiert als Heterozygotie für zwei Defekt-Allele in einem Genort. Phänotypisch sind Symptome beider Allele im Sinne von Zwischenformen zu erwarten.

Man unterscheidet einen Subtyp 1a (OCA1a), bei dem die Tyrosinase durch Mutationen keinerlei Restaktivität mehr besitzt, von einem Subtyp 1b (OCA1b), bei dem noch eine geringe Enzymaktivität feststellbar ist. Beim Subtyp 1a ist zeitlebens keine Melaninbildung möglich. Diese Patienten weisen die bereits in Kap. 1.2.1 beschriebenen klinischen Symptome in ihrer stärksten Ausprägung auf. Der Phänotyp ist in allen ethnischen Gruppen ähnlich. Der Subtyp 1a entspricht somit der früheren

Form des „Tyrosinase-negativen OCA“ im Haarwurzeltest. Beim Subtyp 1b ist die Variationsbreite der kutanen und okulären Pigmentation in Abhängigkeit von der „Rest-Aktivität“ der Tyrosinase sehr groß. Charakteristisch ist hier, die bei Geburt geringe bis fehlende Pigmentierung von Haut und Haaren, die im Laufe des Lebens deutlich zunehmen und annähernd normale Ausmaße erreichen kann (King et al., 1995). Hier beeinflusst die ethnische Zugehörigkeit das Aussehen der Erkrankung.

Es sind beim OCA 1 weitere Sonderformen beschrieben:

- Temperatur-sensitiver okulokutaner Albinismus (OCA1TS). Hier bildet sich ein Enzym, das bei zentraler Körpertemperatur inaktiv ist, bei etwas tieferen Temperaturen eine Restaktivität aufweist. Diese Patienten fallen durch geringe Pigmentierung der Extremitäten auf, während der Körperstamm weiß bleibt (King et al., 1991).
- Der Minimal-Pigment-OCA (OCA1MP) weist eine leichte Zunahme der Pigmentierung über die Jahre auf (Summers und King., 1994).
- Der „Yellow Albinism“ („Yellow Mutant“), bei dem die Haare im Laufe der ersten Jahre durch die Bildung von Phaeomelanin eine weizengelbe Färbung bei kaum pigmentierter Haut entwickeln (van Dorp, 1987).

Zumindest ein Teil der (Punkt-)Mutationen beeinflusst nicht direkt die Aktivität des Enzyms, führt aber dazu, dass die Tyrosinase nicht vom Endoplasmatischen Retikulum zu den Melanosomen transportiert wird (Toyofuku et al., 2001).

### **1.3.2 OCA 2: P-Gen-bezogener Albinismus**

Der OCA 2 ist weltweit die häufigste Form des OCA mit besonders hoher Inzidenz von 1:10.000 bei Afrikanern und Afroamerikanern (Lund et al., 1997). In Europa haben ungefähr 10-20 % der Patienten mit OCA einen OCA 2. Das P-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 15q lokalisiert und kodiert ein Membranprotein der Melanosomen. Wie auch beim OCA 1 sind hier eine Reihe verschiedener Mutationen beschrieben worden. Das Spektrum des kutanen Phänotyps ist sehr breit, bedingt durch die variable

Restaktivität des Proteins. Die Patienten weisen bei Geburt meist eine leichte, hellblonde Pigmentierung der Haare auf.

### **1.3.3 OCA 3: TYRP-1-bezogener OCA**

Der OCA 3 ist bisher überwiegend bei Afrikanern beschrieben. Mutationen im TYRP-1-Gen führen bei den Betroffenen zu einer rötlichen Haut- und Haarfarbe, weshalb diese Form des Albinismus gelegentlich auch als „roter“ (rufous) Albinismus bezeichnet wird. Über die genaue Häufigkeit in Europa liegen keine Daten vor, sie dürfte aber im Bereich von einem Prozent liegen. Neuere Studien zeigen, dass Mutationen im TYRP-1-Gen zu einer Anhäufung von Tyrosinase im Endoplasmatischen Retikulum führt, wie es auch für die Tyrosinase-Mutation selbst gezeigt wurde (Toyofuku et al., 2001). Auch die Halbwertszeit der Tyrosinase scheint bei TYRP-1-Mutationen verringert.

### **1.3.4 OCA 4: AIM-1-Gen-bezogener OCA**

Vor kurzem wurde die Assoziation von Mutationen im AIM-1-Gen mit OCA beim Menschen veröffentlicht. Das Gen wurde ursprünglich in Melanomzellen identifiziert und besitzt möglicherweise auch eine Bedeutung in der Tumorgenese von Melanomzellen. Aussagen zur Häufigkeit des OCA 4 sind bislang noch nicht möglich. Ebenso bedarf es einer Untersuchung der bisher weitgehend unbekanntenen phänotypischen Variationsbreite.

### **1.3.5 OA: Der Okuläre Albinismus**

Der okuläre Albinismus betrifft von der klinischen Symptomatik nur die Augen. Aufgrund der X-chromosomalen rezessiven Vererbung (Bassi et al., 1995) tritt der OA vorwiegend als hemizygote Mutation bei männlichen Individuen auf. Frauen sind aufgrund des zweiten X-Chromosoms seltener erkrankt. Auffällig sind mikroskopisch nachweisbare Makromelanosomen in den Melanozyten der Haut und Haarfollikel, wobei jedoch keine klinischen Auswirkungen nachgewiesen werden können.

*Tabelle 1.1: Übersicht der bekannten an der Melaninpigmentsynthese beteiligten Gene und Proteine und der assoziierten Erkrankungen*

<b>Gen</b>	<b>Chromosom</b>	<b>Gebildetes Protein</b>	<b>Funktion des Proteins</b>	<b>Assoziierte Albinismusform</b>
Tyrosinase-Gen 5 Exons	11q14-21	Tyrosinase	Melanogenes Enzym	OCA 1
P-Gen 25 Exons	15q11-13	p-Protein	Melanosomales Enzym, stabilisierende Funktion	OCA 2
TYRP-1-Gen 7 Exons	9q23	TYRP-1-Protein	Melanosomales Enzym, stabilisierende Funktion	OCA 3
AIM-1-Gen 7 Exons	5p	AIM-1-Protein	Membran-assoziiertes Transportprotein	OCA 4
OA-Gen 9 Exons	Xp22.3	OA1-Protein	Melanosomales Enzym	OA

## 1.4 Aufgabenstellung

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die molekulargenetische Analyse des Tyrosinase-Gens bei Personen mit Albinismus. Bei Mutationen im Tyrosinase-Gen kommt es zu einer Veränderung des Proteins und zum klinischen Bild des Albinismus. Zur Zeit sind über 100 Mutationen und Polymorphismen im Tyrosinase-Gen veröffentlicht. Ziel dieser Arbeit ist die Suche nach genetischen Varianten bei 176 Personen deutschen Ursprungs.



Dazu müssen die 5 Exons des Gens mittels PCR amplifiziert und unter Anwendung der SSCP-Technik auf Auffälligkeiten untersucht werden. Fragmente mit auffälligem Laufverhalten müssen sequenziert werden. Die ermittelten Nukleotidsequenzen werden mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen. Die Veränderungen sollen entsprechend der internationalen Nomenklatur benannt werden. Soweit möglich ist eine Unterscheidung zwischen Mutation und Polymorphismus zu treffen.

Die Differenzierung zwischen Mutationen und Polymorphismen ist wie folgt definiert: Sowohl bei translatierten Genen als auch in nicht translatierten Bereichen des Genoms findet man durch Mutationen entstandene Unterschiede in der Nukleotidsequenz.

Bei translatierten Genen spricht man dann von verschiedenen Allelen. Enzymvarianten, die auf verschiedenen Allelen desselben Genortes basieren, nennt man Alloenzyme. Existieren bezüglich eines Merkmals mit monogener Vererbung mindestens zwei Phänotypen, welche auf mindestens zwei Genotypen zurückzuführen sind, von denen keiner selten ist, d. h. mindestens mit einer Frequenz von 1 – 2 % vorkommt, so spricht man von einem genetischen Polymorphismus. Oft findet man mehr als zwei Allele und mehr als zwei Phänotypen für einen einzigen Locus. Allerdings sollten Polymorphismen nicht mit seltenen genetischen Varianten verwechselt werden.

Seltene genetische Varianten sind dadurch definiert, dass sie mit geringerer, meist weit geringerer Häufigkeit als 1 – 2 % vorkommen ( Tariverdian und Buselmaier, 2004).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

100 bp DNA Leiter	Gibco BRL
Acrylease	Stratagene
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva
Aqua ad iniectabilia	Braun
Aqua Spüllösung	Delta-Pharm
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
DMSO (Dimethylsulfoxid) 100 %	Merck
d-NTPs set	Q-Biogene
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ficoll 400	Pharmacia
Formaldehyd 37 %	Sigma
Formamid 100 %	Fluka
Glycerin	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
pBR 322 DNA –Msp I Standard	Biolabs
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid)	Roth
Salpetersäure 65 %	Merck
SequiTherm EXCEL II	Epicentre

## DNA Sequencing Kit- LC

Silbernitrat	Caelo
Standard-Agarose	BMA
Taq DNA Polymerase	Eppendorf
Temed	Sigma
Tris	ICN Biomedicals
Urea	Merck
XylenCyanol	Sigma

**2.1.2 Primer (Invitrogen):**

Exon	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
1.1	Tyr-1.1F	uni – CCT TGT GAG GAC TAG AGG AA
	Tyr-1.1R	rev – CGT TAA ACA TGG GTG TTG AT
1.2	Tyr-1.2F	uni – CAG CTC AGA CTA TGT CAT C
	Tyr-1.2R	rev – CCT CCC TAC TCT GAC ATC GT
2	Tyr-2F	uni – TCC TAC TGA CTG GTG GTG AC
	Tyr-2R	rev – GGA CTT TGG ATA AGA GAC TG
3	Tyr-3F	uni – AAT CAC ATA GGT TTT CAG TCA
	Tyr-3R	rev – TTA AAT CCA ATG AGC ACG
4	Tyr-4F	uni – TCT TAG TCT GAA TAA C
	Tyr-4R	rev – CTA GAT TCA GCA ATT CC
5	Tyr-5F	uni – ATC GTA ACA ATG GTG GTA AC
	Tyr-5R	rev – CTG GGA ACC TGG ACA TTA C

Bei den verwendeten Forward- (F-) Primern handelte es sich um sogenannte „uni“-Primer, d. h. sie tragen an ihrem 5'-Ende eine zusätzliche M 13-uni-Sequenz (5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT – 3'), während die Reverse- (R-) Primer eine zusätzliche M 13-rev-Sequenz (5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC – 3') tragen.

Diese speziellen M13-Sequenzen waren für die der SSCP vorausgehende PCR bedeutungslos, nahmen aber für die spätere Sequenzierung eine wichtige Rolle an (Anheftung Fluoreszenzstoff-markierter Sequenzprimer, s. Kap.2.2.5).

### 2.1.3 Geräte und Gebrauchsartikel

ComputerProgramme	Biometra BioDocAnalyze V1.0 LI-COR DNA Sequencer 4000
Eismaschine	Ziegra ZBE 30-10
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schueller, GB 002, 460 x 570 mm
Gelträger für Agarose-Gel-Elektrophorese	Serva Blue Marine 100
Glasflaschen	Schott Duran 500 ml/1000 ml
Kammer für Agarose-Gel-Elektrophorese	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership BM 100
Kämme	Labtech International GmbH 48er Haifisch- zahnkamm, mylar, 0,2 mm stark Life Technologies Gibco BRL 62er Hai- Fischzahnkamm, mylar, 0,35 mm stark Serva 12er/14er Kämme, 1,0/1,5 mm stark
Magnetrührer	Heidolph MR 2002, Ika-Combimag RCT
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand MZ 2 C
Mikrowelle	Hitachi Micro 700
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt 0,5/1,5 ml Sarstedt 96er PCR-Mikrotiterplatten + Deckelkette
Pipetten	Gilson Pipetman Pipetten P2, P20, P200,

	P1000
	Thermo Labsystems Multikanal-Finnpipette 4510 (0,5-1,0 µl)
Pipettenspitzen	Finntip Micro 0,2-10 µl Fischer #3510 0,1-10 µl Sarstedt Blaue Spitzen Sarstedt Gelbe Spitzen
Rüttler	Heidolph REAX 2000
Sequenziergeräte	LI-COR DNA Sequencer 4000
Spacer	Li-COR Spacer, 0.2 mm stark Life Technologies Gibco BRL PS Spacer Model S2, mylar, 0,35 mm stark
Spannungsgeber	Life Technologies Gibco BRL PS 9009 Life Technologies Gibco BRL PS 9009 TC Pharmacia Gene Power Supply GPS 200 Pharmacia Gene Power Supply GPS 400
SSCP-Elektrophorese-Kammer	Life Technologies Gibco BRL Sequencing System Model S2
Gel-Trockner	Fröbel Labortechnik G 2000
System zur Auswertung der Agarose-Gele	Biometra BioDocAnalyze System, Vetter GmbH UV-Kontaktlampe
Thermocycler	Biometra T Gradient Biometra UNO II Hybaid OmniGene
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Waage	Sartorius Laboratory L 420 P
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 C

### 2.1.4 Stammlösungen

100 bp DNA Leiter

5 % (w/v) 100 bp DNA Leiter

---

(c der Gebrauchsverdünnung: 50 ng/μl)	33 % (v/v) 6x-Ficoll-Lösung
10x-TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	20 mM EDTA
	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
3x-Ficoll-Lösung	145 μM Bromphenolblau
	186 μM Xylencyanol
	15 % (w/v) Ficoll 400
6x-Ficoll-Lösung	289 μM Bromphenolblau
	371 μM Xylencyanol
	15 % (w/v) Ficoll 400
Agarose-Gel-Lösung	0,634 μM Ethidiumbromid
	2 mM EDTA
	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	0,8 % bzw. 1,5 % (w/v) Standard-Agarose
Formamid-Ladepuffer	289 μM Bromphenolblau
	371 μM Xylencyanol
	20 mM EDTA
	95 % (v/v) Formamid
Glycerin-Gel-Lösung für SSCP	6 % (v/v) Acrylamid
	0,16 % (v/v) Bisacrylamid
	10 % (v/v) wasserfreies Glycerin
	2 mM EDTA
	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	0,0667 % (v/v) Temed
pBR322 DNA-Msp I Standard	5 % (w/v) pBR322 DNA-Msp I Standard
(c der Gebrauchsverdünnung: 50 ng/μl)	33 % (v/v) 6x-Ficoll-Lösung
Sequenzier-Gel-Lösung	6 % (v/v) Acrylamid
	0,147 % Bisacrylamid
	7 M Urea
	2 mM EDTA

89mM Tris

89 mM Borsäure

0,0667 % (v/v) Temed

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Patienten**

In Kooperation mit Frau PD Dr. Käsmann-Kellner aus der Augenklinik der Universität des Saarlandes wurden 176 unabhängige Blutproben von Personen mit Albinismus ungeklärter Ursache im Institut für Humanmedizin der Universität zu Lübeck gesammelt. Bei dem nicht vorselektionierten Patientenkollektiv handelt es sich um Personen aus dem deutschsprachigen Raum. Genau Angaben zur Herkunft sowie klinische Daten der Patienten stehen nicht zur Verfügung. Die aus den Blutproben extrahierte DNA lag für das hier geschilderte Projekt bereits vor. Die isolierte DNA wurde durch Zugabe von Aqua dest. auf vergleichbare Konzentrationen von 10 ng/µl verdünnt. Die Beurteilung der DNA –Konzentrationen erfolgte über die Agarosegelelektrophorese.

### **2.2.2 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese ist eine einfache und schnelle Methode, DNA-Qualität und Konzentration abzuschätzen und PCR-Produkte aufzutrennen bzw. darzustellen.

Der Elektrophorese liegt folgendes Prinzip zugrunde: DNA bewegt sich aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld auf den positiven Pol zu. Die

Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei u. a. von der Molekülgröße, der Viskosität der Trägersubstanz (d. h. der Agarosekonzentration des verwendeten Gels) sowie der angelegten Spannung abhängig. Mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid kann die DNA unter UV-Licht sichtbar angefärbt werden (Knippers, 2001, 23f; Seyffert, 1998, 975, 978f).

Verwendet wurden in diesem Fall 1,5 %ige Agarosegele. Dazu wurden 3,0 g Agarose in 200 ml 1xTBE aufgekocht, auf ca. 60 °C abgekühlt und 5 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Die noch flüssige Lösung wurde in 7 x 10 cm große Gelformen gegossen. Zur Erzeugung von 12 bis 14 Aussparungen im Gel (Slots) für die aufzutragenden Produkte wurden Käme von 1,5 mm Stärke verwendet. Nach Verfestigung des Gels wurden je 3,5µl PCR-Produkt und 3x-Ficoll-Ladepuffer in die Taschen pipettiert. Zur Abschätzung der Produktgröße wurde ein Längenstandard (5 µl 100 bp-Leiter) auf das Gel aufgetragen. Bei einer angelegten Spannung von etwa 100 V wurden die Produkte für ca. 30 min. in einer mit 1 x-TBE-Pufferlösung gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt und dann mittels einer UV-Kontaktlampe sichtbar gemacht. Die fluoreszierenden DNA-Banden wurden anschließend mit einer Kamera aufgenommen und mit Hilfe des Programms BioDocAnalyse V 1.0 der Firma Biometra ausgewertet.

### **2.2.3 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz zwischen zwei Oligonukleotidmolekülen (Primer), die gegenläufig an die einander komplementären DNA-Einzelstränge gebunden sind.

Dazu wird die doppelsträngige DNA (ds-DNA) zunächst durch hohe Temperaturen denaturiert. Danach können die im Überschuss zugefügten Primer an die jetzt einzelsträngige DNA binden (Hybridisierung oder Annealing). Die thermostabile DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase, DNA-Polymerase) heftet nun zugefügte Nukleotide (dNTP) an die 3`-OH-Enden der Primer und synthetisiert auf diese Weise komplementäre DNA-Sequenzen (Neusynthese, Extension) (Knippers,



2001, 476). Diese Schritte (Denaturierung, Annealing, Extension) werden zyklisch wiederholt, wobei sich die Zahl der der DNA-Kopien mit jedem Zyklus verdoppelt (Singer, 1992, 408). Es erfolgt eine exponentielle Synthese des spezifischen DNA-Fragmentes in 20 bis 40 Zyklen.

### **2.2.3.1 PCR für SSCP-Analysen**

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 25 µl 50 ng Patienten-DNA, 0,25 U Taq-Polmerase, 10 % (v/v) Taq-Puffer, jeweils 5 nmol der Nukleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP sowie 10 pmol von jedem der beiden Primer. Abweichungen ergaben sich bei Exon 2, Exon 3 und Exon 4 mit der jeweils doppelten Menge an Primern (20 pmol) (Tab.2.1).

Bei einer Heizdeckeltemperatur von 104 °C wurde die DNA zunächst für 5 min. bei einer Blocktemperatur von 95 °C denaturiert, anschliessend erfolgten 30 PCR-Zyklen bestehend aus 1 min. Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing (s. Tab.2.1) und 30 s Extension bei 72 °C. Abgeschlossen wurde die Reaktion mit einer weiteren Extensionsphase von 5 min. bei ebenfalls 72 °C („final extension“). Nach erfolgreicher Reaktion wurden die Produkte mit jeweils 12,5 µl Formamidladepuffer gemischt.

### **2.2.3.2 Restriktion von PCR-Produkten**

Eine weitere Besonderheit ergab sich in Exon 1.1. Aufgrund seiner Größe von 527 bp musste, um deutlichere Ergebnisse in den SSCP zu erzielen, eine Spaltung des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym Msp I in zwei etwa gleichgroße Fragmente (250 + 277 bp) durchgeführt werden. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Volumen von 15 µl 10 µl des PCR-Produktes, 1 µl Msp I (50ng/µl) und 15 % (v/v) Puffer. Anschließend erfolgte ein sechsstündige Inkubation bei 37 °C. Nach erfolgreicher Reaktion wurde das Produkt mit 8 µl Formamidladepuffer gemischt.

Tabelle 2.1 : Primermenge und Annealingtemperatur für die verschiedenen Exons

<b>Primer</b>	<b>Primermenge</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>
Tyr-1.1	10 pmol	56 °C
Tyr-1.2	10 pmol	55 °C
Tyr-2	20 pmol	58 °C
Tyr-3	20 pmol	55 °C
Tyr-4	20 pmol	55 °C
Tyr-5	10 pmol	55 °C

### 2.2.3.3 Primär-PCR für die Sequenzierung

Zur Herstellung von Ausgangsmaterial für die Sequenzanalyse wurde ebenfalls eine PCR zur DNA-Amplifikation durchgeführt. Die Bedingungen entsprachen den oben beschriebenen. Allerdings wurden die Produkte der Primär-PCR nicht mit Formamidladepuffer versetzt.

Zu einer Modifikation kam es in Exon 2. Um die anfangs die Sequenzierung störenden unspezifischen PCR-Produkte zu minimieren, wurde hier eine Annealingtemperatur von 58 °C statt 55 °C gewählt. Durch die höher gewählte Temperatur wurde die Spezifität der Primerbindung an die DNA erhöht (MWG-Biotech Sequencing Brochure: Fartmann et al.,1999).

### 2.2.4 „Single-strand Conformation Polymorphism“ (SSCP)

Die „Single-strand Conformation Polymorphism“-Analyse basiert auf Polyacrylamid-Gelen, die im Gegensatz zur Agarosegelelektrophorese eine extrem differenzierte Auftrennung der PCR-Produkte und somit die Darstellung kleinster DNA-Fragmente ermöglichen. Ein Längenunterschied von einer bis wenigen Basen kann auf diese Weise sichtbar gemacht werden. Unter diesen Bedingungen kann die SSCP zur Darstellung

von Einzelsträngen (ss) angewandt werden. Das fertige Gel zeigt nach Abschluss der Elektrophorese im oberen Bereich in der Regel zwei relativ zarte Banden, die den DNA-Einzelsträngen entsprechen, sowie eine kräftigere Bande im unteren Gelbereich, die den Doppelstrang repräsentiert.

Das Verfahren ermöglicht die Detektion von Veränderungen der DNA-Sequenz, wenn sich die Wildtyp-DNA und solche mit abweichender Basensequenz bezüglich ihres Migrationsverhaltens im elektrischen Feld unterscheiden. Die Ursache für dieses Phänomen liegt in der komplexen Faltung und Schleifenbildung einzelsträngiger DNA zu dreidimensionalen Strukturen: Schon der Austausch einer einzigen Base genügt, um diese Struktur und damit das Laufverhalten des DNA-Fragmentes nachhaltig zu verändern (Sambrook, 2001, 13.49-13.50).

Die SSCP-Sensitivität variiert in Abhängigkeit vom verwendeten Geltyp. Optimale Ergebnisse werden in der Regel mit Acrylamidgelen erzielt, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Elektrophoresebedingungen durch Gelzusätze wie Glycerin (nicht-denaturierend) oder Harnstoff (denaturierend) zu modifizieren. Dabei geht man davon aus, daß die Auftrennung bei Glyceringelen eher nach dem Gesichtspunkt der Konformation und bei Harnstoffgelen eher nach dem Kriterium der Größe des DNA-Abschnittes erfolgt (Sambrook, 2001, 12.74; 13.90).

Da Gele mit Glycerinzusatz im Allgemeinen eine größere Sensitivität bei der Mutationsdetektion zeigen als Harnstoffgele (Sambrook, 2001, 13.90), wurden in dieser Arbeit bei allen Exons SSCP-Analysen mit Glyceringelen durchgeführt.

### **Durchführung:**

In dieser Arbeit wurde mit Glyceringellösung gearbeitet (Zusammensetzung s. Kap.2.1.4).

Durch Zugabe von 219  $\mu\text{mol}$  APS (Ammoniumpersulfat) zu jeweils 75 ml Gellösung wurde der Polymerisationsvorgang gestartet. Dann wurde die Gellösung zwischen zwei Glasplatten von 39 cm x 33 cm bzw. 42 cm x 33 cm Größe gegossen, die mit Hilfe von Spacern auf 0,35 mm Abstand gehalten wurden. Die kleinere der beiden Platten besaß eine Silanbeschichtung. Zur Herstellung der Taschen („Slots“) zum Einpipettieren der Proben wurden 62er Haifischzahnkämme zunächst mit dem „zahnlosen“ Ende ins Gel eingebracht. Nach Abschluss des Polymerisationsvorganges wurde der Kamm gedreht, so daß 62 Geltaschen entstanden. Der zu untersuchende DNA-Abschnitt wurde mittels PCR amplifiziert (s. Kap.2.2.3). Unmittelbar vor der Elektrophorese wurden die Produkte durch eine Kombination aus Formamid und Hitze (5 min. bei 95 °C) denaturiert und auf Eisblöcken gekühlt.

Die Elektrophorese wurde bei 20 W durchgeführt. Die Laufzeiten variierten in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente. Als Anhaltspunkt für die Elektrophoresedauer wurde der Abstand der Xylencyanol-Farbstoffbande von der Unterkante der Glasplatte herangezogen, der zwischen 17 cm und 23 cm liegen sollte (Angaben s. Tab.2.2).

Nach Ende der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, wobei das Acrylamidgel an der nicht-silanisierten Glasplatte haften blieb. Diese Platte wurde dann mit einem hölzernen Rahmen von 32,5 cm x 38 cm versehen. Daraufhin wurde zur Sichtbarmachung der Banden eine Silbernitratfärbung (nach Seyffert, 1998, 978) durchgeführt. Dabei erfolgte zunächst die Fixierung der DNA mit 10 % (v/v) Salpetersäure für 5 min. Anschliessend wurde mit entionisiertem Wasser dreimal gründlich gespült. Daraufhin wurde das Gel für 20 min. mit 11,9 mM Silbernitrat inkubiert, um die Anlagerung von Silberionen an die Nukleinsäureseitenketten zu bewirken. Nach nochmaliger Spülung mit Wasser erfolgte schließlich der Reduktionsvorgang durch Aufbringen einer Reducerlösung (279 mM Natriumcarbonat, 0.0244 % (v/v) Formaldehyd), wodurch die DNA-Banden sichtbar wurden. Durch Zugabe von 10 % Essigsäure für 3 min. wurde der Färbvorgang gestoppt. Das Gel wurde für weitere 5 min. im Wasserbad belassen, bevor es auf Papier geblottet und mit Hilfe einer Vakuumpumpe bei einer Temperatur von 70 °C getrocknet wurde.

Tabelle 2.2: Abstand der Xylencyanol-Farbstoffbande (xc) zur Gelunterkante im Verhältnis zur Fragmentgröße und Laufzeit

Bezeichnung des DNA-Abschnitts	Fragmentgröße	Laufzeit	Abstand der xc-Farbstoffbande zur Gelunterkante (Laufende)
Exon 1.1 (gespalten)	250bp + 277 bp	360 min.	18 cm
Exon 1.2	418 bp	400 min.	20 cm
Exon 2	336 bp	400 min.	17 cm
Exon 3	256 bp	350 min.	19 cm
Exon 4	257 bp	340 min.	19 cm
Exon 5	348 bp	410 min.	17 cm

## 2.2.5 DNA-Sequenzierung mit der Dideoxymethode (F. Sanger, 1977)

### Prinzip:

Die Dideoxymethode wird genutzt, um die Nukleotidsequenz von DNA-Strängen zu ermitteln.

Zur Sequenzierung müssen zunächst sogenannte M13-Sequenzen an das zu untersuchende DNA-Fragment angefügt werden: das erreicht man in der Primär-PCR mit Hilfe von Primern, die die entsprechende Sequenz an ihrem 5'-Ende tragen (s. Kap. 2.1.2). In der Sequenz-PCR werden dann unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffmarkierten M13-Standard-Primern, die sich zu der angehefteten Sequenz komplementär verhalten, wiederum Kopien der Ausgangs-DNA angefertigt.

Dabei wird die eigentliche Sequenzreaktion in vier separaten Ansätzen durchgeführt, welche jeweils die Deoxynukleotide (dNTPs) dATP, dTTP, dGTP, dCTP sowie eines der Dideoxynukleotide (ddNTPs) ddATP, ddTTP, ddGTP oder ddCTP enthalten. Den Dideoxynukleotiden fehlt im Gegensatz zu den Deoxynukleotiden die freie 3'-OH-Gruppe, an die durch die DNA-Polymerase neue Nukleotide angeheftet werden können.

Wird also anstelle eines normalen Nukleotids ein solches Dideoxynukleotid eingebaut, so führt dieses Ereignis unweigerlich zum Kettenabbruch. Da die ddNTPs nach dem Zufallsprinzip in die Kopie eingebaut werden, erhält man am Ende der Reaktion DNA-Ketten aller möglichen Längen, die – abhängig vom Reaktionsansatz – mit Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin enden (Singer, 1992, 368f).

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

Bei ihrer Wanderung durch das Gel passieren die mit fluoreszenzmarkierten Primern versehenen DNA-Fragmente abhängig von ihrer Länge nacheinander eine Laserlichtquelle, die den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Diese Fluoreszenzsignale werden von einem Computer mit geeigneter Software registriert, welche in der Lage ist, daraus die Sequenz der untersuchten DNA zu rekonstruieren (Knippers, 2001, 307f).

## **Durchführung:**

### **2.2.5.1 Primär-PCR**

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

### **2.2.5.2 Aufreinigung**

Auch unter optimierten PCR-Bedingungen wie bei der Primär-PCR kann nach abgelaufener Reaktion der Verbleib von Primer-„Restbestandteilen“ nie vollkommen vermieden werden: „A PCR product is never clean“ (MWG Biotech Sequencing Brochure: Fartmann et al., 1999).

Um bei der Sequenzierung störende und die Interpretation der Ergebnisse erschwerende Hintergrundsignale zu reduzieren, wurden die PCR-Produkte mit Hilfe einer

Ammonium-Acetat-Fällung aufgereinigt. Dafür wurden 25 µl PCR-Produkt mit 25 µl Aqua dest vermischt. Nach Zugabe von 50 µl 3 M Ammonium-Acetat sowie 200 µl Ethanol 100 % wurde der Ansatz anschließend für 30 min. bei – 70 °C gekühlt. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 12000 rpm für 10 min. Anschließend wurde der Ethanolüberstand abpipettiert, das Pellet mit 100 µl Ethanol 70 % vermischt und für 5 min. bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und das Pellet bei 56 °C kurz getrocknet. Die nun gefällte DNA wurde in 10 µl Aqua dest gelöst.

Das Ziel bei der Ammonium-Acetat-Fällung ist, dass restliche Primer im Überstand verbleiben und durch Zentrifugation und Abpipettieren von dem eigentlichen PCR-Produkt getrennt werden.

Um nach der Aufreinigung sicherzustellen, dass noch genügend DNA-Material für eine Sequenzierung vorhanden war, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

### **2.2.5.3 Sequenz-PCR:**

Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion erfolgt mit dem SequiTherm EXCEL II DNA-Sequencing-Kit-LC für 25-41 cm große Gele (Epicentre). Für jeden zu sequenzierenden DNA-Einzelstrang wurden vier Reaktionsgefäße vorbereitet, in die je 2 µl SequiTherm ECXEL II-LC Terminations-Mix A, T, G oder C vorgelegt wurden. Der Terminations-Mix enthielt jeweils 45 µM dATP, dTTP, dGTP und dCTP sowie 450 µM ddATP (Mix A) oder ddTTP (Mix T) oder ddGTP (Mix G) oder ddCTP (Mix C). Da jede DNA-Probe zur Absicherung des Ergebnisses doppelsträngig sequenziert wurde, waren pro Patient 2 x 4 Ansätze nötig. Für jeden Ansatz wurden 4 µl aus folgendem Mix (Gesamtvolumen 17 µl) pipettiert:

7,2 µl 3,5 SequiTherm EXCEL II Sequencing Buffer

+ 2 µl M13 gelabelter Primer (1pmol/µl)

+ 6,8 µl PCR-Produkt

+ 1  $\mu$ l SequiThermEXCEL II DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l).

Nach kurzem Zentrifugieren der vorbereiteten PCR-Ansätze wurde die eigentliche Sequenzierungsreaktion auf dem Biometra UNO II-Thermocycler gestartet: bei einer Heizdeckeltemperatur von 104 °C zunächst 5 min. Denaturierung bei 94 °C, dann 30 Zyklen bestehend aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 60 °C und 1 min. Extension bei 72 °C. Abschließend erfolgte die Abkühlung auf 4 °C bis zur Entnahme der Proben, die mit je 3  $\mu$ l Stop-Solution aus dem Sequencing-Kit versetzt, lichtgeschützt verpackt und bis zur Durchführung der Acrylamidgelelektrophorese bei - 20 °C eingefroren wurden.

#### **2.2.5.4 Acrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der Sequenz-PCR-Produkte**

Die Auftrennung der erhaltenen Sequenz-Produkte wurde mit dem LI-COR DNA Sequencer 4000 durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden LI-COR-Glasplatten von 41 cm Länge mit 0,2 mm starken Spacern zusammengesetzt und fixiert. Es wurden 45 ml 6 % Sequenziergel-Lösung abgemessen, mit 131  $\mu$ mol APS versetzt und in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten gegossen. Anschließend wurde ein ebenfalls 0,2 mm starker 48well Haifischzahnkamm mit der zahntragenden Seite vom Gel abgewandt eingelegt und mit einer „Casting Plate“ gesichert. Nach erfolgter Polymerisation des Gels wurde die „Casting Plate“ entfernt und durch eine Pufferkammer ersetzt. Der Kamm wurde gedreht, so dass nun die Zähne ins Gel ragten. Die Platten wurden unter Verwendung von Wasser und Ethanol 100 % sorgfältig gereinigt und in das LI-COR-Sequenziergerät eingehängt, die Pufferkammer wurde mit 1x-TBE-Puffer gefüllt.

Die Sequenz-PCR-Produkte wurden für 5 min. bei 95 °C denaturiert und in die 48 Taschen des Gels pipettiert, wobei die Reihenfolge ATGC (Terminations-Mix, s.o.) stets eingehalten wurde. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 2000 V durchgeführt, die Registrierung der fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente erfolgt bei einer Wellenlänge von 800 nm. Nach Ende des Laufes wurden das Ergebnis mit Hilfe



---

des Sequenzprogrammes ausgewertet. Die erhaltene Sequenz wurde mit dem Eintrag in der NCBI-Datenbank abgeglichen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 DNA-Proben

In Kooperation mit Frau PD Dr. med. Käsmann-Kellner aus der Augenklinik der Universität des Saarlandes wurden an der Universität Lübeck 176 unabhängige Vollblutproben von Patienten mit Albinismus unbekannter Ursache gesammelt. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse des Tyrosinase-Gens dargestellt.

Bei Aufnahme dieser Arbeit lagen die DNA-Proben bereits in isolierter Form vor. Um in den molekulargenetischen Untersuchungen exakte Ergebnisse zu erhalten, wurden die DNA-Proben zunächst durch Zugabe von Aqua dest. auf vergleichbare Konzentrationen von 10 ng/ $\mu$ l verdünnt. Die DNA-Konzentrationen wurde unter Anwendung der Agarosegelelektrophorese verglichen. Ziel war es, auf den Agarosegelen etwa gleichstarke Fluoreszenzsignale der verdünnten DNA-Proben (Banden) nachzuweisen (Abb. 3.1).

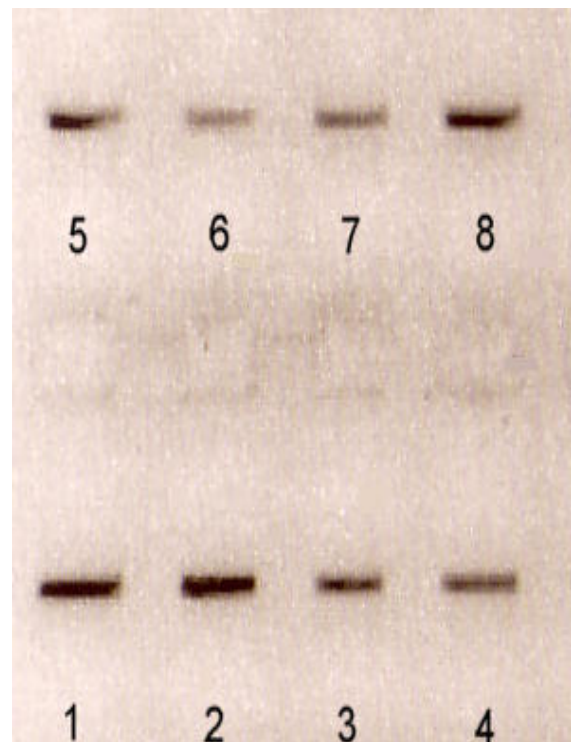


Abbildung 3.1: Darstellung der verdünnten DNA-Proben auf Agarosegel (1,5 %), 1....8 individuelle Proben.

### 3.2 SSCP-Analyse

Zunächst erfolgte die exonspezifische Amplifikation der DNA-Proben mittels PCR (Kap.2.2.3). Zum Nachweis der PCR-Produkte wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Bei erfolgreicher Reaktion konnten die PCR-Produkte im UV-Licht als fluoreszierende Banden nachgewiesen werden (Abb. 3.2.1). Zur Abschätzung der Produktgröße wurde pBR322 Msp I als Marker aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden für SSCP-Analysen eingesetzt.

Wie bereits in Kap. 2.2.3.2 erwähnt, wurde aufgrund der Größe von 527 bp in Exon 1.1 eine Restriktion der PCR-Produkte mit Msp I durchgeführt, um deutlichere Ergebnisse in den SSCP-Analysen zu erhalten. Ziel war es, zwei etwa gleichgroße Fragmente von 250 + 277 bp zu erhalten. Der Erfolg der Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert (Abb. 3.2.2).

Abbildung 3.2: Agarosegele (1,5 %) für die Proben 1 - 5

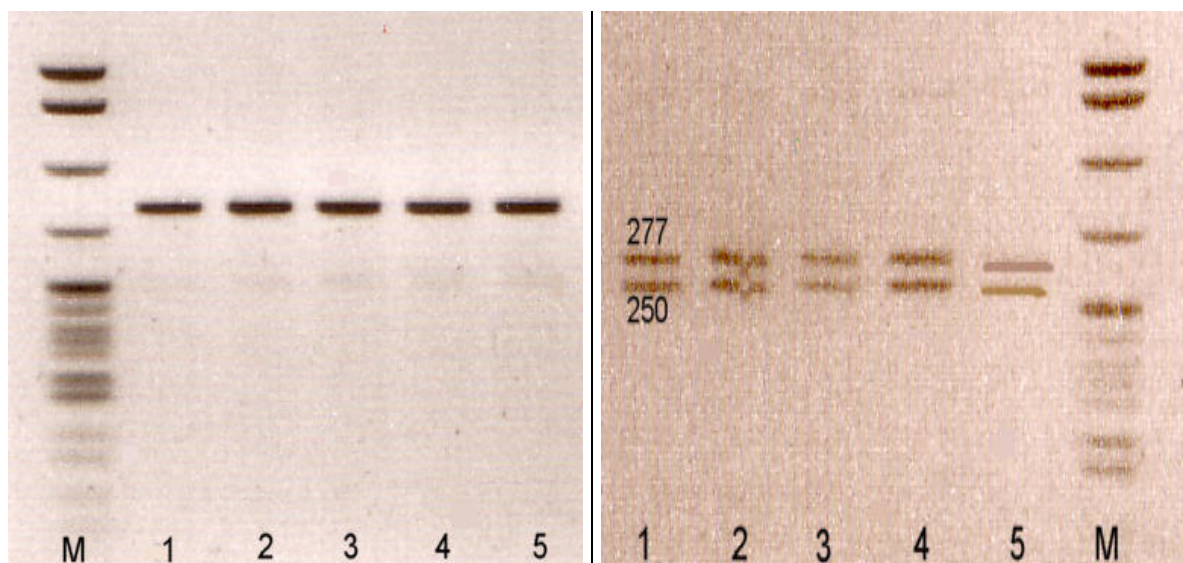


Abb. 3.2.1: Exon 2:

Exemplarische Darstellung eines Agarosegels zum Nachweis der PCR-Produkte.

Abb. 3.2.2: Exon 1.1:

Restriktion des PCR-Produkts aus Exon 1.1 mit Msp I. Es entstehen Fragmente mit 250 bzw. 277 bp Länge.

M: Marker pBR322 Msp I

1...5: Aufgetragene Produkte

Danach erfolgte die SSCP-Analyse (Kap. 2.2.4) der 176 DNA-Proben (352 Allele) der 5 Exons des Tyrosinase-Gens. Dabei war es das Ziel, auffällige DNA-Proben zu detektieren. Die Laufzeit der Elektrophorese in Abhängigkeit zur Fragmentgröße ist in Kap. 2.2.4, Tab. 2.2 dargestellt. Die anschließende Auswertung der Polyacrylamidgels wurde folgendermaßen durchgeführt:

Zunächst erfolgte die Auswertung der doppelsträngigen Fragmente (ds) nach Wildtyp (unauffällig) und im Vergleich dazu auffälligen Fragmenten. Beim Wildtyp zeigen die doppelsträngigen Fragmente eine kräftig angefärbte Bande im unteren Teil des Gels. Als „auffällig“ wurde gewertet, wenn zwei oder mehr ds-Fragmente vorlagen (Abb. 3.3). Das Vorgehen bei der Beurteilung der einzelsträngigen Fragmente (ss) erfolgte entsprechend. Bei den Einzelsträngen stellen sich beim Wildtyp im oberen Teil des Gels zwei hellere Banden dar. Als „auffällig“ wurde gewertet, wenn drei oder mehr Banden oder zwei Banden mit abweichendem Laufverhalten sichtbar wurden (Abb.3.3).

Abbildung 3.3: Exon 1.2: Exemplarische Darstellung eines Polyacrylamidgels (6 % Glycerin)



ds: doppelsträngige DNA-Fragmente (double-strands)

ss: einzelsträngige DNA-Fragmente (single-strands)

### 3.2.1 Auswertung der SSCP-Analyse

Die Auswertung aller SSCP-Analysen der 176 DNA-Proben ergab Auffälligkeiten bei insgesamt 105 Patienten (59,6 %). Es zeigten sich 27 Auffälligkeiten in Exon 1, 19 Auffälligkeiten in Exon 2, 23 Auffälligkeiten in Exon 3, 63 Auffälligkeiten in Exon 4 und 20 Auffälligkeiten in Exon 5. Die Anzahl der Auffälligkeiten pro Patient sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Auffälligkeiten in den Exons 1-5 nach SSCP-Analysen

Exon	Anzahl der Auffälligkeiten
1	27
2	19
3	23
4	63
5	20

Tabelle 3.2: Übersicht der Anzahl der Variationen/Person im Tyrosinase-Gen

Personen	Anzahl der Auffälligkeiten
66 von 176	1 (37,5 %)
36 von 176	2 (20,5 %)
2 von 176	3 (1,1 %)
1 von 176	4 (0,6 %)
<b><math>\Sigma</math> 105 Patienten</b>	

### 3.3 DNA-Sequenzierung

Im Anschluss an die SSCP-Analysen galt es, die 105 auffälligen DNA-Proben zu sequenzieren (Kap. 2.2.5).

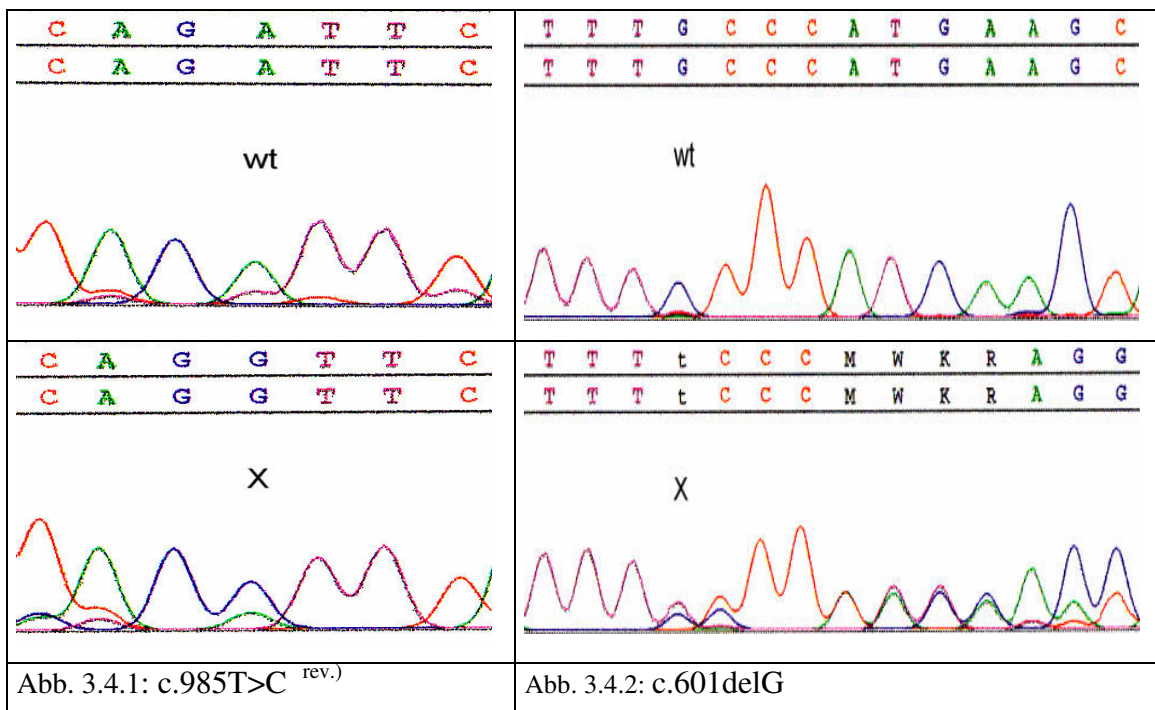
Die so ermittelten Nukleotidsequenzen wurden mit dem Datenbankeintrag verglichen (GenBank reference sequences NM\_000372.1). Ziel war es, zwischen Mutationen und Polymorphismen zu unterscheiden. Die Klassifizierung bisher nicht veröffentlichter Mutationen wurde nach der internationalen Nomenklatur durchgeführt. Bei den Sequenzveränderungen erfolgte eine Einteilung nach Art der Mutation:

- Substitution
- Deletion, Insertion
- Splice-site-Mutation
- Nonsense-Mutation (Stop-Mutation).

### 3.3.1 Ergebnisse der DNA-Sequenzierung

Anhand Abbildungen 3.4 und 3.5 werden exemplarisch 4 DNA-Veränderungen dargestellt, wie sie in den Sequenzierungen sichtbar wurden:

Abbildung 3.4: Sequenzdarstellung zweier Mutationen



3.4.1: Sustitution T>C

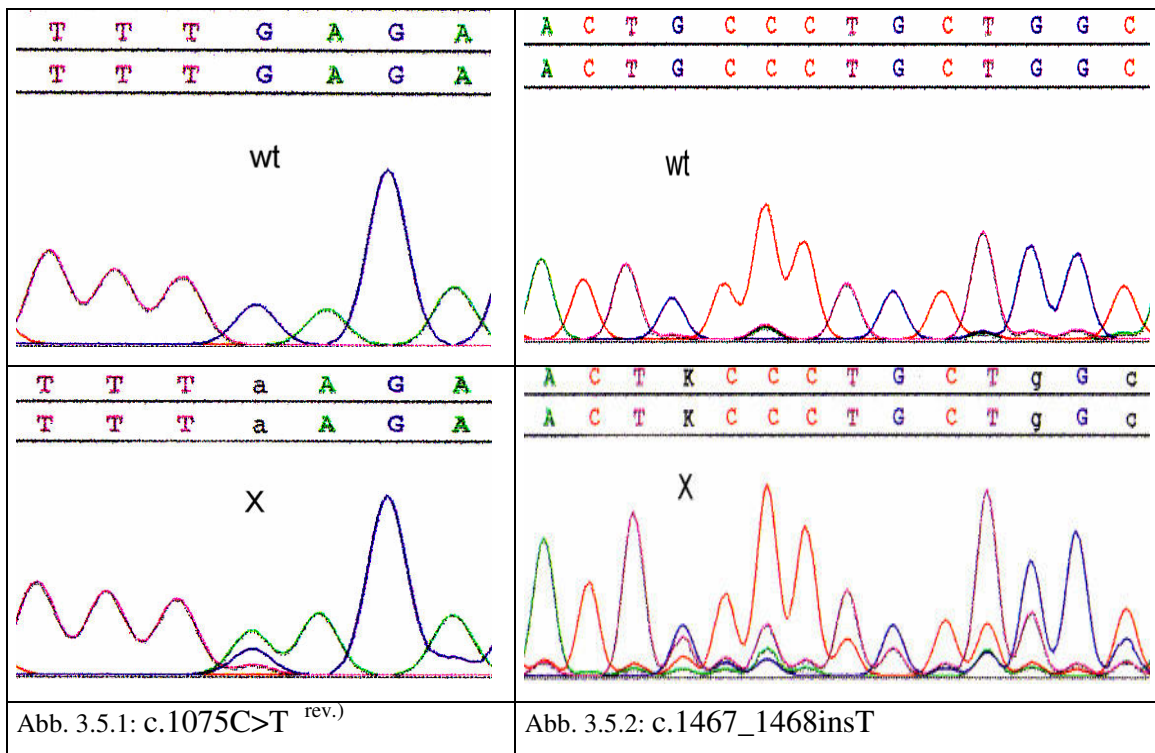
3.4.2: Deletion G (Frameshift-Mutation)

wt: Wildtyp

X: Position der DNA-Veränderung

<sup>rev</sup> Darstellung im Gegenstrang

Abbildung 3.5: Sequenzdarstellung zweier Mutationen



3.5.1: Substitution C&gt;T

3.5.1: Insertion T (Frameshift-Mutation)

wt: Wildtyp

X: Position DNA-Veränderung

<sup>rev</sup> Darstellung im Gegenstrang

Die DNA-Veränderungen wurden mit Datenbanken verglichen und in Mutationen (Tab. 3.3) und Polymorphismen (Tab. 3.4) unterteilt. Als Wildtyp-DNA wurde die Nukleotidsequenz nach GenBank references NM\_000372.1 herangezogen. Konnten bei der Sequenzierung keine eindeutigen Nukleotide dargestellt werden, so wurden zur Auswertung die vom Hersteller angegebenen IUPAC Ambiguity Codes verwendet. Diese sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 3.3: DNA-Variationen und Auswirkung auf Protein-Ebene

Patienten-Nr.	Exon	Änderung auf cDNA-Ebene	Änderung auf Protein-Ebene	Referenz
7397	1.2	c.601delG	p.Ala201fsX24	Z

	3	c.1063G>C	p.Ala355Pro	Z
	4	c.1217C>T	p.Pro406Leu	1
	4	c.1271C>T	p.Ser424Phe	Z
	4	c.1303A>G	p.Asn435Asp	Z
7398	1.2	c.601delG	p.Ala201fsX24	Z
	4	c.1255G>A	p.Gly419Arg	1
7405	1.1	c.140G>A	p.Gly47Asp	1
	1.2	c.766C>T	p.His256Tyr	2
	2	c.913G>A	p.Asp305Asn	Z
7406	1.1	c.230G>A	p.Arg77Gln	1
	5	c.1167_1168insT	p.His390fsX4	Z
	5	c.1501_1502insC	p.Arg501fsX8	3
7412	1.1	c.236C>T	p.Ser79Leu	Z
	4	c.1183A>C	p.Ser395Arg	Z
	4	c.1214G>T	p.Arg405Leu	Z
7417	1.2	c.346C>T	p.Arg116X	1
	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z
	4	c.1331A>G	p.Asp444Gly	Z
7418	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
7419	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
7423	1.1	c.74_75insT	p.Ser26fsX2	1
	1.2	c.719A>T	p.Asp240Val	Z
7424	1.2	c.707G>T	p.Trp236Leu	Z
	2	c.865T>C	p.Cys289Arg	4
	3	c.1147G>A	p.Asp383Asn	1
7425	4	c.1331A>G	p.Asp444Gly	Z
	5	c.1467_1468insT	p.Ala490fsX19	1
7427	4	c.1193A>T	p.Glu398Val	Z
	4	c.1331A>G	p.Asp444Gly	Z
7431	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
	4	c.1331A>G	p.Asp444Gly	Z



7433	4	c.1209G>C	p.Arg403Ser	5
	4	c.1210C>A	p.His404Asn	Z
7434	4	c.1265G>A	p.Arg422Gln	3
7435	4	c.1205G>A	p.Arg402Gln	6
7437	4	c.1280T>G	p.Val427Gly	Z
7438	4	c.1193A>T	p.Glu398Val	Z
	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7440	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
	4	c.1214G>T	p.Arg405Leu	Z
7448	1.1	c.130A>C	p.Ser44Arg	Z
	4	c.1183A>C	p.Ser395Thr	Z
	4	c.1214G>T	p.Arg405Leu	Z
7449	4	c.1214G>T	p.Arg405Leu	Z
7450	2	c.1034A>G	p.Glu345Gly	Z
7453	2	c.953T>A	p.Val318Glu	Z
7456	1.1	c.204A>T	p.Gln68His	Z
	1.1	c.230G>A	p.Arg77Gln	1
7457	3	c.1164delT	p.His389fsX95	5
7470	3	c.1075C>T	p.Gly395X	7
7471	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7472	3	c.1164delT	p.His389fsX95	5
7475	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
	4	c.1246G>T	p.Ala165Ser	Z *3)
7480	4	c.1193A>T	p.Glu398Val	Z
	4	c.1214G>T	p.Arg405Leu	Z
7481	3	c.1118C>A	p.Thr373Lys	1
	4	c.1342G>A	p.Asp448Asn	1
7482	4	c.1205G>A	p.Arg402Gln	6
7484	1.2	c.538C>A	p.His180Asn	Z
	1.2	c.595G>A	p.Asp199Asn	Z
	4	c.1193A>T	p.Glu398Val	Z

7487	1.1	c.230G>A	p.Arg77Gln	1
	1.1	c.236C>T	p.Ser79Leu	Z
7488	2	c.820-2delA	Splice site mutation	Z
7489	5	c.1467_1468insT	p.Ala490fsX19	1
7490	3	c.1177G>T	p.Val393Phe	4
7492	4	c.1205G>T	p.Arg402Leu	Z
7497	1.1	c.73G>T	p.Val25Phe	Z
	1.1	c.139G>T	p.Gly47Cys	Z
	2	c.995T>C	p.Met332Thr	1
7498	3	c.1087C>T	p.His363Thr	Z
7499	3	c.1087C>T	p.His363Tyr	Z
7500	1.1	c.230G>A	p.Arg77Gln	1
	1.1	c.344_345delGA	p.Arg115fsX52	1
7502	2	c.985T>C	p.Ser392Pro	Z
7503	2	c.985T>C	p.Ser392Pro	Z
7504	3	c.1177G>T	p.Val393Phe	4
	3	c.1180delG	p.Asp394fsX90	Z
	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
	4	c.1204C>T	p.Arg402X	1
	4	c.1209G>C	p.Arg403Ser	5
7508	4	c.1224A>C	p.Gln408His	Z
7509	3	c.1118C>A	p.Thr373Lys	1
	3	c.1132C>A	p.Gln378Lys	Z
	5	c.1467_1468insT	p.Ala490fsX19	1
	5	c.1501_1502insC	p.Arg501fsX8	3
7512	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7513	3	c.1118C>A	p.Thr373Lys	1
	3	c.1132C>A	p.Gln378Lys	Z
7515	3	c.1118C>A	p.Thr373Lys	1
	5	c.1467_1468insT	p.Ala490fsX19	1
7520	3	c.1184 +3T>G	Splice site mutation	Z *2)

7521	3	c.1184 +3T>G	Splice site mutation	Z *2)
7523	2	c.985T>C	p.Ser329Pro	Z
	4	c.1227A>C	p.Glu409Asp	Z
7524	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7526	1.2	c.463A>T	p.Thr155Ser	Z
	2	c.985T>C	p.Ser329Pro	Z
7527	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7528	1.1	c.230G>A	p.Arg77Gln	1
	1.1	c.242C>T	p.Pro81Leu	1
	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
	4	c.1331A>G	p.Asp444Gly	Z
7530	4	c.1280T>G	p.Val427Gly	Z
7534	1.2	c.529G>T	p.Val177Phe	Z
	1.2	c.538C>A	p.His180Asn	Z
	1.2	c.649_650CG>TC	p.Arg217Ser	Z
7535	1.2	c.529G>T	p.Val177Phe	Z
	1.2	c.601G>T	p.Ala201Ser	Z
	2	c.842delA	Splice site mutation	Z
7537	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
	4	c.1301G>T	p.Arg434Ile	Z
7543	4	c.1331A>G	p.Asp444Gly	Z
7550	1.1	c.202C>A	p.Gln68Lys	Z
	1.1	c.230G>A	p.Arg77Gln	1
	1.1	c.236C>T	p.Ser79Leu	Z
7551	1.1	c.86A>C	p.Asn29Thr	Z
	1.1	c.130A>G	p.Ser44Gly	Z
	1.1	c.236C>T	p.Ser79Leu	Z
7556	1.2	c.728A>C	p.Lys243Thr	Z
7563	3	c.1063G>C	p.Ala355Pro	Z
7565	1.2	c.529G>T	p.Val177Phe	Z
	1.2	c.535A>T	p.Met179Leu	Z

7566	4	c.1277T>A	p.Met426Lys	Z
7568	4	c.1214G>T	p.Arg405Leu	Z
7569	2	c.820-2delA	Splice site mutation	Z
	4	c.1277T>A	p.Met426Lys	Z
7570	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7575	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7577	5	c.1467_1468insT	p.Ala490fsX19	1
7578	4	c.1237G>T	p.Glu413X	Z
	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7582	4	c.1205G>A	p.Arg402Gln	6
		c.1209G>T	p.Arg403Ser	5
7584	4	c.1210C>A	p.His404Asn	Z
7585	4	c.1271C>T	p.Ser424Phe	Z
7586	4	c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z *3)
7591	3	c.1118C>A	p.Thr373Lys	1
7592	3	c.1118C>A	p.Thr373Lys	1
	4	c.1250C>A	p.Pro417His	Z
7593	4	c.1224A>C	p.Gln408His	Z
	4	c.1205G>A	p.Arg402Gln	6
	4	c.1265G>A	p.Arg422Gln	3
7627	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
7630	2	c.820-2delA	Splice site mutation	Z
7631	4	c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z *3)
	4	c.1214G>T	p.Arg405Leu	Z
	5	c.1467_1468insT	p.Ala490fsX19	1
	5	c.1501_1502insC	p.Arg501fsX8	3
7634	3	c.1118C>A	p.Thr373Lys	1
7670	1.1	c.236C>T	p.Ser79Leu	Z
	1.1	c.242C>T	p.Pro81Leu	1
	2	c.985T>C	p.Ser329Pro	Z
7671	2	c.985T>C	p.Ser329Pro	Z

	4	c.1217C>T	p.Pro406Leu	1
7672	1.1	c.130A>C	p.Ser44Arg	Z
	1.1	c.236C>T	p.Ser79Leu	Z
	1.1	c.242C>T	p.Pro81Leu	1
	4	c.1217C>R	p.Pro406Leu	1
7717	5	c.1467_1468insT	p.Ala490fsX19	1
	5	c.1501_1502insC	p.Arg501fsX8	3

Nukleotidposition nach: GenBank reference sequences NM\_000372.1,

<sup>2</sup> Splice Site Mutation in einer Familie mit 2 betroffenen Kindern

<sup>3</sup> Häufigkeit könnte auf Polymorphismus hindeuten

Z: zuvor nicht veröffentlichte Mutationen

Literaturangaben:

1: King et al., 2003; 2: Camand et al., 2001; 3: Giebel et al., 1991; 4: Oetting et al., 1998;

5: Tripathi et al., 1992; 6: Morell et al., 1997; 7: Spritz et al. 1997.

Tabelle 3.4: Polymorphismen im Tyrosinase-Gen

<b>Patienten Nr.</b>	<b>Exon</b>	<b>Änderung auf cDNA-Ebene</b>	<b>Änderung auf Proteine-Ebene</b>	<b>Referenz</b>
7405	1.2	c.575C>A	p.Ser192Tyr	*4)
7406 <sup>*3)</sup>	5	c.1413G>A	(p.Ala471)	P
<sup>*3)</sup>	5	c.1446G>C	(p.Ala482)	P
7423	1.2	c.575C>A	p.Ser192Tyr	*4)
7424	3	c.1137A>T	(p.Gly379)	P
	4	c.1368A>T	(p.Gly456)	P
7427	4	c.1368T>G	(p.Gly456)	P
7431	4	c.1368A>T	(p.Gly456)	P
7484	1.2	c.575C>A	p.Ser192Tyr	*4)
7490	4	c.1206A>C	(p.Arg402)	P
7556	1.2	c.575C>A	p.Ser192Tyr	*4)
7627	4	c.1338C>G	(p.Gly446)	P

Nukleotidposition nach: GenBank reference sequences NM\_000372.1,

<sup>4</sup> Polymorphismus nach Giebel und Spritz, 1990

P: zuvor nicht veröffentlichte Polymorphismen

<sup>3</sup>: treten in den Proben 7406, 7425, 7448, 7449, 7453, 7454, 7472, 7482, 7485, 7489, 7507, 7509, 7515, 7522, 7530, 7551, 7577, 7626, 7631, 7717 gekoppelt auf.

Bei 94 der 105 in den SSCP-Analysen auffälligen Personen konnten DNA-Veränderungen mittels der Sequenzanalyse nachgewiesen werden. Dabei wurden insgesamt 213 Veränderungen gefunden. Die Veränderungen bestanden zum größten Teil aus Mutationen. Es wurden 6 verschiedene DNA-Polymorphismen nachgewiesen, die keine Veränderung der codierten Aminosäure verursachen.

Bei 89 der 94 Personen mit DNA-Veränderungen wurden Mutationen mit Veränderungen auf Aminosäure-Ebene detektiert (94,7 %). Bei fünf der 94 Personen (7454, 7485, 7507, 7522, 7626) wurden nur Polymorphismen ohne Veränderung der Aminosäuresequenz nachgewiesen (5,3 %). Insgesamt konnten bei 29 Personen Polymorphismen dargestellt werden.

Bei 34 der 94 Personen wurde auf cDNA-Ebene eine einzelne Veränderung (36,2 %), bei 28 Personen 2 Veränderungen (29,8 %), bei 18 Personen 3 Veränderungen (19,1 %) und bei jeweils 7 Personen 4 und 5 Veränderungen ( 7,4 %) (Tab. 3.5) identifiziert. Bei 89 Personen fanden sich Veränderungen auf Aminosäure-Ebene. Hier wiesen 42 Personen lediglich eine Veränderung auf (47,2 %), 26 Personen 2 (29,2 %), 13 Personen 3 (14,6 %), 6 Personen 4 (6,7 %), 2 Personen 5 (2,2 %).

Tabelle 3.5: Anzahl der Veränderungen auf cDNA- bzw. Aminosäure-Ebene

<b>DNA-Veränderungen</b>	<b>Personen</b>	<b>Veränderung der Aminosäuren</b>	<b>Personen</b>
1	34	1	42
2	28	2	26
3	18	3	13
4	7	4	6
5	7	5	2
<b>Σ</b>	<b><u>94</u></b>	<b>Σ</b>	<b><u>89</u></b>

Die Patienten mit 3 bis 5 DNA-Variationen im Tyrosinase-Gen, die Auswirkungen im Protein verursachen, sind in Tab. 3.6 zusammen gefasst.

Tabelle 3.6: Aminosäureveränderungen bei Patienten mit 3 bis 5 DNA-Veränderungen im Tyrosinase-Gen

Patienten Nr.	Aminosäureveränderungen				
	7397 (5M)	p.Ala210fsX24	p.Ala355Pro	p.Pro406Leu	p.Ser424Phe
7504 (5M)	p.Val393Phe	p.Asp394fsX90	p.Glu398Ala	p.Arg402X	p.Arg403Ser
7405 (4M)	p.Gly47Asp	p.His256Tyr	p.Asp305Asn	p.Ser192Tyr	
7484 (4M)	p.His180Asn	p.Asp199Asn	p.Glu398Val	p.Ser192Tyr	
7509 (4M)	p.Thr373Lys	p.Gln378Lys	p.Ala490fsX19	p.Arg501fsX8	
7528 (4M)	p.Arg77Gln	p.Pro81Leu	p.Glu398Ala	p.Asp444Gly	
7631 (4M)	p.Glu398Ala	p.Arg405Leu	p.Ala490fsX19	p.Arg501fsX8	
7672 (4M)	p.Ser44Arg	p.Ser79Leu	p.Pro81Leu	p.Pro406Leu	
7423 (3M)	p.Ser26fsX2	p.Asp240Val	p.Ser192Tyr		
7424 (3M)	p.Trp236Leu	p.Cys289Arg	p.Asp383Asn		
7406 (3M)	p.Arg77Gln	p.His390fsX4	p.Arg501fsX8		
7448 (3M)	p.Ser44Arg	p.Ser395Thr	p.Arg405Leu		
7551 (3M)	p.Asn29Thr	p.Ser44Gly	p.Ser79Leu		
7412 (3M)	p.Ser79Leu	p.Ser395Arg	p.Arg405Leu		
7417 (3M)	p.Arg116X	p.Glu398Ala	p.Asp444Gly		
7497 (3M)	p.Val25Phe	p.Gly47Cys	p.Met332Thr		
7534 (3M)	p.Val177Phe	p.His180Asn	p.Arg217Ser		
7535 (3M)	p.Val177Phe	p.Ala201Ser	p.Glu281fsX37		
7550 (3M)	p.Gln68Lys	p.Arg77Gln	p.Ser79Leu		
7593 (3M)	p.Gln408His	p.Arg402Gln	p.Arg422Gln		
7670 (3M)	p.Ser79Leu	p.Pro81Leu	p.Ser329Pro		

(...M): gibt die Anzahl der Mutationen an

In den 94 sequenzierten DNA-Proben wurden insgesamt 163 Mutationen nachgewiesen. Dabei handelt es sich um 140 einzelne Nukleotidaustausche; 10 Deletionen und 13 Insertionen. Bei den Aminosäureveränderungen fanden sich 134 Missense-Mutationen,

19 Frameshift-Mutationen, 6 Splice site-Mutationen und 4 Nonsense-Mutationen. Knapp 68 % der in dieser Arbeit sequenzierten Mutationen waren zuvor noch nicht beschrieben worden. Bei den 213 cDNA-Veränderungen handelt es sich um 80 Variationen, die sich aus 73 Mutationsvarianten und 7 Polymorphismenvarianten zusammensetzen. Bei keiner Person lagen die cDNA-Variationen homozygot vor.

Als eine Besonderheit fanden sich unter den 163 Mutationen vier mal der Austausch c.575C>A, der zum Aminosäureaustausch p.Ser192Tyr führt. Diese Variante wird nach Giebel und Spritz als Polymorphismus definiert (Giebel und Spritz, 1990).

Insgesamt wurden 6 verschieden DNA-Polymorphismen in 46 Allelen identifiziert, die keine Auswirkung auf die Aminosäure-Sequenz verursachen. Keiner dieser Polymorphismen war zuvor beschrieben worden.

Tabelle 3.7: Aminosäureveränderungen bei Patienten mit 3 bis 5 DNA-Veränderungen im Tyrosinase-Gen

<b>Art der Mutation</b>	<b>Anzahl</b>	<b>davon zuvor nicht veröffentlicht</b>
Missense-Mutation	134	97
Frameshift	19	5
Splice site	6	6
Nonsense-Mutation	4	1
<b>Σ</b>	<b><u>163</u></b>	<b><u>109</u></b>
<b>Anzahl der Polymorphismen</b>		<b>davon zuvor nicht veröffentlicht</b>
ohne Veränderung der Aminosäure: 6		5
mit Veränderung der Aminosäure : 1		( )



## 4 Diskussion

Inhalt dieser Arbeit war die molekulargenetische Analyse von Personen, die von der Pigmentstoffwechselkrankheit Albinismus betroffen sind. Dazu wurden die Proben von 176 nicht-verwandten Personen auf Variationen des Tyrosinase-Gens untersucht. Die 5 Exons des Tyrosinase-Gens wurden unter Anwendung der PCR amplifiziert und mittels der SSCP-Technik nach elektrophoretisch auffälligen Fragmente gesucht. Die Nukleotidsequenz der ausgewählten Proben wurde ermittelt und mit dem Eintrag in der NCBI-Datenbank (GenBank reference sequences NM\_000372.1) abgeglichen. Veränderungen der cDNA wurden nach der internationalen Nomenklatur benannt und zwischen Mutationen und Polymorphismen unterschieden.

Bei der Auswertung der SSCP-Analysen wurden „Auffälligkeiten“ bei insgesamt 105 der 176 DNA-Proben ermittelt (59,6 %). Die Anzahl der ermittelten Auffälligkeiten lag zwischen 63 Auffälligkeiten in Exon 4 und 19 Auffälligkeiten in Exon 2.

Die Sequenzierung zeigte bei 94 Patienten DNA-Variationen. Die Differenz zu den 105 „Auffälligkeiten“ in den SSCP-Analysen erklärt sich dadurch, dass zum einen 6 fraglich „auffällige“ Proben sequenziert wurden, die sich als Wildtyp darstellten. Von 5 Proben konnte keine auswertbare Sequenzdarstellung gewonnen werden. Somit konnten in diesem Albinismus-Projekt bei 53 % der Patienten DNA-Variationen im Tyrosinase-Gen nachgewiesen werden.

Bei 213 DNA-Variationen, die im Tyrosinase-Allelen entdeckt wurden, handelt es sich um 190 Nukleotid-Substitutionen, die zu Missense-Mutationen (134), Nonsense-Mutationen (4) und Polymorphismen (7) führen. Desweiteren wurden 13 Insertionen und 10 Deletionen gefunden.

54 cDNA-Veränderungen traten jeweils bei nur einer Person auf, es handelt sich um sogenannte „private mutations“. Dies ist ein Hinweis darauf, dass im Tyrosinase-Gen zahlreiche Veränderungen vorliegen, die möglicherweise zu einer Veränderung der Aktivität des Proteins führen. Nicht bekannt ist, wie diese Verteilung in den verschiedenen Populationen und ethnischen Gruppen unterschiedlicher Hautfarbe ist.

Hierzu müssten Untersuchungen von Kontrollgruppen z.B. aus Nord-, Mittel- und Südeuropa durchgeführt werden.

Der OCA 1 war die häufigste Form des Albinismus in dieser Studie (53%). Das untersuchte Kollektiv war nicht vorselektioniert (persönliche Mitteilung Frau PD Dr. Zühlke). Im Vergleich liegt dieser Wert deutlich höher als in internationalen Studien, in denen OCA 2 als häufigste Form des Albinismus weltweit und besonders häufig bei Afrikanern (1:10.000) und Afroamerikanern beschrieben wird (Lund et al., 1997). Mutationen (21) im P-Gen (OCA 2) wurden im Rahmen dieses Projektes (Zühlke et al., 2004) verglichen mit internationalen Veröffentlichungen eher selten gefunden. Populationsspezifische Untersuchungen zu Mutationen und Polymorphismen werden am hiesigen Institut für Humangenetik vorbereitet.

Insgesamt wurden 7 verschiedene Polymorphismen nachgewiesen, von denen 6 nicht publiziert waren. Bei diesen handelt es sich um DNA-Polymorphismen (single nucleotide polymorphismen, SNP) ohne Einfluss auf die codierte Aminosäure. Der von Giebel und Spritz 1990 klassifizierte Protein-Polymorphismus (p.Ser192Tyr) wurde viermal gefunden. Die zuvor nicht publizierten cDNA-Veränderung c.1193A>C und c.1246G>T führen zum Aminosäureaustausch p.Glu398Ala und p. Ala416Ser. Sie können als häufige Mutation eingestuft werden. Andererseits ist ihr gehäuftes Auftreten bei jeweils 11 Personen (11 von 352 Allelen=3,1 %) auch mit einem Polymorphismus vereinbar.

Ein weiteres hervorzuhebendes Ergebnis dieser Arbeit sind die zuvor nicht veröffentlichten DNA-Polymorphismen c.1413G>A und c.1446G>C. In beiden Fällen bildet Alanin an dieser Position die codierte Aminosäure und durch die cDNA-Veränderung kommt es zu keinem Aminosäureaustausch (p.Ala471 bzw. p.Ala482). Beiden Polymorphismen treten bei insgesamt bei 20 Personen (20 von 352 Allelen=5,7 %) zusammen auf, bei keiner Person liegt nur einer der Polymorphismen vor. Es handelt sich demnach um einen gekoppelten Polymorphismus. Desweiteren fällt auf, dass alle Personen mit der Frameshift-Mutation c.1467\_1468insT den gekoppelten Polymorphismus tragen. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Insertion auf dem Allel c.1413A und c.1446C entstanden und auf einen gemeinsamen Vorfahren

zurückzuführen ist. Um die Verknüpfung spezifischer Mutationen mit Polymorphismen zu klären, müssten weitere molekulargenetische Untersuchungen an verwandten Personen durchgeführt werden. Leider standen in diesem Projekt keine DNA-Proben der Eltern zur Verfügung.

Bezüglich der Missense-Mutationen ist es nicht möglich, zwischen krankheitsauslösender Mutation und Polymorphismus, der mit einem auffällig pigmentierten Hauttyp einhergeht, zu unterscheiden. Um diese Frage zu klären, sind auch hier molekulargenetische Untersuchungen mit Kontrollgruppen erforderlich. Diese Analysen werden im Rahmen von laufenden Arbeiten am Institut für Humangenetik derzeit durchgeführt.

In Bezug auf die Anzahl der Sequenzveränderungen der einzelnen Patienten ist bisher wenig bekannt. In einer Studie (Passmore et al., 1999) wurde erstmals anhand einer Untersuchung deutscher Patienten das Auftreten von 3 cDNA-Veränderungen pro Patient beschrieben. So sind auch die Ergebnisse bei der Auswertung der multiplen Mutationen als unerwartet hoch anzusehen. Bei 21 der 94 Patienten (22 %) mit Veränderungen im Tyrosinase-Gen traten 3-5 Mutationen auf. Ob bei Personen mit einer Anhäufung von Mutationen der Phänotyp signifikant stärker ist, sollte von Seiten der betreuenden Ärzte abgeklärt werden.

Von den 21 Patienten mit 3-5 Veränderungen tragen 15 den oben beschriebenen gekoppelten Polymorphismus (p.Ala471) + (p.Ala482).

Allerdings weisen Patienten mit zwei Mutationen (28) im Vergleich zu denen mit drei oder mehr Mutationen (21) im Tyrosinase-Gen keine objektivierbaren klinischen Unterschiede auf, obwohl insgesamt, nach Aussage von Frau PD Dr. Käsmann-Kellner, bei den einzelnen Patienten Unterschiede im phänotypischen Erscheinungsbild zu erkennen seien sollen (persönliche Mitteilung Frau PD Dr. Käsmann-Kellner).

Da uns keinerlei klinische Daten zur Verfügung stehen, können keine Aussagen zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation gemacht werden.

Von den 163 unterschiedlichen nachgewiesenen Mutationen waren 109 (68 %) nicht veröffentlicht. Die Mutationen treten in 73 verschiedenen Variationen auf. Wie in der Einleitung erwähnt, waren zuvor ca. 100 Mutationen des Tyrosinase-Gens beschrieben.

Somit liefert die durchgeführte Arbeit einen bedeutenden Beitrag zum Mutationsspektrum und zur Albinismus-Datenbank. Die Arbeit hat auch ein übergeordnetes Ziel erreicht: sie hat gezeigt, dass OCA 1 die häufigste Form des Albinismus in der deutschen Bevölkerung ist. Im Institut für Humangenetik wird jetzt die Mutationsanalyse im Tyrosinase-Gen im Rahmen der genetischen Diagnostik angeboten. Dem Wunsch der Patienten nach Aufklärung ihrer individuellen genetischen Veränderung, die bei ihnen zum Phänotyp Albinismus führt, kann somit nachgekommen werden.

Im Rahmen des Albinismus-Projektes konnten bei insgesamt 73 % der Personen Mutationen in den Genen für OCA 1 (163 Mutationen), OCA 2 (21 Mutationen), OCA 3 (5 Mutationen) und OCA 4 (11 Mutationen) nachgewiesen werden (Zühlke et al., 2004). Diese Daten stimmen mit denen der Literatur (Passmore et al., 1999) überein. Dort wurden 43 % der Mutationen im Tyrosinase-Gen und 22 % im P-Gen lokalisiert. Bei 35 % der Patienten wurden keine Mutationen nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass weitere, bisher unbekannte Genloci an der Pigmentsynthese beteiligt sind. So wurden bei Untersuchungen an Mäusen bislang über 65 Genloci identifiziert, deren Alterationen zur Beeinträchtigung der Pigmentsynthese führen (Boissy und Nordland, 1997; Spritz, 1994; Oetting und King, 1994).

Bei 15 Personen mit Mutationen im Tyrosinase-Gen wurden zusätzlich heterozygote Veränderungen in den Genen für OCA 2, OCA 3 und OCA 4 nachgewiesen. Interessanterweise trugen 10 Personen Variationen in den Genen für OCA 1 + OCA 2, und jeweils 5 Personen in OCA 1 + 3 und OCA 1 + 4. Im Rahmen dieses Albinismus-Projektes konnten insgesamt bei 17 der 176 Personen (10 %) 2-5 DNA-Variationen auf jeweils zwei verschiedenen Gen-Loci nachgewiesen werden (Zühlke et al., 2004). Dieser Befund kann als Hinweis auf eine digenische Vererbung gewertet werden. Leider stehen hier keine Vergleichsdaten zur Verfügung, da Untersuchungsreihen in diesem Umfang weltweit nicht durchgeführt wurden.

Bei 6 Personen wurden heterozygote Mutationen im P-Gen gefunden (Zühlke et al., 2004). Daher sollten Einflüsse von heterozygoten Mutationen in nicht-allelen Genen diskutiert werden. So wurden beim Okulären Albinismus und beim Waardenburg-Syndrom Mutationen mit digenischer Vererbung beschrieben (Morell et

al., 1997; Muenke und Mink, 2002). Es ist denkbar, dass heterozygote Mutationen in nicht-allelen Genen Einfluss auf codierende Proteine und Enzyme der Pigmentsynthese nehmen und eine verstärkende Wirkung auf den Phänotyp des OCA ausüben.

## Ausblick

Das Albinismus-Projekt hat in Übereinstimmung mit Untersuchungen deutscher Population (Passmore et al., 1999) gezeigt, dass bei 30 % der Betroffenen mit okulokutanem Albinismus keine Veränderungen in den bekannten Genen gefunden werden. Dies lässt auf weitere Gene, deren Produkte die Pigmentsynthese beeinflussen, schließen. Die Aufklärung eben dieser Gene ist Gegenstand der derzeitigen wissenschaftlichen Forschung. Bei der Maus sind mehr als 65 Genloci bekannt, welche die Pigmentsynthese beeinflussen. Daher könnten auch beim Menschen noch zahlreiche Gene in Frage kommen. In diesem Zusammenhang werden auch Kandidatengene für den okulokutanen Albinismus beim Hermansky-Pudlak-, Chediak-Higashi- und Waardenburgsyndrom vermutet. Dabei werden auch Gene identifiziert, die bei Patienten ohne manifesten okulokutanen Albinismus Haut- und Haarfarbe beeinflussen. Varianten des MC1R-Gens, welches für den MSH-Rezeptor kodiert, beeinflussen beispielsweise die Haarfarbe, aber auch die Bräunungsfähigkeit der Haut und die Zahl der Pigmentflecken (Sturm und Teasdale, 2001).

Das gehäufte Auftreten von „private mutations“ lässt auf zahlreiche Veränderungen im Tyrosinase-Gen schließen. Hier könnten durch Untersuchung von Kontrollgruppen der unterschiedlichen Populationen Aussagen über die Häufigkeit und phänotypische Auswirkung der Veränderungen getroffen werden.

Auch im Bezug auf die Verknüpfung spezifischer Mutationen z. B. c.1467\_1468insT mit gekoppelten Polymorphismen z. B. c.1413G>A + c.1446G>C sollten molekulargenetische Untersuchungen an verwandten Personen durchgeführt werden. Untersuchungen an Kontrollgruppen bieten sich auch bezüglich der Missense-Mutationen an, bei denen nicht zwischen krankheitsauslösender Mutation und phänotypisch auffälligem Polymorphismus unterschieden werden kann.

---

Erhöhter Forschungsbedarf besteht ohne Zweifel auf dem Gebiet der in diesem Projekt erstmals beschriebenen digenischen Vererbung in den Genen für OCA 1, OCA 2, OCA 3 und OCA 4. Bezüglich der digenischen Vererbung bei Albinismus wurden international bisher keine ausreichenden Studien durchgeführt, so dass hier zur Gewinnung weiterer Daten ausgiebige Untersuchungen durchgeführt werden sollten.

Die aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit angebotene Mutationsanalyse im Tyrosinase-Gen wird in Zukunft einerseits dem Interesse der betroffenen Personen nach Aufklärung ihrer genetischen Veränderung nachkommen, zum anderen werden sich dadurch die molekulargenetischen Erkenntnisse über Veränderungen des Tyrosinase-Gens erweitern und ergänzende Beiträge zur Albinismusdatenbank liefern.

## 5 Zusammenfassung

Albinismus ist eine klinisch und genetisch heterogene Erkrankung, die etwa eine von 20.000 Personen betrifft. Es kommt zu einer Störung der Synthese des Pigments Melanin. Klinisch zeigen sich Hypopigmentierung der Haut, Haare und Iris und Störungen des optischen Systems. Es wird zwischen dem okulokutanem Albinismus (OCA) und dem okulären Albinismus unterschieden. Der OCA folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Bisher sind vier Gene bekannt, die zum OCA führen. Diese Gene sind das Tyrosinase-Gen (OCA1), das P-Gen (OCA2), das TRP-1-Gen (OCA3) und das AIM-1-Gen (OCA4). Im Rahmen des Albinismus-Projektes wurde bei 176 unabhängigen Personen überwiegend deutscher Herkunft mit OCA eine Mutationsanalyse in diesen vier Genen durchgeführt. Inhalt dieser Arbeit war die Mutationsanalyse im Tyrosinase-Gen. Dazu wurden die 5 codierenden Exons mittels PCR amplifiziert, anschließend unter Anwendung der SSCP-Analyse auf elektrophoretische Auffälligkeiten untersucht. Auffällige Proben wurden sequenziert.

Es wurden 213 DNA-Variationen bei 94 Personen gefunden. Dabei handelt es sich um 190 Nukleotid-Substitutionen, die zu Missense-Mutationen, Nonsense-Mutationen und Polymorphismen führen. Desweiteren wurden 13 Insertionen und 10 Deletionen gefunden. 54 DNA-Veränderungen wurden jeweils bei nur einer Person nachgewiesen, es handelt es sich um „private mutations“. Knapp 68 % der Mutationen waren zuvor noch nicht beschrieben worden. Bei 21 Personen mit OCA1 konnten 3-5 DNA-Veränderungen nachgewiesen werden. Die Veränderungen c.1413G>A plus c.1446G>C traten insgesamt bei 20 Personen als gekoppelter DNA-Polymorphismus auf. Zudem wiesen alle Personen mit der Veränderung c.1467\_1468insT diesen Polymorphismus auf. Dies lässt auf einen gemeinsamen Vorfahren schließen.

Bei 15 Personen mit Mutationen im Tyrosinase-Gen wurden zusätzliche heterozygote Veränderungen in den Genen für OCA2, 3 oder 4 nachgewiesen, was als Hinweis für eine digenische Vererbung gewertet werden kann.

94 der 176 Personen (53 %) wiesen Veränderungen im Tyrosinase-Gen auf. Somit ist der OCA1 die häufigste Albinismus-Form in dem hier durchgeführten Projekt bei Patienten deutscher Herkunft. Dieser Wert liegt deutlich über dem internationaler Veröffentlichungen, in denen OCA2 als häufigste Form des Albinismus beschrieben wird.

## 6 Literaturverzeichnis

Barton DE, Kwon BS, Francke U: Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14-q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics* 3:17-24 (1988)

Bassi MT et al.: Cloning of the gene for ocular albinism type I from the distal short arm of the X chromosome. *Nat Genet* 10:13-19 (1995)

Boissy RE, Nordland JJ: Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. *Pigment Cell Res* 10:12-24 (1997)

Brilliant MH: The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Res* 14:86-93 (2001)

Camand O, Marchand D, Boutboul S, Pequignont M, Odent S, Dollfus H, Sutherland J, Levin A, Menasche M, Marsac C, Dufier J-H, Heon E, Abitbol M.: Mutation analysis of the tyrosinase gene in oculocutaneous albinism. *Human Mutation, Mutation in Brief #409* (2001) Online

Creel DJ, Summers CG, King RA: Visual anomalies associated with albinism. *Ophthalmic Paediatr Genet* 11:193-200 (1990)

den Dunnen JT, Antonarakis E: Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109:121-124 (2001)

den Dunnen JT, Antonarakis E: Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human Mutation* 15:7-12 (2000)

Fartmann B, Nikoleit K, Rehfeldt K: Instructions for DNA Template Preparation, Primer Design and Sequencing with the LI-COR DNA Sequencer 4000 and 4200 series. *Sequencing Brochure by MWG-Biotech AG* (1999)

Fukai K, Holmes SA, Lucchese NJ, Siu VM, Weleber RG, Schnur RA: Autosomal recessive ocular albinism associated with functionally significant tyrosinase gene polymorphism. *Nat Genet* 9:92-95 (1995)

Garrod AE: Inborn errors of metabolism. Lecture II. *Lancet* 2:73-79 (1908)

Giebel LB, Spritz RA: RFLP for MboI in the human tyrosinase (TYR) gene detected by PCR. *Nucleic Acids Res* 18:3103 (1990)

Giebel LB, Tripathi RK, King RA, Spritz RA: A tyrosinase gene missense mutation in temperatur-sensitive type I oculocutaneous albinism. A human homologue to the Siamese cat and the Himalayan mouse. *J Clin Invest* 87:1119-1122 (1991b)

Giebel LB, Tripathi RK, Strunk KM, Hanifin JM, Jackson CE, King RA, Spritz RA: Tyrosinase gene mutations associated with type IB ("yellow") oculocutaneous albinism. *Am J Hum Genet* 48:1159-1167 (1991)



- Käsmann-Kellner B, Ruprecht KW: Albinism – Classification and clinical manifestations. *Z prakt Augenheilk* 20:189-203 (1999)
- King RA et al.: Temperature sensitive tyrosinase associated with peripheral pigmentation in oculocutaneous albinism. *J Clin Invest* 87:1046-1053 (1991)
- King RA, Hearing VJ, Oetting WS: Albinism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DY (eds): *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 4353-4392 (1995)
- King RA, Pietsch J, Fryer JP, Savage S, Brott MJ, Russell-Eggitt I, Summers CG, Oetting WS: Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism I (OCA1): definition of the phenotype. *Hum Genet* 113:502-513 (2003)
- King RA, Olds DP: Tyrosinase uptake in normal and albino hairbulbs. *Arch. Dermatol Res* 276:313-316 (1984)
- King RA, Olds DP, Witkop CJ: Characterization of human hairbulb tyrosinase: properties of normal and albino enzyme. *J Invest Dermatol* 71:136-139 (1978)
- Knippers R: *Molekulare Genetik*. 8. völlig neubearbeitete Auflage. 23f; 307; 476. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2001)
- Lund PM, Puri N, Durham PD, King RA, Brilliant MH: Oculocutaneous albinism in an isolated Tonga community in Zimbabwe. *J Med Genet* 34:733-735 (1997)
- Morell R, Spritz RA, Ho L, Pierpont J, Guo W, Friedman TB, Asher JH Jr: Apparent digenic inheritance of Waardenburg syndrome type 2 (WS2) and autosomal recessive albinism (AROA). *Hum Mol Genet* 6:659-664 (1997)
- Muenke M, Ming JE: Multiple hits during early embryonic development: digenic disease and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 71:1017-1032 (2002)
- Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, Brilliant MH: Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet* 69:981-988 (2001)
- Oetting WS, Fryer JP, King RA.: Mutations of the human tyrosinase gene associated with tyrosinase related oculocutaneous albinism (OCA1). *Hum Mutat.* #204 (1988) Online
- Oetting WS, Fryer JP, Oofiji Y, Middendorf LR, Brumbaugh JA, Summers CG, King RA: Analysis of tyrosinase gene mutations using direct automated infrared fluorescence DNA sequencing of amplified exons. *Electrophoresis* 15:159-164 (1994)
- Oetting WS, King RA: Analysis of mutations in the copper B binding region associated with type I (tyrosinase related) oculocutaneous albinism. *Pigment Cell Res* 5:274-278 (1992)
- Oetting WS, King RA: Molecular basis of type I (tyrosinase related) oculocutaneous albinism: mutations and polymorphism of the human tyrosinase gene. *Hum Mutat* 2:1-6 (1993)

- Oetting WS, King RA: Analysis of tyrosinase mutations associated with tyrosinase related oculocutaneous albinism (OCA1). *Pigment Cell Res* 7:285-290 (1994)
- Oetting WS, King RA: Molecular basis of albinism: mutations and polymorphism of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat* 13:99-115 (1999)
- Opitz S, Käsmann-Kellner B, Kaufmann M, Schwinger E, Zühlke C: Detection of 53 novel DNA variations within the tyrosinase gene and accumulation of mutations in 17 patients with albinism. *Hum Mutat* 23:630-631 (2004)
- Opitz S, Zühlke C: Albinismus – Leben ohne Melanin. Teil 1: Biologie des Melaninstoffwechsels. *BIOforum* 10:672-674 (2002)
- Opitz S, Zühlke C: Albinismus – Leben ohne Melanin. Teil 2: Vom Genotyp zum Phänotyp. *BIOforum* 11:754-756 (2002)
- Park SK, Lee KH, Park KC, Lee JS, Spritz RA, Lee ST: Prevalent and novel mutations of the tyrosinase gene in Korean patients with tyrosinase-deficient oculocutaneous albinism. *Mol Cells* 7:187-191 (1997)
- Passmore LA, Käsmann-Kellner B, Weber BHW: Novel and recurrent mutations in the tyrosinase gene and the P gene in the German albino population. *Hum Genet* 105:200-210 (1999)
- Rundshagen U, Zühlke C, Schwinger E, Käsmann-Kellner B: Mutations in the MATP-gene in five German patients affected by oculocutaneous albinism type 4. *Hum Mutat* 23:106-110 (2004)
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning*. 3. ed. A Laboratory Manual Publ. 12.47; 13.49-13.50; 13.90. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)
- Sarangarajan R, Boissy RE: Tyrp1 and oculocutaneous albinism type 3. *Pigment Cell Res* 14:437-444 (2001)
- Schnur RE et al.: OA 1 mutations and deletions in X linked ocular albinism. *Am J Hum Genet* 62:800-809 (1998)
- Schnur RE et al.: Phenotypic variability in x linked ocular albinism: relationship to linkage genotypes. *Am J Hum Genet* 55:484-496 (1994)
- Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach KH (Hrsg.): *Seyffert Lehrbuch der Genetik*. 975; 978f. Gustav Fischer, Stuttgart (1998)
- Shen B, Samaraweera P, Rosenberg B, Orlow SJ: Ocular albinism type 1: more than meets the eye. *Pigment Cell Res* 14:243-248 (2001)
- Singer M, Berg P: *Gene und Genome*. 368f; 408. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1992)

- Spritz RA, Oh J, Fukai K, Holmes Sa, Ho L, Chitayat D, France TD, Musarella Ma, Orlow SJ, Schnur RE, Weleber RG, Levin AV: Novel mutations of the tyrosinase gene (TYR) in type I oculocutaneous albinism (OCA1). *Hum Mutat* 10:171-174 (1997)
- Spritz RA: Molecular genetics of oculocutaneous albinism. *Hum Mol Genet* 3:1469-1475 (1994)
- Sturm RA, Taesdale RD Box NF: Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 277:49-62 (2001)
- Summers CG, King RA: Ophthalmic features of minimal pigment oculocutaneous albinism. *Ophthalmology* 101:906-914 (1994)
- Tariverdian G, Buselmaier W: Variabilität des Genoms. In: *Humangenetik*. 3. aktualisierte Auflage: 19, Springer (2004)
- Toyofuku K, Valencia JC, Kushimoto T, Costin GE, Virador VM, Vieira WD, Ferrans VJ, Hearing VJ: The etiology of oculocutaneous albinism (OCA) type II: the pink protein modulates the processing and transport of tyrosinase. *Pigment Cell Res* 15:217-224 (2002)
- Toyofuku K, Wada I, Valencia JC, Kushimoto T, Ferrans VJ, Hearing VJ: Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp 1 can effect the processing of both mutant and wild-type proteins. *FASEB J* 15:2149-2161 (2001)
- Trevor-Roper PD: Marriage of two complete albinos with normally pigmented children. *Br J Ophthalmol* 36:107-109 (1952)
- Tripathi RK, Strunk KM, Giebel LB, Weleber RG, Spritz RA: Tyrosinase gene mutations in type I (tyrosinase-deficient) oculocutaneous albinism define two clusters of missense substitutions. *Am J Med Genet* 43:865-871 (1992)
- van Dorp DB: Albinism, or the NOACH syndrome (the book of Enoch c. v. I 20). *Clin Genet* 31:228-242 (1987)
- Zühlke C, Dalski A, Kaufmann M, Opitz S, Lipka A, Rundshagen U, Schwinger E, Käsmann-Kellner B: Molecular analysis in 163 unrelated patients with albinism: Mutations in the genes for OCA1, OCA2, OCA3, and OCA4. *Europ J of Hum Genet* 16:229 (2004)

## 7 Anhang

cDNA-Sequenz des Tyrosinase-Gens und die abgeleiteten Aminosäuren

### Exon 1

ATG CTC CTG GCT GTT TTG TAC TGC CTG CTG TGG AGT TTC CAG ACC TCC	48
Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu Leu Trp Ser Phe Gln Thr Ser	16
GCT GGC CAT TTC CCT AGA GCC TGT GTC TCC TCT AAG AAC CTG ATG GAG	96
Ala Gly His Phe Pro Arg Ala Cys Val Ser Ser Lys Asn Leu Met Glu	32
AAG GAA TGC TGT CCA CCG TGG AGC GGG GAC AGG AGT CCC TGT GGC CAG	144
Lys Glu Cys Cys Pro Pro Trp Ser Gly Asp Arg Ser Pro Cys Gly Gln	48
CTT TCA GGC AGA GGT TCC TGT CAG AAT ATC CTT CTG TCC AAT GCA CCA	192
Leu Ser Gly Arg Gly Ser Cys Gln Asn Ile Leu Leu Ser Asn Ala Pro	64
CTT GGG CCT CAA TTT CCC TTC ACA GGG GTG GAT GAC CGG GAG TCG TGG	240
Leu Gly Pro Gln Phe Pro Phe Thr Gly Val Asp Asp Arg Glu Ser Trp	80
CCT TCC GTC TTT TAT AAT AGG ACC TGC CAG TGC TCT GGC AAC TTC ATG	288
Pro Ser Val Phe Tyr Asn Arg Thr Cys Gln Cys Ser Gly Asn Phe Met	96
GGA TTC AAC TGT GGA AAC TGC AAG TTT GGC TTT TGG GGA CCA AAC TGC	336
Gly Phe Asn Cys Gly Asn Cys Lys Phe Gly Phe Trp Gly Pro Asn Cys	112
ACA GAG AGA CGA CTC TTG GTG AGA AGA AAC ATC TTC GAT TTG AGT GCC	384
Thr Glu Arg Arg Leu Leu Val Arg Arg Asn Ile Phe Asp Leu Ser Ala	128
CCA GAG AAG GAC AAA TTT TTT GCC TAC CTC ACT TTA GCA AAG CAT ACC	432
Pro Glu Lys Asp Lys Phe Phe Ala Tyr Leu Thr Leu Ala Lys His Thr	144
ATC AGC TCA GAC TAT GTC ATC CCC ATA GGG ACC TAT GGC CAA ATG AAA	480
Ile Ser Ser Asp Tyr Val Ile Pro Ile Gly Thr Tyr Gly Gln Met Lys	160
AAT GGA TCA ACA CCC ATG TTT AAC GAC ATC AAT ATT TAT GAC CTC TTT	528
Asn Gly Ser Thr Pro Met Phe Asn Asp Ile Asn Ile Tyr Asp Leu Phe	176
GTC TGG ATG CAT TAT TAT GTG TCA ATG GAT GCA CTG CTT GGG GGA TCT	576
Val Trp Met His Tyr Tyr Val Ser Met Asp Ala Leu Leu Gly Gly Ser	192
GAA ATC TGG AGA GAC ATT GAT TTT GCC CAT GAA GCA CCA GCT TTT CTG	624
Glu Ile Trp Arg Asp Ile Asp Phe Ala His Glu Ala Pro Ala Phe Leu	208
CCT TGG CAT AGA CTC TTC TTG TTG CGG TGG GAA CAA GAA ATC CAG AAG	672
Pro Trp His Arg Leu Phe Leu Leu Arg Trp Glu Gln Glu Ile Gln Lys	224
CTG ACA GGA GAT GAA AAC TTC ACT ATT CCA TAT TGG GAC TGG CGG GAT	720
Leu Thr Gly Asp Glu Asn Phe Thr Ile Pro Tyr Trp Asp Trp Arg Asp	240

GCA GAA AAG TGT GAC ATT TGC ACA GAT GAG TAC ATG GGA GGT CAG CAC	768
Ala Glu Lys Cys Asp Ile Cys Thr Asp Glu Tyr Met Gly Gly Gln His	256
CCC ACA AAT CCT AAC TTA CTC AGC CCA GCA TCA TTC TTC TCC TCT TGG	816
Pro Thr Asn Pro Asn Leu Leu Ser Pro Ala Ser Phe Phe Ser Ser Trp	272
<i>Exon 2</i>	
CAG ATT GTC TGT AGC CGA TTG GAG GAG TAC AAC AGC CAT CAG TCT TTA	864
Gln Ile Val Cys Ser Arg Leu Glu Glu Tyr Asn Ser His Gln Ser Leu	288
TGC AAT GGA ACG CCC GAG GGA CCT TTA CGG CGT AAT CCT GGA AAC CAT	912
Cys Asn Gly Thr Pro Glu Gly Pro Leu Arg Arg Asn Pro Gly Asn His	304
GAC AAA TCC AGA ACC CCA AGG CTC CCC TCT TCA GCT GAT GTA GAA TTT	960
Asp Lys Ser Arg Thr Pro Arg Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu Phe	320
TGC CTG AGT TTG ACC CAA TAT GAA TCT GGT TCC ATG GAT AAA GCT GCC	1008
Cys Leu Ser Leu Thr Gln Tyr Glu Ser Gly Ser Met Asp Lys Ala Ala	336
<i>Exon 3</i>	
AAT TTC AGC TTT AGA AAT ACA CTG GAA G AA TTT GCT AGT CCA CTT ACT	1056
Asn Phe Ser Phe Arg Asn Thr Leu Glu Gly Phe Ala Ser Pro Leu Thr	352
GGG ATA GCG GAT GCC TCT CAA AGC AGC ATG CAC AAT GCC TTG CAC ATC	1104
Gly Ile Ala Asp Ala Ser Gln Ser Ser Met His Asn Ala Leu His Ile	368
TAT ATG AAT GGA ACA ATG TCC CAG GTA CAG GGA TCT GCC AAC GAT CCT	1152
Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val Gln Gly Ser Ala Asn Asp Pro	384
<i>Exon 4</i>	
ATC TTC CTT CTT CAC CAT GCA TTT GTT GAC AG T ATT TTT GAG CAG TGG	1200
Ile Phe Leu Leu His His Ala Phe Val Asp Ser Ile Phe Glu Gln Trp	400
CTC CGA AGG CAC CGT CCT CTT CAA GAA GTT TAT CCA GAA GCC AAT GCA	1248
Leu Arg Arg His Arg Pro Leu Gln Glu Val Tyr Pro Glu Ala Asn Ala	416
CCC ATT GGA CAT AAC CGG GAA TCC TAC ATG GTT CCT TTT ATA CCA CTG	1296
Pro Ile Gly His Asn Arg Glu Ser Tyr Met Val Pro Phe Ile Pro Leu	432
TAC AGA AAT GGT GAT TTC TTT ATT TCA TCC AAA GAT CTG GGC TAT GAC	1344
Tyr Arg Asn Gly Asp Phe Phe Ile Ser Ser Lys Asp Leu Gly Tyr Asp	448
<i>Exon 5</i>	
TAT AGC TAT CTA CAA GAT TCA G AC CCA GAC TCT TTT CAA GAC TAC ATT	1392
Tyr Ser Tyr Leu Gln Asp Ser Asp Pro Asp Ser Phe Gln Asp Tyr Ile	464
AAG TCC TAT TTG GAA CAA GCG AGT CGG ATC TGG TCA TGG CTC CTT GGG	1440
Lys Ser Tyr Leu Glu Gln Ala Ser Arg Ile Trp Ser Trp Leu Leu Gly	480
GCG GCG ATG GTA GGG GCC GTC CTC ACT GCC CTG CTG GCA GGG CTT GTG	1488
Ala Ala Met Val Gly Ala Val Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gly Leu Val	496
AGC TTG CTG TGT CGT CAC AAG AGA AAG CAG CTT CCT GAA GAA AAG CAG	1536
Ser Leu Leu Cys Arg His Lys Arg Lys Gln Leu Pro Glu Glu Lys Gln	512

CCA CTC CTC ATG GAG AAA GAG GAT TAC CAC AGC TTG TAT CAG AGC CAT 1584  
 Pro Leu Leu Met Glu Lys Glu Asp Tyr His Ser Leu Tyr Gln Ser His 528

TTA (TAA) 1587 (1590)  
 Leu (TER) 529 (530)

cDNA-Sequenz des menschlichen Tyrosinase-Gens und die codierten Aminosäuren.

Die obere Zeile gibt jeweils die DNA-Sequenz an, die Zeile darunter die codierten Aminosäuren. Am Zeilenende befindet sich die Nummerierung der Nukleotide (1-1587) und der codierten Aminosäuren (1-529).

Exon 1...5: zeigt den Beginn der Exons (1-5) im Tyrosinase-Gen

#### Nachgewiesene Mutationen des Tyrosinase-Gens und Häufigkeit der Allele

Veränderung auf cDNA-Ebene	Veränderung auf Protein-Ebene	Referenz	Allele
c.73G>T	p.Val25Phe	Z	1
c.74_75insT	p.Ser26fsX2	1	1
c.86A>C	p.Asn29Thr	Z	2
c.130A>C	p.Ser44Arg	Z	2
c.130A>G	p.Ser44Gly	Z	1
c.139G>T	p.Gly47Cys	Z	1
c.140G>A	p.Gly47Cys	1	1
c.202C>A	p.Gln68Lys	Z	1
c.204A>T	p.Gln68His	Z	1
c.230G>A	p.Arg77Gln	1	5
c.236C>T	p.Ser79Leu	Z	5
c.242C>T	p.Pro81Leu	1	3
c.344_345delGA	p.Arg115fsX52	1	1
c.346C>T	p.Arg116X	1	1
c.463A>T	p.Thr155Ser	Z	1
c.529G>T	p.Val177Phe	Z	3
c.535A>T	p.Met179Leu	Z	1
c.538C>A	p.His180Asn	Z	2
c.595G>A	p.Asp199Asn	Z	1
c.601G>T	p.Ala201Ser	Z	1
c.601delG	p.Ala201fsX24	Z	2

c.649_650G>TC	p.Arg217Ser	Z	1
c.707G>T	p.Trp236Leu	Z	1
c.719A>T	p.Asp240Val	Z	1
c.728A>C	p.Lys243Thr	Z	1
c.766C>T	p.His256Tyr	2	1
c.820-2delA	Splice-site mutation	Z	3
c.842delA	p.Glu281fsX37	Z	1
c.865T>C	p.Cys289Arg	4	1
c.913G>A	p.Asp305Asn	Z	2
c.953T>A	p.Val318Glu	Z	1
c.985T>C	p.Ser329Pro	Z	5
c.995T>C	p.Met332Thr	1	1
c.1034A>G	p.Glu345Gly	Z	2
c.1063G>C	p.Ala355Pro	Z	2
c.1075C>T	p.Gly395X	7	1
c.1087C>T	p.His363Tyr	Z	2
c.1118C>A	p.Thr373Lys	1	7
c.1132C>A	p.Gln378Lys	Z	2
c.1147G>A	p.Asp383Asn	1	1
c.1167delT	p.His389fsX95	5	2
c.1167_1168insT	p.His390fsX4	Z	1
c.1177G>T	p.Val393Phe	4	2
c.1180delG	p.Asp394fsX90	Z	1
c.1183A>C	p.Ser395Arg	Z	2
c.1184+3T>G	Splice site mutation	Z	2
c.1193A>T	p.Glu398Val	Z	4
c.1193A>C	p.Glu398Ala	Z	11
c.1204C>T	p.Arg402X	1	1
c.1205G>T	p.Arg402Leu	Z	1
c.1205G>A	p.Arg402Gln	6	4
c.1209G>C	p.Arg403Ser	5	3
c.1210C>A	p.His404Asn	Z	2
c.1214G>T	p.Arg405Leu	Z	6

c.1217C>T	p.Pro406Leu	1	3
c.1224A>C	p.Gln408His	Z	2
c.1227A>C	p.Glu409Asp	Z	1
c.1237G>T	p.Glu413X	Z	1
c.1246G>T	p.Ala416Ser	Z	11
c.1250C>A	p.Pro417His	Z	1
c.1255G>A	p.Gly419Arg	1	1
c.1265G>A	p.Arg422Gln	3	2
c.1271C>T	p.Ser424Phe	Z	2
c.1277T>A	p.Met426Lys	Z	2
c.1280T>G	p.Val427Gly	Z	2
c.1301G>T	p.Arg434Ile	Z	1
c.1303A>G	p.Asn435Asp	Z	1
c.1331A>G	p.Asp444Gly	Z	6
c.1342G>A	p.Asp448Asn	1	1
c.1467_1468insT	p.Ala490fsX19	1	7
c.1501_1502insC	p.Arg501fsX8	3	4

Nucleotidposition nach: GenBank reference sequences NM\_000372.1,

Z. zuvor nicht veröffentlichte Mutationen

Literaturangaben:

1: King et al., 2003; 2: Camand et al., 2001; 3: Giebel et al., 1991; 4: Oetting et al., 1998; 5: Tripathi et al., 1992; 6: Spritz et al., 1997.

#### Nachgewiesene Polymorphismen des Tyrosinase-Gens und Häufigkeit der Allele

<b>Änderung auf cDNA-Ebene</b>	<b>Änderung auf Proteine-Ebene</b>	<b>Referenz</b>	<b>Allele</b>
c.575C>A	p.Ser192Tyr	*4)	4
c.1413G>A	(p.Ala471)	P	20
c.1446G>C	(p.Ala482)	P	20
c.1137A>T	(p.Gly379)	P	1
c.1368A>T	(p.Gly456)	P	3
c.1206A>C	(p.Arg402)	P	1



c.1338C>G	(p.Gly446)	P	1
-----------	------------	---	---

Nukleotidposition nach: GenBank reference sequences NM\_000372.1,

<sup>4</sup> Polymorphismus nach Giebel und Spritz, 1990

P: zuvor nicht veröffentlichte Polymorphismen

<sup>3</sup>: treten in den Proben 7406, 7425, 7448, 7449, 7453, 7454, 7472, 7482, 7485, 7489, 7507, 7509, 7515, 7522, 7530, 7551, 7577, 7626, 7631, 7717 gekoppelt auf.

Liste der möglichen IUPAC-Kodierungen (MWG-Biotech Sequenzing Brochure: Fartmann B et al., 1999)

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
a	fraglich Adenin
c	fraglich Cytosin
g	fraglich Guanin
t	fraglich Thymin
R	Adenin oder Guanin
Y	Cytosin oder Thymin
M	Cytosin oder Guanin
K	Guanin oder Thymin
W	Adenin oder Thymin
S	Cytosin oder Guanin
B	Cytosin oder Guanin oder Thymin
D	Guanin oder Adenin oder Thymin
H	Adenin oder Cytosin oder Thymin
V	Adenin oder Cytosin oder Guanin
N	weder Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin

## 8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Eberhard Schwinger für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Ganz besonders danke ich Frau PD Dr. Christine Zühlke, die mir sowohl während der experimentellen Durchführung als auch beim Verfassen der schriftlichen Abhandlung jederzeit sowohl mit konstruktiver Kritik und Vorschlägen als auch mit viel Zeit und Geduld zur Seite stand.

Frau PD Dr. Barbara Käsmann-Kellner danke ich für die kooperative Zusammenarbeit bezüglich der Betreuung der Patienten und ihrer Familien und für die Bereitstellung der Patientenblutproben.

Allen Teilnehmern dieser Studie gilt ein besonderer Dank für ihr großes Interesse an der Durchführung der Studie und die Bereitstellung ihrer Blutproben für wissenschaftliche Forschungszwecke.

Ich möchte mich herzlich bei allen MitarbeiterInnen des Instituts für die freundliche und sehr persönliche Aufnahme in das Team bedanken. Insbesondere Frau Heike Pawlack und Frau Ulrike Gehlken danke ich für ihre kompetente Unterstützung und Geduld beim Erlernen der Laborroutine.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname

Kaufmann, Markus

Anschrift

Guntherweg 2, 23562 Lübeck

Geburtstag und -Ort

01.09.1975 in Pinneberg

### Schulbildung

1982-1986

Grundschule Birkenallee, Uetersen

1986-1991

Elsa-Brändström-Gymnasium, Elmshorn

1991-1996

Ludwig-Meyn-Gymnasium, Uetersen

### Zivildienst

Okt. 1996-Okt. 1997

Rettungssanitäter, Rettungsdienst Kreis Pinneberg

### Studium

Okt. 1997-Apr. 2003

Studium der Humanmedizin, Universität Lübeck

Apr. 2003-Apr. 2004

Praktisches Jahr, UK-SH, Campus Lübeck

10.06.2004

Ärztliche Prüfung

### Studiumbegleitende Tätigkeiten:

06/2003-01/2004

freier wissenschaftlicher Mitarbeiter an einer klinischen multizentrischen Studie „Einsatzmöglichkeiten einer Präparation der Hydroxyäthylstärke in der Klinik“, Klinik für Anästhesiologie, UK-SH, Campus Lübeck

08/2003-04/2004

freier wissenschaftlicher Mitarbeiter an einer klinischen multizentrischen Studie „Nachweis der Genauigkeit der 48-stündigen subcutanen Glucosemessung“, Medizinische Klinik I, UK-SH, Campus Lübeck

### Berufliche Tätigkeit

ab 01.Okt. 2004

Assistenzarzt im Fachgebiet Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, UK-SH, Campus Kiel

### Promotion

Aug. 2001-Juli 2003

praktische Durchführung der Experimente

Juli 2004-Sept. 2004

Verfassen der Abhandlung

Veröffentlichungen:Vortrag:

- Kaufmann M, Zühlke C, Schwinger E, Käsmann-Kellner B: Mutationsanalyse im Tyrosinase-Gen: Ergebnisse der SSCP-Analysen. XXI. Treffen der Norddeutschen Humangenetiker, Greifswald (Nov. 2001)

Poster Abstracts:

- Opitz S, Kaufmann M, Schwinger E, Zühlke C, Käsmann-Kellner B: Oculocutaneous albinism in Germany: Spectrum of mutations in TYR and P-gene. Medizinische Genetik 14: 339 (2002)
- Opitz S, Kaufmann M, Schwinger E, Zühlke C, Käsmann-Kellner B: Mutations in the TYR and P-gene in individuals with oculocutaneous albinism. European Journal of Human Genetics 10:206 (2002)
- Zühlke C, Kaufmann M, Dalski A, Opitz S, Lipka A, Rundshagen U, Schwinger E, Käsmann-Kellner B: Molecular analysis in 163 unrelated patients with albinism: Mutations in genes for OCA 1, OCA 2, OCA 3, OCA 4“, European Journal of Human Genetics 12:229 (2004)

Publikation:

- Opitz S, Käsmann-Kellner B, Kaufmann M, Schwinger E, Zühlke C: Detection of 53 novel DNA variations within the tyrosinase gene and accumulation of mutations in 17 patients with albinism. Human Mutation 23:106-110 (2004)