

Aus der Medizinischen Klinik  
mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Morbus Wilson**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Benita Elisabeth Christine von Heyden  
aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Schmidt

2. Prof. Dr. med. H. J. Schlitt

3. Prof. Dr. med. M. P. Manns

Datum der Disputation: 10.09.2007

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 PHYSIOLOGIE DES KUPFERSTOFFWECHSELS	1
1.1.1 <i>Charakteristika der ATPase7B</i>	3
1.2 MORBUS WILSON, HEPATOLENTIKULÄRE DEGENERATION	4
1.2.1 <i>Die Geschichte des Morbus Wilson</i>	4
1.2.2 <i>Pathophysiologie und Pathogenese</i>	6
1.2.3 <i>Klinischer Verlauf</i>	9
1.2.3.1 Hepatische Manifestation	10
1.2.3.2 Neurologische Manifestation	11
1.2.3.3 Psychiatrische Auswirkungen	11
1.2.3.4 Manifestation am Auge	12
1.2.3.5 Hämatologische Manifestation	12
1.2.3.6 Renale Manifestation	13
1.2.3.7 Andere Manifestationen	13
1.2.4 <i>Diagnostik des Morbus Wilson</i>	14
1.2.4.1 Labordiagnostik	14
1.2.4.2 Histologische Diagnostik	15
1.2.4.3 Radiologische Diagnostik	15
1.2.4.4 Molekulargenetische Diagnostik	15
1.2.5 <i>Therapie</i>	16
1.2.5.1 Diät	17
1.2.5.2 Penicillamin	17
1.2.5.3 Zink	18
1.2.5.4 Trientine	18
1.2.5.5 Ammonium Tetrathiomolybdat	19
1.2.5.6 Antioxidantien	19
1.2.5.7 Lebertransplantation	19
1.2.6 <i>Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Morbus Wilson</i>	19
<b>2. AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 <i>Technisches Material und Chemikalien</i>	26
3.2 METHODEN	27
3.2.1 <i>Gewinnung der DNA</i>	27
3.2.2 <i>Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-chain-reaction, PCR)</i>	28
3.2.3 <i>Reinigung des PCR-Produktes</i>	32
3.2.4 <i>Gelelektrophorese</i>	32
3.2.5 <i>Sequenzanalyse</i>	33
3.2.5.1 Sequenzanalyse mit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	33
3.2.5.2 Aufreinigung des Sequenzierungsproduktes	34
3.2.5.3 Auftragen der Proben	35

3.2.5.4	Charakteristika des benutzten Sequenziergerätes	35
3.2.6	<i>Assay für neue Mutationen</i>	35
3.2.6.1	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP)	35
3.2.6.2	Allelspezifische PCR	36
<b>4.</b>	<b>RESULTATE</b>	<b>37</b>
4.1	RESULTATE DER GENETISCHEN UNTERSUCHUNG	37
4.1.1	<i>Verteilung der genetisch untersuchten Patienten</i>	38
4.1.2	<i>Verteilung der identifizierten Mutationen in den Exons</i>	40
4.1.3	<i>Länderbezogene Verteilung der Mutationen</i>	45
4.1.3.1	Mutationsspektrum Polen	46
4.1.3.2	Mutationsspektrum Deutschland	48
4.1.3.3	Mutationsspektrum Brasilien	50
4.1.3.4	Mutationsspektrum China	52
4.1.3.5	Mutationsspektrum Iran	54
4.1.3.6	Mutationsspektrum Ägypten	56
4.1.3.7	Mutationsspektrum Litauen	58
4.1.3.8	Mutationsspektrum Griechenland	59
4.1.3.9	Mutationsspektrum Serbien	60
4.1.3.10	Mutationsspektren Rumänien, Slowakai und U.S.A	61
4.2	HOMOZYGOTE MUTATIONEN UND IHR KLINISCHES BILD	63
4.2.1	<i>Die H1069Q-Mutation im Exon 14</i>	68
4.2.2	<i>Die 3402delC-Mutation im Exon 15</i>	75
4.2.3	<i>Die L708P-Mutation im Exon 8</i>	79
4.2.4	<i>Die E396X-Mutation im Exon 2</i>	82
4.2.5	<i>Die Q289X-Mutation im Exon 2</i>	82
4.2.6	<i>Die R148W-Mutation im Exon 2</i>	82
4.2.7	<i>Die 845delT-Mutation im Exon 2</i>	83
4.2.8	<i>Die L549P-Mutation im Exon 4</i>	83
4.2.9	<i>Die D642H-Mutation im Exon 6</i>	83
4.2.10	<i>Die Q680X Mutation im Exon 7</i>	84
4.2.11	<i>Die 2296dupA-Mutation im Exon 8</i>	84
4.2.12	<i>Die R778G-Mutation im Exon 8</i>	85
4.2.13	<i>Die D765N-Mutation im Exon 8</i>	86
4.2.14	<i>Die I857T-Mutation im Exon 10</i>	86
4.2.15	<i>Die S932X-Mutation im Exon 12</i>	86
4.2.16	<i>Die L936X- Mutation im Exon 12</i>	87
4.2.17	<i>Die P992L- Mutation im Exon 13</i>	87
4.2.18	<i>Die T977M- Mutation im Exon 13</i>	87
4.2.19	<i>Die A1003T-Mutation im Exon 13</i>	88
4.2.20	<i>Die G1061E-Mutation im Exon 14</i>	88
4.2.21	<i>Die H1126P-Mutation im Exon 15</i>	89

## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.22	<i>Die G1089E-Mutation im Exon 15</i>	90
4.2.23	<i>Die F1094L-Mutation im Exon 15</i>	90
4.2.24	<i>Die Q1124X-Mutation im Exon 16</i>	91
4.2.25	<i>Die I1148T-Mutation im Exon 16</i>	91
4.2.26	<i>Die 3472-3482del11-Mutation im Exon 16</i>	92
4.2.27	<i>Die 3697delC-Mutation im Exon 17</i>	92
4.2.28	<i>Die 3649-3654del6-Mutation im Exon 17</i>	92
4.2.29	<i>Die N1270S-Mutation im Exon 18</i>	93
4.2.30	<i>Die IVS18-2A&gt;G-Mutation im Exon 18</i>	93
4.2.31	<i>Die L1299R-Mutation im Exon 18</i>	94
4.2.32	<i>Die 3713-14del2-Mutation im Exon 18</i>	94
4.2.33	<i>Die G1341R-Mutation im Exon 20</i>	94
4.3	<b>KAYSER-FLEISCHER-RING UND DIE PRIMÄRSYMPТОМАТИК</b>	96
4.4	<b>HFE-GENOTYP UND DIE PRIMÄRSYMPТОМАТИК</b>	97
4.4.1	<i>Die C282Y-Mutation</i>	97
4.4.2	<i>Die H63D-Mutation</i>	98
4.4.3	<i>Compound heterozygote Mutationen</i>	99
4.5	<b>APOE-GENOTYP UND DIE PRIMÄRSYMPТОМАТИК</b>	100
4.5.1	<i>APOE 3/3-Genotyp</i>	101
4.5.2	<i>APOE 4/3-Genotyp</i>	102
4.5.3	<i>APOE 3/2-Genotyp</i>	102
4.5.4	<i>APOE 4/4-Genotyp</i>	102
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>103</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>123</b>
<b>8.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>129</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>131</b>
9.1	DANKSAGUNG	131
9.2	LEBENS LAUF	132
9.3	ERKLÄRUNG	133

# 1. EINLEITUNG

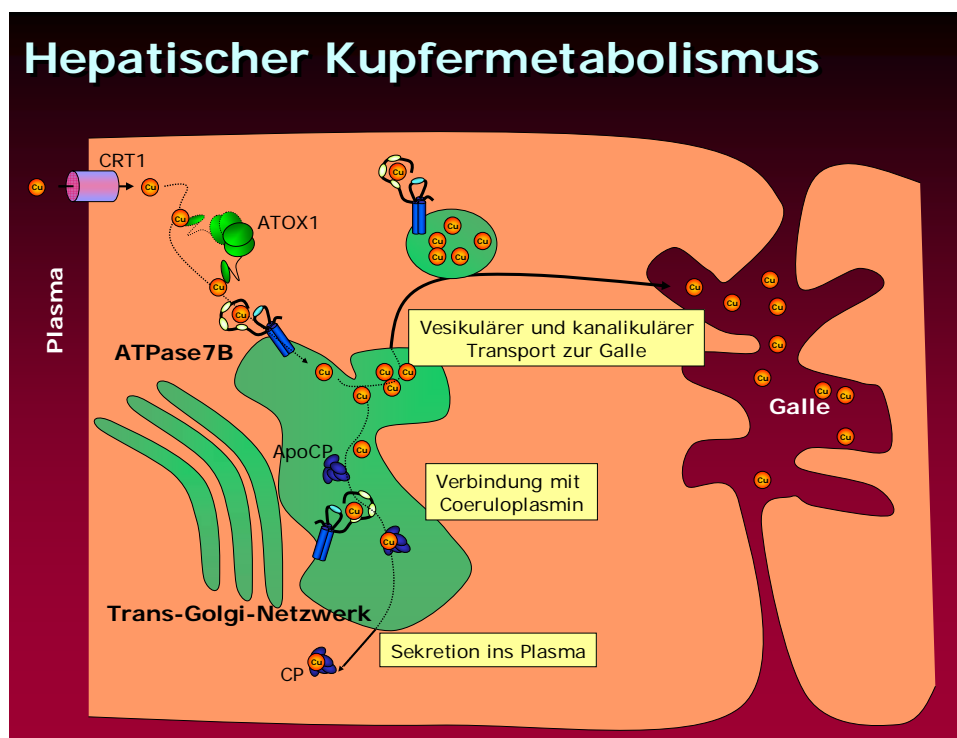
## 1.1 Physiologie des Kupferstoffwechsels

Kupfer ist ein wichtiges Spurenelement, welches in viele Funktionen der Zelle involviert ist.

Unter anderem ist Kupfer Cofaktor für die Cytochrom-c-Oxidase, welche für den Elektronentransport in den Mitochondrien verantwortlich ist. Außerdem ist Kupfer Cofaktor für die Superoxiddismutase, welches ein zu den Oxidoreduktasen gehörendes im Erythrozyten befindliches Enzym ist. Dieses wird zur Umsetzung von entstehenden Peroxidradikalen bei der Autooxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin benötigt. Darüber hinaus ist Kupfer beteiligt an der lysalen Oxidase, welche für die Verkettung von Kollagen und Elastin benötigt wird [1]. Außerdem spielt Kupfer eine wichtige Rolle in der Melanin-Biosynthese, wobei die Tyrosinase mit Kupfer als Cofaktor die Bildung von Melanin aus Tyrosin katalysiert. Zusätzlich ist Kupfer wichtig für die Inaktivierung von biogenen Aminen durch die Monoaminoxidase. Im Eisenstoffwechsel spielt Kupfer ebenfalls eine maßgebliche Rolle.

Der durchschnittliche Kupfergehalt des menschlichen Körpers beträgt ungefähr 100 mg und wird zum einen durch die gastroenterale Aufnahme und zum anderen über die biliäre Exkretion reguliert [2]. Die Leber stellt das wichtigste Organ für den Kupferstoffwechsel dar, da sie den größten Speicheranteil beherbergt und für die Ausscheidung über die Galle verantwortlich ist, welche den Kupfergehalt maßgeblich reguliert [3, 4]. Lebensmittel mit einem hohen Kupfergehalt sind Schellfisch, Leber, Pilze, Nüsse, Sojaprodukte, Gelatine und Schokolade [5]. Täglich werden durchschnittlich 1,5 bis 5 mg Kupfer vom Gastrointestinaltrakt aufgenommen, wovon der Hauptteil vom Magen und Duodenum durch einen carriervermittelten Transport der Mukosa resorbiert wird [6]. Nach der Aufnahme in die Enterozyten wird Kupfer an Albumin oder an Aminosäuren, wie zum Beispiel Histidin, gebunden und erscheint in dieser Form schnell wieder in der portalen Zirkulation. In der Leber wird Kupfer aus dem sinusidalen Blut über die in der basolateralen Membran lokalisierten Proteine hCRT1 (high-affinity transport) und hCRT2 (low-affinity transport) von den Hepatozyten in die Zelle transportiert [5]. In den Hepatozyten kommt es zur Bindung des aufgenommenen Kupfers an thiolreiche zytosolische Proteine, zum Beispiel an Metallothionein, und an bestimmte Enzyme, die Kupfer-Chaperonen, welche Kupfer vor intrazellulärer Chelation schützen und zu spezifischen anderen Enzymen transportieren, die für den weiterführenden Stoffwechsel essentiell sind. Das Chaperon Atox 1 interagiert mit der Wilson Disease ATPase7B. Atox 1 enthält eine Kopie des kupferbindenden Motivs MXCXXC,

die ebenfalls in der amino-terminalen Region der ATPase7B vorhanden ist. Die Bindung dieser Proteine ist für den hepatischen Kupferstoffwechsel unbedingt erforderlich. Die ATPase7B ist eine kupfertransportierende P-Typ ATPase, die am Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist. Die ATPase7B transportiert Kupfer zum einen zur sekretorischen Komponente über die Galle und zum anderen zur Inkorporation in Apocoeruloplasmin, was zur Bildung von Coeruloplasmin führt. Obwohl der biologische Mechanismus der vesikulären Kupferexkretion unbekannt ist, haben Studien ein zytosolisches Protein, Murr1, identifiziert, welches an diesem Prozess beteiligt ist [4, 5]. Hepatozyten sind in der Lage den zytoplasmatischen Kupfergehalt zu ermessen und regulieren dadurch die biliäre Exkretion [5]. Es wird vermutet, dass der hepatozytäre Kupfertransport und dessen Ausscheidung posttranslational durch den Kupfergehalt der Zelle bestimmt wird [7].

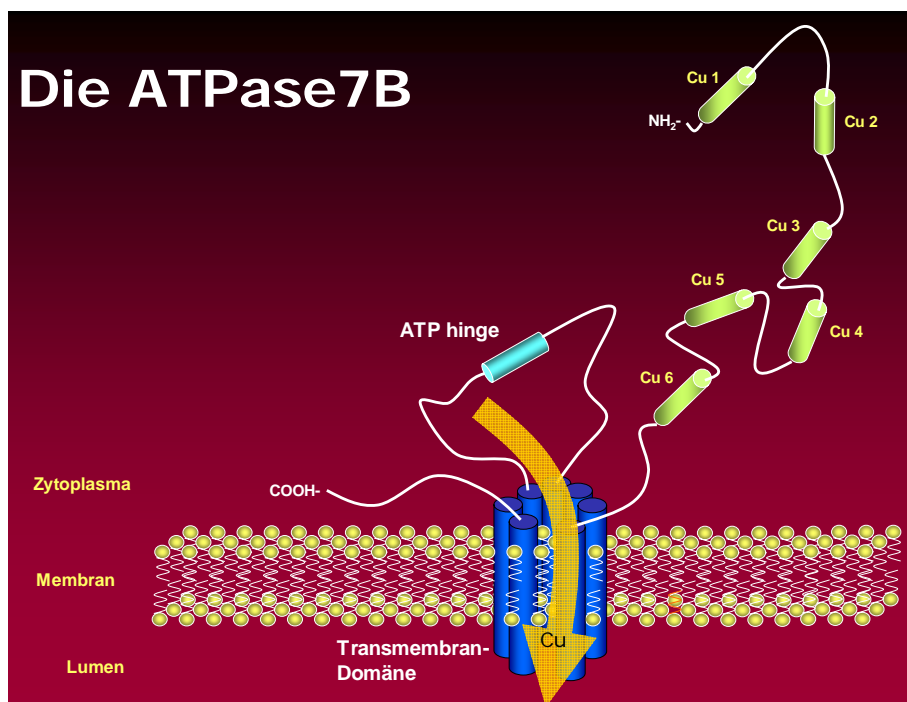


*Abbildung 1:* Die Abbildung stellt den physiologischen hepatischen Kupferstoffwechsel schematisch dar. Man sieht in der Abbildung, dass Kupfer aus dem Plasma über das Protein CRT1 in die Zelle aufgenommen wird, anschließend Atox1-vermittelt zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert wird, wo Atox1 mit der ATPase7B interagiert, was den Kupfertransport in das Trans-Golgi-Netzwerk ermöglicht. Dort wird Kupfer entweder an Apocoeruloplasmin gebunden und in Coeruloplasmin ins Plasma sezerniert oder über vesikulären und kanalikulären Transport in die Galle befördert. Verwendete Abkürzungen: CP: Coeruloplasmin, ApoCP: Apocoeruloplasmin.

Studien zeigen, dass nur 10% des nach portaler Zirkulation in die Leber aufgenommenen Kupfers innerhalb von 24 Stunden wieder im Blutplasma an Coeruloplasmin gebunden erscheint [8]. Das im Blutplasma befindliche Kupfer ist zu 95% an Coereloplasmin gebunden [9]. Der restliche Anteil wird, an Aminosäuren und Albumin gebunden, in verschiedene Gewebe transportiert. Eine renale Exkretion des Kupfers spielt nur bei Überlastung der tubulären Reabsorbtion eine Rolle. Kupfer unterliegt keinem enterohepatischen Kreislauf. Nach biliärer Sekretion wird es als unabsorbierbarer Komplex mit dem Stuhl ausgeschieden [4].

### 1.1.1 Charakteristika der ATPase7B

Über die physiologischen Funktionen der ATPase7B ist bekannt, dass die Hauptaufgabe dieses Proteins in der Aufrechterhaltung der Kupfer-Homöostase der Zelle besteht. Dafür befördert es Kupfer aktiv vom Zytosol in das exkretorische Kompartiment der Zelle, damit das Schwermetall dort in Apocoeruloplasmin eingebaut und mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden kann. An der Bewegung der Kupferionen durch die Membran der Gallenkanälchen ist die ATPase7B wahrscheinlich auch direkt beteiligt. Innerhalb der Leber wird das Protein an der Membran der Gallenkanälchen vermutet. Es wird angenommen, dass es in der Leber, vor allem aber am Trans-Golgi-Retikulum, lokalisiert ist [10, 11, 12].



*Abbildung 2:* In der Abbildung ist die ATPase7B, welche, wie in Abbildung 1 gezeigt, am Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist, schematisch dargestellt. Sie ist für den Kupfertransport aus dem Zytoplasma in das Trans-Golgi-Netzwerk verantwortlich.



Das Genprodukt des *ATP7B*-Gens kodiert 1465 Aminosäuren [10, 13, 14]. Der N-Terminus enthält sechs repetitive Metallbindungsmotive, die jeweils ungefähr 30 Aminosäuren umfassen und alle ein Glycin-Methionin-X-Cystein-X-Serin-Cystein-(GMXCXSC-) Motiv enthalten, das homolog auch in Metallbindungsdomänen von Bakterien vorkommt (X steht dabei für eine unspezifische Aminosäure). Zusammen bilden die sechs repetitiven Motive die Kupferbindungsstelle. Es schließt sich der erste von insgesamt acht transmembranösen Bereichen (Tm1-Tm8) an. In Analogie zu den anderen Mitgliedern der Familie der P-Typ-ATPasen verfügt das Protein über eine Transduktions-, eine Phosphorylierungs- und eine ATP-bindende Domäne. Die Transduktionsregion (TGEA-Motiv) ist für die Nutzbarmachung der Energie, die bei der Hydrolyse des ATP entsteht, verantwortlich. Die ATP-Bindungsstelle, relativ nahe dem Carboxy-Ende, ist ein in der Evolution hochkonservierter Bereich [15].

## **1.2 Morbus Wilson, hepatolentikuläre Degeneration**

Beim Morbus Wilson handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Störung des Kupfermetabolismus, der mit den klinischen Folgen der Kupferüberladung verschiedener Organe, insbesondere der Leber, der Basalganglien, der Augen, der Nieren und des Bluts, einhergeht [16, 17, 18]. Die Krankheit manifestiert sich in der Regel nicht vor dem 5. und selten nach dem 32. Lebensjahr. Der Altersgipfel der Erstmanifestation liegt in der zweiten und dritten Lebensdekade. Die Prävalenz des Morbus Wilson in Deutschland und auch weltweit liegt bei etwa 1: 30.000. Für Heterozygote errechnet sich daraus eine Häufigkeit von etwa 1: 87. In manchen ethnischen Gruppen, zum Beispiel in der Bevölkerung Sardinien, ist jedoch die Prävalenz höher (1:10.000 bis 1:30.000) [15, 19].

### **1.2.1 Die Geschichte des Morbus Wilson**

Der Morbus Wilson wurde erstmals 1912 von dem in Amerika geborenen, aber in England lebenden, Neurologen Samuel Alexander Kinnier Wilson als „progressive lentikuläre Degeneration“ beschrieben. Dieser beobachtete in vier Fällen junge Erwachsene mit ähnlichen Symptomen, die seiner Meinung nach durch die selbe Krankheit verursacht waren. Ebenfalls deutete er auf acht ähnliche Patienten aus der Literatur hin, die ebenfalls die klinischen Symptome einer lentikulären Degeneration in Verbindung mit einer Leberzirrhose zeigten.

Patienten wiesen unkontrollierte Bewegungen, Dysphagie, Dysarthrie, Spastik und psychiatrische Symptome auf [20, 21].

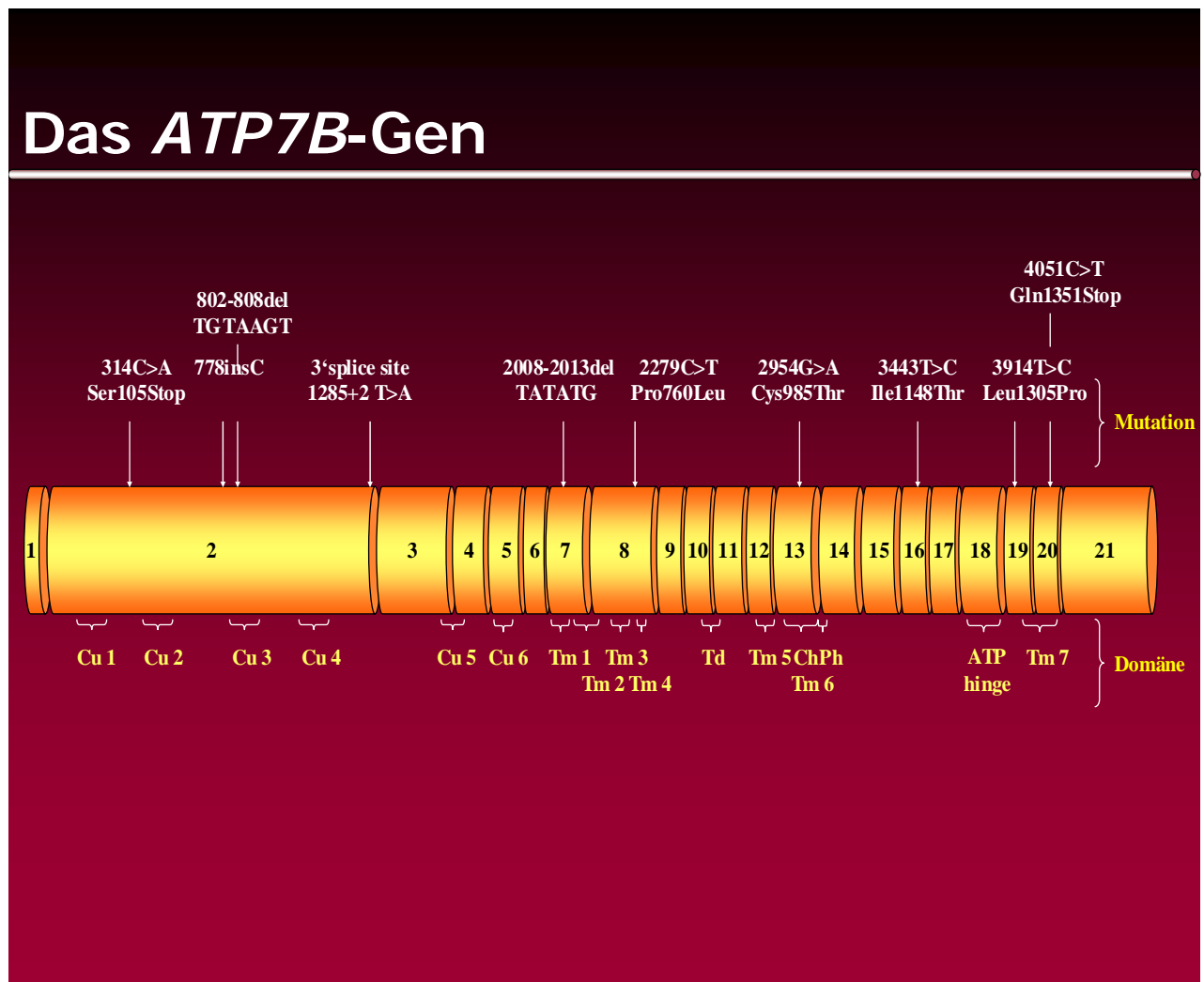
Anfangs nahm Wilson an, dass die hepatische Beteiligung kein bestimmender Faktor dieser Erkrankung zu sein schien, was sich jedoch schnell als gegenteilig herausstellte [4].

Frerichs hatte 1860 den ersten Patienten mit Morbus Wilson beschrieben, wobei es sich um ein Kind mit den selben pathologischen Erscheinungen wie die von Wilson beschriebenen handelte [2]. Rumpel identifizierte erstmals 1913 einen Zusammenhang zwischen einem Überschuß an Kupfer und der Leber. 1929 entdeckte Vogt und später auch Haurowitz und Glazebrook bei Patienten, die an Morbus Wilson gestorben waren, dass sich sowohl in der Leber als auch im Gehirn übermäßige Kupfereinlagerungen befanden. Der Kayser-Fleischer-Ring, der sich als Einlagerung überschüssigen Kupfers in die Cornea darstellt, wurde 1902 erstmals von den Augenärzten Kayser und Fleischer beschrieben und wurde 1936 von Policard *et al.* dargestellt [6]. Cummings fand 1948 heraus, dass die Erkrankung mit einem erhöhten hepatischen Kupferanteil einherging. Wenig später bewiesen Gitlin und Scheinberg einen Zusammenhang zwischen Morbus Wilson und erniedrigten Coeruloplasminwerten im Serum [4]. Bennetts und Chapman fanden 1956 heraus, dass es zwischen Morbus Wilson und Störungen des Kupfermetabolismus einen Zusammenhang gibt und begründeten diese These anhand der übermäßigen Kupferausscheidung im Urin bei Patienten mit der Erkrankung [6]. Walshes führte den oralen Chelator Penicillamin als einfache und gut wirksame Therapieform ein [22]. Die Erkenntnis, dass es sich bei der Erkrankung um eine Störung des Kupfergleichgewichts handelt, erweckte das Interesse an zellulären Mechanismen des Kupferstoffwechsels in Bezug auf diese Krankheit und führte zu Untersuchungen auf molekularer Ebene. Es stellte sich durch detaillierte, familiäre Studien heraus, dass es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung handelt, wobei Frydman 1986 herausfand, dass das betroffene Gen auf dem Locus der Esterase D auf dem Chromosom 13 lokalisiert ist [23]. Mehr noch zeigte sich 1993 durch Klonierung des Gens, dass das Wilson-Disease-Gen für eine kupfertransportierende ATPase kodiert, welche für die Kupferexkretion über die Galle zuständig ist [4, 24, 25].

Die Aufklärung der molekulargenetischen Ursache des Morbus Wilson vertiefte den Einblick in biochemische, zelluläre Vorgänge und molekulargenetische Untersuchungen und ebnete somit den Weg für eine weiterführende Forschung und Behandlung bei vielen verschiedenen Krankheiten [6].

## 1.2.2 Pathophysiologie und Pathogenese

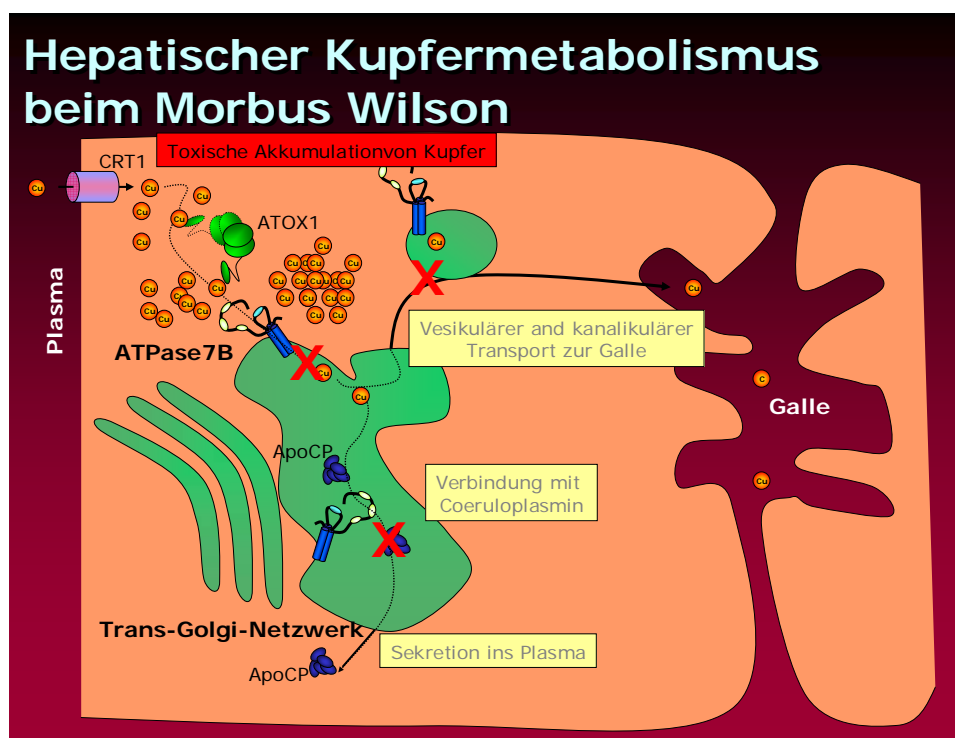
Das *ATP7B*-Gen, welches auf dem langen Arm des Exon 13 lokalisiert ist, besteht aus 21 Exons und erstreckt sich mit allen seinen intronischen Sequenzen über eine Länge von ungefähr 100 Kilobasen (kb) [25, 26, 27]. Wegen seiner großen Homologie zu dem kurz zuvor identifizierten Gen der Menkes-Erkrankung (*ATP7A*) wurde es als *ATP7B* bezeichnet [15]. Beide kodieren für eine kupfertransportierende ATPase. Es wurden bereits über 250 krankheitsverursachende Mutationen im *ATP7B*-Gen identifiziert (Wilson Database: [www.medgen.med.ualberta.ca/database.html](http://www.medgen.med.ualberta.ca/database.html)) [28].



**Abbildung 3:** In der Abbildung ist die schematische Darstellung des *ATP7B*-Gens zu sehen. Das *ATP7B*-Gen besteht aus 21 Exons. Oberhalb des Gens sind Mutationen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bezüglich ihres Ortes im Gen dargestellt. Unterhalb des Gens sind die Domänen, für welche das Gen an der bezeichneten Lokalisation kodiert, dargestellt.

Beim Morbus Wilson wurden unter den krankheitsverursachenden Mutationen sowohl Insertions- und Deletionsmutationen, welche zu den *frameshift*-Mutationen gehören, als auch *missense*-, *nonsense*- und *splice-site*- Mutationen identifiziert. Der größte Anteil der Patienten ist compound heterozygot, was bedeutet, dass nicht auf beiden Allelen die gleiche Mutation besteht, sondern auf den Allelen unterschiedlich Mutationen existieren [5]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Mutationen teilweise einer geographischen Verteilungen unterliegen. So weisen in Polen 70% [29], in Österreich und Ostdeutschland über 60% [30, 31] der Morbus Wilson Patienten die meist verbreitetste Mutation H1069Q (His 1069 Gln) auf. Bei diesem genetischen Defekt findet sich auf der Position 1069 eine Mutation von Histidin zu Glutamin [6]. Diese Mutation macht bei allen anderen Europäern und Nordamerikanern einen Anteil von 10 bis 40% von allen identifizierten Mutationen aus, wohingegen sie im asiatischen und afrikanische Raum kaum vorkommt. Über die Hälfte aller Mutationen kommen eher selten und vereinzelt vor und lassen keine geographischen Zusammenhänge erkennen [32].

Durch eine Mutation im *ATP7B*-Gen kommt es zu einer Funktionseinschränkung der ATPase7B [5]. Man beobachtet zum Beispiel Veränderungen im ATPase7B-abhängigen Kupfertransport, im kupferinduzierten Transport und in der Interaktion mit Atox1 [4]. Verschiedene Mutationen stehen im Zusammenhang mit unterschiedlichem Schweregrad der Funktionsuntauglichkeit des Wilson-Proteins, was vermutlich zu unterschiedlicher Ausprägung des klinischen Bildes führt [32]. Die ATPase7B kann der Funktion des Transports von Kupfer aus dem Zytosol der Hepatozyten in den Golgi-Apparat, wo Kupfer an Apoceruloplasmin gebunden oder in die Lysosomen transportiert wird, nicht mehr nachkommen. Es kommt zu einer Akkumulation des zytosolischen Kupfers, was durch kupfervermittelte oxygene Schädigung zu Funktionseinbußen der Zelle führt [4, 6]. Man beobachtet eine Verminderung des Coeruloplasmin im Blut und eine verminderte biliäre Exkretion [6]. Es kommt zur Abgabe ungebundenen Kupfers ins Blutplasma und zur Ablagerung in vielen anderen nicht-hepatischen Geweben. Dieser Kupferüberschuss kann die Aktivierung des programmierten Zelltods veranlassen [4, 5].



*Abbildung 4:* In der Abbildung ist der pathologische Kupferstoffwechsel der Leber beim Morbus Wilson schematisch dargestellt. Durch eine Veränderung im ATP7B-Gen kommt es zu einer Funktionseinschränkung bzw. zum Funktionsverlust der ATPase7B, was zu einer toxischen Kupferakkumulation führt. Verwendete Abkürzungen: ApoCP: Apocöeruloplasmin.

Britton beschreibt, dass Kupfer eine bedeutende katalytische Rolle in der Initiation der Reaktion mit freien Radikalen zugeschrieben wird. So kommt es zur Reaktion der resultierenden reaktiven Nitrogene, Oxygene und ungesättigten Aldehyde mit intrazellulären Antioxidantienspeichern, die dadurch geleert werden. Später kommt es zur Reaktion mit intrazellulären Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und Carbohydraten, was die Funktion der Zelle zerstört oder zumindest beeinträchtigt. Besonders die Membranfunktionen der Mitochondrien und Lysosomen werden durch die Zerstörung der Lipide beeinträchtigt, wobei man außerdem eine Zerstörung der mitochondrialen DNA beobachtet hat [33, 34].

Die Heterogenität der phänotypischen Ausprägung mag im Zusammenhang mit genetischen und umweltbedingten Faktoren stehen, welche die Kupfersequestration durch Metallothionein, die kupfertransportierende Funktion von Atox1, die exkretorische Funktion durch Murr1 und andere in den Kupferstoffwechsel involvierte Proteine beeinflussen [4].

Obwohl die ATPase7B nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Geweben vorhanden ist, ist ein Funktionsverlust des hepatozellulären Proteins allein für die Krankheit verantwortlich,

wie sich durch die Reversibilität der Kupferhomöostasestörung bei Patienten nach Lebertransplantation gezeigt hat [35].

An homozygoten Mäusen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen intrazellulärer Kupferakkumulation und der Entwicklung einer Leberzirrhose dargestellt werden [36]. Außerdem ließ sich ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und einem Leberkarzinom erklären, da reaktive Oxigene und Nitrogene Mutationen in Genen hervorrufen können, die mit der Entstehung von Karzinomen in Zusammenhang stehen, zum Beispiel vom p53-Supressorgen [37]. Hussian *et al.* zeigte, dass es bei 60% der Patienten mit Wilson`s Disease nicht nur zu einer Erhöhung des intrazellulären oxidativen Stress kommt, sondern auch zu einer erhöhten Frequenz von p53-mutierten Allelen, was man in direkten Zusammenhang mit der vermehrten Erzeugung von Oxigenen, Nitrogenen und ungesättigten Aldehyden stellte [38]

Diese Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen Metallüberschuss und einer Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms schließen. Hepatozelluläre Karzinome sind bei Morbus Wilson im Gegensatz zur Hämochromatose eher ungewöhnlich. Man vermutet, dass die Seltenheit dieser Entwicklung im Zusammenhang mit der relativ niedrigen entzündlichen Komponente bei der Entwicklung einer Leberzirrhose beim Morbus Wilson steht. Außerdem wird der beim Morbus Wilson induzierten Chelationstherapie eine protektive Wirkung zugesprochen [5].

### **1.2.3 Klinischer Verlauf**

Die klinischen Manifestationen des Morbus Wilson sind durch die Kupfer-Ablagerung in den unterschiedlichen Geweben bedingt [15]. Schon bei der Geburt ist die hepatozelluläre Kupferakkumulation bei Patienten mit Morbus Wilson vorhanden, obwohl vor dem fünften Lebensjahr nur sehr selten klinische Symptome beobachtet werden [39]. Wie oben bereits beschrieben, tritt die Erkrankung meistens zwischen dem 5. und 32. Lebensjahr in Erscheinung, wobei der Altersgipfel in der zweiten und dritten Lebensdekade liegt.

Der Morbus Wilson kann sich klinisch sehr verschieden zeigen. Anhand großflächiger Beobachtungen von Patienten ließ sich die Verteilung der klinischen Erstmanifestation wie folgt beurteilen: Hepatische Symptome wiesen 42% der Patienten auf, 34% zeigten neurologische Auffälligkeiten, 12% zeigten hämatologische Defizite, 10% zeigten psychiatrische Störungen und nur 1% zeigte eine renale Manifestation [39].

Insgesamt zeigen 40-70% der Patienten eine hepatische Symptomatik des Morbus Wilson, wobei sogar 80% der Patienten, die in der ersten Lebensdekade erkranken, unter der primär hepatischen

Manifestation leiden. Bei einer Erstmanifestation nach dem 20. Lebensjahr manifestiert sich der Morbus Wilson bei 75% der Erkrankten durch eine neurologische Symptomatik [40].

### 1.2.3.1 Hepatische Manifestation

Die hepatischen Manifestationen lassen sich in akute und chronische Verlaufsformen unterteilen [41]. Sie können sich durch eine asymptomatische Erhöhung der Leberenzyme bis hin zu einem fulminanten Leberversagen zeigen. Viele verschiedene Leberveränderungen, wie Autoimmunhepatitis, Steatosis mit oder ohne Hepatitis und Zirrhose können durch die Erkrankung verursacht sein [6]. Das akute oder subakute Leberversagen tritt eher bei jüngeren weiblichen Patienten auf und entsteht zumeist aus völliger Gesundheit. Oft ist es innerhalb kurzer Zeit letal. Begleitet wird das Versagen häufig von einer Coombs-negativen hämolytischen Anämie [41]. Außerdem bestehen oft gleichzeitig eine Koagulopathie und eine Niereninsuffizienz. Dieser Zustand lässt sich nur schwer mit konservativen Methoden therapieren. Therapeutisch bleibt meistens nur die Lebertransplantation [42]. Ein Großteil des in der Leber gespeicherten Kupfers wird aus den nekrotischen Hepatozyten freigesetzt, wodurch es in die Blutzirkulation übergeht und auf diesem Wege Membranphospholipide der Erythrozyten und Hämoglobin sowie Enzyme zerstört [15]. Die renale Toxizität entsteht ebenfalls durch die massive Freisetzung von Kupfer ins Blut, was in der Niere zu einer tubulären Dysfunktion führt, welche zunächst durch Glykosurie, Hypophosphatämie und erniedrigte Harnsäure gekennzeichnet ist [6]. Zur Abgrenzung eines fulminanten Leberversagen anderer Genese beobachtet man bei einem durch Morbus Wilson verursachten fulminanten Leberversagen folgende Veränderungen: deutliche Erhöhung des Bilirubins in Zusammenhang mit einer oft nur geringen Erhöhung der Transaminasen, sowie Hämolyse, normale bis erniedrigte Werte der alkalischen Phosphatase, erhöhte Serumkupferwerte und eine Verschiebung des Aspartataminotransferase-Alaninaminotransferase-Verhältnisses auf größer als 4 [43, 44]. Obwohl Morbus Wilson eine seltene Erkrankung ist, beträgt der Anteil an durch diese Krankheit verursachten fulminanten Leberversagen mit nachfolgender Notfall-Transplantation 6-12% [45]. Bei ungefähr einem Viertel der Patienten besteht zum Zeitpunkt der Erstmanifestation eine akute Hepatitis. Sie tritt meistens bei älteren Patienten auf und kann spontan in einen inaktiven Zustand übergehen. Sowohl die akute als auch die chronische Hepatitis können mit einem Ikterus, mit Abgeschlagenheit und einer Transaminasen-Erhöhung einhergehen. Wird zu diesem Zeitpunkt nichts unternommen, kann sich das Vollbild einer Zirrhose mit den typischen Komplikationen, z.B. portaler Hypertension, Ösophagusvarizen und Hypersplenismus, entwickeln [15].

### 1.2.3.2 Neurologische Manifestation

Durch den Kupferanstieg im Gehirn kommt es beim Morbus Wilson zu neurologischen Symptomen. Diese sind durch kavernenartige Degeneration der Basalganglien, beträchtliche Gliose und Neuronenuntergang bedingt, was durch den Kupferüberschuss in dieser Region verursacht wird [2].

Als neurologische Manifestation kann der Morbus Wilson mit geringgradigen Veränderungen wie einem leichten Tremor, Sprachschwierigkeiten oder einer Mikrographie beginnen [46]. Später entwickeln die Patienten Bewegungsstörungen wie Ataxien oder eindeutige Dysarthrien, die oft von Dysphagien begleitet werden. Zu den weiteren frühen neurologischen Manifestationen zählen die Hypersalivation und die Hypomimie. Ohne Behandlung verschlechtert sich der neurologische Zustand der Patienten bisweilen derart, dass sie bei nicht oder nur geringfügig geminderter Intelligenz und vollem Bewusstsein aufgrund progredienter Bewegungsstörungen mit Dystonie, Spastiken und Rigidity bettlägerig werden, Beugekontrakturen entwickeln, die Sprachfähigkeit verlieren und nicht mehr selbständig essen können. Die früher häufigen epileptischen Anfälle treten heute aufgrund wirksamer Therapeutika nur noch selten auf. Weitere pathologische Veränderungen können eine Dilatation des Ventrikelsystems, eine Basalgangliatrophie und eine generelle Kortex- und Hirnstamm-Atrophie sein. Häufig können im CT oder MRT Veränderungen im Thalamus, im Nucleus dentatus, in der Capsula interna oder der grauen Substanz dargestellt werden [47]. Allerdings korrelieren die radiologisch nachweisbaren Veränderungen nicht unbedingt mit dem Ausmaß der neurologischen Störungen [15].

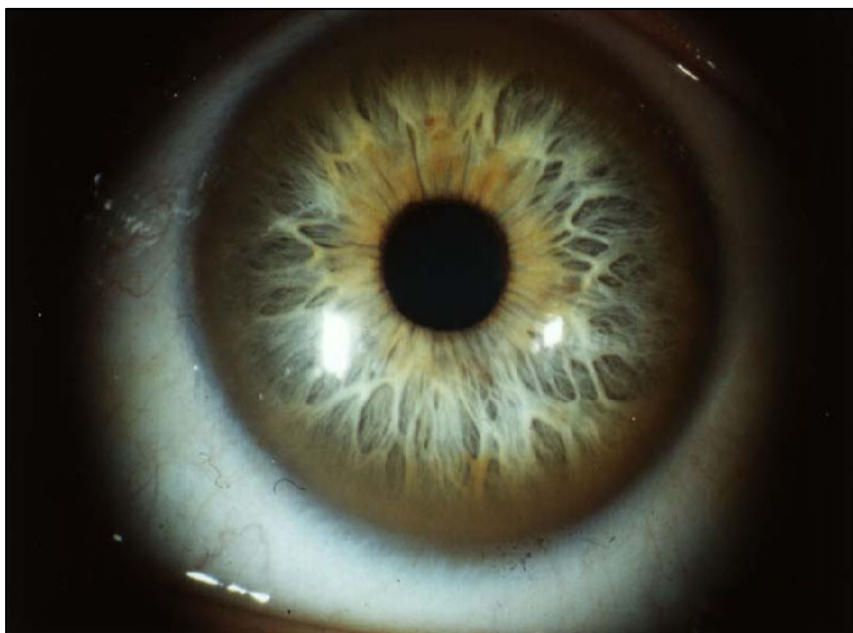
### 1.2.3.3 Psychiatrische Auswirkungen

Die wichtigsten psychiatrischen Symptome sind Persönlichkeitsveränderungen (erhöhte Reizbarkeit, aggressiver oder gefühlsbetonter Habitus, Wutanfälle). Zusätzlich tritt oft eine Abnahme der Leistung in der Schule oder am Arbeitsplatz in Erscheinung. Manche Betroffene neigen zu Depressionen, manisch-depressiver Symptomatik, Exhibitionismus, Neurosen oder Psychosen. Bei einer primär psychiatrischen Manifestation besteht die Problematik, dass die zugrunde liegende Erkrankung oft verkannt wird und es dann aufgrund einer fehlenden Therapie zu einer Progredienz der Erkrankung kommt. Insbesondere werden die bei jugendlichen Patienten auftretenden Stimmungsschwankungen und Apathien nicht selten als alterstypisch angesehen und ihnen daher keine pathologische Bedeutung zugeschrieben [15].



### 1.2.3.4 Manifestation am Auge

Die 1 bis 3 mm breiten, grünlich-braunen, rötlichen oder gold-braunen Kayser-Fleischer-Kornealringe sind am Rand der Kornea im inneren Drittel der Descemet-Membran, deren Verlauf sie streng folgen, gelegen [48, 49, 50]. Diese Kupferakkumulationen sind am besten mit der Spaltlampe zu beurteilen, können bei stärkerer Ausprägung aber auch mit bloßem Auge erkannt werden [6]. Für sich gesehen besitzen sie keinen Krankheitswert, da das Sehvermögen nicht eingeschränkt ist. Sie bestehen aus schwefel- und kupferreichen, elektronendichten Granula. Ca. 80% der Patienten weisen Kayser-Fleischer-Kornealringe auf. Bei neurologischer Symptomatik treten sie fast immer auf, seltener sind sie bei hepatischer Manifestation anzutreffen, dann vor allem im späteren Krankheitsverlauf. Die Kayser-Fleischer-Ringe sind zwar typisch für Morbus Wilson, aber nicht pathognomonisch, da sie bisweilen auch bei cholestatischen Lebererkrankungen, z.B. der primär biliären Zirrhose, nachzuweisen sind. Selten können auch sonnenblumenförmige Katarakte vorkommen. Gelegentlich führt eine routinemäßige ophthalmologische Untersuchung über den Befund von Kayser-Fleischer-Ringen gegebenenfalls zur Diagnose eines Morbus Wilson [15].



*Abbildung 5: Kayser-Fleischer-Kornealring [15]*

### 1.2.3.5 Hämatologische Manifestation

Im Rahmen der Manifestation eines fulminanten Leberversagens oder einer chronischen Hepatitis kann es zu einer massiven Hämolyse kommen. Das Auftreten der Hämolyse kann unterschiedlich sein. So kann sie chronisch, isoliert oder in Kombination mit portalem

Bluthochdruck und Splenomegalie auftreten. Hepatobiliäre Bilirubinsteine kommen als Resultat der Hämolyse vor. Teilweise werden Patienten bei einem Hämatologen vorstellig, bevor die ursächliche hepatologische Krankheit erkannt wird [51, 52].

### 1.2.3.6 Renale Manifestation

Bei einer renalen Manifestation sind die Glomeruli und die Tubuli betroffen. In 20% der Fälle mit einer renalen Manifestation zeigt sich eine Azotämie. Die glomeruläre Filtrationsrate ist reduziert. Nicht ganz geklärt ist die Frage, ob diese Reduktion eine direkte Folge der Kupferüberlagerung ist, oder als eine Folge der Zirrhose zu betrachten ist. Die tubuläre Beteiligung ist deutlich als Folge des Kupferüberschusses zu erkennen und ist durch Medikation mit Chelatoren zu verbessern. Die tubuläre Dysfunktion kann mit erhöhter Harnsäureausscheidung, mit einem Fanconi-Syndrom mit einer Erhöhung der Ausscheidung von Aminosäuren, mit tubulärer Azidose und mit verschiedenen pathologischen Veränderungen des Elektrolythaushaltes einhergehen. Elektrolytstörungen können auch eine Nephrokalzinose zur Folge haben. Eine Verminderung der Glukosekonzentration im Urin stellt einen Ausgleich zu der verminderten Glukosekonzentration im Blut bei einem Leberversagen dar [6].

### 1.2.3.7 Andere Manifestationen

Im Zusammenhang mit einem übermäßigem Kupfergehalt im Körper wurden auch pathologische Veränderungen am Herzen beobachtet. So sah man bereits linksventrikuläre Hypertrophien, vorzeitige ventrikuläre Kontraktionen, atriale Fibrillationen und sinoatriale Blockierungen. Pathologen entdeckten außerdem ventrikuläre Fibrosen und dilatierte Kardiomyopathien. Als Veränderung am Muskel wurden Rhabdomyolysen beschrieben, was auf die toxische Wirkung des Kupfers an den Mitochondrien zurückzuführen ist. In den Gelenken kann es zu einer Kupfereinlagerung in die Synovia kommen, was zu einer Arthritis führen kann. Ebenfalls beobachtet wurden Osteoporose und Osteochondritis dissecans. Vitamin-D-resistente Rachitis ist als Folge der renalen Dysfunktion ebenfalls beschrieben worden. Im endokrinen Stoffwechsel sieht man Hypoparathyreodismus als eine Komplikation des Morbus Wilson, wofür die Speicherung von Kupfer eine mögliche Erklärung zu sein scheint. Testikuläre Atrophie wird ebenfalls mit der Toxizität des vermehrten Kupfers in Verbindung gestellt [2, 50, 53]. In seltenen Fällen können eine primäre oder sekundäre Amenorrhoe oder wiederholte unerklärte Spontanaborte die Erstmanifestation des Morbus Wilson sein [15].

## 1.2.4 Diagnostik des Morbus Wilson

### 1.2.4.1 Labordiagnostik

Bei Patienten mit einer bislang ungeklärten Lebererkrankung oder neuropsychiatrischen Symptomen sollte nach dem Ausschluss der häufigeren Ursachen neben einer ophthalmologischen Untersuchung mit der Spaltlampe zur Detektion des Kayser-Fleischer-Kornealrings eine Bestimmung der Kupferstoffwechsel-Parameter (freies Kupfer im Serum, Serum-Coeruloplasmin und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin) durchgeführt werden. Für den Morbus Wilson ist eine erhöhte Konzentration des freien Kupfers, eine erniedrigte Konzentration des Coeruloplasmin im Serum und eine Erhöhung der Kupferausscheidung im Urin typisch. Die Gesamtkonzentration des Kupfers im Serum ist bei Patienten mit Morbus Wilson in der Regel erniedrigt. Sowohl das Kupfer im Serum als auch das Coeruloplasmin im Serum können jedoch im Normbereich sein. Pathognomonisch, aber nicht obligat vorhanden, ist eine transiente Erniedrigung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Außerdem lassen sich im Verhältnis zum Bilirubin nur mäßig erhöhte Transaminasen messen. Bestehen weiterhin diagnostische Probleme, können als zusätzliches Kriterium die Ergebnisse einer Testbehandlung mit Penicillamin oder eines Radiokupfer-Tests zur Hilfe genommen werden [15].

Bei 45% der Patienten mit hepatischer Manifestation eines Morbus Wilson ist die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration verringert oder liegt am unteren Rande des Normbereiches. In Abwesenheit eines Kayser-Fleischer-Rings reicht ein erniedrigter Serum-Coeruloplasminspiegel nicht für eine Diagnose [17]. Coeruloplasmin gehört zu den Akut-Phase-Proteinen, so dass die Serumkonzentration, zum Beispiel bei einer chronisch-aktiven Hepatitis, im Normalbereich liegen kann. Diagnostisch hilfreich ist, dass das zirkulierende Coeruloplasmin eine Verminderung der enzymatischen Aktivität aufweist, was auf die herabgesetzte Kupferinkorporation in Apocoeruloplasmin in der hepatischen Zelle zurückzuführen ist [54].

Die Messung des freien Kupfers ist diagnostisch zwar hilfreich, aber meistens nicht wegweisend. Viel mehr wird sie zu Zwecken der Therapieresponse bestimmt. Die Kupferausscheidung im Urin ist ebenfalls kein zuverlässiges diagnostisches Kriterium, da Sie auch bei hepatischer Nekrose anderer Genese erhöht sein kann. Außerdem kann bei präsymptomatischen Patienten die Kupferausscheidung im Normbereich liegen [45].

### 1.2.4.2 Histologische Diagnostik

Beim Verdacht eines Morbus Wilson sollte auf jeden Fall eine Untersuchung des hepatischen Kupfergehalts gemacht werden. Eine Leberbiopsie mit der quantitativen Bestimmung des hepatischen Kupfergehalts hat für die Diagnose einen hohen Beweiswert. Eine Kupferkonzentration  $>250 \mu\text{g/g}$  Trockengewicht einer Leberbiopsie erfasst auch präsymptomatische Patienten. Hingegen sind histologische Kupferfärbungen keine zuverlässigen Hilfsmittel, da diese z.B. auch bei cholestatischen Lebererkrankungen auffällig sein können [15]. In den meisten Fällen sieht man histologisch eine feintropfige Leberzellverfettung in Anwesenheit von Mallory-bodies. Außerdem lässt sich eine fibrotische Umstrukturierung des Mesenchyms erkennen. Diese Veränderungen sind allerdings nicht krankheitsspezifisch und werden auch bei anderen chronischen Erkrankungen der Leber, wie zum Beispiel bei einer alkoholinduzierten Hepatitis, gefunden [55].

### 1.2.4.3 Radiologische Diagnostik

Durch das MRT und das CT kann im Gehirn erhöhte Kupferspeicherung gemessen werden, was sich schon zu einem frühen Krankheitszeitpunkt nachweisen lässt und somit für den Verlauf eine wichtige Rolle spielen kann. Diese sieht man häufig im Thalamus, Nucleus dentatus, in der Capsula interna oder der grauen Substanz. Eine Korrelation zwischen dem Maß der Veränderung und der klinischen Präsentation ist allerdings nicht immer ersichtlich [15, 47, 56, 57].

### 1.2.4.4 Molekulargenetische Diagnostik

Aufgrund des autosomal rezessiven Erbgangs des Morbus Wilson sind statistisch  $\frac{1}{4}$  der Geschwister eines Patienten ebenfalls betroffen. Da die Geschwister meist klinisch unauffällig beziehungsweise subjektiv gesund sind, handelt es sich bei ihnen um eine prädiktive genetische Diagnostik. Einer derartigen Diagnostik sollte eine genetische Beratung vorausgehen, damit die Untersuchten sich mit dem möglichen Ergebnis und dessen Konsequenzen, zum Beispiel im Hinblick auf Kranken- und Lebensversicherungen, vorher auseinandersetzen können. Wenn keine Blutsverwandtschaft der Eltern vorliegt, sind die Kinder eines Patienten mit Morbus Wilson nur mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 1:175 betroffen [15].

Die Mutationsanalyse zum Zweck der Diagnostik ist aufgrund der vielen Mutationen ein sehr mühsames Unterfangen. Hinzu kommt, dass die meisten Patienten compound heterozygot sind, was bedeutet, dass sie zwei verschiedene Mutationen tragen. Wenn man sich aber auf die in einer Bevölkerungsgruppe gehäuft vorkommenden Mutationen beschränkt, ist die Mutationsanalyse

sehr hilfreich. Eine Polymerasekettenreaktion für die am häufigsten vorkommende Mutation in einer Region macht eine Diagnosestellung innerhalb einer Woche möglich [45].

Die am häufigsten identifizierte Mutation in Europa ist H1069Q im Exon 14 [30, 31, 58]. Der Nachweis dieser Mutation ist zwar einfach, jedoch meist nur begrenzt aussagekräftig, da die Mutation nur bei etwa 15% der Patienten homozygot vorliegt [59]. Die bisher bekannten über 250 Mutationen (Wilson Database: [www.medgen.med.ualberta.ca/database.html](http://www.medgen.med.ualberta.ca/database.html)) kommen in verschiedenen Exons des Gens vor [28, 60, 61, 62, 63, 64]. Es besteht bereits aktuell in speziellen Laboren die Möglichkeit einer umfassenden genetischen Diagnostik. Die Detektionsrate für Mutationen im *ATP7B*-Gen mittels direkten Sequenzierens aller Exons in den von Schmidt untersuchten Kollektiv liegt bei 65-85%. Diese Detektionsraten konnten auch in Kollektiven aus Brasilien, Polen, China und Iran bestätigt werden [15]. Die vorläufige Interpretationen zu den genetischen Ergebnissen zeigt, dass die Mutationen sowohl das Alter der initialen Symptome als auch das Erscheinungsbild mitprägen können, obwohl weitere bisher unbekannte modifizierende Faktoren bei der Expression der Erkrankung eine Rolle spielen [15, 32]. Wenn bei einem Patienten die Mutation im *ATP7B*-Gen auf beiden Chromosomen identifiziert ist, dann ist eine prädiktive genetische Diagnostik bei den Geschwistern einfach. Schwieriger ist es dagegen, das wenn auch relativ geringe Risiko für die Kinder eines Patienten auszuschließen, da bei dem Partner jegliche Anomalie im gesamten Gen ausgeschlossen werden müsste. Diese Untersuchung sollte nur unter Mitwirkung eines humangenetischen Beraters vorgenommen werden [15].

Momentan eröffnen sich vor allem in der molekulargenetischen Diagnostik Möglichkeiten, Analysen rentabler und schneller durchzuführen. Die Identifizierung der die Krankheit verursachenden Mutationen ist insbesondere im Hinblick auf mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelationen von Interesse und spätestens dann erforderlich, wenn gentherapeutische Strategien zur Anwendung verfügbar sind. Die Gentherapie wird möglicherweise zukünftig die Therapie der Wahl darstellen. Auf dem Wege dahin müssen jedoch noch viele Probleme des gezielten Gentransfers für den Einsatz im Menschen gelöst werden [65, 66, 67].

### **1.2.5 Therapie**

Ziel einer Therapie des Morbus Wilson ist die konsequente Entfernung des überschüssigen Kupfers aus dem Körper und das Erreichen einer Homöostase des Kupfer-Haushaltes. Die Therapie sollte unmittelbar nach Diagnose unabhängig von den Symptomen eingeleitet und dauerhaft fortgeführt werden. Als Optionen stehen dabei eine kupferarme Diät, mehrere

pharmakologische Therapeutika und die Lebertransplantation zur Verfügung. Bei der medikamentösen Behandlung wird eine Initial- und eine Erhaltungsphase unterschieden. Die initiale Phase umfasst durchschnittlich vier bis sechs Monate und ist beendet, wenn die Serumkonzentration des freien Kupfers im Normbereich ist. Die 24h-Kupfer-Ausscheidung im Urin sollte geringer als 500 µg sein. Die Therapie muss zeitlebens durchgeführt werden. Mit einer Besserung z.B. neurologischer Symptome ist frühestens ein halbes Jahr nach dem Abfall des Kupfers unter den toxischen Schwellenwert zu rechnen. Eine endgültige Genesung ist frühestens ein bis zwei Jahre nach Behandlungsbeginn zu erwarten. Jedoch darf vom neurologischen Status keinesfalls auf den Stand der Therapie geschlossen werden [15]. Hermann *et al.* entwickelten dazu ein Verfahren zur Therapiekontrolle, das auf einem standardisierten Scoreverfahren zur Beurteilung des klinisch neurologischen Schweregrads basiert [46].

### 1.2.5.1 Diät

Kupferreiche Lebensmittel wie Schellfisch, Leber, Pilze, Nüsse, Sojaprodukte, Gelatine, Rosinen, Schalentiere und Schokolade sollten besonders während der initialen Behandlungsphase bei einer Erkrankung an Morbus Wilson möglichst vermieden werden. In Gebieten, in denen ein hoher Kupfergehalt des Trinkwassers bekannt ist, sollte dieses vermieden werden.

### 1.2.5.2 Penicillamin

Penicillamin ist der „Gold-Standard“ für die Therapie des Morbus Wilson. Penicillamin reduziert das an Proteine gebundene Kupfer und senkt die Affinität der Proteine zum Kupfer. Dies ermöglicht die Bindung des Kupfers an Penicillamin. Nachdem Kupfer von Penicillamin auf diese Weise mobilisiert worden ist, erfolgt die Ausscheidung im Urin. Die meisten der symptomatischen Patienten reagieren innerhalb eines Monats auf die Behandlung [45]. Herkömmlich wurde in der Regel das Penicillamin verabreicht, initial täglich in einer Dosis von 1 g p.o. auf 1-2 Dosen verteilt. Da Penicillamin Wirkungen von Pyridoxin antagonisieren kann, sollten zusätzlich 25 mg Pyridoxin täglich verabreicht werden. In Einzelfällen kann auch eine neurologische Progredienz unter Penicillamin beobachtet werden und bei einer Dauer von mehr als einer Woche zu einem Umstellen der Therapie führen [15]. Penicillamin ist ein Medikament mit vielen Nebenwirkungen. Diese lassen sich einteilen in direkt dosisabhängige Nebenwirkungen und immunologisch induzierte Schädigung. Zu den dosisabhängigen Nebenwirkungen gehört der Mangel an Pyridoxin und der Eingriff in die Elastin- und

Kollagenanordnungen, was zu Hautläsionen wie Cutis laxa und Elastosis perforans serpingiosa führen kann. Zu den immunologisch induzierten Schäden, welche einen sofortigen Abbruch der Therapie erfordern, gehören Thrombozytopenien, Leukopenien, Immunkomplexnephritis, Pemphigus, systemischer Lupus erythematoses, Myasthenia gravis, buccale Ulzerationen, Goodpasture-Syndrom und Optikusneuritis [45].

### 1.2.5.3 Zink

Die Wirkung des Zinks als Medikament zur Behandlung der Morbus Wilson begründet sich durch zwei Wirkungsmechanismen. Zum einen blockiert Zink einen Carrier in den Enterozyten, der einen gemeinsamen Transporter für Kupfer und Zink darstellt. Zum anderen induziert Zink die Bildung von Metallothionein in den Enterozyten. Metallothionein bindet Kupfer und führt zu dessen Ausscheidung mit den Fäzes. Zink induziert außerdem die Bildung von Methallothionein in der Leber, was die Hepatozyten vor der Toxizität des Kupfers schützt [68, 69, 70]. Zink ist nebenwirkungsarm. In einer Dosis von 150 mg pro Tag, verabreicht als Acetat oder Glukonat, stellt elementares Zink eine effektive Erhaltungstherapie beim Morbus Wilson dar. Es darf infolge möglicher Komplexbildungen nicht mit Trien oder Penicillamin zusammen verabreicht werden [15].

### 1.2.5.4 Trientine

Trien, auch als Trientine, Triethylentetramin-Dihydrochlorid und TETA bezeichnet, ist ein oral verabreichter Chelator [15]. Das Medikament erhöht die Ausscheidung von Kupfer im Urin und ist in der Wirkung genauso effektiv wie Penicillamin, mit dem Vorteil, weniger Nebenwirkungen zu verursachen [71]. Die Effizienz dieser Behandlung ist allerdings in der Initialphase nicht so erfolgreich wie die mit Penicillamin. Trien erzeugt zwar eine bessere Kupfermobilisation, führt aber zu einem schnelleren Abfall der Kupferausscheidung im Urin als Penicillamin [45]. Mehrfach wurden als Nebenwirkungen eine Kontaktdermatitis und eine Eisenmangelanämie beobachtet. Deshalb wird bei der Einnahme von Trien eine Eisensupplementation empfohlen. Die verabreichte Dosis bei Erwachsenen liegt zwischen 750-1250 mg verteilt auf 2-4 Einnahmen pro Tag und wird individuell eingestellt. Trien wird nüchtern gegeben und stellt eine effektive Therapie dar [15].

### 1.2.5.5 Ammonium Tetrathiomolybdat

Diesem Medikament werden zwei Wirkungsmechanismen zugeschrieben. Zum einen bildet es im Intestinaltrakt mit Kupfer Komplexe, so dass Kupfer gar nicht erst in die intestinalen Zellen gelangt. Zum anderen bildet es mit Kupfer und Albumin im Blut Komplexe, so dass eine zelluläre Aufnahme von Kupfer aus dem Blut unmöglich ist. Die Erfahrung mit diesem Medikament ist bis jetzt noch nicht groß, scheint aber gerade in der Initialphase bei Patienten mit neurologischer Symptomatik besonders wirksam zu sein [45, 72].

### 1.2.5.6 Antioxidantien

Antioxidantien werden als zusätzliche Medikamente verabreicht. Man hat herausgefunden, dass bei einer Erkrankung an Morbus Wilson oft auch ein Mangel an Vitamin E, sowohl hepatisch als auch im Serum, besteht. Bei Substitution von Vitamin E wurde eine Verbesserung der Symptomatik beschrieben [45].

### 1.2.5.7 Lebertransplantation

Im Falle eines akut bzw. subakut verlaufenden Leberversagens oder im Falle einer chronisch progredienten Leberzirrhose ist die Lebertransplantation indiziert. Die hepatozytäre *ATP7B*-Gen-Expression ist im wesentlichen für das Krankheitsbild des Morbus Wilson verantwortlich. Die Lebertransplantation führt somit im Sinne einer somatischen Gentherapie zur Korrektur des genetischen Defektes. Nach Lebertransplantation ist keine spezifische Therapie des Morbus Wilson mehr erforderlich. Dennoch sind, soweit die terminale Lebererkrankung nicht im Vordergrund steht, die medikamentösen Therapiemöglichkeiten auszuschöpfen. Inwieweit sich nach Lebertransplantation neuropsychiatrische Symptome bessern können, wird kontrovers diskutiert. Fortgeschrittene neuropsychiatrische Symptome sind als Kontraindikation für eine Lebertransplantation anzusehen [15].

## 1.2.6 Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Morbus Wilson

Wie oben bereits beschrieben sind bis heute über 250 verschiedene Mutationen im *ATP7B*-Gen identifiziert worden (Wilson Database: [www.medgen.med.ualberta.ca/database.html](http://www.medgen.med.ualberta.ca/database.html)) [28]. Diese Heterogenität im *ATP7B*-Gen erschwert die Untersuchung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation, zumal sehr viele Patienten compound heterozygot sind. Zum Zwecke der Beurteilung des phänotypischen Bildes werden das Geschlecht, die Primärsymptomatik, das Alter der Erstmanifestation, einige Laborparameter, wie die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, die



Serum-Kupfer-Konzentration und die Kupferkonzentration im Urin, die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes, das Bild einer Leberbiopsie und der Kupfergehalt des Lebergewebes beurteilt. Studien an Homozygoten zeigen, dass es Zusammenhänge zwischen dem mutationsbedingtem Funktionsverlust des Genproduktes und dem Alter der Erstsymptomatik gibt. Eine Untersuchung von Panagiotakaki *et al.* ergab, dass die homozygote Trägerschaft einer *frameshift*- oder *nonsense*-Mutationen im Vergleich zu der Trägerschaft einer homozygoten *missense*-Mutationen phänotypisch zu einer früheren Krankheitsmanifestation und einer stärkeren Verringerung der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration führen, während bezüglich der Serum-Kupfer-Konzentration und der Kupfer-Konzentration im Urin keine Unterschiede erkannt wurden [73]. Dieser Umstand erklärt sich durch die unterschiedliche Funktionsbeeinträchtigung des Genproduktes des *ATP7B*-Gens. So führen *frameshift*- und *nonsense*- Mutationen zur Produktion sehr instabiler mRNA [73, 74], welche meist zu nichtfunktionalen Proteinen führt, während zum Beispiel bei der *missense*-Mutation H1069Q eine Restfunktion des Proteins erhalten bleibt [14, 75]. Außerdem scheint die homozygote Trägerschaft einer *frameshift*-Mutation mit einer überwiegend hepatischen Primärsymptomatik einherzugehen [76]. Das phänotypische Bild wird laut einiger Autoren nicht allein durch die krankheitsverursachende Mutation beeinflusst. So spielen andere genetische Faktoren, wie zum Beispiel der *APOE*-Genotyp [77], epigenetische Faktoren und Umweltbedingungen, wie zum Beispiel der Kupfergehalt des Trinkwassers und die Ernährung bezüglich kupferhaltiger Lebensmittel, in diesem Zusammenhang eine Rolle [64, 78]. Diese Theorie wird bestätigt durch die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps unter Patienten mit einem identischen Genotyp, was sogar unter Familienmitgliedern einer Familie bestätigt werden konnte [76].

Über die phänotypische Auswirkung der H1069Q-Mutation, welche in Zentral- und Osteuropa die am häufigsten identifizierte Mutation ist [30, 31, 58], konnten bis heute in diesem Zusammenhang die meisten Erkenntnisse gesammelt werden. Sie geht phänotypisch mit einer überwiegend neurologischen Primärsymptomatik und einer verhältnismäßig späten Erstmanifestation einher [73, 75, 77]. Hermann *et al.* beschreibt, dass manche Untersuchungen zu dem Ergebnis eines Ungleichgewichtes der Geschlechterverteilung mit einem überwiegenden Anteil weiblicher Patienten mit dieser Mutation kamen, während andere Untersuchungen dieses Ergebnis nicht bestätigen konnten. Außerdem beschreibt er einen vergleichsweise milden Verlauf der hepatischen Manifestation des Morbus Wilson bei dieser homozygoten Mutation [76]. Die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes wurde in einer Untersuchung von Caca *et al.* bei 82% der H1069Q-Homozygoten identifiziert [31]. Des weiteren fand Wu *et al.* heraus, dass die homozygote Trägerschaft der R778L-Mutation, welche in China die am häufigsten

identifizierte Mutation ist, zu einem verhältnismäßig frühen Krankheitsbeginn und einem Überwiegen der hepatischen Primärsymptomatik führt [79, 80]. Über die 3402delC-Mutation und die L708P-Mutation, welche die am häufigsten in Südamerika identifizierten genetischen Veränderungen im *ATP7B*-Gen sind, ist bisher nur bekannt, dass sich bei beiden Mutationen die Ausprägung des klinischen Bildes sehr heterogen darstellt. Es wird angenommen, dass Umweltbedingungen und andere genetische Faktoren das klinische Bild beeinflussen und dass die Veränderung im *ATP7B*-Gen allein nicht für das klinische Bild verantwortlich sein kann [78].

Der *APOE*-Genotyp hat Einfluss auf die klinische Manifestation des Morbus Wilson. Dem Apolipoprotein E 3 wird eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben, während das Apolipoprotein E 4 zur Verschlechterung degenerativer Erkrankungen des ZNS führt. So wurde in mehreren Untersuchungen herausgefunden, dass das Vorhandensein des *APOE*-Genotyps 3/3 im Vergleich mit anderen *APOE*-Genotypen zu einer späteren Erstmanifestation des Morbus Wilson führt [77, 81, 82].

Untersuchungen des *HFE*-Gens, welches bei der homozygoten Trägerschaft der C282Y-Mutation oder der compound heterozygoten Trägerschaft der Mutationen C282Y und H63D zu einer Erkrankung an der hereditären Hämochromatose führt, ergaben, dass das alleinige Vorhandensein einer der beiden Mutationen den Eisenstoffwechsel der an Morbus Wilson erkrankten Patienten nicht beeinflusst, während die homozygote Trägerschaft der C282Y-Mutation den Eisenmetabolismus auch bei gut therapiertem Morbus Wilson verändert [83, 84]. Dies mag in diesem Zusammenhang daran liegen, dass die betroffenen Patienten sowohl an der hereditären Hämochromatose als auch an Morbus Wilson erkrankt sind.

## 2. AUFGABENSTELLUNG

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, mögliche Korrelationen zwischen dem Genotyp im *ATP7B*-Gen und dem Phänotyp bei Patienten mit diagnostiziertem Morbus Wilson herauszufinden. Zu diesem Zweck wurde die klinische Symptomatik der Patienten betrachtet, bei denen eine Mutation homozygot im Genotyp identifiziert wurde. Beurteilt wurden diesbezüglich das Geschlecht, die Primärsymptomatik, das Alter der Erstmanifestation, die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes, Ergebnisse einer eventuell vorhandenen Leberbiopsie, die Familienanamnese bezüglich der Erkrankung, die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration und die Kupfer-Konzentration im Serum und im Urin. Weiterführend wurden andere genetische Faktoren, wie der *APOE*-Genotyp und eventuell vorhandene Mutationen im *HFE*-Gen, in Hinblick auf die Primärsymptomatik der an Morbus Wilson erkrankten Patienten untersucht. Das Vorhandensein bzw. das Nichtvorhandensein eines Kayser-Fleischer-Ringes wurde zusätzlich noch einmal bezüglich der Primärsymptomatik betrachtet. Durch die genannten Untersuchungen und Auswertungen soll beurteilt werden können, ob die krankheitsverursachenden Mutationen zu bestimmten Tendenzen des klinischen Bildes führen können und ob andere genetische Faktoren Auswirkung auf die Ausprägung der Erkrankung haben. Umgekehrt könnte somit auch von bestimmten klinischen Symptomen und Parametern auf eine Mutationsart geschlossen werden, was eine schnelle und adäquate Behandlung unterstützen könnte.

Außer der Interpretation einer möglichen Genotyp-Phänotyp-Korrelation soll anhand länderbezogener Mutationsspektren, welche die in den jeweiligen Ländern identifizierten Mutationen in der Häufigkeit ihres Auftretens und in ihrer Allel-Frequenz darstellen, gezeigt werden, welche Mutationen in den unterschiedlichen Ländern häufig vorkommen und nach welchen dementsprechend bei der genetischen Analyse zuerst gesucht werden sollte.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Material**

Durch die große Kooperation vieler Medizinischer Kliniken weltweit konnte eine sehr große Anzahl an Patienten mit klinisch diagnostiziertem Morbus Wilson ermittelt und genetisch untersucht werden. Insgesamt wurden in dieser Arbeit die Daten von 718 Patienten erfasst und ausgewertet. Dabei wurden 347 Proben von mir selbst analysiert und ausgewertet. Bei diesen Proben handelte es sich um die DNA von 107 Patienten aus Deutschland, 28 Patienten aus Ägypten, 153 polnischen, 13 slovakischen, 10 serbischen, 14 rumänischen und 18 litauischen Patienten sowie 4 Patienten aus den U.S.A.. Die Ergebnisse der genetischen Analyse vorheriger Doktoranden (Grit Sommer 50 Proben, Sebastian Pokojski 70 Proben) flossen ebenfalls in diese Arbeit ein. Die Sequenzdaten weiterer 251 Proben waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Patientenmaterial sowie Informationen zur klinischen Symptomatik bezogen wir sowohl aus vielen verschiedenen Zentren innerhalb Deutschlands als auch aus Brasilien, Polen, Iran, China, Rumänien, Slowakai, Tschechien, Serbien, Litauen, U.S.A., Ägypten und Griechenland (Tabelle 1). Bei allen Patienten erfolgten die molekulargenetischen Untersuchungen nur nach schriftlicher Einverständniserklärung. Das genetische Material wurde nach einer Blutentnahme aus den Leukozyten gewonnen. Im Falle einer vorausgegangenen Leberpunktion war eine DNA-Gewinnung auch aus dem zur Verfügung stehenden Lebergewebe möglich. Die Blutentnahme erfolgte teilweise bei dem betreuenden Hausarzt und teilweise in der zuständigen Klinik. Anschließend wurden die Proben in Form von 9 ml- EDTA Monovetten bei +4°C gekühlt an die Charité geschickt. Das zu untersuchende Lebergewebe musste bei -80°C zur Charité gesandt werden, wo die genetische Diagnostik stattfand. Die Ermittlung der klinischen Symptomatik der an Morbus Wilson erkrankten Patienten erfolgte durch einen speziell für das Krankheitsbild des Morbus Wilson entworfenen Fragebogen, welcher auf der Seite 25 abgebildet ist. Dieser wurde von dem behandelnden Arzt ausgefüllt und anschließend an die Charité zur Auswertung zurückgesandt. Arztbriefe und Berichte zum Verlauf der einzelnen Patienten boten ebenfalls eine Informationsquelle.

*Medizinische Zentren im Ausland*

Polen	Professor Anna Czlonkowska 2nd Department of Neurology Institute Psychiatry and Neurology Warsaw	Litauen	Prof. habil. Dr. L. Kupcinskas Department of Gastroenterology Kaunas University of Medicine Kaunas
Polen	Piotr Socha, MD Department of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition The Children's Memorial Health Institute Warsaw	Rumänien	Cristina Maria Mihai, MD Constanta Hospital Pediatric Department Constanta
Brasilien	Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Caçado Dr. Marta Deguti Prof. Dr. Egberto Reis Barbosa Departments of Gastroenterology and Neurology Hospital das Clinicas University of Sao Paulo Sao Paulo	Griechenland	Giorgios Dedoussis Department of Nutrition Science and Dietics Harokopi University of Athens Athens
China	Professor Xiuling Liang, MD Department of Neurology First Affiliated Hospital Sun-Yat-sen University of Medical Science Guangzhou	Slowakai	Doc. MUDr. Viera Kupcová, CSc. 3. Department of Internal Medicine Derer's Hospital Bratislava
Iran	H.Najmabadi, Ph.D Ass. Prof of Mol. Genetics Director of Genetic Research Center Welfare and Rehabilitation University Tehran	Serbien	Slobodan Kazic, MD Zverdara Hospital Belgrad
Ägypten	Dr. Ezzat Elsobky, M.D. FACMG. Director Prof. of Genetics Tawhida Yassin Abdel Ghaffar, MD Prof. of Pediatric Hepatology Ain Shams University Cairo	U.S.A.	Dr. Tom Vallone Tufts University School of Medicine New England Medical Center Boston

*Tabelle 1: Die Tabelle beinhaltet die medizinischen Zentren im Ausland, von denen sowohl klinische Informationen als auch Patientenmaterial, welches in der Charité genetisch untersucht wurde, zur Verfügung gestellt wurde.*

**Questionnaire Wilson disease**

Liver involvement  Neuropsychiatric symptoms  Asymptomatic

**Index / Relative<sup>+</sup> patient:** \_\_\_\_\_ born: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ male  female

**Height:** \_\_\_\_\_ cm **Weight:** \_\_\_\_\_ kg **Country of birth:** \_\_\_\_\_

**Ethnic origin** caucasian  asian  black  others: \_\_\_\_\_

**Date of first symptoms:** \_\_\_\_\_ **Date of diagnosis:** \_\_\_\_\_

**Alive**  **Dead**  if so, **date of death:** \_\_\_\_\_ **and pathology report\***

**ATP7B genotype:** \_\_\_\_\_ **ceruloplasmin genotype:** \_\_\_\_\_

**Apo E genotype:** \_\_\_\_\_ **HFE genotype:** \_\_\_\_\_ **others:** \_\_\_\_\_

**Availability of tissue**  if so, please specify: \_\_\_\_\_ **DNA**  **RNA**

**Ceruloplasmin serum conc.:** \_\_\_\_\_ g/l (normal > \_\_\_\_\_ g/l)

**Total serum copper conc.:** \_\_\_\_\_ **non-protein bound serum copper conc.:** \_\_\_\_\_

**Urinary copper conc.:** \_\_\_\_\_ µg/24h (normal < \_\_\_\_\_)

**Urinary copper excretion after penicillamine:** \_\_\_\_\_ µg/24h

**Serum iron conc.:** \_\_\_\_\_ **Ferritin serum conc.:** \_\_\_\_\_ **Transferrin sat.:** \_\_\_\_\_ %

**Liver biopsy** yes  no

if yes: **Hepatic copper concentration:** \_\_\_\_\_ **Hepatic iron concentration:** \_\_\_\_\_

**Hepatic copper stain** pos.  neg.  **Hepatic iron stain** pos.  neg.

**Liver transplantation** yes  no

if yes: **date of LTx:** \_\_\_\_\_ **Follow up after LTx, please specify:** \_\_\_\_\_

**acute liver failure**  **chronic liver failure**  other reasons for LTx: \_\_\_\_\_

**Hemolysis** yes  no  if yes, proven by: \_\_\_\_\_

**Family history** yes  no  if so, please specify (e.g. attach pedigree)

brother/sister  child  parent  other \_\_\_\_\_

**Kayser-Fleischer-Ring** yes  no

**Treatment** **penicillamine**  **Zinc**  **trientine**  others: \_\_\_\_\_

**Course of disease since initiation of treatment:** \_\_\_\_\_

**Please, specify clinical symptoms and any other comments\*:** \_\_\_\_\_

<sup>+</sup>in case of relative, please indicate also the index patient

\*please, attach a copy of a report or specify in more detail on a separate page

### 3.1.1 Technisches Material und Chemikalien

#### Technisches Material:

ABIPrism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Analysenwaage (Sartorius)

Biofuge fresco Heraeus Instruments

Eppendorf Reference Pipetten

Mikrowelle

Power Supply (Biometra)

T3 Thermocycler (Biometra)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Vortex (Roth)

#### Chemikalien:

Agarose 50 – 100 bp (Roth)

BigDye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)

QIAamp Blood Kit, Cat.Nr. 51104, (Qiagen)

QIAquick PCR purification Kit, Cat.Nr. 28106 (Qiagen)

DNeasy Tissue Kit, Cat.Nr. 69504, (Qiagen)

DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen)

Ethanol (96 – 100%)

HPLC-H<sub>2</sub>O

Primer

Sybrgreen

Template Supression Reagent (TSR), (Applied Biosystems)

TBE-Puffer

AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems)

HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Gewinnung der DNA**

Die Gewinnung menschlicher DNA ist aus allen kernhaltigen Zellen möglich. Zur genetischen Diagnostik werden in diesem Falle die Leukozyten oder, wenn möglich, das Lebergewebe, verwendet. Zur Isolation der DNA aus Leukozyten wird QIAamp Blood Kit, Cat. Nr.51104, der Firma Qiagen verwendet, wohingegen die DNA aus Lebergewebe mittels DNeasy Tissue KIT isoliert wird.

Die Leukozyten werden durch Zentrifugation gewonnen. Bei dieser Methode wird die Blutprobe auf Raumtemperatur erwärmt, bevor sie dann 15 Minuten bei 2800 Umdrehungen in der Minute (rpm) zentrifugiert wird. Auf diese Weise trennen sich die festen Blutbestandteile vom Plasma. Zwischen diesen Fraktionen entsteht ebenfalls durch die Zentrifugation eine Dritte, die sogenannte Leukozytenmanschette, welcher unser spezielles Interesse gilt. Zur Isolierung der DNA, welche mit Hilfe des QIAamp Blood Kit (Qiagen) vollzogen wird, werden die Leukozyten lysiert. Dazu benötigt man 250 µl der Leukozytenmanschette, auch Buffy coat genannt, 25 µl Qiagen-Protease und 250 µl Puffer AL. Diese Substanzen werden 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt bevor sie anschließend 10 Minuten bei 56°C inkubiert werden. Nach kurzem Anzentrifugieren der Probe mit nachfolgender Zugabe von 250 µl Ethanol ( 96-100% ) zur Fällung der DNA, wird die Probe nochmals 10 Sekunden auf dem Vortex gemischt und nochmals anzentrifugiert. Anschließend werden die lysierten Leukozyten auf eine Spinsäule übertragen und eine Minute bei 8500 rpm oder bei zähflüssigen Proben bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Spinsäule enthält eine spezielle Matrix zur Adsorption der DNA. In weiteren Schritten wird die DNA mit Hilfe eines Puffers gewaschen. So gibt man 500 µl des Puffers AW1 auf die Spinsäule und zentrifugiert sie anschließend bei 8000 rpm für eine Minute. Danach wird die Spinsäule mit 500 µl des Puffer AW2 versetzt und drei Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur endgültigen Auswaschung der DNA, die sich in Verbindung mit der Matrix der Spinsäule befindet, versetzt man die Probe wieder mit einem Puffer, dieses Mal mit 200 µl des Puffers AE, und zentrifugiert die Probe nun zum letzten Mal für eine Minute bei 8000 rpm.

Die Gewinnung der humanen DNA aus dem Lebergewebe erfolgt nach der Entnahme von 25 mg aus dem gefrorenen Gewebe. Dieses wird zunächst in kleinere Stücke zerteilt und anschließend mit 20 µl Proteinkinase K und 180 µl Puffer ATL versetzt. Diese Probe wird nach Mischung auf dem Vortex über Nacht bei 55°C inkubiert. Dieser Arbeitsschritt führt zur Lyse der Zellen. Der



Probe wird auf dem Vortex 200 µl AL Puffer hinzugemischt, bevor sie für eine Minute bei 70°C inkubiert wird, um eine komplette Lyse zu erreichen. Anschließend wird die DNA mit Hilfe von 200 µl 196-100%igem Ethanol und Mischung auf dem Vortex gefällt, bevor die Probe auf eine Spinsäule aufgetragen und bei 8000 rpm zentrifugiert wird. Die Arbeitsschritte zur Reinigung und endgültigen Elution der DNA erfolgen auf gleiche Weise, wie bei der Extraktion von humaner DNA aus Leukozyten, die oben bereits beschrieben ist.

### 3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-chain-reaction, PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen, der in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung zugekommen ist. Diese Methode wurde 1985 veröffentlicht, nachdem sie 1984 von Kary Mullis konzipiert wurde. Er wurde schließlich 1993 mit dem Nobelpreis geehrt.

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion besteht darin, dass spezifische DNA-Sequenzen mit Hilfe natürlicher DNA-Polymerase des *Escherichia coli* Bakteriums vervielfältigt werden. Zunächst wird der zu vervielfältigende Abschnitt der DNA mit einem Primer hybridisiert. Ein Primer ist ein Oligonukleotid, dessen Sequenz komplementär zu dem Anfang des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts ist. Von diesem Primer aus kann nun ein zu der Ausgangs-DNA komplementärer Abschnitt synthetisiert werden. Man kann einen Zyklus der PCR in drei Phasen unterteilen. Zuerst beobachtet man die Denaturierungsphase, in der die DNA auf 95°C erhitzt wird, um die beiden Einzelstränge voneinander zu trennen, die nach Abkühlung auf eine für einen bestimmten Primer optimale Temperatur als Matrize gebraucht werden. Anschließend erfolgt die Hybridisierungsphase, in der der Primer mit dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt hybridisiert wird. Bei einer Temperatur von 72°C folgt nun die Elongationsphase, in der unter der Katalyse einer spezifischen Taq-Polymerase die Neusynthese zweier zu den DNA-Strängen komplementärer Sequenzen erfolgt. Mittlerweile verwendet man ein hitzestabiles Enzym des Bakterium *Thermus aquaticus*, welches im Gegensatz zu den vorher verwendeten Enzymen des *E. coli*-Stammes selbst bei Temperaturen bis zu 95°C aktiv ist. Dadurch kann der PCR-Zyklus mehrmals hintereinander durchgeführt werden ohne erneut Substitutionsmittel hinzuzugeben. Die in einem PCR-Zyklus entstandenen Sequenzen werden in den darauf folgenden Schritten ebenfalls als Matrize genutzt, so dass sich die Anzahl der DNA-Stränge exponentiell vervielfacht.

Bedeutung findet die Polymerase-Ketten-Reaktion beim Nachweis von genetischen Mutationen, wie zum Beispiel des Morbus Wilson, aber auch beim Nachweis von Bakterien und Viren und

bei der Forensik, welche man auch als genetischen Fingerabdruck bezeichnet. Da Mutationen, die begründend für eine Krankheit sind, häufig auf einem bestimmten Genlocus vermehrt zu finden sind, macht es Sinn, zunächst diese entsprechenden Exons zu untersuchen. Ost- und zentraleuropäische Patienten mit klinischem Verdacht auf Morbus Wilson untersucht man genetisch zum Beispiel zunächst auf die Mutation H1069Q im Exon 14.

Die PCR wird in einem programmierbaren Temperaturwechselgerät (Thermocycler) durchgeführt. Vor Beginn der einzelnen Reaktionszyklen wird die Temperatur bei Verwendung des Master-Mix 1 und 2 für 10 Minuten auf 95°C eingestellt, woraufhin die DNA innerhalb einer Minute bei 95°C denaturiert. Unter Verwendung des Master-Mix 3 wird die Temperatur nur für zwei Minuten auf 95°C eingestellt, bevor die DNA innerhalb einer Minute bei selbiger Temperatur denaturiert. Anschließend senkt das Gerät für eine Minute die Temperatur für die Annealingphase auf das für den gewählten Primer spezifische Temperatur-Optimum. Im anschließenden Schritt findet die Elongationsphase statt. Während dieser Phase wird die Temperatur für 1,5 Minuten auf 72°C erhöht auf der sie weitere zwei Minuten für die Finalelongitation erhalten bleibt. Diese Temperatur entspricht dem Temperatur-Optimum der hitzestabilen *Taq*-Polymerase. Abschließend kühlt das Gerät die Proben auf 4°C ab. Für die Bearbeitung der einzelnen Exons wurden verschiedene Primer und Reaktionsansätze (Master-Mix 1-3) und Temperatur-Optima benutzt, die in Tabelle 2 aufgelistet sind. Nachfolgend ist die Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsansätze beschrieben.

## Material und Methoden

		Primer	Annealing-Temperatur	Basen-paare	Reaktions-ansatz
Exon 1	forward	5'- TTC CCG GAC CCC TGT TTG CT -3'		262 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- AAT CCT CCT GGT GGG AGT GAG CAC -3'	54°C		
Exon 2a	forward	5'- TGA CAC CAG TGG CAT TGT TT -3'		450 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- GAG GCT GCC TTT CCT TCT G -3'	60°C		
Exon 2b	forward	5'- CAT TGA GGA CAG GAT TTC CAA T -3'	Tm:	447 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- ATA TCA ATT GGT CCC AGG CTT A -3'	60°C		
Exon 2c	forward	5'- GTA AAT GAC ATG GGA TTT GAA G -3'		480 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- AGA ACT GGA AGA CCT GTG ATC T -3'	57°C		
Exon 2d	forward	5'- GAA GAA AAT ATT GGC CAG CTC -3'		508 bp	Master-Mix 2
	reversed	5'- AAG AGA AAA GGA GAC AAG CTC A -3'	58°C		
Exon 3	forward	5'- GAT ATT TCT GAC ATT TTA TCC -3'		323 bp	Master-Mix 3
	reversed	5'- GCA GCA TTC CTA AGT TCA -3'	57°C		
Exon4	forward	5'- GCA GCC TCA TTT TCA AAC AGT G -3'		460 bp	Master-Mix 3
	reversed	5'- CGG CTT CAA AGG AAA GTG AAA C -3'	62°C		
Exon 5	forward	5'- GCT TTC ACA GGC TTT CCT TG -3'		349 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- AAA GGT GAC TAC AAT TTT TAA TGA TGA -3'	60°C		
Exon 6	forward	5'- AGC TGT CTT CCC AGA AGT GC -3'		400 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- GCA GCT AAT CCA GGA GGA AG -3'	59,5°C		
Exon 7	forward	5'- TGT GAC AAA GGC AGG TCT TAA A -3'		503 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- GAA ACC AGG CCC TTA GTA GTC C -3'	60°C		
Exon 8	forward	5'- AGC TAG AGG CTT TGC CAT CC -3'		404 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- CAT GGT GTT CAG AGG AAG TGA G -3'	60,5°C		
Exon 9	forward	5'- TTT CGA TAG CTC TCA TTT CAC A -3'		209 bp	Master-Mix 2
	reversed	5'- AAA CCA CAT GGG CAT CTG AT -3'	55°C		
Exon 10	forward	5'-CAG CTG GCC TAG AAC CTG AC-3'		350 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'-TTA CAG TGC TTC CGG GTT TC -3'	60°C		
Exon 11	forward	5'- GCT GAG CAA GTG ACA GTT -3'		231 bp	Master-Mix 3
	reversed	5'- CGA GGA AGA TGA AGT TAG TT -3'	57°C		
Exon 12	forward	5'- TCC ATG CTT GTG GTG TTT TAT T -3'		358 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- TCT GGC TTA GAT TTT GCT GTC A -3'	60°C		
Exon 13	forward	5'- GAA CCC AAG TTC GTC ACG TT-3'		350 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- CAT CTC TCA GGA TGG GGA AA -3'	60°C		
Exon 14	forward	5'- GCA GGT TGG GTG AAG TTC TG -3'		399 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- GGG CCC TCT AAG TGG TTT TC -3'	60,5°C		
Exon 15	forward	5'- CTT TCT CTC AGT TCC CGC TTT C -3'		358 bp	Master-Mix 3
	reversed	5'- TCT GTG GTT TGA CCC ACC TCT A -3'	62°C		
Exon 16	forward	5'- GCT GTT AAA AGG ATT GCA TGG -3'		300 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- AGG AGG ACT CTT TTG CCT GA -3'	60°C		
Exon 17	forward	5'- AAC TTG GTA GCT GCT GAT -3'		239 bp	Master-Mix 3
	reversed	5'- TTT TGT CTC TAA CTG CTT TTA TGA -3'	57°C		
Exon 18	forward	5'- TAA CTT GAG GTT TCT GCT GCT ATC -3'		345 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- GGA GCA CAC AGT GAG GAA GG -3'	60°C		
Exon 19	forward	5'- GGC AGA CCC CTT CCT CAC -3'		215 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- CCT GGG AGA GAG AAG CCT TT -3'	54°C		
Exon 20	forward	5'- CTA GGT GTG AGT GCG AGT T -3'		253 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- CAG CAT TTG TCC CAG GT -3'	53°C		
Exon 21	forward	5'- AAT GGC TCA GAT GCT GTT -3'		361 bp	Master-Mix 1
	reversed	5'- GCT TGT GGT GAG TGG AGG -3'	53°C		

*Tabelle 2: In der Tabelle findet sich eine Auflistung der für die einzelnen Exons verwendeten Primer, die Größe des entstehenden PCR-Produktes sowie der verwendete Reaktionsansätze und die benötigten Temperaturen.*

**Master Mix 1**

17,9 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
3,0 µl	Qiagen Puffer 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
6,0 µl	Qiagen Q-Solution
0,6 µl	dNTP
0,6 µl	Forward-Primer (100µmol)
0,6 µl	Reverse-Primer (100µmol)
0,3 µl	Qiagen <i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl)
1,0 µl	Template

**Master Mix 2**

22,1 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
3,0 µl	Qiagen Puffer 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
1,8 µl	MgCl <sub>2</sub> 25 mM
0,6 µl	dNTP
0,6 µl	Forward-Primer (100µmol)
0,6 µl	Reverse-Primer (100µmol)
0,3 µl	Qiagen <i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl)
1,0 µl	Template

**Master Mix 3**

23,9 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
3,0 µl	PE Puffer 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
0,6 µl	dNTP
0,6 µl	Forward-Primer (100µmol)
0,6 µl	Reverse-Primer (100µmol)
0,3 µl	PE <i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl)
1,0 µl	Template

### 3.2.3 Reinigung des PCR-Produktes

Zur Bearbeitung der gewonnenen DNA muß die DNA von allen Störfaktoren, wie zum Beispiel von restlichen dNTPs und überschüssigen Primern, gereinigt werden. Zu diesem Zweck führt man die Aufreinigung der DNA mit *QIAquick™ PCR-Purification Kit* durch.

Diese Methode bedient sich des speziellen Aufreinigungs-Kits der Firma Qiagen und durchläuft folgende Schritte: Zunächst werden 30 µl PCR-Produkt mit 150 µl Puffer versetzt und vermischt. Anschließend wird die Lösung auf eine spezielle Filtersäule gegeben. Die Probe wird nun 1 Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert, erneut mit 750 µl Puffer versetzt und anschließend noch einmal 1 Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der Filtergebundenen DNA werden 30 µl Puffer AE auf den Filter gegeben. Im Anschluss daran wird die Probe 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend erneut 1 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert.

### 3.2.4 Gelelektrophorese

Um die Qualität der PCR-Produkte zu überwachen, kontrolliert man diese mit der Gelelektrophorese. Durch die elektrische Ladung der Moleküle kommt es zu einer Wanderung im Elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit lässt erkennen, wie groß das Molekül ist und wie stark seine Ladung ist.

Man benötigt zunächst Agarose-Gel, wofür man 3 g Agarose (50-100000 bp) mit 100 ml TBE-Puffer mischt und mehrmals kurz aufkocht bis eine homogene Flüssigkeit entsteht, die nach Abkühlung auf 50°C auf eine Gelkammer gegossen wird und dort zu Gel erstarrt. Dieses Gel wird wiederum mit TBE-Puffer übergossen, bevor in die jeweils erste Geltasche einer zweireihigen Gelplatte ein 6 µl eines DNA-Markers pipettiert wird. Diese gibt nach Anfärbung Auskunft über Größe des Moleküls. Alle anderen Geltaschen werden mit einer Mischung aus 2 µl Elektrophoresepuffer, welcher der Sichtbarmachung der Lauffront dient, und 3 µl gereinigtem PCR-Produkt gefüllt. Der Gelplatte wird nun eine Spannung von 105 V angelegt, bis die Lauffront die Mitte der Gelplatte von der Kathode in Richtung der Anode überquert hat. Anschließend wird das Gel in einem Sybrgreenbad bestehend aus 50 ml TBE-Puffer und 5 µl Sybrgreen 30 Min. lang gefärbt und im UV-Licht bei 320 nm durchleuchtet und zu Dokumentationszwecken fotografiert.

### 3.2.5 Sequenzanalyse

1977 entwickelte Frederick Sanger die Kettenabbruchmethode. Diese dient der Bestimmung der Nukleotid-Sequenz der DNA. Nach Denaturierung der DNA wird der zu analysierende Einzelstrang mit einem spezifischen Primer hybridisiert, welcher am 3' Ende der DNA bindet. Dieses Hybrid dient in Zusammenhang mit einer DNA-Polymerase der Bildung einer komplementären Sequenz, welche Rückschlüsse auf die Originalsequenz erlaubt, indem man indem man die vier Desoxynukleosidtriphosphate, welche radioaktiv markiert sind, und ein 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP), als Analogon zu einem der dNTPs, zusetzt. Der Einbau eines ddNTPs führt zu Abbruch der Strangsynthese, da ein ddNTP aufgrund des Fehlens des 3'-Hydroxyendes keine Phosphorbindung knüpfen kann. Vier Reaktion mit jeweils einem anderen ddNTP werden auf diese Weise durchgeführt. Im Anschluss daran werden die Abbruchfragmente des jeweiligen Ansatzes unter Berücksichtigung ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht und letztendlich von der Kathode zur Anode hin abgelesen.

#### 3.2.5.1 Sequenzanalyse mit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Das Prinzip der BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Allerdings sind die Didesoxynukleosidtriphosphat-Moleküle (ddNTP) fluoreszenzmarkiert. Die Farbterminatoren sind kovalent an die ddNTPs gebunden und führen nach Einbau zum Kettenabbruch und zur gleichzeitigen Markierung durch den Fluoreszenzfarbstoff. Anhand unterschiedlicher Farbstoffe an den vier unterschiedlichen ddNTPs können diese unterschieden werden. Die Farbstoffe werden durch einen Laser des Sequenzierungsgerätes aktiviert.

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der Terminationsreaktionsmischung beschrieben.

- Fluoreszenzmarkierte A-/C-/G-/T-Farbterminatoren
- Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dTTP, dUTP)
- AmpliTaq® DNA- Polymerase mit thermisch stabiler Pyrophosphatase
- MgCl<sub>2</sub>
- Tris-HCl – Puffer, pH 9,0

Durch einen Ersatz des Nukleotids dGTP durch dITP im dNTP-Mix vermeidet man die Zusammenlagerung zwischen den Nukleotiden Guanin und Cytosin und hält somit die DNA Einzelstränge voneinander getrennt. Durch diese Methode kann die Elektrophorese ungestört ablaufen, ohne dass es zu einer Verringerung des Abstandes zwischen den einzelnen Banden kommt.

Die Sequenzierungsreaktion wird mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

5,8 µl HPLC-H<sub>2</sub>O

2,0 µl Terminationsreaktionsmischung

0,2 µl Primer (100 µmol)

2,0 µl gereinigtes PCR-Produkt

Zur Durchführung der Methode werden die Proben in einem programmierbaren Temperaturwechselgerät bearbeitet. Die bei allen Exons mit insgesamt 30 Zyklen durchgeführte Bearbeitung läuft unter den selben Bedingungen und Temperaturen und mit den gleichen verwendeten Primern und Annealingtemperaturen ab, wie sie bei der PCR angewendet werden. Zunächst wird die Temperatur im Thermocycler für 10 bzw. 2 Minuten auf 95°C gebracht. Anschließend wurde die DNA bei 95°C für eine Minute denaturiert. Anschließend folgt für eine Minute die Annealingphase bei der für den jeweiligen Primer optimale Temperatur (s. Tabelle). Es folgte die 4-minütige Elongationsphase bei 55°C und das abschließende Herunterkühlen der Proben auf 4°C.

### 3.2.5.2 Aufreinigung des Sequenzierungsproduktes

Um nicht eingebaute Nukleotide und andere überschüssige Reagentien zu entfernen, ist es zunächst notwendig das gewonnene Sequenzierungsprodukt einer Reinigung zu unterziehen.

Diese erfolgt mit Hilfe des DyeEx™ Spin Kit der Firma Qiagen, indem eine spezielle Gelsäule hochmolekulare Substanzen zurückhält, während niedermolekulare Substanzen durch mehrfache Zentrifugation herausgefiltert werden. Zunächst erfolgt eine Zentrifugation der Gelsäule für 2 Minuten bei 3000 rpm. Anschließend wird auf die Mitte des Gels 10 µl des Sequenzierungsproduktes pipetiert, woraufhin eine erneute zweiminütige Zentrifugation bei 3000 rpm stattfindet, was zum oben beschriebenen Herausfiltern der Probe und zum Zurückhalten von Nukleotiden und Primer führt.

### 3.2.5.3 Auftragen der Proben

Das gereinigte Sequenzierungsprodukt wird zunächst denaturiert, bevor es in einem Sequenzierungsgerät weiterbehandelt wird. Dazu werden 4 µl des Sequenzierungsproduktes mit 20µl der Template-Suppression Reagent (TSR) – Lösung gemischt und anschließend bei 90°C für 2 Minuten auf einem Heizblock inkubiert. Diese Anwendung dient der Denaturierung der DNA, welche für die nachfolgende Sequenzanalyse benötigt wird.

### 3.2.5.4 Charakteristika des benutzten Sequenziergerätes

Das Sequenzierungsgerät, ABI Prism 310 Genetic Analyzer, wird zur Sequenzanalyse angewandt. Ein Argonlaser regt den Fluoreszenzfarbstoff in der DNA zur Emission eines für ihn spezifisches Licht an und ermittelt durch das entstehende spezifische Licht das entsprechende Nukleotid. Über eine Kamera ist es dem Gerät möglich, aus den durch eine gelgefüllte Kapillare passierenden DNA-Sequenzen, Fluoreszenz von vier verschiedenen Wellenlängen zu erfassen, entsprechend der Emission der vier verwendeten Farbterminatoren. Durch spezielle Computer-Software können die ermittelten Informationen zu einem Elektropherogramm verarbeitet werden.

## 3.2.6 Assay für neue Mutationen

Jede neue Mutation muss mit einem zweiten Assay bestätigt werden. Zwei Methoden stehen hierfür zur Verfügung:

### 3.2.6.1 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP)

Diese Methode wurde Ende der sechziger Jahre von Werner Aber, Hamilton Smith und Daniel Nathans entdeckt. Spezifische Enzyme von Prokaryonten besitzen die Fähigkeit bestimmte Basensequenzen der DNA zu erkennen und auch zu schneiden. Bei diesen spezifischen Enzymen handelt es sich um Restriktionsendonukleasen oder Restriktionsenzyme, die die spezifischen Basensequenzen meist in Form eines Pallidroms erkennen. Die entstandenen Fragmente werden in Kilobasen (kb) gemessen und durch die Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht. Durch diesen Mechanismus werden Varianten in Bezug auf die Länge der Segmente erkannt, welche z.B. durch eine Mutation begründet sind. Dieser Längenpolymorphismus gibt außer dem generellen Nachweis einer Mutation Aufschluss über das Vorliegen einer homozygoten oder einer heterozygoten Mutation. Zur Detektion der Mutation im *ATP7B*-Gen muss man zunächst ein sowohl für die Basensequenz der Original- als auch für die der Mutationssequenz geeignetes



Restriktionsenzym finden. Man beginnt mit einer PCR zur Vervielfältigung der zu untersuchenden Exons. Nach achtstündiger Inkubation des Replikationsproduktes mit den jeweiligen spezifischen Restriktionsenzymen, werden die Längen der entstandenen DNA-Fragmente mittels der Gel-Elektrophorese identifiziert. Auf diesem Wege beweist man das Vorhandensein einer Mutation in dem untersuchten Exon.

### 3.2.6.2 Allelspezifische PCR

Das Prinzip der allelspezifischen PCR beruht darauf, dass die zu untersuchende DNA mit einem für die Mutation spezifischen Primer versetzt wird. Aufgrund der Spezifität dieses Primers kommt es nur bei bestehender Mutation zu einer Vervielfältigung der DNA. Man wiederholt die PCR mit einem für das gesunde Allel spezifischen Primer, wodurch sich nur das gesunde Allel amplifizieren lässt. Anschließend werden die entstandenen DNA-Sequenzen elektrophoretisch aufgetrennt.

## **4. RESULTATE**

### **4.1 Resultate der genetischen Untersuchung**

In diesem Kapitel wird ein Überblick über die identifizierten Mutationen der genetisch untersuchten Patienten geboten. Zunächst wird beschrieben, wie viele Personen insgesamt untersucht wurden und wie sich diese auf die einzelnen Länder verteilen. Fortsetzend ist dargestellt, ob die Patienten als Index-Patienten, also aufgrund einer klinischen Symptomatik, oder als Verwandte dieser Index-Patienten untersucht wurden. Ebenfalls findet sich eine Aufteilung der Patienten, in welcher gezeigt wird, ob ein, zwei oder gar kein verändertes Allel identifiziert wurde (Tabelle 3). Alle Mutationen, die bei der genetischen Untersuchung identifiziert wurden, sind in der Tabelle 4 mit Angabe ihres Genorts aufgelistet. Die neu identifizierten Mutationen sind detailliert beschrieben. Auf Abbildungen der einzelnen Elektropherogramme wurde aus Platzgründen verzichtet. In Tabelle 5 und Abbildung 6 ist die Anzahl identifizierter Mutationen in den einzelnen Exons dargestellt. Weiterführend bietet dieses Kapitel einen Überblick über das Auftreten und die Verteilung identifizierter Mutationen unter den Patienten eines Landes. Für jedes Land ist diesbezüglich ein Diagramm bzw. eine Tabelle entworfen worden, welche einen genauen Überblick ermöglicht.

### 4.1.1 Verteilung der genetisch untersuchten Patienten

Länder	Anzahl der Patienten	Index-Patienten	Verwandte eines Index-Patienten	Zwei betroffene Allele	Ein betroffenes Allel	kein betroffenes Allel
<b>Polen</b>	283	250	33	174	57	52
<b>Deutschland</b>	146	119	27	85	37	24
<b>Brasilien</b>	107	91	16	74	24	9
<b>China</b>	51	42	9	24	18	9
<b>Iran</b>	30	30	0	20	5	5
<b>Ägypten</b>	28	23	5	25	0	3
<b>Litauen</b>	18	6	12	3	9	6
<b>Rumänien</b>	14	7	7	3	6	5
<b>Griechenland</b>	13	8	5	5	7	1
<b>Slowakai</b>	13	11	2	7	6	0
<b>Serbien</b>	10	9	1	6	1	3
<b>U.S.A.</b>	4	4	0	0	2	2
<b>Gesamt</b>	718	599	119	426	172	120

<b>Gesamtzahl der Allele, auf denen eine Mutation identifiziert wurde</b>	<b>1024</b>
---	-------------

*Tabelle 3: Die einzelnen Länder und die Anzahl der genetisch untersuchten Patienten sind in dieser Tabelle beschrieben. Nachfolgend ist dargestellt, wie viele der Patienten aufgrund einer klinischen Indikation, als Index-Patienten, und wie viele der Patienten aufgrund der Erkrankung eines Familienmitgliedes, als Verwandte eines Index-Patienten, an der Charité genetisch untersucht wurden. In den anderen drei Spalten soll gezeigt werden, bei wie vielen Patienten zwei Mutationen, eine Mutation oder gar keine Mutation nachgewiesen werden konnte. Die unterste Zeile schildert die vorher beschriebenen Zeilen in der Gesamtheit aller Patienten. Der Kasten unter der Tabelle gibt zusätzlich Auskunft über die Anzahl der Allele auf denen eine Mutation identifiziert wurde.*

Die Tabelle 3 zeigt einen Gesamtüberblick der Verteilung der insgesamt 718 genetisch untersuchten Patienten. Zunächst wird dargestellt, wie viele Patienten eines einzelnen Landes untersucht wurden. Beginnend mit Polen, woher die meisten genetisch untersuchten Patienten stammen, bis hin zu den U.S.A., woher die wenigsten genetisch untersuchten Patienten stammen, wird jeweils die Anzahl dieser Patienten genannt. Anschließend ist dargestellt, wie viele

Patienten aufgrund einer klinischen Symptomatik, als Index-Patienten, und wie viele Patienten aufgrund der Erkrankung eines Verwandten, als Verwandte eines Index-Patienten, bei denen ebenfalls eine genetische Veränderung zu erwarten war, genetisch untersucht wurden. Außerdem ist zu sehen, wie viele dieser Patienten Träger zweier betroffener Allele, eines oder keines betroffenen Allels sind. Nachdem diese Zahlen zunächst für die jeweiligen Länder berechnet wurden und in den entsprechenden Zeilen vermerkt sind, findet sich in der untersten Zeile eine Gesamtauswertung aller Patienten bezüglich der genannten Einteilungen. Unter den 718 Patienten, von denen 599 als Index-Patienten und 119 als Verwandte dieser Index Patienten betrachtet werden, finden sich bei 426 untersuchten Patienten zwei Mutationen, bei 172 eine Mutation und bei 120 Patienten keine Mutation. Unterhalb der Tabelle wird die Gesamtanzahl aller identifizierten Mutationen in einem Kasten dargestellt, welche sich auf 1024 beläuft.

Sowohl auf die Patientenanzahl der einzelnen Länder und die Unterteilungen in Index-Patienten und Verwandte, als auch auf die Patientenzahlen bezüglich der Anzahl der betroffenen Allele wird bei der Beschreibung der Mutationsspektren der einzelnen Länder eingegangen.

## 4.1.2 Verteilung der identifizierten Mutationen in den Exons

### Bekannte Mutationen

Exon	Mutation	Exon	Mutation
2	845delT	14	E1064K
2	C271X	14	G1061E
2	Q289X	14	H1069Q
3	1518_21del4	14	R1041W
4	1639delC	15	3402delC
4	1672_73del2	15	G1089E
4	IVS4-1G/C	15	G1099S
5	R616Q	15	I1102T
6	D642H	15	Q1095P
6	M645R	16	3449delA
7	G691R	16	3472_3482del11
8	2304insC	16	IVS16+1G/A
8	D765N	16	Q1142H
8	G710S	16	Q1142X
8	L708P	16	G1176R
8	M769V	17	3649_3654del6
8	R778G	17	T1220M
8	R778L	17	V1216M
8	R778W	18	3713_14del2
8	W779X	18	D1279G
10	2532delA	18	G1266R
10	I857T	18	IVS18-2A>G
12	D918N	18	N1270S
12	G943D	18	P1273L
12	L936X	19	3973_3974insC
12	R919G	19	R1319X
12	R919W	20	G1341D
12	S921N	21	T1434M
13	A1003T		
13	A1003V		
13	P992L		
13	R969Q		
13	T977M		

Tabelle 4, Teil 1

## Resultate

### Neue Mutationen

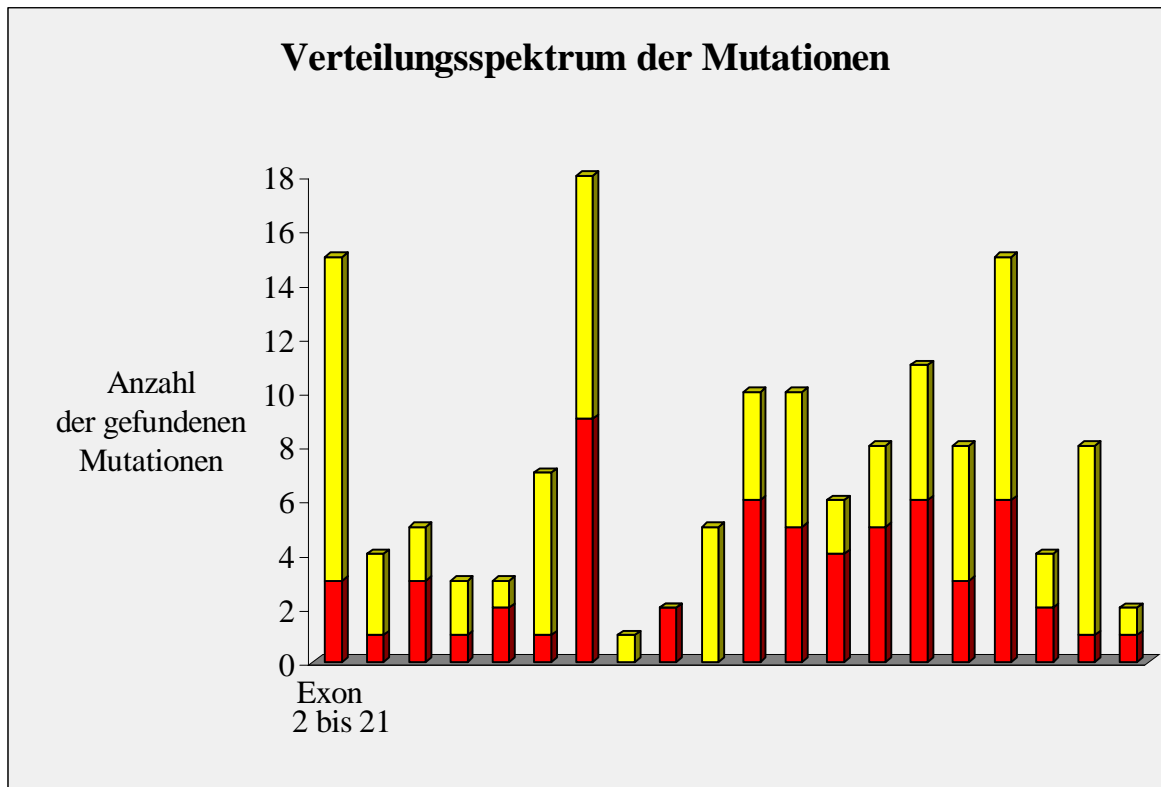
<i>Exon</i>	<i>Nukleotid</i>		<i>Aminosäure</i>	<i>Typ</i>	<i>Domäne</i>
2	c.397delT	TCCtGGC	p.W133Gfs	deletion, fs	Cu2
2	c.507delA	TGCAaGGA	p.G170Efs	deletion, fs	Cu2
2	c.802_808delTGTAAGT	TtgaagtCTT	p.C268Lfs	deletion, fs	Cu3
2	c.778insC	CcAAC	p.Q290Pfs	insertion, fs	Cu2
2	c.442C>T	CGG>TGG	p.R148W	missense	Cu2
2	c.122A>G	AGT>AAT	p.N41S	missense	Cu1
2	c.1186G>T	GAA>TAA	p.E396X	nonsense	
2	c.1063C>A	CAG>TAG	p.Q355X	nonsense	Cu3/4
2	c.314C>A	TCG>TAG	p.S105X	nonsense	Cu1
2	c.721C>T	CAG>TAG	p.Q241X	nonsense	Cu3
2	c.1285+2 T>A	TGgta>TGgaa	IVS2+2T>A	splice site	Cu3
2	c.524_525delAA	TCAaaGTC	p.K175Mfs	deletion, fs	Cu2
3	c.1436delC	GTCCCcACA	p.P479Hfs	deletion, fs	
3	c.1543+1G>C	Ggt>Gct	IVS3+1G>C	splice	
3	c.1543+4A>G	CTGgta>CTGgtg	IVS3+4A>G	splice	
4	c.1708-1G>A	agA>aaA	IVS4-1G>A	splice	
4	c.1646T>C	CTG>CCG	p.L549P	missense	Cu5/6
5	c.1772G>A	GGC>GAC	p.G591D	missense	Cu6
5	c.1797_1798insT	CCTtGCC	p.P600Cfs	insertion, fs	Cu6
6	c.1915C>T	CAT>TAT	p.H639Y	missense	Cu6/Tm1
7	c.2108G>A	TGT>TAT	p.C703Y	missense	Tm2
7	c.1947-4C>T	ccagGTG>tcagGTG	IVS6-4T>C	splice site ?	
7	c.2008_2013delTATATG	ATCtatatgCTG	p.Y670_M671del	deletion	Tm1
7	c.1958C>A	TCT>TAT	p.S653Y	missense	TM1
7	c.2038C>T	CAG>TAG	p.Q680X	nonsense	Cu6/Tm1
7	c.2121+3A>G	CAGgta>CAGgtg	IVS7+3A>G	splice site	TM2
8	c.2192T>A	GTG>GAG	p.V731E	missense	TM3
8	c.2296dupA	TCGACaAaCGCC	p.T766Pfs	insertion, fs	Tm4
8	c.2297C>T	ACG>ATG	p.T766M	missense	TM4
8	c.2315_2323del9	TTTGtgttcattgCCCT	p.V772_I774del	deletion	TM4
8	c.2323G>A	GCC>ACC	p.A775T	missense	Tm4
8	c.2327T>C	CTG>CCG	p.L776P	missense	TM4
8	c.2206C>A	GCC>GAC	p.A736D	missense	Tm3
8	c.2210C>T	ACA>ATA	p.T737I	missense	TM3
8	c.2279C>T	CCT>CTT	p.P760L	missense	TM3/4
9	c.2438_2440delTAAinsAT	ATTtaa(at)TCA	p.L813Yfs	deletion, insertion	Tm4
11	c.2662A>C	ACC>CCC	p.T888P	missense	Td/Tm5
11	c.2645_2646delCT	CATGGCTctGTG	p.S882Cfs	deletion	TM5
11	c.2579A>G	GAA>GGA	p.E860G	missense	Td
11	c.2632A>G	AAT>GAT	p.N878D	missense	Td/Tm5
11	c.2668G>A	GTG>ATG	p.V890M	missense	Td/Tm5
12	c.2866-2A>C	agAAC>cgAAC	IVS12-2A>C	splice	
12	c.2790_2792delCAT	CATcatGTC	p.I930del	deletion inframe	
12	c.2846T>G	GTT>GGT	p.V949G	missense	Tm5
12	c.2795C>A	TCA>TAA	p.S932X	nonsense	Tm5

Tabelle 4, Teil 2

## Resultate

<i>Exon</i>	<i>Nukleotid</i>		<i>Aminosäure</i>	<i>Typ</i>	<i>Domäne</i>
13	c.2948G>T	TGC>TTC	p.C983F	missense	Ch/TM6
13	c.2962G>C	GGG>CGG	p.G988R	missense	TM6
13	c.2954G>A	TGC>TAC	p.C985Y	missense	Ch/TM6
13	c.2993G>A	GGC>GAC	p.G998D	missense	Ch/Tm6
13	c.2951C>G	CCC>CGC	p.P984R	missense	Ch/TM6
14	c.3140delA	GGGaTGTGG	p.D1047fs	deletion, fs	Ph
14	c.3061-2A>G	agATAA>ggATAA	IVS13-2A>G	splice site	Ph/SEPHL
15	c.3263T>A	TTG>TAG	p.L1088X	nonsense	ATP loop
15	c.3373_3377delAGTCAinsTCT	GCCagtc(tct)CCT	p.H1126P, fs	deletion, insertion	ATP loop
15	c.3282C>G	TTC>TTG	p.F1094L	missense	ATP loop
16	c.3350-3353delAGCG	GTGagcgCCC	p.E1117fs	deletion, fs	ATP loop
16	c.3451C>A	CGT>TGT	p.R1151C	missense	ATP loop
16	c.3551T>C	ATT>ACT	p.I1184T	missense	ATP loop
16	c.3443T>A	ATT>AAT	p.I1148N	missense	ATP loop
16	c.3517G>A	GAG>AAG	p.E1173K	missense	ATP loop
17	c.3697delC	CCACCcAG	p.Q1233Rfs	deletion, fs	ATP loop
17	c.3620A>C	CAC>CGC	p.H1207R	missense	ATP loop
17	c.3694A>C	ACC>CCC	p.T1232P	missense	ATP binding
17	c.3650T>A	GTT>GAT	p.V1217D	missense	ATP binding
17	c.3583G>A	GCA>ACA	p.A1195T	missense	ATP loop
18	c.3731delT	TGCtGCC	p.L1244Rfs	deletion, fs	
18	c.3880delG	CGAGgCAG	p.A1294Qfs	deletion, fs	ATP loop
18	c.3842_3843insT	ATGGGTtGTG	p.V1282Cfs	insertion, fs	ATP hinge
18	c.3800A>G	GAT>GGT	p.D1267V	missense	ATP hinge
18	c.3818C>A	CCG>CAG	p.P1273Q	missense	ATP hinge
18	c.3896T>G	CTT>CGT	p.L1299R	missense	ATP loop
18	c.3799G>A	GAT>AAT	p.D1267N	missense	ATP hinge
18	c.3812A>G	GAC>GGC	p.D1271G	missense	ATP hinge
18	c.3772A>T	AAA>TAA	p.K1258X	nonsense	ATP hinge
20	c.4021G>C	GGT>CGT	p.G1341R	missense	TM8
20	c.4051C>T	CAG>TAG	p.Q1351X	nonsense	TM8
20	c.4093_4094insT	TGTGTtCTG	p.S1365Ffs	insertion, fs	Tm8
20	c.4076T>C	ATG>ACG	p.M1359T	missense	Tm8
20	c.4106C>T	TCA>TTA	p.S1369L	missense	Tm8
20	c.4114C>A	CAG>AAG	p.Q1372K	missense	TM8
20	c.4118T>G	CTC>CGC	p.L1373R	missense	Tm8
21	c.4230G>A	TGG>TGA	p.W1410X	nonsense	3'COOH

*Tabelle 4: Die Tabelle gibt einen Überblick über die identifizierten Mutationen. Alle Mutationen, die bei der genetischen Untersuchung identifiziert wurden, sind in dieser Tabelle mit Angabe ihres Genortes aufgelistet. Die neu identifizierten Mutationen sind bezüglich der Nukleotide, Aminosäuresequenzen, des Mutationstyps und der betreffenden Domäne detailliert beschrieben.*



*Abbildung 6: Mit der Abbildung soll anschaulich gemacht werden, wie viele unterschiedliche Mutationen in den einzelnen Exons identifiziert wurden. Generell wurden nur in den Exons 2 bis 21 Mutationen identifiziert, weswegen auch nur diese von links nach rechts dargestellt sind. Die einzelnen Balken, welche die Anzahl der Mutationen in den einzelnen Exons darstellen, sind farblich halbiert. Der rote Teil kennzeichnet die noch nicht bekannten Mutationen, während der gelbe Teil die bereits im Zusammenhang mit Morbus Wilson bekannten Mutationen darstellt.*



Exon	Mutationen insgesamt	Bekannte Mutationen	Neue Mutationen
2	15	3	12
3	4	1	3
4	5	3	2
5	3	1	2
6	3	2	1
7	7	1	6
8	18	9	9
9	1	0	1
10	2	2	0
11	5	0	5
12	10	6	4
13	10	5	5
14	6	4	2
15	8	5	3
16	11	6	5
17	8	3	5
18	15	6	9
19	4	2	2
20	8	1	7
21	2	1	1
<b>Insgesamt</b>	<b>145</b>	<b>61</b>	<b>84</b>

*Tabelle 5: Dieser Tabelle ist die Anzahl der in den einzelnen Exons identifizierten Mutationen zu entnehmen. In der linken Spalte wird das Exon genannt, während in den anderen Spalten eine Unterteilung der Anzahl der identifizierten Mutationen in „Mutationen insgesamt“, „Bekannte Mutationen“ und „Neue Mutationen“ erfolgt.*

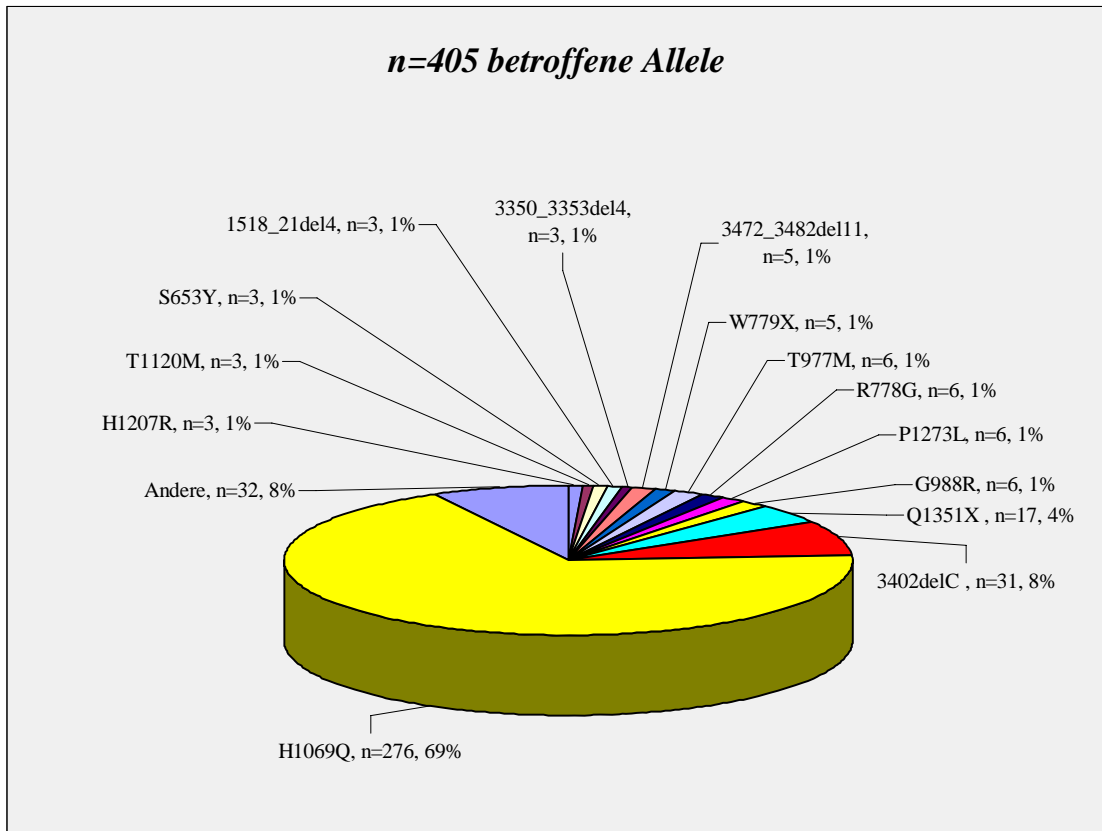
Die Tabellen 4 und 5 und die Abbildung 6 liefern Informationen über die Mutationen, welche im Rahmen der genetischen Untersuchung an der Charité identifiziert wurden. Zunächst sind die einzelnen Mutationen in der Tabelle 4 aufgelistet. Um eventuelle Häufungen identifizierter Mutationen in einem Exon zu veranschaulichen, ist in Abbildung 6 ein Stufendiagramm dargestellt. Die einzelnen Diagrammsäulen stellen die Anzahl der auf einem Exon identifizierten Mutationen dar. Zusätzlich sind die einzelnen Säulen farblich unterteilt. Der rote Teil der Säulen gibt die Anzahl der bisher noch nicht beschriebenen Mutationen wieder, während der gelbe Teil der Säule die Anzahl der bekannten Mutationen darstellt. Die genauen Anzahlen der Mutationen, welche in einem Exon identifiziert wurden, sind in Tabelle 5 aufgelistet. Dort findet sich eine Unterteilung, der zu entnehmen ist, wie viele Mutationen insgesamt auf einem Exon gefunden wurden und wie viele davon bereits bekannt bzw. bisher noch nicht bekannt sind. Insgesamt

konnten 145 verschiedene Mutationen identifiziert werden. Unter diesen befinden sich 61 bereits bekannte und 84 bisher noch nicht beschriebene Mutationen. Man erkennt in Abbildung 6 deutlich eine Häufung identifizierter Mutationen in den Exons 2, 8 und 18. Im Exon 2 wurden 15 verschiedene Mutationen entdeckt, unter denen sich zwölf bisher noch nicht beschriebene Mutationen befinden. Im Exon 8 konnten unter 18 identifizierten Mutationen neun bisher noch nicht bekannte Mutationen beschrieben werden. Ebenfalls neun bisher noch nicht bekannte Mutationen wurden unter insgesamt 15 identifizierten Mutationen im Exon 18 gefunden.

### **4.1.3 Länderbezogene Verteilung der Mutationen**

In diesem Teil der Arbeit sind die Mutationsspektren der einzelnen Länder dargestellt. Alle identifizierten Mutationen der genetisch untersuchten Patienten des jeweiligen Landes sind in der Häufigkeit ihres Auftretens und in ihrem prozentualen Anteil, gemessen an der Gesamtheit der in diesem Land auftretenden Mutationen, in einem Kreisdiagramm dargestellt. Mutationen, die zweimal oder seltener in dem jeweiligen Land identifiziert wurden, sind in dem entsprechenden Kreisdiagramm unter „Andere“ zusammengefasst und unterhalb der Abbildung aufgelistet. Sowohl für die Abbildungen als auch für die Auflistung gilt, dass bereits bekannte Mutationen in schwarzer Schrift und neue, bisher noch nicht beschriebene Mutationen in roter Schrift dargestellt sind.

4.1.3.1 Mutationsspektrum Polen



**Andere Mutationen:**

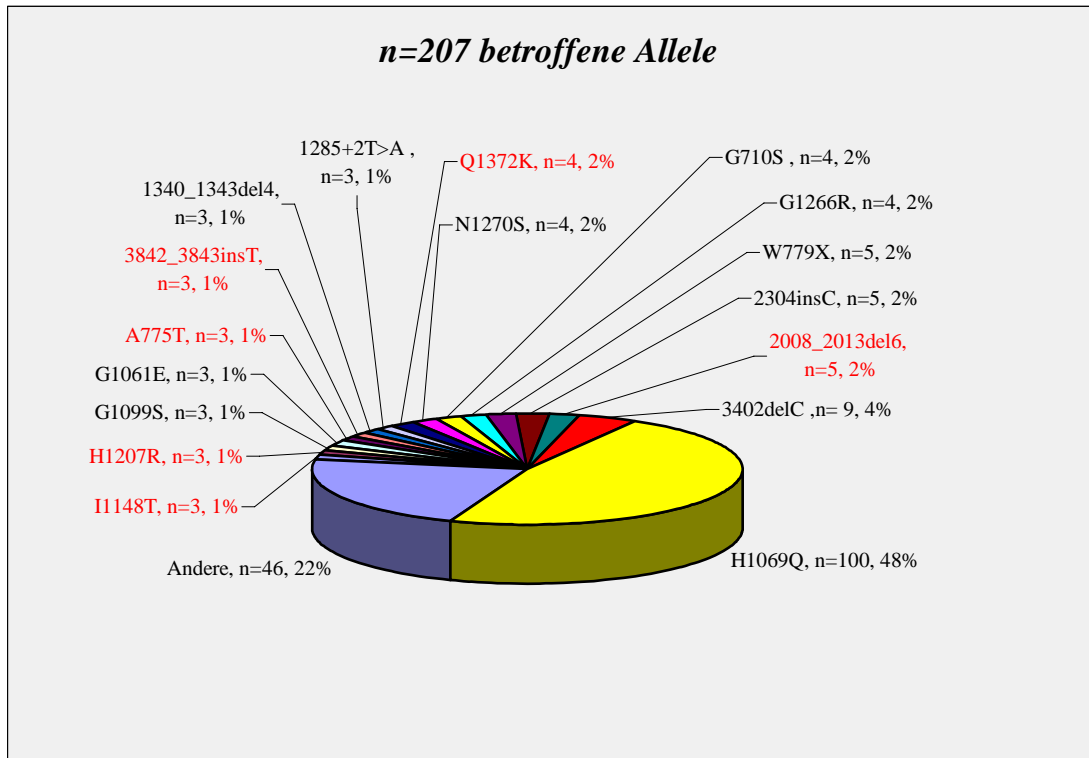
Bekannte Mutationen: 2532delA, 2304insC, R616Q, R1319X, Q1095P, P992L, L938X, G1341D, D918N, D756N, 3973\_3974insC, 3649del6

Neue Mutationen: V890M, Q355X, L776P, H639Y, 3149delA, IVS7+3A>G, T737I, P894L, G1341R, A1195T, 2315\_2323del9

*Abbildung 7: In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten auftreten. Insgesamt sind 405 betroffene Allele unter den polnischen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil dieser Mutation an den 405 identifizierten Mutationen. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift geschrieben, während noch nicht bekannte Mutationen durch rote Schrift gekennzeichnet sind. Unterhalb der Tabelle findet sich eine Aufzählung der Mutationen, welche im Kreisdiagramm unter „Andere“ zusammengefasst wurden. Diese Mutationen wurden jeweils höchstens zweimal identifiziert.*

Die größte Anzahl untersuchter Patienten stammt, wie in der Tabelle 3 zu sehen ist, aus Polen. Insgesamt wurden 283 polnische Patienten, von denen 250 Index-Patienten und 33 Verwandte dieser Index-Patienten sind, genetisch untersucht. Bei 174 Patienten wurde auf zwei Allelen eine Mutation entdeckt. Bei weiteren 57 genetisch untersuchten Personen fand man nur eine Mutation, während bei den restlichen 52 sequenzierten Personen keine Mutation nachgewiesen werden konnte. Auf den 405 betroffenen Allelen der insgesamt 283 genetisch untersuchten polnischen Patienten wurden 37 verschiedene Mutationen identifiziert. Diese sind in Abbildung 7 hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens und ihres prozentualen Anteils an den insgesamt 405 identifizierten Mutationen in einem Kreisdiagramm dargestellt. Insgesamt 21 dieser Mutationen sind bereits bekannt, während weitere 16 bisher noch nicht beschrieben wurden. Die bekannte H1069Q-Mutation im Exon 14 tritt unter den 405 identifizierten Mutationen in Polen 276-mal auf und ist somit mit einem Anteil von 69% gemessen an der Gesamtzahl der bei den polnischen Patienten identifizierten Mutationen die am häufigsten identifizierte Mutation. Die ebenfalls bekannte Mutation 3402delC im Exon15 tritt am zweithäufigsten auf. Insgesamt wurde diese Mutation 32-mal gefunden, was einen prozentualen Anteil von 8% ausmacht. Die bisher noch nicht beschriebene Q1351X-Mutation im Exon 20 konnte unter den polnischen Patienten 17-mal identifiziert werden. Ihr Anteil an den insgesamt 405 identifizierten Mutationen beträgt somit 4%. Alle anderen Mutationen sind in deutlich geringerer Anzahl aufgetreten. Keine dieser Mutationen ist mehr als sechsmal unter den genetisch untersuchten Polen identifiziert worden. Die genaue Anzahl, sowie ihr prozentualer Anteil ist dem Kreisdiagramm in Abbildung 7 zu entnehmen. Mutationen die zweimal oder weniger identifiziert wurden, sind unterhalb des Diagramms aufgelistet.

### 4.1.3.2 Mutationsspektrum Deutschland



#### **Andere Mutationen:**

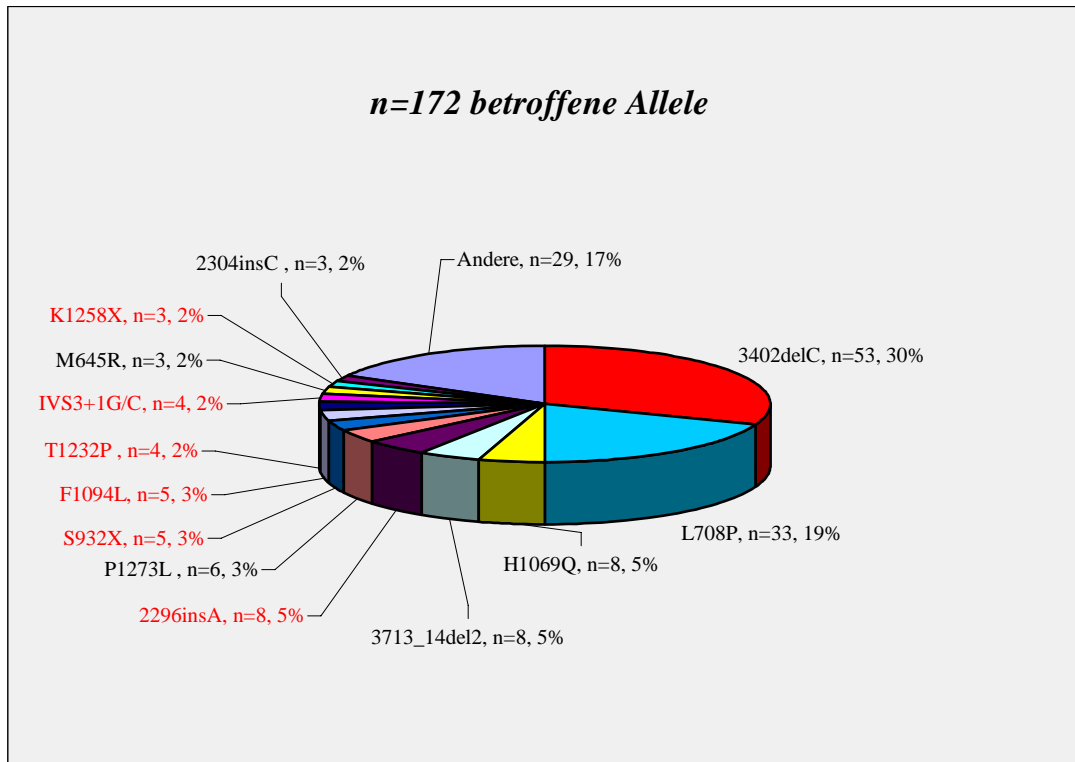
Bekannte Mutationen: V1216M, R969Q, R919W, E1064K, D642H, A1003V, 3973\_3974insC, 2532delA, T1220M, M769V, L708P, G691R, C271X

Neue Mutationen: V731E, V1217D, T766M, S105X, P760L, N878D, L1305P, L1088X, E860G, D1267N, C985Y, C983F, 802\_808del7, 524\_525del2, 2645\_2646del2, 1797\_1798insT, R1151C, IVS13-2A>G, D1267V, 778insC

*Abbildung 8:* In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten auftreten. Insgesamt sind 207 betroffene Allele unter den deutschen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil dieser Mutation an den 207 identifizierten Mutationen. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift geschrieben, während noch nicht bekannte Mutationen durch rote Schrift gekennzeichnet sind. Unterhalb der Tabelle findet sich eine Aufzählung der Mutationen, welche im Kreisdiagramm unter „Andere“ zusammengefasst wurden. Diese Mutationen wurden jeweils höchstens zweimal identifiziert.

Unter den 146 deutschen Patienten wurden 119 Patienten als Index-Patienten verzeichnet. Weitere 27 genetisch untersuchte Personen sind im Kontext eines Verwandtschaftsverhältnisses dieser Index-Patienten genetisch untersucht worden. Unter den deutschen Patienten konnten bei 85 zwei Mutationen, bei 37 eine Mutation und bei 24 gar keine Mutation ermittelt werden. Auf 207 Allelen wurden 50 verschiedene Mutationen identifiziert, was in Abbildung 8 in einem Kreisdiagramm dargestellt ist. Die Beschriftung gibt zuerst den Namen der Mutation, dann die Anzahl ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil der Mutation unter den 207 identifizierten Mutationen an. Bereits bekannt waren 24 dieser Mutationen, während die anderen 26 vorher noch nicht beschrieben worden sind. Die H1069Q-Mutation im Exon 14 ist wie auch in Polen die am häufigsten auftretende Mutation. Unter den deutschen Patienten tritt diese Mutation 100-mal auf und hat einen prozentualen Anteil von 48% von der Gesamtzahl der in Deutschland aufgetretenen Mutationen. Die am zweithäufigsten auftretende Mutation ist, ebenfalls wie in Polen, die 3402delC-Mutation im Exon 15. Sie ist mit einem Anteil von nur 4% und einem Auftreten von neunmal schwach vertreten. Die anderen 48 Mutationen treten höchstens fünfmal unter den deutschen Patienten auf. Die genaue Anzahl und der prozentuale Anteil dieser Mutationen an der Gesamtheit der in Deutschland identifizierten Mutationen ist dem Kreisdiagramm zu entnehmen.

### 4.1.3.3 Mutationsspektrum Brasilien



#### **Andere Mutationen:**

Bekannte Mutationen: R1391X, N1270S, G1061E, D765N, S921N, R778L, R778G, R1041W, 3449delA, 1672\_73del2

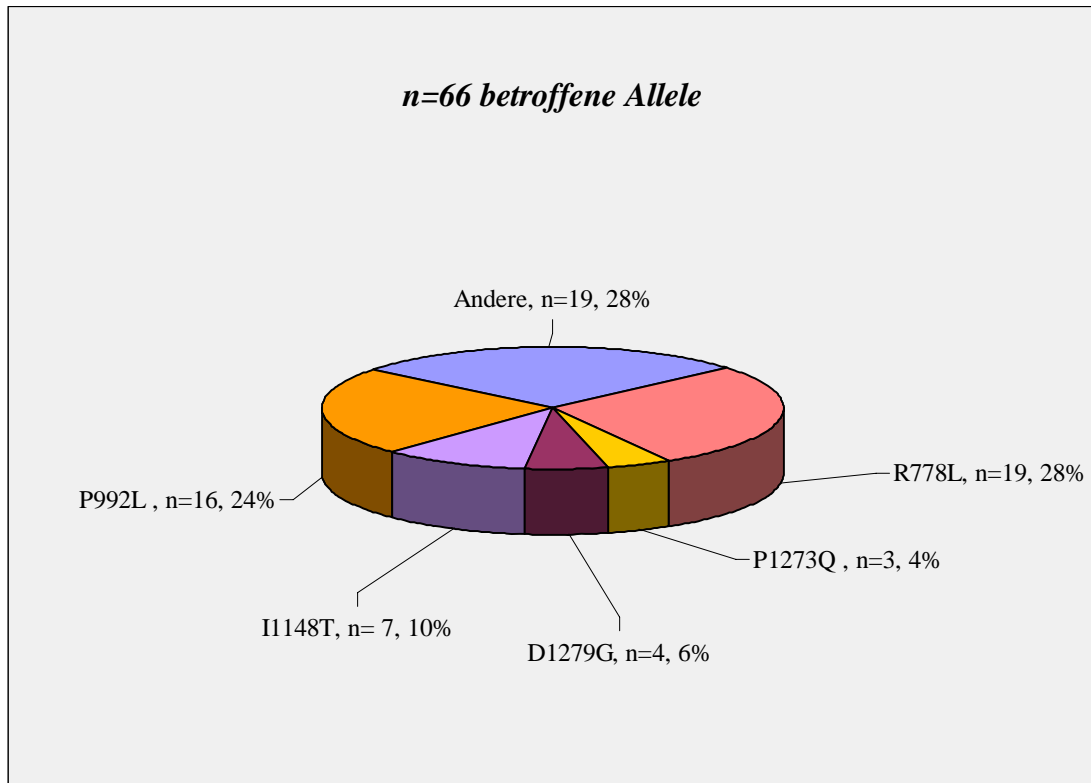
Neue Mutationen: IVS4-1G/A, V949G, Q241X, P984R, N41S, L1373R, L1088X, I1148T, D1271G, A736D, 4093\_4094insT, 3880delG, 2438\_2440delTAAinsAT, 1436delC

*Abbildung 9:* In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten auftreten. Insgesamt sind 172 betroffene Allele unter den brasilianischen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil dieser Mutation an den 172 identifizierten Mutationen. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift geschrieben, während noch nicht bekannte Mutationen durch rote Schrift gekennzeichnet sind. Unterhalb der Tabelle findet sich eine Aufzählung der Mutationen, welche im Kreisdiagramm unter „Andere“ zusammengefasst wurden. Diese Mutationen wurden jeweils höchstens zweimal identifiziert.

In Brasilien wurden 107 Patienten, unter denen sich 91 Index-Patienten und 16 Verwandte befinden, genetisch untersucht. Bei 74 Patienten fand man zwei betroffene Allele, während bei anderen 24 Patienten nur ein betroffenes Allel entdeckt wurde. Bei weiteren neun untersuchten Personen konnte keine Mutation ausfindig gemacht werden. Unter den 107 brasilianischen Patienten wurde insgesamt auf 172 Allelen eine Mutationen gefunden. Unter diesen wurden 37 verschiedene Mutationen identifiziert, welche in Abbildung 9, bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens unter den brasilianischen Patienten und ihres prozentualen Anteils, in einem Kreisdiagramm dargestellt sind. Von diesen Mutationen sind 17 bereits bekannt, während die anderen 20 bisher noch nicht beschrieben wurden. Zum Zweck einer besseren Übersicht, sind bereits bekannte Mutationen in schwarzer Schrift und noch nicht bekannte Mutationen in roter Schrift dargestellt. Am häufigsten kommt unter den brasilianischen Patienten die 3402delC-Mutation im Exon 15 vor, welche mit einem prozentualen Anteil von 30% insgesamt 53-mal auftritt. Die Mutation L708P im Exon 11 hat, gemessen an allen 172 unter den Brasilianern identifizierten Mutationen, einen prozentualen Anteil von 19% und ist mit der Häufigkeit ihres Auftreten von 33-mal die am zweithäufigsten auftretende Mutation unter den Patienten dieses Landes. Die in Deutschland und Polen besonders häufig vorkommende H1069Q-Mutation im Exon 14 kommt unter den brasilianischen Patienten mit einem verhältnismäßig geringen prozentualen Anteil von 5% eher selten vor. Alle anderen Mutationen, die unter den brasilianischen Patienten identifiziert wurden, traten achtmal oder seltener auf.



#### 4.1.3.4 Mutationsspektrum China



#### **Andere Mutationen:**

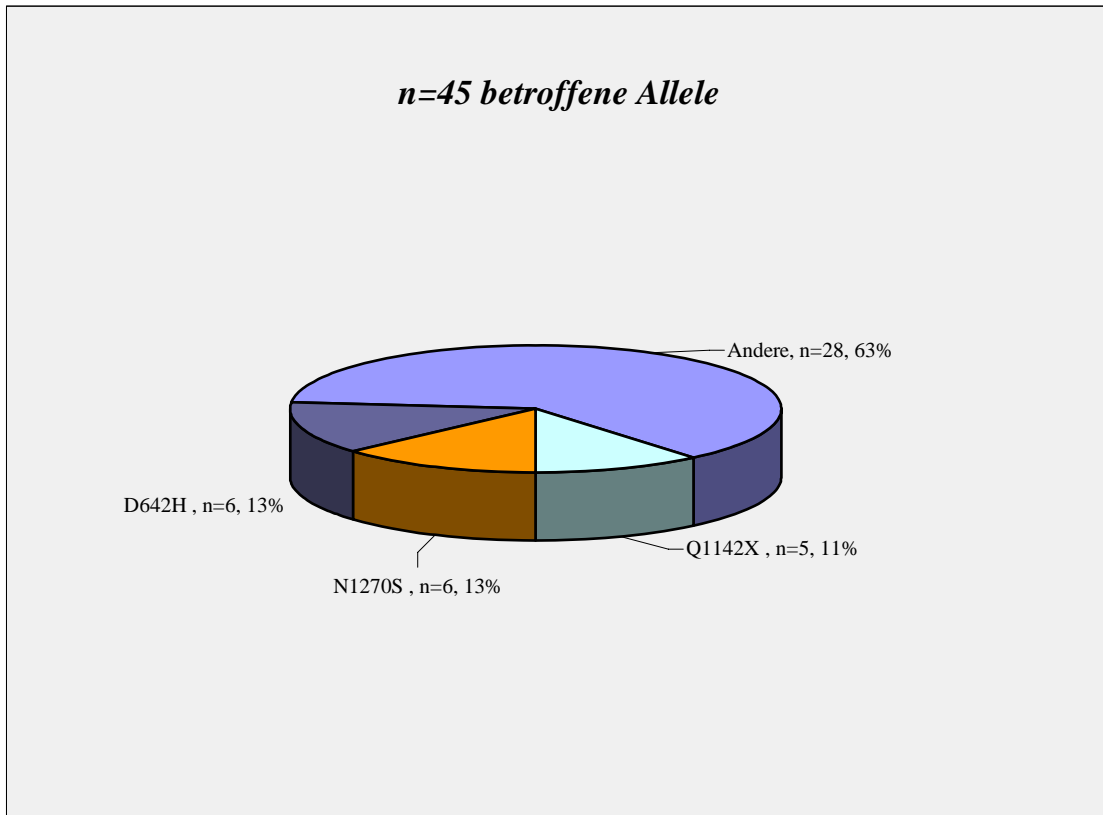
Bekannte Mutationen: N1270S, IVS4-1G/C, H1069Q, G943D, A1003V, R919G, IVS16+1G/A, Q1142H

Neue Mutationen: T888P, IVS6-4C>T, IVS4+4A/G, E1173K, 2790\_2792del3, 2604delC

*Abbildung 10:* In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten auftreten. Insgesamt sind 66 betroffene Allele unter den chinesischen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil dieser Mutation an den 66 identifizierten Mutationen. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift geschrieben, während noch nicht bekannte Mutationen durch rote Schrift gekennzeichnet sind. Unterhalb der Tabelle findet sich eine Aufzählung der Mutationen, welche im Kreisdiagramm unter „Andere“ zusammengefasst wurden. Diese Mutationen wurden jeweils höchstens zweimal identifiziert.

Unter den 51 untersuchten Chinesen befinden sich 42 Index-Patienten und neun als Verwandte eines Index-Patienten untersuchte Personen. Bei 24 untersuchten Personen war nachweisbar auf zwei Allelen eine Mutation zu verzeichnen. Bei weiteren 18 Patienten wurde auf einem Allel eine Mutation identifiziert, wohingegen bei neun Personen keine Mutation festgestellt wurde. Unter den insgesamt 66 Mutationen konnten 19 verschiedene Mutationen identifiziert werden. Elf dieser Mutationen sind bereits bekannt, während acht von ihnen noch nicht beschrieben wurden. Die Verteilung dieser Mutationen bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens und ihrer prozentualen Verteilung ist in Abbildung 10 anhand eines Mutationsspektrums dargestellt. Während bereits bekannte Mutationen in schwarzer Schrift geschrieben sind, sind noch nicht bekannte Mutationen in roter Schrift dargestellt. Betrachtet man die vorher beschriebenen Länder in der Verteilung der aufgetretenen Mutationen, stellt sich in China wiederum ein völlig anderes Mutationsspektrum dar. Sind die Mutationen H1069Q im Exon 14 und 3402delC im Exon 15 in den bis jetzt beschriebenen Ländern sehr stark vertreten, so sind sie in China so gut wie gar nicht zu finden. Die H1069Q-Mutation ist unter den chinesischen Patienten nur einmal identifiziert worden, während die 3402delC-Mutation gar nicht beschrieben werden konnte. Die R778L-Mutation im Exon 8 kommt mit 28% am häufigsten auf den 66 betroffenen Allelen der 51 genetisch untersuchten Chinesen vor. Die P992L-Mutation ist mit einem Auftreten von 16-mal und einem prozentualen Anteil von 24% die am zweithäufigsten auftretende Mutation. Mit einer Allel-Frequenz von 10% ist die Mutation I1148T im Exon 16 die am dritthäufigsten auftretende Mutation. Viermal konnte die Mutation D1279G nachgewiesen werden. Eine weitere noch nicht bekannte Mutation, die P1273Q-Mutation, wurde auf drei betroffenen Allelen identifiziert. Alle anderen Mutationen sind im Mutationsspektrum unter „Andere“ zusammengefasst und unter der Abbildung aufgelistet.

#### 4.1.3.5 Mutationsspektrum Iran



#### **Andere Mutationen**

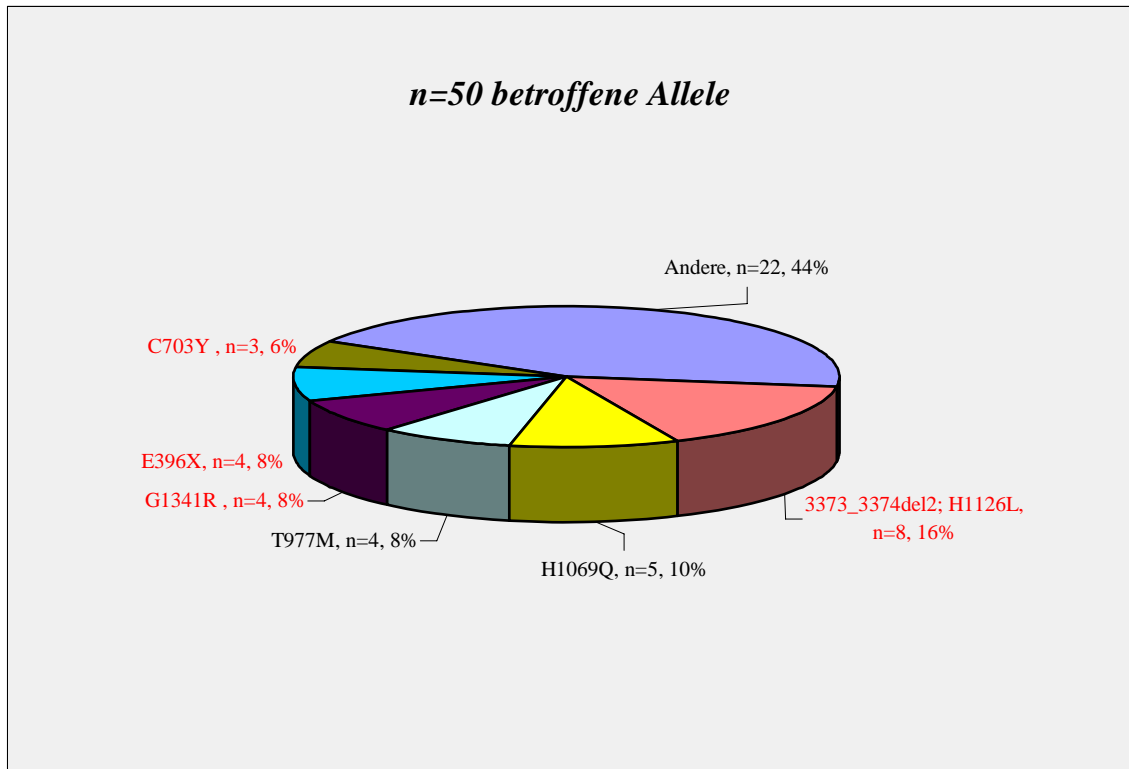
Bekannte Mutationen: R969Q, R919W, R778W, R778G, 1693delC, L936X, I857T, H1069Q, G1089E, 845delT, 3649\_3654del6

Neue Mutationen: S1369L, G591D, IVS12-2 A/C, R148W, Q680X, L1299R, 3697delC

*Abbildung 11:* In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten aus dem Iran auftreten. Insgesamt sind 45 betroffene Allele unter diesen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil dieser Mutation an den 45 identifizierten Mutationen. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift geschrieben, während noch nicht bekannte Mutationen durch rote Schrift gekennzeichnet sind. Unterhalb der Tabelle findet sich eine Aufzählung der Mutationen, welche im Kreisdiagramm unter „Andere“ zusammengefasst wurden. Diese Mutationen wurden unter den Patienten dieses Landes jeweils höchstens zweimal identifiziert.

Aus dem Iran wurden 30 Patienten, welche alle als Index-Patienten betrachtet werden, genetisch untersucht. Bei 20 von ihnen konnte auf zwei Allelen eine Mutation nachgewiesen werden, während bei weiteren fünf nur eine Mutation gefunden wurde. Bei den restlichen fünf Patienten wurde keine Mutation identifiziert. Unter den 30 genetisch untersuchten Patienten aus dem Iran wurden auf 45 Allelen 21 verschiedene Mutationen gefunden. Diese Mutationen sind in Abbildung 11 bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens in einem Kreisdiagramm dargestellt. Ferner ist die prozentuale Verteilung der einzelnen Mutationen, welche sich auf die Gesamtheit der 45 Mutationen bezieht, den Beschriftungen der einzelnen Mutationen hinzugefügt. Unter den identifizierten Mutationen befinden sich 14 bereits bekannte Mutationen, während sieben Mutationen bis jetzt noch nicht beschrieben worden sind. Das Verteilungsspektrum der identifizierten Mutationen der Patienten aus dem Iran ist sehr breit gefächert. Man erkennt, dass die am häufigsten vorkommenden Mutationen die D642H-Mutation im Exon 6, die N1270S-Mutation im Exon 18 und die Q1142X-Mutation im Exon 16 sind. Allerdings sieht man in Abbildung 11, dass keine dieser Mutationen öfter als sechsmal unter den Patienten aus dem Iran identifiziert wurde. Außerdem erkennt man deutlich, dass die unter „Andere“ zusammengefassten Mutationen einen beträchtlichen Teil des Kreisdiagramms einnehmen. Alle unter „Andere“ zusammengefassten Mutationen sind unterhalb der Abbildung 11 aufgelistet. Keine dieser Mutation wurde unter den genetisch untersuchten Patienten dieses Landes öfter als zweimal identifiziert.

### 4.1.3.6 Mutationsspektrum Ägypten



**Andere Mutationen:**

Bekannte Mutationen: P1273L, IVS18-2A>G, T1434M, T1220M, N1270S, D642H, 2304insC

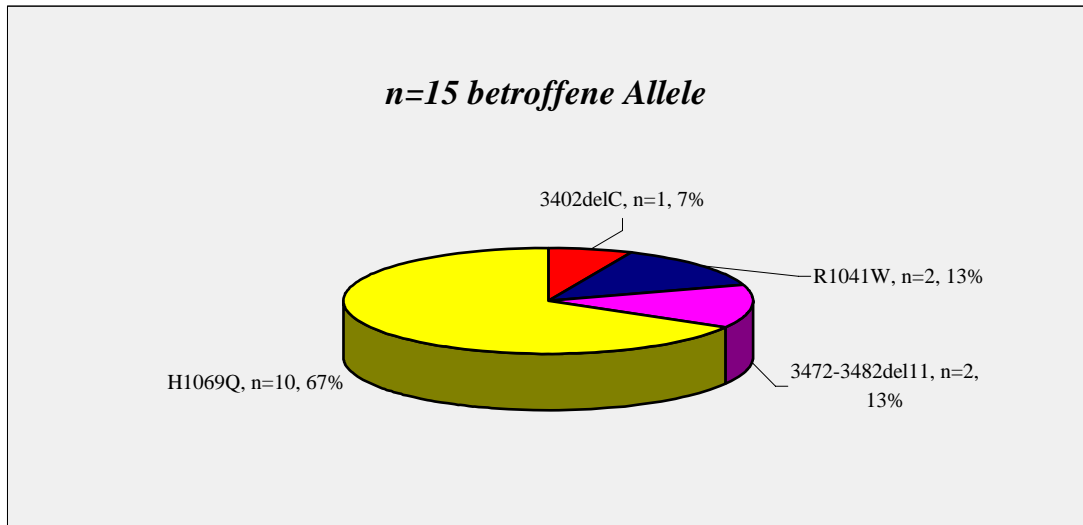
Neue Mutationen: W1410X, L549P, G998D, 507delA, 3731delT, P1273Q, I1148T, G591D

*Abbildung 12:* In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten aus Ägypten auftreten. Insgesamt sind 50 betroffene Allele unter diesen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil dieser Mutation an den 50 identifizierten Mutationen. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift geschrieben, während noch nicht bekannte Mutationen durch rote Schrift gekennzeichnet sind. Unterhalb der Tabelle findet sich eine Aufzählung der Mutationen, welche im Kreisdiagramm unter „Andere“ zusammengefasst wurden. Diese Mutationen wurden unter den Patienten dieses Landes jeweils höchstens zweimal identifiziert.

Aus Ägypten wurden 28 Patienten, unter denen sich 23 Index-Patienten und fünf Verwandte dieser Index-Patienten befinden, genetisch an der Charité untersucht. Bei 25 Personen fand man zwei betroffene Allele, wohingegen bei den anderen drei Patienten keine Mutation identifiziert wurde. Das Mutationsspektrum der untersuchten ägyptischen Patienten ist in Abbildung 12 dargestellt. Dieses gestaltet sich sehr heterogen, da unter den 50 betroffenen Allelen insgesamt 22 verschiedene Mutationen identifiziert wurden. Unter diesen 22 Mutationen befinden sich 13 Mutationen, welche bisher noch nicht beschrieben wurden. Weitere neun Mutationen sind im Zusammenhang mit einer hepatolentikulären Degeneration bereits bekannt. Am häufigsten stellen sich die Mutationen 3373-3374del2 und H1126P im Exon 15 dar, welche auf dem gleichen Allel identifiziert wurden und zu den noch nicht bekannten Mutationen gezählt werden. Insgesamt tritt dieses veränderte Allel mit einem Anteil von 16%, bezogen auf die Gesamtzahl der in Ägypten veränderten Allele, achtmal auf. Allerdings kann nicht von einer deutlichen Gewichtung auf diese Mutation gesprochen werden, da unter den ägyptischen Patienten in Betrachtung der insgesamt 50 identifizierten Mutationen 21 verschiedene verzeichnet werden konnten. Die Häufigkeit des Auftretens der anderen Mutationen sowie ihr prozentualer Anteil sind dem Kreisdiagramm in Abbildung 12 zu entnehmen.

Die nachfolgend erläuterten Länder, Griechenland, Litauen und Serbien, sind in ihrer Abbildung anders dargestellt. Aufgrund einer geringeren Patientenzahl im Verhältnis zu den weiter oben beschriebenen Ländern und der damit einhergehenden geringeren Anzahl betroffener Allele, können alle aufgetretenen Mutationen der Patienten eines Landes in einer Abbildung zusammengefasst werden. Bereits bekannte Mutationen sind wie vorher in schwarzer Schrift und noch nicht beschriebene Mutationen in roter Schrift dargestellt. Ebenfalls wie vorher sind die einzelnen Diagrammpunkte mit Namen der Mutation, der Häufigkeit ihres Auftretens und ihrem prozentualen Anteil gekennzeichnet.

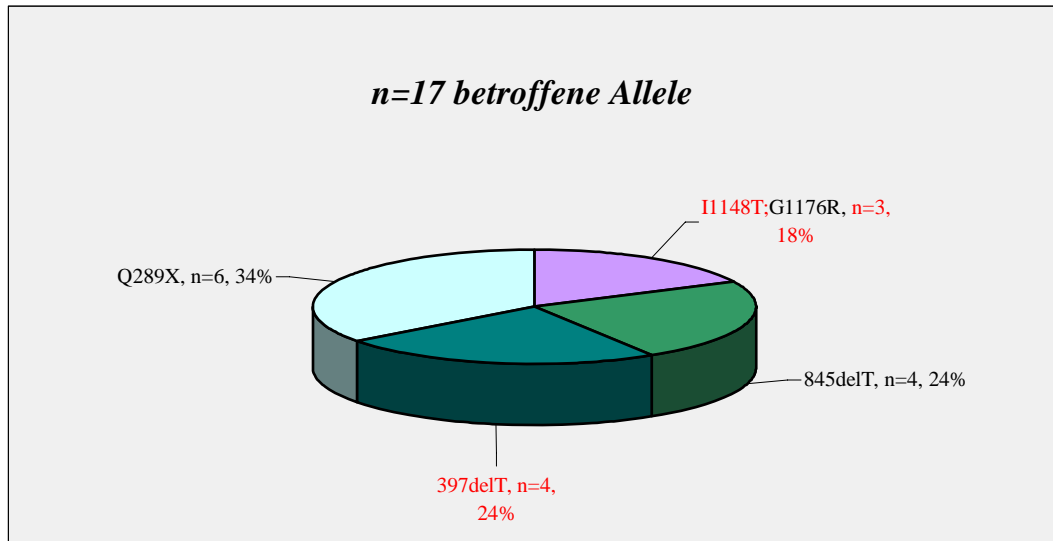
#### 4.1.3.7 Mutationsspektrum Litauen



*Abbildung 13:* In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten aus Litauen auftreten. Insgesamt sind 15 betroffene Allele unter diesen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil dieser Mutation an den 15 identifizierten Mutationen.

Unter den 18 Patienten aus Litauen befinden sich zwölf Index-Patienten und sechs Verwandte. Bei drei Patienten wurden zwei Mutationen identifiziert, während bei weiteren neun Patienten nur eine Mutation entdeckt wurde. Bei den anderen sechs wurde keine Mutation gefunden. Unter den Patienten aus Litauen konnten insgesamt 15 betroffene Allele erkannt werden, auf denen vier verschiedene Mutationen identifiziert wurden. Alle vier Mutationen sind im Zusammenhang mit dem Morbus Wilson bereits bekannt. Obwohl nur verhältnismäßig wenige Patienten aus Litauen genetisch untersucht wurden, sieht man eine deutliche Häufung der H1069Q-Mutation im Exon 14. Sie kommt zehnmal vor und fällt mit einem prozentualen Anteil von 67% erheblich ins Gewicht. Ansonsten auftretende Mutationen sind die 3402delC-Mutation im Exon 15, die R1041W-Mutation im Exon 14 und die 3472-3482del11-Mutation im Exon 16. Die genaue Anzahl ihres Auftretens sowie die prozentuale Verteilung der Mutationen sind der Abbildung 13 zu entnehmen.

#### 4.1.3.8 Mutationsspektrum Griechenland

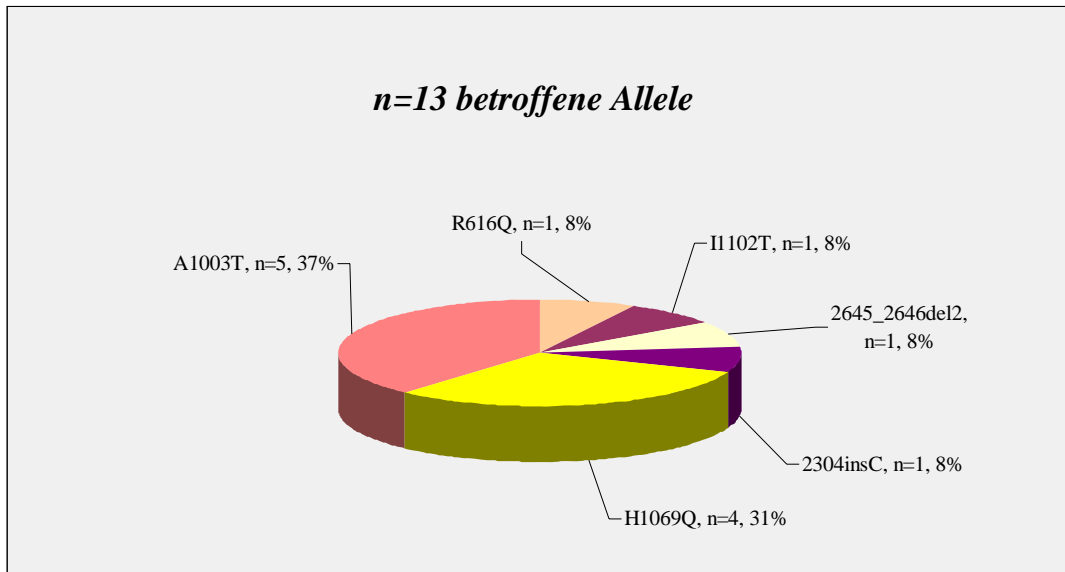


*Abbildung 14:* In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten aus Griechenland auftreten. Insgesamt sind 17 betroffene Allele unter diesen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil des veränderten Allels an den 17 betroffenen Allelen. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift geschrieben, während noch nicht bekannte Mutationen durch rote Schrift gekennzeichnet sind.

Aus Griechenland wurden 13 Personen genetisch untersucht. Acht dieser Patienten sind Index-Patienten, die anderen sechs sind Verwandte dieser. Bei fünf Patienten fand man zwei betroffene Allele; bei weiteren sieben wurde eine Mutation ermittelt, während nur bei einem Patienten kein genetisch pathologischer Befund erhoben wurde. Bei der Sequenzierung der 13 griechischen Patienten, wurde auf 17 Allelen eine Mutation identifiziert, deren Häufigkeit und Verteilung in einem Diagramm in Abbildung 14 dargestellt ist. Unter den 17 betroffenen Allelen wurden insgesamt vier unterschiedliche Veränderungen entdeckt, welche ähnlich häufig zu finden waren. Es befanden sich sowohl zwei bereits bekannte Mutationen, die Q289X-Mutation und die 845delT-Mutation im Exon 2, als auch zwei noch nicht beschriebene Mutationen, die 397delT-Mutation und die I1148T-Mutation unter ihnen. Eine weitere Mutation, die bereits bekannte G1176R-Mutation im Exon 16, wurde auf demselben Allel wie die I1148T-Mutation identifiziert.



#### 4.1.3.9 Mutationsspektrum Serbien



*Abbildung 15:* In der Abbildung ist dargestellt, welche Mutationen unter den genetisch untersuchten Patienten aus Serbien auftreten. Insgesamt sind 13 betroffene Allele unter diesen Patienten identifiziert worden. Die Beschriftung der einzelnen Kreisdiagrammabschnitte zeigt zunächst den Namen der Mutation, dann die Häufigkeit ihres Auftretens und zuletzt den prozentualen Anteil des veränderten Allels an den 13 betroffenen Allelen. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift geschrieben, während noch nicht bekannte Mutationen durch rote Schrift gekennzeichnet sind.

Zehn Patienten aus Serbien wurden untersucht, unter denen sich neun Index-Patienten und nur ein Verwandter befindet. Man fand bei sechs Patienten zwei betroffene Allele, bei einem Patient eine Mutation und bei drei Patienten keine Mutation. Unter den genetisch untersuchten serbischen Patienten wurden sechs verschiedene Mutationen auf 13 Allelen identifiziert, von denen fünf bereits bekannt sind, wohingegen eine Mutation noch nicht vorher in einen Zusammenhang mit einer Erkrankung an Morbus Wilson gebracht wurde. Die Mutationen sind bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens und ihrer prozentualen Verteilung in Abbildung 15 dargestellt. Hervorstechend in der Häufigkeit ihres Auftretens sind die Mutationen A1003T im Exon 13 und H1069Q im Exon 14, wie man in dem Mutationsspektrum der Abbildung 15 erkennen kann. Die anderen Mutationen kommen jeweils nur einmal vor.

4.1.3.10 Mutationsspektren Rumänien, Slowakai und U.S.A

*Rumänien: n=12 betroffene Allele*

*Slowakai: n=20 betroffene Allele*

*U.S.A.: n=2 betroffene Allele*

<b>Länder</b>	<b>Bekannte Mutationen</b>	<b>Anzahl der Mutationen</b>	<b>Neue Mutation</b>	<b>Anzahl der Mutationen</b>
<b>Rumänien</b>	H1069Q	10		
	2304insC	2		
<b>Slowakai</b>	H1069Q	17	M1359T	3
<b>U.S.A.</b>	R1319X	1	I1148N	1

*Tabelle 6: In der Tabelle werden die identifizierten Mutationen der Länder Rumänien, Slowakai, und U.S.A. dargestellt, von welchen nur eine geringere Patientenanzahl genetisch untersucht wurde und somit auch wenig Mutationen identifiziert werden konnten. Bereits bekannte Mutationen sind in schwarzer Schrift dargestellt, während noch nicht bekannte Mutationen rot markiert sind.*

Die identifizierten Mutationen der Patienten der Länder Rumänien, Slowakai und U.S.A. sind aufgrund der geringen Anzahl an Patienten und somit auch der Mutationen in Tabelle 6 gemeinsam beschrieben.

Unter den 14 untersuchten Patienten aus Rumänien befinden sich sieben Index-Patienten und sieben Verwandte. Bei drei Personen wurde auf zwei Allelen eine Mutation ermittelt, während bei weiteren sechs nur eine Mutation auffindig gemacht werden konnte. Bei anderen fünf Untersuchten wurde keine Mutation identifiziert. Auf zwölf veränderten Allelen der insgesamt 14 rumänischen Patienten waren Mutationen vorzufinden. Es wurden nur zwei verschiedene bereits bekannte Mutationen verzeichnet. Der H1069Q-Mutation im Exon 14 kann ein deutlicher Schwerpunkt zugesprochen werden, da sie unter den zwölf identifizierten Mutationen zehnmal vorkam. Die andere Mutation ist die 2304insC-Mutation im Exon 8, die auf den beiden verbleibenden veränderten Allelen gefunden wurde.

Aus der Slowakai wurden 13 Patienten an der Charité genetisch untersucht. Elf dieser Patienten sind Index-Patienten, während die anderen zwei untersuchten Personen Verwandte dieser Index-

Patienten sind. Die genetische Untersuchung ergab bei sieben Patienten zwei und bei sechs weiteren Patienten ein betroffenes Allel. Insgesamt wurden unter 20 identifizierten Mutationen nur zwei verschiedene Mutationen identifiziert. Insgesamt wurde 17-mal die H1069Q-Mutation im Exon 14 entdeckt. Die weiteren drei betroffenen Allele trugen die bisher noch nicht bekannte Mutation M1359T im Exon 20.

Aus den U.S.A. wurden nur 4 Patienten genetisch untersucht, die alle als Index-Patienten untersucht wurden. Bei zwei Patienten wurde jeweils ein betroffenes Allel identifiziert: Zum einen die bereits bekannte R1319X-Mutation im Exon 19 und zum anderen die noch nicht bekannte I1148N-Mutation im Exon 16.

## **4.2 Homozygote Mutationen und ihr klinisches Bild**

Insgesamt 221 der 718 genetisch untersuchten Patienten sind homozygote Träger einer bestimmten Mutation im *ATP7B*-Gen. Insgesamt konnten 45 verschiedene homozygote Veränderungen der DNA identifiziert werden, von denen 33 hier im Hinblick auf die klinische Ausprägung beschrieben sind. Die wohl am häufigsten im Zusammenhang mit dem Morbus Wilson auftretende Mutation, die H1069Q-Mutation im Exon 14, prägt die größte Anzahl der homozygoten Patienten. Insgesamt sind 124 Patienten homozygote Träger der H1069Q-Mutation. Die nächst größte Patientenanzahl mit homozygot veränderter DNA trägt die 3402delC-Mutation auf dem Exon 15, welche bei 19 Patienten identifiziert wurde. Insgesamt bei elf Patienten entdeckte man im Exon 8 die L708P-Mutation als homozygote Veränderung der DNA. Vier homozygote Träger einer bestimmten Mutation fand man jeweils für die Mutationen 2296dupA-Mutation im Exon 8, T977M im Exon 13, P992L ebenfalls im Exon 13, H1126P im Exon 15, und N1270S im Exon 18. Jeweils zwei homozygote Träger einer Mutation fand man bei zehn verschiedenen Mutationen: E396X, 845delT und Q289X im Exon 2, IVS3+1G/C im Exon 3, D642H im Exon 6, R778G und G710S im 8, A1003T im Exon 13, Q1142X im Exon 16, G1341R im Exon 20. Bei 27 weiteren genetisch untersuchten Personen wurde ebenfalls die homozygote Trägerschaft einer Mutation identifiziert. Die folgenden 27 Mutationen wurden jeweils nur bei einer Person als homozygote Veränderung des Gencodes entdeckt: R148W im Exon 2, L549P und IVS4-1G/A im Exon 4, Q680X, G691R, C703Y und 2008-2013del6 im Exon 7, D765N im Exon 8, I857T im Exon 10, S932X und L936X im 12, G998D im Exon 13, G1061E im Exon 14, G1089E und F1094L im Exon 15, T1232P, R1151C, I1148T und 3472-82del11 im Exon 16, 3697delC und 3649-3654del6 im Exon17, P1273L, L1299R, IVS18-2A>G, 3731delT und 3713-14del2 im Exon 18 und W1410X im Exon 21..

Die Beschreibung der homozygoten Patienten beschäftigt sich in diesem Teil der Arbeit mit der Auswirkung der krankheitsverursachenden Mutationen auf die klinische Symptomatik. Genauer betrachtet wurden zu diesem Zweck die Primärsymptomatik, das Alter der Erstsymptomatik, das Geschlecht, die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes, die Abstammung, die familiäre Vorbelastung und, wenn erhältlich, das histologische Bild infolge einer Leberbiopsie und der Kupfergehalt des Lebergewebes. Einige Laborparameter, die diagnostisch wichtig zur Aufdeckung der Erkrankung sind und Auskunft über das Maß der Erkrankung geben, wurden diesbezüglich ebenfalls ausgewertet. Hierbei handelt es sich um die Ceruloplasmin-Serum-Konzentration, die totale Kupfer-Serum-Konzentration und die Kupferkonzentration im Urin.

Die Datenbeschaffung und -auswertung war besonders arbeits- und zeitintensiv, da die behandelnden Ärzte der Patienten zunächst über e-mail, Post oder Telefon erreicht werden mussten, was sich in den verschiedenen Ländern unterschiedlich schwierig gestaltete und den Datenfluss des Öfteren erschwerte. Eine zusätzliche Schwierigkeit und Herausforderung ergab sich bei der Auswertung der Laborparameter, welche länder-, zentren- und städteabhängige Unterschiede bezüglich der Referenzwerte und Messeinheiten aufwiesen. Zum Zwecke einer möglichst genauen Auswertung der Daten wurden die Daten nicht in dieselben Einheiten umgerechnet, solange die passenden Referenzwerte, welche im Text bei den einzelnen Berechnungen genannt sind, vorhanden waren. Im Falle unbekannter Referenzwerte wurden die totalen Kupfer-Serum-Konzentrationen durch eine Umrechnungstabelle ([www.medizinforum.de/index.php3?menue=Foren&go=zeigeArtikel&nid=77&seite=&aid=325113](http://www.medizinforum.de/index.php3?menue=Foren&go=zeigeArtikel&nid=77&seite=&aid=325113)) von den konventionellen Einheiten in die SI-Einheiten umgerechnet und nachfolgend mit den Referenzwerten der Charité ([www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/75324.htm](http://www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/75324.htm)) ausgewertet. Auch die Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen wurden bei unbekanntem Referenzwert mit den Referenzwerten der Charité ([www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/28540.htm](http://www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/28540.htm)) ausgewertet. Die Umrechnung der Kupferkonzentrationen im Urin erfolgte bei unbekanntem Referenzwert mit Hilfe einer Umrechnungstabelle ([www.ukaachen.de/go/show?ID=1296122&DV=0&COMP=download&NAVID=1296112&NAVDV=0](http://www.ukaachen.de/go/show?ID=1296122&DV=0&COMP=download&NAVID=1296112&NAVDV=0)), bevor die Daten nachfolgend mit den Referenzwerten der Charité ([www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/48040.htm](http://www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/48040.htm)) ausgewertet werden konnten. Der Kupfergehalt des Lebergewebes aller Patienten, von denen Informationen bezüglich dieses Parameters vorhanden waren, wurde mit den Referenzwerten der Charité ([www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/1922853.htm](http://www.charite.de/ilp/routine/referenzdb/1922853.htm)) ausgewertet. Der Kupfergehalt der Leber war bei den meisten Patienten in  $\mu\text{g/g}$  Trockengewicht der Leber angegeben und musste zur Auswertung durch die Charité-Referenzwerte in SI-Einheiten umgerechnet werden. Die Umrechnung erfolgte mit Hilfe des Faktors 63,6132316, welcher sich aufgrund der Gleichsetzung von  $250 \mu\text{g/g TG}$  und  $3,93 \mu\text{mol/g TG}$  der Leber, die auf der oben genannten Charité-Seite genannt wurde, errechnete.

Um die Daten miteinander vergleichbar zu machen, wurde jeder einzelne Wert in einen prozentualen Zusammenhang mit seinem zugehörigen Referenzbereich gestellt. Daten, die unterhalb des Referenzbereiches lagen, wurden durch die untere Referenzbereichsbegrenzung dividiert, während Daten, die über der oberen Referenzbereichsbegrenzung lagen, durch diese geteilt wurden. Innerhalb des Referenzbereiches liegende Konzentrationen wurden gleich behandelt, in dem sie mit 100% berechnet wurden. Aus den auf diese Weise errechneten Prozentwerten wurde nachfolgend ein Mittelwert errechnet, welcher sowohl in der Tabelle 7 als

auch im Text genannt wird. Sowohl für die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration als auch für die Kupfer-Serum-Konzentration gibt der Mittelwert an, auf wie viel Prozent die Konzentrationen der Patienten durchschnittlich gegenüber der Konzentration eines Gesunden verringert ist. Diese Berechnungen der Werte erfolgten für jede Patientengruppe, welche sich aus den Patienten, die Träger derselben homozygoten Mutation sind, zusammensetzt. Die Erhöhungen der einzelnen Kupfer-Konzentrationen im Urin wurden jeweils als x-fache Erhöhung des jeweiligen Referenzbereiches berechnet. Nachfolgend wurde der Mittelwert der Erhöhungen ermittelt, welcher sowohl in der Tabelle 7 als auch im Text genannt ist.

Für die Patientengruppen, die homozygote Träger der H1069Q-Mutation und der 3402delC-Mutation sind, wurden die Berechnungen der Laborwerte aufgrund der großen Patientenzahl zusätzlich bezüglich der Primärsymptomatik durchgeführt. Außerdem wurde bei der Auswertung der homozygoten Träger der H1069Q-Mutation außer den prozentualen Berechnungen der Konzentrationsabweichungen, sowohl bei der Gesamtauswertung als auch bei der Auswertung unter den Patienten mit der selben Primärsymptomatik, der Mittelwert und die Standardabweichung der Laborwerte der größten Patientengruppe, in diesem Fall von über 50 Polen, bestimmt. Der Mittelwert der prozentualen Abweichungen bzw. der prozentualen Anteile gemessen am Referenzbereich wurde ebenfalls für die größte Patientengruppe im Zuge der Beschreibung der Patientengruppen mit unterschiedlicher Primärsymptomatik bestimmt. Die Standardabweichung dient der Bestimmung der Streuung einer Messreihe. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden ebenfalls für die Laborwerte, allerdings sehr viel kleinerer Patientengruppen, im Zuge der Gesamtauswertung der Patientengruppen homozygoter Träger der 3402delC- und der L708P-Mutation berechnet. Die Standardabweichung ist zusätzlich für das Alter der Erstmanifestation der homozygoten Träger der Mutationen H1069Q, 3402delC und L708P bestimmt worden.

### *Übersichtstabelle der klinischen Ausprägung bei der Trägerschaft einer homozygoten Mutation*

Mutation	Exon	Anzahl homozygoter Patienten	weiblich	männlich	hepatische Primärsymptomatik	neurologische Primärsymptomatik	Asymptomatisch	Mittelwert des Alters zum Zeitpunkt der Erstsymptomatik	Standardabweichung	Mittelwert der prozentualen Anteile der Coeruloplasmin-Serumkonzentrationen gemessen am Normbereich	Mittelwert der prozentualen Anteile der Serum-Kupferkonzentrationen gemessen am Normbereich	Faktor der Erhöhung der Urin-Kupferkonzentration	Kayser-Fleischer-Ring vorhanden	Kayser-Fleischer-Ring nicht vorhanden	positive Familienanamnese	negative Familienanamnese	Ergebnis einer Leberhistologie vorhanden	Mittelwert der Faktoren der hepatischen Kupferkonzentrationserhöhung
H1069Q	14	124	59	59	23	34	5	26,6	±10,3	50,6	72,1	4,1	7	9	7	3	10	11,4
3402delC	15	19	8	7	3	7	1	15,8	±2,4	22,8	40,1	6,6	9		5		1	13,3
L708P	8	11	2	6	2	3	2	15,6	±4	24,1	68,9	2,4	4	3	6			
E396X	2	2	1	1			2			12,3			2		2			
Q289X	2	2	1	1	2			6		25	52,7			2	2		2	
R148W	2	1		1				<12						1		1		
845delT	2	2	1					<8		5		8,9		1		1		
L549P	4	1		1	1			11		12,8					1		1	
D642H	6	2	1	1						15,7	42,3	9,9	2		1	1		
Q680X	7	1		1				<8		18,2		8,8	1		1			
2296dupA	8	4	3	1	1		3	24		14,9	31,8	1,9	1	3	4		3	24,9
R778G	8	2	1	1		1		20,5		8,7	10	9,2						
D765N	8	1	1			1		25		11,5	17,1	i.NB.	1		1			
I857T	10	1		1				<9		18,2	65,4	12,9	1			1		
S932X	12	1		1	1			24		11,5	41,4	i.NB.	1		1			

Tabelle 7, Teil 1

## *Übersichtstabelle der klinischen Ausprägung bei der Trägerschaft einer homozygoten Mutation*

Mutation	Exon	Anzahl homozygoter Patienten	weiblich	männlich	hepatische Primärsymptomatik	neurologische Primärsymptomatik	Asymptomatisch	Mittelwert des Alters zum Zeitpunkt der Erstsymptomatik	Mittelwert der prozentualen Anteile der Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen gemessen am Normbereich	Mittelwert der prozentualen Anteile der Serum-Kupfer-Konzentrationen gemessen am Normbereich	Faktor der Erhöhung der Urin-Kupfer-Konzentration	Kayser-Fleischer-Ring vorhanden	Kayser-Fleischer-Ring nicht vorhanden	positive Familienanamnese	negative Familienanamnese	Ergebnis einer Leberhistologie vorhanden	Mittelwert der Faktoren der hepatischen Kupfer-Konzentrationserhöhung
L936X	12	1		1				<14						1		1	
P992L	13	4					1				7,5			1			
T977M	13	4	2		2			9,5	17,4	78,6	5			2			
A1003T	13	2	1		1				i.NB.	56,6	1,1	1		1			
G1061E	14	1		1	1	1		10,5	verringert		erhöht	1				1	13,1
H1126P	15	4	3	1	4			10	73,1		6,6	3	1	4		2	
G1089E	15	1		1				<9	5,5	32,1	2,8	1			1		
F1094L	15	1		1		1		25	46,2	57,1	4,4	1		1			
Q1124X	16	2		2	2			<9,5	19,8		3,6	2			2		
I1148T	16	1	1		1			10,5	52,4	57,7			1			1	14,9
3472_3482del11	16	1							21,7	44,3	6,4						
3697delC	17	1		1				<10	7,3	23,1		1		1		1	
3649_3654del6	17	1		1				<3	20,5	8,21	5,6		1		1	1	
N1270S	18	4	2					<14,5	25	46,2	9,9	2		2			
IVS18-2A>G	18	1		1	1			12				1			1		
L1299R	18	1		1				<9	4,5	55,1	1,1	1		1			
3713_14delAA	18	1		1		1		25	7,7	52,9	1,6						
G1341R	20	2	1	1	2			<10	52,3		64	1		2		1	

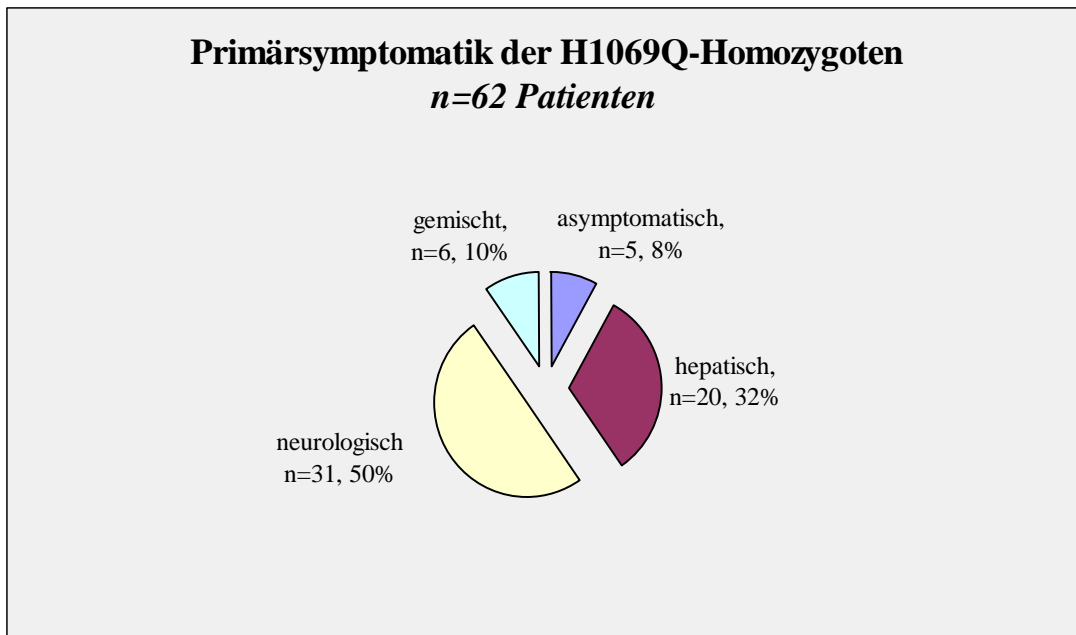
*Tabelle 7: Die Tabelle zeigt zusammenfassend das klinische Bild einzelner Patienten bzw. Patientengruppen, die genetisch Träger einer homozygoten Mutation sind. Der Tabelle ist zu entnehmen, wie viele Patienten homozygote Träger einer bestimmten Mutation sind, wie viele unter ihnen weiblichen oder männlichen Geschlechts sind und an welcher Primärsymptomatik sie leiden. Zusätzlich ist der Mittelwert und gegebenenfalls die Standardabweichung des Alters zum Zeitpunkt der Erstsymptomatik angegeben. Ferner zeigt die Tabelle den Mittelwert der prozentualen Anteile der einzelnen Konzentrationen gemessen am Referenzbereich, welche für die Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen und die Kupfer-Serum-Konzentrationen bestimmt wurden. Außerdem ist der Mittelwert der einzelnen Faktoren der Urin-Kupferkonzentrationen zur Bestimmung der Erhöhung der Konzentration gemessen am jeweiligen Referenzbereich angegeben. Die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes, eine eventuelle familiäre Vorgeschichte sowie die Existenz eines histologischen Ergebnisses infolge einer Leberbiopsie sind ebenfalls der Tabelle zu entnehmen. Weiter ist anzumerken, dass Patienten, welche sowohl eine hepatische als auch eine neurologische Primärsymptomatik aufweisen, in beiden Kategorien hinzugezählt wurden. Die Abkürzung i.N.B. steht für im Normbereich liegende Konzentrationen. Zum Alter der Erstmanifestation ist zu bemerken, dass bei den Patienten, bei denen ein <-Zeichen vor die Zahl gesetzt ist, ein genaues Alter nicht bekannt ist. Sicher ist aber, dass die Patienten vor dem genannten Alter erkrankten.*



### 4.2.1 Die H1069Q-Mutation im Exon 14

H1069Q	insgesamt	neurologisch	hepatisch	gemischt	asymptomatisch
Alter zum Zeitpunkt der Erstsymptomatik	26,6	30,8	25,1	21,1	
Standardabweichung	±10,3	±8,7	±7,9	±14,2	
Anzahl der betrachteten Patienten	61	31	19	5	
Mittelwert der prozentualen Anteile der Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen gemessen am Normbereich	50,6%	44,3%	51%		s.u.
Anzahl der betrachteten Patienten	69	29	17		s.u.
Mittelwert der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration in mg/dl unter den polnischen Patienten (Referenzbereich: 9,2 bis 16)	4,89	4,02	4,28		5,72
Standardabweichung	±4,2	±2	±2		
Mittelwert der prozentualen Konzentrationsveränderungen gemessen am Normbereich der polnischen Patienten	48,6%	43,7%	46,5%		62%
Anzahl der betrachteten Patienten	58	28	17		5
Mittelwert der prozentualen Anteile der Serum-Kupfer-Konzentrationen gemessen am Normbereich	72,1%	s.u.	72,8%		s.u.
Anzahl der betrachteten Patienten	67	s.u.	17		s.u.
Mittelwert der Serum-Kupfer-Konzentration in µg/dl unter den polnischen Patienten (Referenzbereich: 70 bis 140)	52,26	51,61	52,69		53,2
Standardabweichung	±21,2	±21,9	±20		
Mittelwert der prozentualen Anteile der Serum-Kupfer-Konzentrationen gemessen am Normbereich unter den polnischen Patienten	70,8%	69,6%	71,6%		74,60%
Anzahl der betrachteten Patienten	58	28	17		5
Mittelwert der Faktoren der Kupfer-Konzentrationserhöhung im Urin	4,1	5	3,3		s.u.
Anzahl der betrachteten Patienten	72	29	17		s.u.
Mittelwert der Kupferkonzentration im Urin in µg/d unter den polnischen Patienten (Referenzbereich: <50)	195,32	252,79	156,78		101,4
Standardabweichung	±291	±402	±86,9		
Mittelwert der Faktoren der Kupfer-Konzentrationserhöhung im Urin unter den polnischen Patienten	3,9	5,1	3,1		2
Anzahl der betrachteten Patienten	57	28	17		5

*Tabelle 8: In der Tabelle sind verschiedene Berechnungen des Alters, der Primärsymptomatik und der Laborparameter, welche bei homozygoten Trägern der H1069Q-Mutation zu beurteilen waren, dargestellt. Sowohl die Gesamtauswertung der Laborparameter aller Patienten mit dieser homozygoten Mutation, als auch die Auswertung einzelner Patientengruppen, welche aufgrund der unterschiedlichen Primärsymptomatik der Patienten unterteilt wurden, sind hier bezüglich des Alters der Primärsymptomatik, der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, der Serum-Kupfer-Konzentration und der Kupfer-Konzentration im Urin beschrieben. Die Abkürzung „s.u.“ bedeutet „siehe unten“. Sie wird eingesetzt, wenn die Auswertung in einer Patientengruppe, bezüglich der Anzahl der Patienten, deren Daten ausgewertet wurden, und dem errechneten prozentualen Konzentrationsanteil bzw. der Konzentrationserhöhung, dem der gesamten Gruppe entspricht.*



*Abbildung 16:* Die Abbildung gibt einen Überblick über die Verteilung der Primärsymptomatik der homozygoten Träger der H1069Q-Mutation. Über 62 der insgesamt 124 homozygoten Träger dieser Mutation bestehen Informationen bezüglich der Primärsymptomatik.

124 der genetisch untersuchten Patienten, unter denen sich sowohl 59 Männer als auch 59 Frauen befinden, sind homozygote Träger der H1069Q-Mutation auf dem Exon 14. Zwei von ihnen stammen aus Ägypten, zwei aus Brasilien, 29 aus Deutschland, einer aus dem Iran, einer aus Serbien, 83 aus Polen, zwei aus Rumänien und fünf aus der Slowakai. Informationen bezüglich der Primärsymptomatik sind bei 62 Patienten vorhanden. Bei 31 dieser 62 Patienten ist eine primär neurologische Manifestation der heptatolentikulären Degeneration bekannt, wohingegen bei 20 Patienten eine vorwiegend hepatische Manifestation das klinische Bild bestimmt. Ein gemischtes Krankheitsbild aus neurologischer und hepatischer Manifestation besteht bei weiteren sechs Patienten. Fünf untersuchte Personen weisen trotz der genetischen Veränderung keine klinische Symptomatik auf (Abbildung 16).

Von 61 der 124 homozygoten Träger der H1069Q-Mutation bestehen Information bezüglich des Zeitpunktes der klinischen Erstmanifestation. Das durchschnittliche Alter der Erstmanifestation liegt bei  $26,6 \pm 10,3$  Jahren.

Über die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration zum Zeitpunkt der Diagnostik existieren von insgesamt 69 Patienten Informationen. Durchschnittlich erreichte die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration dieser Patienten 50,6% der Konzentration eines Gesunden. Unter den Patienten befinden sich 58 Polen, deren durchschnittliche Konzentration bei einem Referenzbereich von

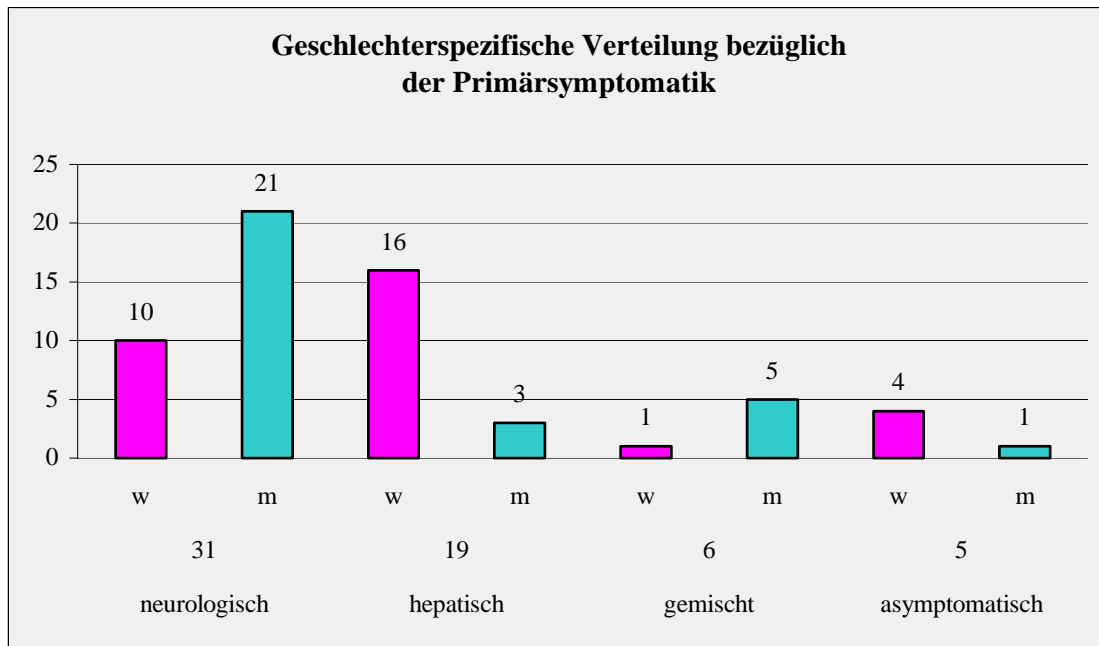
9,2 bis 16 mg/dl  $4,89 \pm 4,2$  mg/dl ergab. Durchschnittlich erreichten die Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen der polnischen Patienten 48,6% der Konzentration eines Gesunden.

Die Serum-Kupfer-Konzentration ist von 67 Patienten bekannt. Die Konzentrationen dieser Patienten ergaben durchschnittlich 72,1 % der im Normbereich liegenden Werte. Die größte Patientengruppe kommt aus Polen. Diese 58 Polen zeigen eine durchschnittliche Konzentration von  $52,26 \pm 21,2$   $\mu\text{g/dl}$  bei einem Referenzbereich von 70 bis 140  $\mu\text{g/dl}$ . Insgesamt belief sich die Serum-Kupfer-Konzentration der polnischen Patienten durchschnittlich auf 70,8% der Norm.

Die Kupfer-Konzentration im Urin ist von 72 Patienten zum Zeitpunkt der Diagnostik bekannt. Die Konzentration dieser Patienten ist durchschnittlich 4,1fach erhöht. 57 der Patienten stammen aus Polen. Mit einer durchschnittlichen Konzentration von  $195,32 \pm 291$   $\mu\text{g/d}$  bei einem Referenzbereich von  $<50$   $\mu\text{g/d}$  ist diese Konzentration 3,9fach erhöht.

Von 16 Patienten sind Informationen bezüglich der Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes bekannt. Nur bei sieben dieser Patienten wurde zum Zeitpunkt der Diagnostik ein Kayser-Fleischer-Ring gefunden, während er bei den anderen neun Patienten nicht existierte. Über eine eventuelle familiäre Vorgeschichte bezüglich der hepatolentikulären Degeneration existieren über zehn Patienten Informationen, von denen sieben familiär vorbelastet sind, während bei den anderen drei eine familiäre Vorbelastung ausgeschlossen wurde.

Bei zehn Patienten ist das Ergebnis einer Leberbiopsie bekannt. Bei acht von ihnen zeigt sich das Bild einer Fettleber und einer Fibrose. Bei einem anderen wurde nur das Bild einer Fibrose beschrieben. Bei einem weiteren Patienten konnten nur unspezifische Veränderungen beschrieben werden. Von sieben Patienten sind Werte über die intrahepatische Kupferspeicherung bekannt. Durchschnittlich zeigt sich ein Wert von 9,93  $\mu\text{mol/g}$  Trockengewicht der Leber, welcher sich nach Umrechnung der einzelnen Werte aus den konventionellen Einheiten in die SI-Einheiten ergab, während die obere Grenze des Referenzbereiches bei 0,87  $\mu\text{mol/l}$  liegt. Der Mittelwert der Faktoren, um welche die hepatische Kupfer-Konzentration der einzelnen Patienten erhöht ist, ergibt 11,4.



*Abbildung 17:* Die Abbildung stellt die geschlechterspezifische Verteilung bezogen auf den Zeitpunkt der Erstsymptomatik dar. Insgesamt sind diesbezüglich von 61 der 124 homozygoten Träger der H1069Q-Mutation Informationen vorhanden.

Wenn man die homozygoten Träger der H1069Q-Mutation mit neurologischer Primärsymptomatik betrachtet, fällt auf, dass der Zeitpunkt der Erstsymptomatik durchschnittlich in einem höheren Alter auftritt, als das Durchschnittsalter der gesamten Patienten mit dieser homozygoten Mutation. Das durchschnittliche Alter der Erstmanifestation der Patienten mit dieser Primärsymptomatik liegt bei  $30,8 \pm 8,7$  Jahren. Nur eine Patientin entwickelte vor dem 15. Lebensjahr, im Alter von sieben Jahren, eine klinische Symptomatik. Zwischen dem 20. und 29. Lebensjahr wurden 14 dieser Patienten zum ersten Mal klinisch auffällig. Nach Vollendung des 30. Lebensjahres zeigten 16 homozygote Träger der H1069Q-Mutation erstmalig ein klinisches Bild. Insgesamt 21 der hauptsächlich neurologischen Patienten sind Männer. Man erkennt deutlich, dass zwischen dem 21. und 30. Lebensjahr mehr Männer erkranken als Frauen, da von den 16 Patienten, welche in diesem Zeitraum eine klinische Symptomatik entwickelten, 12 Männer sind. Unter den nach dem 30. Lebensjahr neurologisch erkrankten Patienten zeigt sich ebenfalls eine Häufung des männlichen Geschlechts, da sich unter den 14 Patienten nur fünf Frauen befinden. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration ist von 29 Patienten bekannt, von denen 28 aus Polen stammen und einer aus Deutschland kommt. Der Mittelwert des prozentualen Anteils der Konzentrationen gemessen an der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration gesunder Personen beträgt 44,3%. Die durchschnittliche Coeruloplasmin-Serum-

Konzentration der 28 polnischen Patienten beträgt  $4,02 \pm 2$  mg/dl. Es ergibt sich hieraus ein durchschnittlich 43,7%iges Vorhandensein der bei einem Gesunden erwarteten Konzentration. Die Serum-Kupfer-Konzentration ist von 28 Polen bekannt. Die durchschnittliche Konzentration beträgt  $51,61 \pm 21,9$   $\mu$ g/dl mit einer bei einem Referenzbereich von 70 bis 140  $\mu$ g/dl. Durchschnittlich sind die Konzentrationen der polnischen Patienten vermindert. Es sind nur 69,6% der Normalkonzentration vorhanden. Die Kupferkonzentration im Urin ist von denselben Patienten bekannt, von welchen bereits die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration bekannt war. Der Mittelwert der Konzentrationserhöhungen zeigt eine 5fache Erhöhung an. Die durchschnittliche Konzentration der polnischen Patienten liegt mit  $252,79 \pm 402$  mg/dl oberhalb des Referenzbereiches von  $<50$   $\mu$ g/d. Unter den polnischen Patienten ergibt sich durchschnittlich eine 5,1fache Konzentrationserhöhung. Alle Patienten sind kaukasischer Abstammung. Nur bei einem dieser Patienten ist die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes bekannt.

Betrachtet man die Patienten, bei denen die hepatische Manifestation der hepatolentikulären Degeneration im Vordergrund steht, fällt deutlich die frühere Entwicklung der klinischen Symptomatik auf. Der Mittelwert des Erstmanifestationsalters liegt unter den 19 Patienten, von denen das Alter der Primärsymptomatik bekannt ist, bei  $25,1 \pm 7,9$  Jahren. Nur drei dieser Patienten, ein Junge und zwei Mädchen, entwickelten vor dem 15. Geburtstag ein klinisch auffälliges Bild. Elf Patienten wurden zwischen dem 16. und 30. Lebensjahr klinisch auffällig. Fünf Patienten entwickelten erst nach Vollendung des 30. Lebensjahres eine Symptomatik. Insgesamt sind nur drei der 19 Patienten mit einer hepatischen Manifestation des Morbus Wilson männlichen Geschlechts. Zwischen dem 16. und 30. Lebensjahr erkrankten nur Frauen, wohingegen sich bei einem Manifestationsalter nach dem 30. Lebensjahr ein heterogenes Bild darstellt: Drei der fünf Patienten sind Frauen, die anderen zwei sind Männer. Alle Patienten sind kaukasischer Abstammung. Informationen bezüglich der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, der Serum-Kupfer-Konzentration und der Kupfer-Konzentration im Urin sind von jeweils den selben 17 Patienten vorhanden. Es handelt sich um eine Patientin aus Brasilien, 13 polnische Patienten und drei Patienten aus der Slowakai. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration dieser 17 Patienten belief sich zum Zeitpunkt der Diagnostik auf durchschnittlich auf 51% der Konzentration eines Gesunden. Der Mittelwert der Coeruloplasminwerte der 13 polnischen Patienten lag bei einem Referenzbereich von 9,2 bis 16 mg/dl bei  $4,28 \pm 2$  mg/dl. Die polnischen Patienten mit einer hepatischen Primärsymptomatik bei dieser homozygoten Mutation haben durchschnittlich nur 46,5% der bei einem Gesunden zu erwartenden Coeruloplasmin-Serum-Konzentration. Die Kupfer-Serum-Konzentration erreicht unter diesen 17 Patienten

durchschnittlich nur 72,8% der Konzentration eines Gesunden. Der durchschnittliche Wert der polnischen Patienten liegt bei  $52,69 \pm 20$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ , welcher bei einem Referenzwertbereich von 70 bis 140  $\mu\text{g}/\text{dl}$  erniedrigt ist. Insgesamt erreichen die polnischen Patienten 71,6% der Konzentration eines gesunden Menschen. Die Kupferkonzentration im Urin über 24 Stunden ergab unter den polnischen Patienten einen durchschnittlichen Wert von  $156,78 \pm 86,9$   $\mu\text{g}/\text{d}$ , was gemessen am Referenzbereich  $<50$   $\mu\text{g}/\text{d}$  eine Konzentrationserhöhung anzeigt. Durchschnittlich ist die Kupfer-Konzentration im Urin unter den 13 polnischen Patienten 3,1fach erhöht, während sie unter den 17 Patienten insgesamt 3,3fach erhöht ist. Bei sieben dieser Patienten bestehen Informationen bezüglich der Existenz eines Kayser-Fleischer-Ringes. Bei vier von ihnen existiert er, während er bei den anderen drei Patienten nicht diagnostiziert wurde. Bei drei Patienten ist eine familiäre Vorgeschichte der hepatolentikulären Degeneration bekannt. Zusätzlich ist bei einem dieser Patienten die Blutsverwandtschaft der Eltern bekannt. Bei einem weiteren Patienten wurde eine familiäre Vorgeschichte sicher ausgeschlossen.

Sechs Patienten wurden durch eine sowohl hepatische als auch neurologische Symptomatik auffällig. Der Mittelwert des Alters der Erstmanifestation, welches von fünf Patienten bekannt ist, ist bei diesen Patienten niedriger als bei den zuvor beschriebenen und liegt bei  $21,1 \pm 14,2$  Jahren. Über eventuelle Häufungen der Primärsymptomatik in einem bestimmten Altersabschnitt lassen sich keine genaueren Aussagen machen. Bei einem Patienten ist die Entwicklung eines klinischen Bildes bereits im Alter von elf bekannt, eine andere Patientin wurde erst im Alter von 45 klinisch auffällig. Fünf der sechs Patienten sind männlichen Geschlechts. Alle Patienten sind kaukasischer Abstammung. Bei drei Patienten bestehen Informationen bezüglich eines Kayser-Fleischer-Ringes. Nur bei einem von ihnen ist er präsent. Bei diesem Patienten und einem weiteren ist zusätzlich eine familiäre Vorgeschichte des Morbus Wilson bekannt.

Bei fünf der H1069Q-homozygoten Patienten, welche alle Polen sind, war zum Zeitpunkt der Diagnostik keine klinische Symptomatik aufzufinden. Alle fünf Patienten sind als Angehörige eines klinisch auffälligen Patienten mit genetisch gesicherter Diagnose eines Morbus Wilson untersucht worden. Vier dieser Patienten sind weiblichen Geschlechts. Die jüngste dieser Patienten ist 23 Jahre alt, die älteste ist 65 Jahre alt. Obwohl die Patienten zum Zeitpunkt der Diagnostik asymptomatisch waren, wurden pathologische Veränderungen der Laborparameter beobachtet. Durchschnittlich ergab sich unter den fünf polnischen Patienten eine auf 62% der Norm erniedrigte Coeruloplasmin-Serum-Konzentration. Die durchschnittliche Konzentration dieser Patienten lag zum Zeitpunkt der Diagnostik bei 5,72  $\text{mg}/\text{dl}$ , unterhalb des

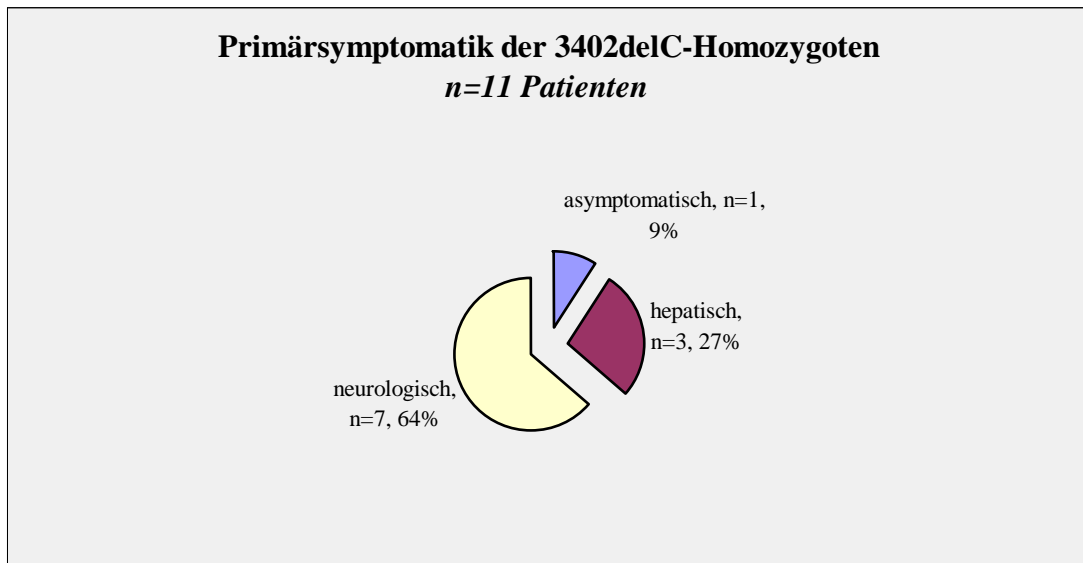
Referenzbereichs von 9,2 bis 16 mg/dl. Die Kupfer-Serum-Konzentration der selben Patienten lag im Durchschnitt bei 53,2 µg/dl, was ebenfalls eine Verringerung bezogen auf den unteren Normwert von 70 µg/dl anzeigt. Durchschnittlich erreichten diese Patienten 74,6% der Serum-Kupfer-Konzentration eines Gesunden. Die Kupferausscheidung im Urin belief sich zum Zeitpunkt der Diagnostik unter diesen fünf Patienten auf einen durchschnittlichen Wert von 101,4 µg/d, was bei einem Referenzbereich von <50 µg/d einer 2fachen Erhöhung dieser Konzentration entspricht.

### 4.2.2 Die 3402delC-Mutation im Exon 15

3402delC	insgesamt	neurologisch	Hepatisch	asymptomatisch
Alter zum Zeitpunkt der Erstsymptomatik	15,8	15,7	16	
Standardabweichung	±2,4	±2,7		
Anzahl der betrachteten Patienten	11	7	3	
Mittelwert der prozentualen Anteile der Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen gemessen am Normbereich	22,8%	11,8%	15%	7,7%
Anzahl der betrachteten Patienten	13	7	3	1
Mittelwert der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration in mg/dl unter den brasilianischen Patienten (Referenzbereich: 26 bis 58)	3,58			
Standardabweichung	±2,3			
Mittelwert der prozentualen Konzentrationsveränderungen gemessen am Normbereich der brasilianischen Patienten	13,8%			
Anzahl der betrachteten Patienten	9			
Mittelwert der prozentualen Anteile der Serum-Kupfer-Konzentrationen gemessen am Normbereich	40,1%	38,8%	59,3%	22,9
Anzahl der betrachteten Patienten	12	7	2	1
Mittelwert der Serum-Kupfer-Konzentration in µg/dl unter den brasilianischen Patienten (Referenzbereich: 70 bis 140)	31,4			
Standardabweichung	±15,2			
Mittelwert der prozentualen Anteile der Serum-Kupfer-Konzentrationen gemessen am Normbereich unter den brasilianischen Patienten	44,9%			
Anzahl der betrachteten Patienten	9			
Mittelwert der Faktoren der Kupfer-Konzentrationserhöhung im Urin	6,6	11,6	2,1	2,2
Anzahl der betrachteten Patienten	9	4	2	1
Mittelwert der Kupferkonzentration im Urin in µg/d unter den brasilianischen Patienten (Referenzbereich: 2 bis 80)	633,4			
Mittelwert der Faktoren der Kupfer-Konzentrationserhöhung im Urin unter den brasilianischen Patienten	8,3			
Anzahl der betrachteten Patienten	5			

*Tabelle 9:* In der Tabelle sind verschiedene Berechnungen des Alters der Primärsymptomatik und der Laborparameter, welche bei homozygoten Trägern der 3402delC-Mutation zu beurteilen waren, dargestellt. Sowohl die Gesamtauswertung der Laborparameter aller Patienten mit dieser homozygoten Mutation, als auch die Auswertung einzelner Patientengruppen, welche aufgrund der unterschiedlichen Primärsymptomatik der Patienten unterteilt wurden, sind hier bezüglich des Alters der Primärsymptomatik, der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, der Serum-Kupfer-Konzentration und der Kupfer-Konzentration im Urin beschrieben.





*Abbildung 18:* Die Abbildung gibt einen Überblick über die Verteilung der Primärsymptomatik der homozygoten Träger der 3402delC-Mutation. Über 11 der insgesamt 19 homozygoten Träger dieser Mutation bestehen Informationen bezüglich der Primärsymptomatik.

19 der insgesamt 221 Patienten, die homozygote Träger einer Mutation im *ATP7B*-Gen sind, sind homozygot für die 3402delC-Mutation auf dem Exon 15. 13 dieser Patienten stammen aus Brasilien, einer aus Deutschland und fünf aus Polen. Insgesamt ist von 15 Patienten das Geschlecht bekannt, so dass sicher gesagt werden kann, dass sich unter diesen Patienten acht Männer und sieben Frauen befinden. Bei elf der Patienten sind Informationen bezüglich der Primärsymptomatik und dem Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation vorhanden. Sieben der homozygoten Träger der 3402delC-Mutation leiden an einer vorwiegend neurologischen Form der hepatolentikulären Degeneration, weitere drei wurden klinisch durch eine überwiegend hepatische Manifestation des Morbus Wilson auffällig. Bei einem weiteren homozygoten Träger der 3402delC-Mutation ist bekannt, dass er klinisch asymptomatisch ist (Abbildung 18). Der Mittelwert des Alter zum Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation liegt bei diesen Patienten bei  $15,8 \pm 2,4$  Jahren.

Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration ist von 13 Patienten, unter denen sich neun Brasilianer und vier Polen befinden, bekannt. Die Konzentrationen dieser Patienten erreichten durchschnittlich nur 22,8% der Konzentration eines Gesunden. Die durchschnittliche Coeruloplasmin-Serum-Konzentration der brasilianischen Patienten lag zum Zeitpunkt der Diagnostik bei  $3,58 \pm 2,3$  mg/dl, welche in Betrachtung des Referenzbereiches von 26 bis 58 mg/dl nur 13,8% der Konzentration eines Gesunden erreicht. Die Serum-Kupfer-Konzentration

ist von zwölf Patienten, neun Brasilianern und drei Polen bekannt. Die Konzentrationen der einzelnen Patienten erreichten durchschnittlich nur 40,1% ihres jeweiligen Referenzwertes. Unter neun brasilianischen Patienten errechnet sich eine durchschnittliche Konzentration von  $31,4 \pm 15,2 \mu\text{l/l}$ , welche bei einem Normwertbereich von 70 bis  $140\mu\text{l/l}$  nur 44,9% der Konzentration eines Gesunden erreicht. Von weiteren neun Patienten, von denen fünf Brasilianer und vier Polen sind, bestehen Informationen bezüglich der Kupferausscheidung im Urin. Durchschnittlich ist die Kupfer-Konzentration im Urin der Patienten 6,6fach erhöht. Während die durchschnittliche Konzentration der vier polnischen Patienten mit einem Wert von  $228,1 \mu\text{g/d}$  bei einem oberen Referenzwert von  $50 \mu\text{g/d}$  nur 4,6fach erhöht ist, ist der durchschnittliche Wert der brasilianischen Patienten von  $633,4 \mu\text{g/d}$  bei einem Referenzbereich von 2 bis  $80 \mu\text{g/d}$  durchschnittlich 8,3fache erhöht. Weiter ist von neun der Patienten bekannt, dass sie zum Zeitpunkt der Diagnostik einen Kayser-Fleischer-Ring aufwiesen. Eine familiäre Vorbelastung ist bei fünf Patienten bekannt. Vier dieser fünf Patienten sind Kinder blutsverwandter Eltern. Nur bei einem Patienten ist der Kupfergehalt des Lebergewebes infolge einer Leberbiopsie bekannt. Bei der polnischen Patientin liegt die Kupferkonzentration, nach Umrechnung von der konventionellen in die SI-Einheit, bei  $11,58 \mu\text{mol/l}$  Trockengewicht des Lebergewebes und ist somit bei einem oberen Referenzwert von  $0,87 \mu\text{mol/g}$  13,3fach erhöht.

Unter den sieben Patienten, die an einer primär neurologischen Form der hepatolentikulären Degeneration leiden, befinden sich vier Männer und drei Frauen. Einer der Männer ist Mulatte, die anderen sechs Patienten sind kaukasischer Abstammung. Betrachtet man den Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation ergibt sich ein eher heterogenes Bild. Im Gegensatz zu homozygoten Trägern der H1069Q-Mutation treten bei dieser Mutation neurologische Symptome vergleichsweise früher auf. Diese sieben Patienten erkrankten klinisch zwischen dem 14. und 21. Lebensjahr. Der Mittelwert des Alters der Erstmanifestation liegt bei diesen Patienten bei  $15,7 \pm 2,7$  Jahren. Durchschnittlich erreichen diese Patienten nur 11,8% der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration eines Gesunden. Die Serum-Kupfer-Konzentration ist ebenfalls verringert. Durchschnittlich beläuft sich die Konzentration dieser sieben Patienten auf 38,8% der Normalkonzentration. Informationen bezüglich der Kupferkonzentration im Urin sind von vier Patienten vorhanden. Der Mittelwert der Konzentrationsabweichungen vom jeweiligen Referenzbereich zeigt eine 11,6fache Erhöhung an. Bei sechs der sieben Patienten mit neurologischer Primärsymptomatik ist die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes bekannt. Zwei von ihnen sind Kinder blutsverwandter Eltern. Ein anderer unter ihnen hat zwei Brüder, welche ebenfalls betroffen sind.

Unter den drei primär hepatisch erkrankten Patienten befinden sich zwei Mädchen und ein Junge. Eines der Mädchen ist afrikanischer Abstammung, während die anderen beiden Patienten kaukasischer Abstammung sind. Auch hier fand die klinische Erstmanifestation bereits im jugendlichen Alter zwischen 14 und 18 Jahren statt, was, verglichen mit den homozygoten Trägern der H1069Q-Mutation, relativ früh ist. Der Mittelwert des Alters der Erstmanifestation dieser Patienten liegt bei  $16 \pm 2$  Jahren. Eine geschlechterspezifische Gewichtung, bezogen auf einen bestimmten Altersabschnitt der klinischen Erstmanifestation, ist bei der 3402delC-Mutation aufgrund der vorhandenen Daten zunächst nicht anzunehmen. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, welche von drei Patienten bekannt ist, liegt durchschnittlich bei 15% der Konzentration eines Gesunden. Die Serum-Kupfer-Konzentration ist von zwei brasilianischen Patienten bekannt. Durchschnittlich erreichen die Patienten 59,3% eines Normwertes. Über die Kupferausscheidung im Urin liegen von zwei Patienten Informationen vor. Im Mittelwert ergibt sich eine 2,1fache Erhöhung der Konzentration gegenüber der Norm. Zwei der drei Patienten wurde klinisch die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes nachgewiesen. Bei einem von ihnen ist zusätzlich bekannt, dass seine Eltern miteinander blutsverwandt sind.

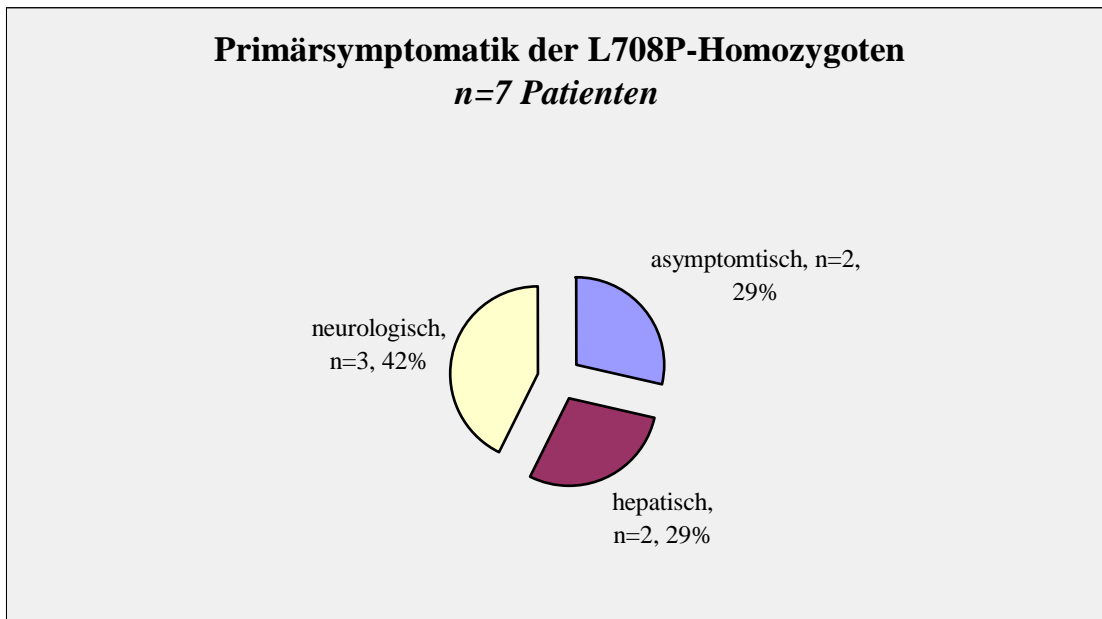
Ein Mann kaukasischer Abstammung war zum Zeitpunkt der Diagnostik, im Alter von 31 Jahren, asymptomatisch. Trotzdem zeigte sich während der Diagnostik Veränderungen der Laborparameter, wie eine auf 7,7% der Norm verringerte Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, eine auf 22,9% der Norm erniedrigte Serum-Kupfer-Konzentration und eine 2,2fach erhöhte Kupfer-Ausscheidung im Urin. Ein Kayser-Fleischer-Ring wurde zusätzlich gefunden.

### 4.2.3 Die L708P-Mutation im Exon 8

3402dleC	insgesamt	neurologisch	hepatisch
Alter zum Zeitpunkt der Erstsymptomatik	15,6	17,7	14,5
Standardabweichung	4		
Anzahl der betrachteten Patienten	5	3	2

Betrachtete Parameter	insgesamt
Mittelwert der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration in mg/dl unter den brasilianischen Patienten (Referenzbereich: 26 bis 60)	6,27
Standardabweichung	3,7
Mittelwert der prozentualen Konzentrationsveränderungen gemessen am Normbereich der brasilianischen Patienten	24,10%
Anzahl der betrachteten Patienten	6
Mittelwert der Serum-Kupfer-Konzentration in µg/dl unter den brasilianischen Patienten (Referenzbereich: 70 bis 140)	48,25
Standardabweichung	8,1
Mittelwert der prozentualen Anteile der Serum-Kupfer-Konzentrationen gemessen am Normbereich unter den brasilianischen Patienten	68,90%
Anzahl der betrachteten Patienten	4
Mittelwert der Kupferkonzentration im Urin in µg/d unter den brasilianischen Patienten (Referenzbereich: 2 bis 80)	188,8
Standardabweichung	97,6
Mittelwert der Faktoren der Kupfer-Konzentrationserhöhung im Urin unter den brasilianischen Patienten	2,4
Anzahl der betrachteten Patienten	5

*Tabelle 10:* In der Tabelle sind verschiedene Berechnungen des Alters der Primärsymptomatik und der Laborparameter, welche bei homozygoten Trägern der L708P-Mutation zu beurteilen waren, dargestellt. Sowohl die Gesamtauswertung der Laborparameter aller Patienten mit dieser homozygoten Mutation, als auch die Auswertung einzelner Patientengruppen, welche aufgrund der unterschiedlichen Primärsymptomatik der Patienten unterteilt wurden, sind hier bezüglich des Alters der Primärsymptomatik, der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, der Serum-Kupfer-Konzentration und der Kupfer-Konzentration im Urin beschrieben.



*Abbildung 19:* Die Abbildung gibt einen Überblick über die Verteilung der Primärsymptomatik der homozygoten Träger der L708P-Mutation. Über sieben der insgesamt elf homozygoten Träger dieser Mutation bestehen Informationen bezüglich der Primärsymptomatik.

Unter den 221, für eine bestimmte Mutation im *ATP7B*-Gen homozygoten, Patienten befinden sich elf Patienten, die homozygot für die L708P-Mutation sind. Alle elf Patienten stammen aus Brasilien. Über sieben dieser Patienten sind Informationen bezüglich ihrer Primärsymptomatik (Abbildung 19) und anderer klinischer Daten vorhanden. Bei acht der elf Patienten ist das Geschlecht bekannt. Sechs dieser Patienten sind männlich, zwei von ihnen sind weiblichen Geschlechts. Der Mittelwert des Alters zum Zeitpunkt der Primärsymptomatik liegt unter fünf Patienten, über welche Informationen bezüglich dessen vorhanden sind, bei  $15,6 \pm 4$  Jahren. Von einigen der sieben Patienten, über die klinische Informationen bekannt sind, sind diagnostisch wichtige Laborwerte vorhanden. Die durchschnittliche Coeruloplasmin-Serum-Konzentration liegt unter sechs Patienten bei  $6,27 \pm 3,7$  mg/dl, was bei einem Referenzbereich von 26 bis 58 mg/dl eine Verringerung auf 24,1% der Norm anzeigt. Die Serum-Kupfer-Konzentration, welche von vier Patienten bekannt ist, ist mit einem durchschnittlichen Wert von  $48,25$  µg/dl ebenfalls deutlich niedriger als die eines gesunden Menschen, bei dem eine Serum-Kupfer-Konzentration zwischen 70 bis 140 µl/l zu erwarten ist. Dieser durchschnittlich errechnete Wert zeigt eine Verringerung auf 68,9% der Normwertkonzentration an. Von fünf Patienten existieren Informationen bezüglich der Urin-Kupfer-Konzentration. Sie beträgt durchschnittlich  $188,8$  µg im Sammelurin über 24 Stunden. Bei einem Referenzbereich von 2 bis 80 µg/d ist dieser Wert

auf das 2,4fache der oberen Normwertgrenze erhöht. Über die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes ist bekannt, dass er bei vier der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnostik vorhanden war, während seine Existenz bei drei weiteren Patienten ausgeschlossen werden konnte. Sechs der Patienten weisen eine familiäre Vorgeschichte auf. Fünf dieser Patienten haben unter anderem blutsverwandte Eltern.

Drei der elf Patienten zeigen primär das Bild der neurologischen Form der hepatolentikulären Degeneration. Unter ihnen befinden sich zwei Männer und ein Mädchen. Das Mädchen, welches afrikanischer Abstammung ist, entwickelte die ersten Symptome im Alter von 14 Jahren. Nur bei einem der Männer ist die Abstammung bekannt. Er ist kaukasischer Abstammung und war zum Zeitpunkt des ersten Auftretens der Primärsymptomatik 20 Jahre alt. Der andere Mann, dessen Abstammung nicht bekannt ist, wurde im Alter von 19 Jahren das erste Mal klinisch auffällig. Das durchschnittliche Erstmanifestationsalter beträgt bei den Patienten mit neurologischer Symptomatik 17,7 Jahre und liegt somit etwas über dem für alle Patienten berechneten Durchschnittsalter. Alle drei Patienten weisen einen Kayser-Fleischer-Ring auf. Zusätzlich ist bei den drei Patienten bekannt, dass ihre Eltern miteinander blutsverwandt sind. Bei zwei dieser Patienten sind auch Angehörige von der Erkrankung betroffen.

Zwei der Patienten, welche beide männlichen Geschlechts sind, leiden an der primär hepatischen Form des Morbus Wilson. Einer von ihnen ist kaukasischer Abstammung. Er entwickelte die ersten Symptome im Alter von zehn Jahren, der andere, welcher Mulatte ist, wurde im Alter von 15 Jahren klinisch auffällig. Daraus ergibt sich ein durchschnittliches Erstmanifestationsalter unter den beiden Patienten mit primär hepatischer Symptomatik von 14,5 Jahren, was somit etwas unter dem für alle Patienten berechneten Durchschnittsalter der Erstmanifestation liegt. Bei dem kaukasischen Patienten ist die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes bekannt. Zusätzlich besteht die Information, dass seine Eltern miteinander blutsverwandt sind und dass zwei seiner Geschwister ebenfalls betroffen sind. Bei dem anderen Patienten ist ebenfalls eine familiäre Vorgeschichte bekannt. Ein Geschwisterkind ist ebenfalls betroffen. Ein Kayser-Fleischer-Ring wurde bei diesem Patienten nicht gefunden.

Zwei genetisch untersuchte Personen, welche beide männlichen Geschlechts und kaukasischer Abstammung sind, sind bis zum heutigen Tage asymptomatisch. Bei einem von ihnen ist eine Blutsverwandtschaft der Eltern bekannt.

#### **4.2.4 Die E396X-Mutation im Exon 2**

Die E396X-Mutation im Exon 2 wurde bei einem ägyptischen Geschwisterpaar, einem Mann und einer Frau, als homozygote Veränderung im *ATP7B*-Gen diagnostiziert. Beide sind klinisch asymptomatisch und wurden aufgrund der Erkrankung ihres Bruders an Morbus Wilson, über den keine weiteren Informationen vorliegen, genetisch untersucht. Bei beiden ist eine verringerte Couloplasmin-Konzentration im Serum ermittelt worden. Die Werte liegen bei diesen Patienten bei 7,0 und 7,7 g/l, während sie normalerweise bei über 60 g/l liegen müssten. Die Coeruloplasmin-Konzentration ist damit mit einem durchschnittlichen Wert von 7,35 g/l auf das 12,3% des unteren Referenzwertes verringert. Bei beiden Patienten entdeckte man zum Zeitpunkt der Diagnose, an dem die Patienten 14 und 18 Jahre alt waren, einen Kayser-Fleischer-Ring.

#### **4.2.5 Die Q289X-Mutation im Exon 2**

Die Q289X-Mutation im Exon 2 konnte bei zwei Patienten als homozygote Veränderung diagnostiziert werden. Es handelt sich um zwei griechische Patienten, einen Mann und eine Frau, die miteinander verwandt sind und beide unter der primär hepatischen Form des Morbus Wilson leiden. Bei beiden Patienten zeigten sich die ersten Symptome der Erkrankung im Alter von sechs Jahren. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration lag zum Zeitpunkt der Diagnostik durchschnittlich bei 5 mg/dl, was sich, bezogen auf den unteren Referenzwert von 20 mg/dl, als eine Verringerung auf 25% des unteren Normwertes belief. Die einzelnen Serum-Kupfer-Konzentrationen der Patienten zeigten Werte von 44 und 34 µg/dl, welche im Durchschnitt, gemessen an den unteren Referenzwerten 70 und 80 µg/dl, eine Verringerung der Konzentration auf 52,7% der Norm anzeigten. Bei beiden Patienten wurde eine Leberbiopsie durchgeführt. Die histologische Untersuchung zeigte bei einem Patienten eine makrovesikuläre Steatosis mit einem erhöhten Kupfergehalt der Leber, die des anderen zeigte eine portale Fibrose und Lipidinfiltrationen. Die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes wurde bei beiden Patienten ausgeschlossen. Die Eltern beider Patienten, wobei es sich auch um die selben handeln kann, sind miteinander blutsverwandt.

#### **4.2.6 Die R148W-Mutation im Exon 2**

Diese Mutation ist bei einem Jungen aus dem Iran als homozygote Veränderung im *ATP7B*-Gen erkannt worden. Ein genaues Datum der Erstsymptomatik ist bei diesem Patienten nicht bekannt. Allerdings kann sicher gesagt werden, dass der Patient die ersten klinischen Zeichen im

Kindesalter vor der Vollendung seines zwölften Lebensjahres entwickelte. Ein Kayser-Fleischer-Ring war zum Zeitpunkt der Diagnostik nicht vorhanden. Außerdem besteht keine familiäre Vorgeschichte.

#### **4.2.7 Die 845delT-Mutation im Exon 2**

Bei zwei Patienten wurde die 845delT-Mutation im Exon 2 des *ATP7B*-Gens identifiziert. Betroffen sind ein aus dem Iran stammendes Mädchen und ein aus Griechenland stammender Patient, dessen Geschlecht nicht bekannt ist. Über den griechischen Patienten sind keine weiteren Informationen bekannt. Die Patientin aus dem Iran wurde im Kindesalter, vor Vollendung ihres achten Lebensjahres, klinisch auffällig. Über ein genaues Datum der Erstsymptomatik bestehen allerdings keine Angaben. An Laborwerten ist über die Iranerin bekannt, dass sie zum Zeitpunkt der Diagnostik mit einem Wert von 1,1 mg/dl und einem Referenzbereich von 22 bis 40 mg/dl eine Verringerung der Coeruloplasmin-Serumkonzentration auf 5% des unteren Normwertes aufwies. Außerdem war die gemessene Kupferausscheidung im Urin mit einem Wert von 580 µg über 24 Stunden und dem oberen Referenzwert von 65 µg/d um das 8,9fache dieses Wertes erhöht. Sowohl die Existenz eines Kayser-Fleischer-Ring als auch eine familiäre Vorgeschichte wurden bei der Patientin ausgeschlossen.

#### **4.2.8 Die L549P-Mutation im Exon 4**

Die homozygote Mutation L549P auf dem Exon 4 wurde bei einem Jungen ägyptischer Herkunft festgestellt. Er entwickelte im Alter von elf Jahren die ersten Zeichen einer hepatolentikulären Degeneration in Form eines Ikterus. Zum Zeitpunkt der Diagnostik zeigte die Serum-Coeruloplasmin-Konzentration von 7,7 g/l und einem Referenzbereich von >60 g/l eine Konzentrationsverringering auf 12,8% des unteren Normwertes an. Die Leberbeteiligung steht bei seinem Krankheitsbild im Vordergrund, obwohl auch Dysarthrien und Rigidität beobachtet wurden. Eine positive familiäre Vorgeschichte ist bekannt. Über diese sind allerdings keine näheren Angaben vorhanden. Bei einer Leberbiopsie zeigt sich das Bild einer chronischen Hepatitis mit hervorgehobener Aktivität und einer beginnenden Zirrhose.

#### **4.2.9 Die D642H-Mutation im Exon 6**

Die D642H-Mutation im Exon 6 wurde bei zwei Patienten aus dem Iran als homozygote Veränderung identifiziert. Es handelt sich um einen Mann und eine Frau, deren



Primärsymptomatik nicht bekannt ist. Die Coeruloplasmin-Konzentration im Serum der Patienten lag zum Zeitpunkt der Diagnostik durchschnittlich bei 3,45 mg/dl, was bei einem Referenzbereich von 22 bis 40 mg/dl eine Konzentrationsverringering auf 15,7% des unteren Normwertes anzeigt. Die Bestimmung der Kupferausscheidung im Urin über 24 Stunden ergab im Durchschnitt einen Wert von 645 µg und zeigt eine Konzentrationssteigerung um das 9,9fache der oberen Normwertgrenze, welche bei 65 µg/d angesetzt ist. Nur bei der Patientin ist die Kupfer-Serum-Konzentration bekannt, die zum Zeitpunkt der Diagnostik mit einem Wert von 33µg/dl und einem unteren Referenzwert von 78 µg/dl auf 42,3% dieses Wertes verringert war. Außer den beschriebenen Laborparameter ist über die Patienten bekannt, dass beide einen Kayser-Fleischer-Ring aufweisen. Bei dem männlichen Patienten ist zusätzlich eine familiäre Vorgeschichte bekannt, welche nicht näher erläutert ist.

### **4.2.10 Die Q680X Mutation im Exon 7**

Diese Mutation wurde als homozygote Veränderung bei einem männlichen Patienten aus dem Iran identifiziert. Die hepatolentikuläre Degeneration wurde bei ihm bereits im Kindesalter vor Vollendung des achten Lebensjahres diagnostiziert. Über einen genauen Zeitpunkt der Erstsymptomatik sind keine Informationen bekannt. Zum Zeitpunkt der Diagnostik belief sich die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration auf einen Wert von 4 mg/dl. Bei einem Referenzbereich zwischen 22 und 40 mg/dl zeigt sich gemessen an der unteren Normwertgrenze eine Verringerung auf 18,2% dieses Wertes. Der Kupfer-Gehalt im Urin über 24 Stunden war mit einer Konzentration von 571 µg und einem Referenzbereich von 10 bis 65 µg/d um das 8,8fache erhöht. Bei dem Patienten ist sowohl eine familiäre Vorgeschichte in Bezug auf eine Erkrankung an Morbus Wilson als auch die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes bekannt.

### **4.2.11 Die 2296dupA-Mutation im Exon 8**

Bei weiteren vier Patienten entdeckte man eine homozygote Veränderung des *ATP7B*-Gen im Exon 8, die 2296dupA-Mutation. Die vier Patienten, drei Frauen und ein Mann, stammen alle aus Brasilien, sind kaukasischer Abstammung und gehören zu einer Großfamilie. Alle erkrankten Personen haben Eltern, die ebenfalls miteinander blutsverwandt sind. Eine Patientin unter ihnen entwickelte im Alter von 24 Jahren die ersten klinischen Symptome, die auf eine Erkrankung an Morbus Wilson hindeuteten. Bei ihr wurde die primär hepatische Form der hepatolentikulären Degeneration diagnostiziert. Die anderen drei Familienmitglieder waren zum Zeitpunkt der genetischen Untersuchung im Alter von sechs, sieben und zwölf Jahren klinisch unauffällig. Alle

vier Patienten hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erniedrigte Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen und erniedrigte Konzentrationen der totalen Serum-Kupfer-Konzentration. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration lag im Durchschnitt bei 3,86 mg/dl. Es ergibt sich hieraus bei einem Referenzbereich von 26 bis 58 mg/dl eine Konzentrationsverringering auf 14,9% des unteren Normwertes. Die Serum-Kupfer-Konzentration lag im Durchschnitt bei 22,25  $\mu$ l/l und ist bei einem Normwertbereich zwischen 70 und 140 $\mu$ l/l auf 31,8% des unteren Normwertes verringert. Bei zwei der Patienten bestanden Informationen über die Kupferausscheidung im Urin. Durchschnittlich ergibt sich ein Wert von 115  $\mu$ g/d bei einem Referenzbereich von 2 bis 80  $\mu$ g/d. Es ergibt sich im Mittelwert der Konzentrationserhöhungen eine 1,9 fache Erhöhung der Konzentration gegenüber der eines Gesunden. Die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes wurde nur bei einer Patientin zum Zeitpunkt der Diagnostik gefunden. Es handelt sich um die Patienten, die als einzige das Bild einer hepatischen Primärsymptomatik bietet. Anhand einer Leberbiopsie konnte bei drei Patienten eine chronisch aktive Hepatitis erkannt werden. Zwei von ihnen konnten zusätzlich noduläre Transformationen nachgewiesen werden. Wiederum zwei von ihnen zeigten das Bild einer makro- und mikrovesikulären Steatosis. Bei zwei Patienten ist der Kupfergehalt der Leber bekannt, welcher durchschnittlich nach Umrechnung der einzelnen Werte von konventionellen in SI-Einheiten bei 21,63  $\mu$ mol/g TG liegt und somit um das 24,9fache des oberen Normwertes von 0,87  $\mu$ mol/g TG erhöht ist. Die Rhodaninfärbung des gewonnenen Lebergewebes ist bei einem der Patienten bekannt und positiv ausgefallen.

### **4.2.12 Die R778G-Mutation im Exon 8**

Die R778G-Mutation auf dem Exon 8 wurde als homozygote Veränderung bei zwei polnischen Patienten beobachtet. Es handelt sich um einen Mann und eine Frau. Da sie den gleichen Nachnamen tragen, ist anzunehmen, dass sie miteinander verwandt sind. Nur über den Mann sind Informationen vorhanden. Er entwickelte mit 20 Jahren eine klinische Symptomatik. Im Vordergrund der Erkrankung steht bei ihm die neurologische Form der hepatolentikulären Degeneration. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration lag bei diesem Patienten zum Zeitpunkt der Diagnostik bei 0,8 mg/dl und war somit bei einem Referenzbereich von 9,2 bis 16,0 mg/dl auf 8,7% des unteren Normwertes verringert. Die Serum-Kupfer-Konzentration war ebenfalls niedriger als die eines gesunden Patienten. Mit einem Wert von 7  $\mu$ g/dl war die Konzentration auf 10 % der unteren Normwertgrenze von 70  $\mu$ g/dl verringert. Die Bestimmung des ausgeschiedenen Kupfers im Urin über 24 Stunden zeigte eine Konzentration von 460  $\mu$ g, was bei einem Referenzbereich maximal 50  $\mu$ g/d eine 9,2fache Konzentrationssteigerung ergab.

#### **4.2.13 Die D765N-Mutation im Exon 8**

Diese Mutation ist als homozygote Veränderung bei einer brasilianischen Mulattin bekannt. Sie entwickelte die ersten Symptome im Alter von 25 Jahren. Bei ihr besteht eine neurologische Primärsymptomatik, was sich vor allem durch Dysarthrie, Haltungs- und Aktionstremor, Dystonie und Verhaltensstörungen, insbesondere neurotische Störungen, äußert. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration war zum Zeitpunkt der Diagnostik mit einem Wert von 3 mg/dl bei einem Referenzbereich von 26 bis 58 mg/dl auf 11,5% bezogen auf die untere Normwertgrenze verringert. Die Serum-Kupfer-Konzentration entsprach zum Zeitpunkt der Diagnostik mit einem Wert von 12 µg/l bei einem Referenzbereich von 70 bis 140 ebenfalls nicht der bei einem gesunden Menschen erwarteten Konzentration. Die Konzentration ist gemessen an der unteren Normwertgrenze auf 17,1% verringert. Die Kupferkonzentration im Urin über 24 Stunden zeigte mit einem Wert von 80 µg bei einem Referenzbereich von 2 bis 80 µg/d keine pathologische Veränderung an. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war ein Kayser-Fleischer-Ring vorhanden. Über die familiäre Vorgeschichte der Patientin ist bekannt, dass ihre Eltern blutsverwandt sind und dass eines ihrer Geschwister ebenfalls betroffen ist.

#### **4.2.14 Die I857T-Mutation im Exon 10**

Bei einem aus dem Iran stammenden Jungen wurde diese Mutation als homozygote Veränderung der DNA diagnostiziert. Über ihn ist bekannt, dass er vor Vollendung seines neunten Lebensjahr eine klinische Symptomatik entwickelte und dass er das klinische Bild eines Kayser-Fleischer-Ringes aufweist. Zum Zeitpunkt der Diagnostik zeigte sich eine Serum-Coeruloplasmin-Konzentration von 4 mg/dl, welche nur 18,2% des unteren Normwertes von 22 mg/dl ausmacht. Die Serum-Kupfer-Konzentration lag zum Zeitpunkt der Diagnostik bei 51 µg/dl, welche bei einem Referenzbereich von 78 bis 131 µg/d eine Verringerung auf 65,4% des unteren Normwertes ausmacht. Außerdem sah man eine 12,9fache erhöhte Konzentration des Kupfers im Sammeleurin über 24 Stunden, welche sich durch die Konzentration von 840 µg gemessen an der oberen Referenzwertgrenze von 65µg/d darstellte. Außer den Laborparametern ist bekannt, dass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein Kayser-Fleischer-Ring vorhanden war. Eine familiäre Vorgeschichte konnte bei dem beschriebenen Patienten ausgeschlossen werden.

#### **4.2.15 Die S932X-Mutation im Exon 12**

Diese Mutation wurde bei einem brasilianischen Patienten als homozygote Veränderung im *ATP7B*-Gen identifiziert. Über den Patienten ist bekannt, dass er männlichen Geschlechts und

kaukasischer Abstammung ist und im Alter von 24 Jahren die ersten klinischen Symptome entwickelte. Im Vordergrund seiner Erkrankung steht die hepatische Manifestation des Morbus Wilson. Zum Zeitpunkt der Diagnostik zeigte die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration mit einem Wert von 3 mg/dl und einem Referenzbereich von 26 bis 58 mg/dl eine Verringerung auf 11,5% des unteren Normwertes an. Die Serum-Kupfer-Konzentration ergab mit einem Wert von 29 µl/l und einem Referenzbereich von 70 bis 140 µl/l eine Verringerung auf 41,4% der unteren Normwertkonzentration. Die Kupferkonzentration im Urin lag zum Zeitpunkt der Diagnostik mit einem Wert von 40 µg/d und einem Referenzbereich von 2 bis 80 µg/d im Normbereich. Zum Zeitpunkt der Diagnostik wurde bei ihm ein Kayser-Fleischer-Ring identifiziert. Es ist außerdem bekannt, dass eine Blutsverwandtschaft der Eltern besteht.

### **4.2.16 Die L936X- Mutation im Exon 12**

Ein Junge aus dem Iran weist diese Mutation als homozygoten Defekt im *ATP7B*-Gen auf. Die Diagnose der hepatolentikulären Degeneration wurde bereits im Kindesalter vor Abschluss des 14. Lebensjahres diagnostiziert. Bei ihm ist eine familiäre Vorgeschichte bekannt. Außerdem wurde bei einer Leberbiopsie eine Kupferpigmentierung entdeckt.

### **4.2.17 Die P992L- Mutation im Exon 13**

Eine homozygote Veränderung in Form der P992L-Mutation im Exon 13 ist bei vier Patienten bekannt. Alle vier Patienten stammen aus China. Klinische Daten sind nur von einem Patienten vorhanden. Dieser war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung klinisch asymptomatisch und wurde nur aufgrund des Todes seines Bruders untersucht, welcher an fulminanten Lebersagen verstarb. Die Kupferausscheidung im Urin über 24 Stunden war mit einem Wert von 7,03 µmol/d, welcher sich durch Umrechnung aus der konventionellen Einheit ergab, gemessen am oberen Referenzwertbereich der Charité von 0,94 µmol/d um das 7,5fache dieses Wertes erhöht.

### **4.2.18 Die T977M- Mutation im Exon 13**

Vier Patienten der als homozygote Träger einer Mutation im *ATP7B*-Gen identifizierten Personen tragen die Mutation T977M auf dem Exon 13. Zwei von ihnen stammen aus Polen, die anderen beiden stammen aus Ägypten. Über die ägyptischen Patienten liegen leider keine klinischen Informationen vor. Da die Patienten den gleichen Nachnamen haben, ist anzunehmen, dass es sich hierbei wie bei den polnischen Patientinnen um eine Geschwisterpaar handelt. Bei den aus Polen stammenden Patienten handelt es sich um zwei Frauen, die beide unter der primär

hepatischen Form der hepatolentikulären Degeneration leiden. Die eine Patientin wurde im Alter von acht Jahren, die andere Patientin im Alter von elf Jahren symptomatisch, was zu einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 9,5 Jahren führt. Die durchschnittliche Coeruloplasmin-Serum-Konzentration betrug zum Zeitpunkt der Diagnostik 1,6 mg/dl, was bei einem Referenzbereich von 9,2 bis 16 mg/dl eine Verringerung auf 17,4% des unteren Normwert anzeigt. Die Serum-Kupfer-Konzentration ergab zum Zeitpunkt der Diagnostik mit einer Konzentration von durchschnittlich 55 µg/dl bei einem Referenzbereich von 70 bis 140 µg/dl eine Verringerung der Konzentration auf 78,6% des unteren Normwertes. Die Kupferausscheidung im Urin wurde bei beiden polnischen Patientinnen ebenfalls bestimmt. Durchschnittlich ergab sich ein Wert von 248 µg/d, was bei dem oberen Grenzwert von 50 µg/d eine fünffache Erhöhung anzeigt.

### **4.2.19 Die A1003T-Mutation im Exon 13**

Die A1003T-Mutation im Exon 13 ist bei zwei serbischen Patienten kaukasischer Abstammung entdeckt worden. Nur von einer Patientin sind klinische Daten vorhanden. Bei ihr wurde die primär hepatische Form des Morbus Wilson diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag die Serum-Coeruloplasmin-Konzentration mit einem Wert von 0,35g/l und einem Referenzbereich von 0,2 bis 0,6 g/l im Normbereich. Die Serum-Kupfer-Konzentration zeigte zu diesem Zeitpunkt mit einem Wert von 7,7 µmol/l und einem Referenzbereich von 10,6 bis 21,6 µmol/l eine Konzentrationsverringerng auf 56,6% der unteren Normwertgrenze. Die Bestimmung der Kupferausscheidung im Urin über 24 Stunden erreichte den Wert 4,24 mmol, welcher sich durch Umrechnung aus der konventionellen Einheit errechnete. Gemessen am oberen Referenzwert der Charité von <0,94 mmol/d war er 1,1fach erhöht. Ein Kayser-Fleischer-Ring war zur Zeit der Diagnostik präsent. Die Patientin hat vier Geschwister, von denen drei ebenfalls an Morbus Wilson erkrankt sind. Eine Schwester leidet an der neurologische Form des Morbus Wilson, die andere verstarb 1985 an den Folgen einer fulminanter Hepatitis. Der Bruder verstarb an den Folgen einer Leberzirrhose. Die genetischen Veränderungen der Geschwisterkinder sind nicht bekannt.

### **4.2.20 Die G1061E-Mutation im Exon 14**

Dieser genetische Defekt ist bei einem in Deutschland lebenden Patienten erhoben worden. Im Alter von 10,5 Jahren wurde der Junge klinisch durch Transaminasenerhöhung und eine Leberzirrhose auffällig. Das klinische Bild des Kindes ist zum einen durch eine hepatische und

zum anderen durch eine psychiatrische Primärsymptomatik geprägt. Die psychiatrische Ausprägung äußerte sich in diesem Fall durch Lernbehinderung und Verhaltensstörungen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration im Serum verringert und die Urin-Kupfer-Konzentration erhöht, ohne dass nähere Angaben über diese Parameter bekannt sind. Histologisch war sowohl das Bild einer Zirrhose zu erkennen als auch ein Kupfergehalt von 11,37  $\mu\text{mol/g}$ , welcher sich durch die Umrechnung aus der konventionellen Einheit nach dem oben genannten Verfahren errechnete, zu ermitteln. Dieser Wert zeigt bei einem Referenzbereich von 0,24 bis 0,87  $\mu\text{mol/g}$  Trockengewicht eine 13,1 fache Erhöhung des oberen Normwertes an. Ein Kayser-Fleischer-Ring war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vorhanden.

### **4.2.21 Die H1126P-Mutation im Exon 15**

Auf dem Exon 15 des *ATP7B*-Gens fand man bei vier Patienten homozygot die H1126P-Mutation. Die vier Patienten, unter denen sich nur ein Mann befindet, stammen aus Ägypten. Es handelt sich um zwei Geschwisterpaare, die zusätzlich miteinander verwandt sind. Alle vier Patienten leiden unter der hepatischen Form der hepatolentikulären Degeneration. Drei der vier Patienten wurden zwischen dem neunten und zwölften Lebensjahr mit einem durchschnittlichen Alter von zehn Jahren klinisch auffällig. Die vierte Patientin hatte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Alter von elf Jahren keine Beschwerden. Trotzdem wurde bei ihr, wie auch bei ihrem Bruder und ihren beiden Cousins, die hepatolentikuläre Degeneration mit einer hauptsächlich hepatischen Manifestation diagnostiziert. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, welche von allen vier Patienten bekannt ist, liegt durchschnittliche bei 12,15 g/l. Jeweils zwei Werte wurden an zwei unterschiedlichen Referenzbereichen von 17 bis 65 g/l und 15,5 bis 60 g/l gemessen. Der Mittelwert der Konzentrationsverringeringen ergibt eine Konzentrationsverringering auf 73,1% der bei einem Gesunden zu erwartenden Coeruloplasmin-Serum-Konzentration. Die Urin-Kupfer-Konzentration ist von drei Patienten bekannt. Durchschnittlich ergibt sich ein Wert von 332,67  $\mu\text{g/l}$ , was wiederum, gemessen an zwei unterschiedlichen Referenzbereichen von <50 und <70  $\mu\text{g/l}$ , durchschnittlich eine 6,6fache Erhöhung ausmacht. Außer den Laborwerten ist über die Patienten bekannt, dass eine weitere Schwester des einen Geschwisterpaares im Alter von 18 Jahren verstarb. Bei drei der Patienten konnte ein Kayser-Fleischer-Ring diagnostiziert werden, während bei dem vierten Patienten keiner zu finden war. Bei zwei Patienten wurde eine Leberhistologie durchgeführt. Die histologische Untersuchung der einen Patientin beschreibt eine moderate chronische Hepatitis

mit frühen nodulären Formationen; die des anderen Patienten zeigt das Bild einer chronischen Hepatitis mit moderater Aktivität und einer frühen Zirrhose. Die Orcein-Färbung der Leberbiopsate ist bei beiden Patienten negativ ausgefallen.

### **4.2.22 Die G1089E-Mutation im Exon 15**

Diese Mutation wurde als homozygote Veränderung der DNA bei einem Jungen aus dem Iran identifiziert. Die Diagnose der hepatolentikulären Degeneration wurde bereits vor Vollendung seines neunten Lebensjahres gestellt. Zum Zeitpunkt der Diagnostik zeigte die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration mit einem Wert von 1,2 mg/dl und einem Referenzbereich von 22 bis 40 mg/dl eine Verringerung auf 5,5% des unteren Normwertes an. Die Serum-Kupfer-Konzentration zeigte mit einem Wert von 25 µg/dl und einem Referenzbereich von 78 bis 131 µg/dl eine Verringerung auf 32,1% gemessen an der unteren Normwertkonzentration an. Die Bestimmung der Kupferausscheidung im Urin ergab mit einem Wert von 185 µg/d bei einem Referenzbereich von 10 bis 65 µg/d eine 2,8fache Erhöhung der oberen Normwertkonzentration an. Zum Zeitpunkt der Diagnostik war die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes bekannt. Eine familiäre Vorgeschichte besteht bei diesem Patienten nicht.

### **4.2.23 Die F1094L-Mutation im Exon 15**

Diese Mutation konnte bei einem brasilianischen Mulatten als homozygoter Defekt identifiziert werden. Der Patient entwickelte mit 25 Jahren die ersten Symptome. Er leidet primär an der neurologischen Form des Morbus Wilson. Diese äußert sich vor allem durch Dysarthrie, Dystonie, Parkinsonismus, Dysphagie, Krampfanfälle und Demenz. Trotz der primär neurologischen Manifestation der Erkrankung, wurde bei ihm ein Ikterus beobachtet. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration mit einem Wert von 12mg/dl bei einem Referenzbereich von 22 bis 40 mg/dl verringert. Daraus ergibt sich eine Verringerung der Konzentration auf 46,2% des unteren Normwertes. Die Serum-Kupfer-Konzentration zeigte mit einem Wert von 40 µg/dl bei einem Referenzbereich von 78 bis 131 µg/dl eine Verringerung auf 57,1% der unteren Normwertkonzentration an. Die Kupferausscheidung im Urin über 24 Stunden zeigte mit einem Wert von 348 µg gemessen an der oberen Normwertgrenze von 80 µg/d eine 4,4fache Erhöhung an. Ein Kayser-Fleischer-Ring wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beschrieben. Informationen bezüglich einer familiären Vorgeschichte ergaben zum einen, dass seine Eltern miteinander verwandt sind und

zum anderen, dass außer ihm drei seiner Cousins an der hepatolentikulären Degeneration erkrankt sind.

#### **4.2.24 Die Q1124X-Mutation im Exon 16**

Die Q1124 X-Mutation des Exon 16 wurde als homozygote Veränderung bei zwei Jungen aus dem Iran diagnostiziert. Bei beiden steht die hepatische Beteiligung der hepatolentikulären Degeneration im Vordergrund. Die klinische Symptomatik zeigte sich durchschnittlich im Kindesalter vor Vollendung des zehnten Lebensjahres. Die durchschnittliche Coeruloplasmin-Serum-Konzentration zum Zeitpunkt der Diagnostik lag bei 4,35 mg/dl, was bei einem Referenzbereich von 22 bis 40 mg/dl eine Verringerung auf 19,8% des unteren Normwertes angibt. Die Bestimmung der durchschnittlichen Konzentration des ausgeschiedenen Kupfers im Urin über 24 Stunden ergab einen Wert von 231 µg, was bei einem oberen Referenzwert von 65 µg/d eine 3,6fache Erhöhung der Konzentration aufzeigt. Bei beiden Patienten ist die Präsenz eines Kayser-Flaischer-Rings bekannt. Eine familiäre Vorgeschichte bezüglich der hepatolentikulären Degeneration oder neurologische oder hepatische Erkrankungen unklarer Genese bei Angehörigen sind bei beiden Patienten nicht bekannt.

#### **4.2.25 Die I1148T-Mutation im Exon 16**

Diese homozygote Veränderung wurde bei einem in Deutschland lebenden Mädchen erkannt. Anhand ihres Namens zu urteilen ist sie nicht deutscher Abstammung. Im Alter von 10,5 Jahren entwickelte sie einen Ikterus. Bei ihr wurde der Morbus Wilson mit hepatischer Primärsymptomatik diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Diagnostik lag die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration bei 13mg/dl und zeigte somit gemessen am unteren Referenzwert der Charité von 25 mg/dl eine Konzentrationserniedrigung auf 52,4% an. Die Kupferkonzentration im Serum lag bei 7 µmol/l, was bei einem unteren Referenzwert der Charité von 13 µmol/l eine Verringerung auf 57,7% dieses Wertes anzeigt. Eine Leberbiopsie zeigte eine Fettleber und eine Zirrhose zweiten bis dritten Grades. Der Kupfergehalt der Leber war mit einem Wert von 12,97 µmol/g TG, welcher sich durch die Umrechnung aus der konventionellen Einheit mittels des oben genannten Verfahrens ergab, um das 14,9fache des oberen Referenzwertes von 0,87 µmol/l erhöht. Einen Kayser-Fleischer-Ring hatte sie zum Zeitpunkt der Diagnostik nicht.



#### **4.2.26 Die 3472-3482del11-Mutation im Exon 16**

Bei einem polnischen Patienten, von welchem sowohl das Geschlecht als auch die Primärsymptomatik nicht bekannt sind, wurde diese Mutation als homozygote Veränderung im *ATP7B*-Gen entdeckt. Zum Zeitpunkt der Diagnostik, welcher ebenfalls nicht bekannt ist, zeigte die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration von 2 mg/dl bei einem Referenzbereich von 9,2 bis 16 mg/dl eine Verminderung dieses Wertes auf 21,7% der unteren Normwertkonzentration an. Die Serum-Kupfer-Konzentration von 31 µg/dl ergab eine Verminderung auf 44,3% des unteren Referenzwertes bei einem Referenzbereich von 70 bis 140 µg/dl. Die Kupfer-Konzentration im Urin über 24 Stunden war mit einem Wert von 320 µg um das 6,4fache des oberen Normwertes eines Referenzbereiches von 0 bis 50 µg/d erhöht.

#### **4.2.27 Die 3697delC-Mutation im Exon 17**

Diese homozygote DNA-Veränderung wurde bei einem Jungen aus dem Iran festgestellt. Über ihn ist bekannt, dass er im Kindesalter vor Vollendung des 10. Lebensjahres klinisch symptomatisch wurde. Zum Zeitpunkt der ersten Symptome, der nicht genau bekannt ist, war die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration mit einem Wert von 1,6 mg/dl bei einem Referenzbereich von 22 bis 40 mg/dl auf 7,3% der unteren Normwertgrenze verringert. Die Serum-Kupfer-Konzentration war mit einem Wert von 18µg/dl und einem Referenzbereich von 78 bis 131 µg/dl auf 23,1% des unteren Normwertes verringert. Eine Leberbiopsie wurde durchgeführt und zeigte histologisch das Bild einer Zirrhose. Sowohl eine familiäre Vorgeschichte als auch die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes sind bekannt.

#### **4.2.28 Die 3649-3654del6-Mutation im Exon 17**

Als homozygoter Defekt wurde diese Mutation bei einem Patienten aus dem Iran identifiziert. Es handelt sich um einen Jungen, der im Kindesalter vor Vollendung seines dritten Lebensjahres bereits symptomatisch wurde. Ein genauer Zeitpunkt über das Auftreten der ersten Symptome ist nicht bekannt. Zum Zeitpunkt der Diagnostik war die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration mit einem Wert von 4,5 mg/dl bei einem Referenzbereich von 22 bis 40 mg/dl auf 20,5% des unteren Normwertes verringert. Die Serum-Kupfer-Konzentration war ebenfalls verringert. Mit einem Wert von 64 µg/dl und einem Referenzbereich von 78 bis 131µg/dl zeigt die Konzentration eine Verminderung auf 82,1% des unteren Normwertes an. Die Kupferkonzentration im Urin war zum Zeitpunkt der Diagnostik auf das 5,6fache des oberen Normwertes erhöht. Normalerweise beträgt der Urin-Kupfergehalt eines gesunden Menschen in 24 Stunden 10 bis 65 µg/dl. Bei

diesem Patienten wurde ein Wert von 364 µg/dl erhoben. Die Untersuchung des Lebergewebes in Folge einer Biopsie ergab einen zehnfach erhöhten Kupferwert. Sowohl eine familiäre Vorgeschichte als auch ein Kayser-Fleischer-Ring existiert nicht.

### **4.2.29 Die N1270S-Mutation im Exon 18**

Vier untersuchte Personen sind homozygote Träger der N1270S-Mutation im Exon 18. Zwei dieser Patienten, welche Frauen sind und von denen angenommen werden kann, dass es sich um Geschwister handelt, stammen aus dem Iran. Die jüngere der beiden Patientinnen erkrankte vor Vollendung des 12. Lebensjahres, während die andere vor Vollendung des 19. Lebensjahres erkrankte, was durchschnittlich zu einem Erstmanifestationsalter vor Vollendung des fünfzehnten Lebensjahres führt. Genauere Daten zum Zeitpunkt der Erstsymptomatik sind nicht bekannt. Zum Zeitpunkt der Diagnostik wurde bei beiden Patientinnen die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration sowie die Kupfer-Ausscheidung im Urin über 24 Stunden bestimmt. Die Serum-Kupfer-Konzentration wurde nur bei einem Patienten ermittelt. Durchschnittlich lag die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration bei 5,5 mg/dl, was bei einem unteren Normwert von 22 mg/dl eine Verringerung auf 25% bezüglich dieses Wertes ausmacht. Die Urin-Kupfer-Konzentration belief sich durchschnittlich auf 646 µg/d. Bei dem oberen Referenzwertbereich von 65 µg/d zeigte sich hiermit eine Erhöhung auf das 9,9fache dieses Wertes. Die Serum-Kupfer-Konzentration der einen Patientin lag zum Zeitpunkt der Diagnostik bei 36 µg/dl, was bei einem Referenzbereich von 78 bis 131 µg/dl eine Verminderung auf 46,2% des unteren Normwertes darstellt. Außer den genannten Laborwerten ist bekannt, dass beide Patientinnen einen Kayser-Fleischer-Ring aufweisen. Die anderen zwei Patientinnen, welche in Deutschland diagnostiziert wurden, stammen spekulativ, anhand ihrer Namen zu urteilen, nicht aus dem mitteleuropäischen Raum. Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Geschwisterpaar, von dem keine weiteren klinischen Daten vorhanden sind.

### **4.2.30 Die IVS18-2A>G-Mutation im Exon 18**

Als homozygoten Träger dieser Mutation erkannte man einen ägyptischen Jungen. Er wurde im Alter von 12 Jahren durch die Entwicklung eines Ikterus klinisch auffällig. Die hepatische Manifestation steht bei seinem Erkrankungsbild im Vordergrund, obwohl auch neurologische Symptome, wie Dysarthrie und Konzentrationsstörungen, beobachtet wurden. Eine familiäre Vorgeschichte besteht nicht. Die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes ist bekannt.

#### **4.2.31 Die L1299R-Mutation im Exon 18**

Bei einem aus dem Iran stammenden männlichen Patienten entdeckte man diese Mutation als homozygote Veränderung der DNA. Die Diagnose des Morbus Wilson wurde bereits im Kindesalter vor Vollendung des neunten Lebensjahres gestellt. Ein genaues Datum zum Zeitpunkt der Primärsymptomatik ist nicht bekannt. Zum Zeitpunkt der Diagnostik zeigte die Coeruloplasmin-Konzentration im Serum mit einem Wert von 1 mg/dl bei einem Referenzwert von 22 bis 40 mg/dl eine Verringerung auf 4,5% der unteren Normwertkonzentration an. Die Serum-Kupfer-Konzentration war mit einem Wert von 43 µg/dl bei einem Referenzbereich von 78 bis 131 µg/dl des unteren Normwertbereichs ebenfalls verringert. Ausgehend von dem unteren Normwert ergibt sich hieraus eine Verringerung der Konzentration auf 55,1%. Die Kupferausscheidung im Urin über 24 Stunden war mit 70 µg bei einem Referenzbereich von 10 bis 65µg/d gemessen am oberen Referenzwert nur 1,1fach erhöht. Sowohl eine positive Familienanamnese, die nicht genauer bekannt ist, als auch die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes zum Zeitpunkt der Diagnostik sind bekannt.

#### **4.2.32 Die 3713-14del2-Mutation im Exon 18**

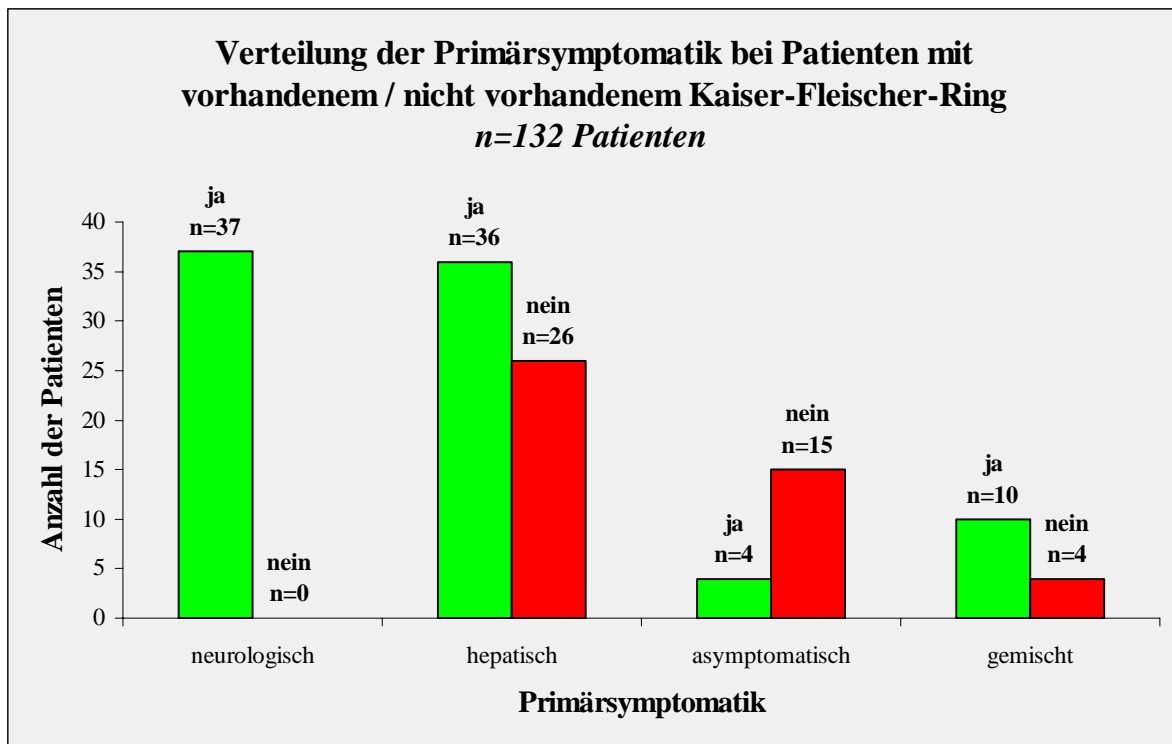
Bei einem brasilianischen Mann wurde diese Mutation als homozygote Veränderung erkannt. Über ihn ist bekannt, dass die Primärsymptomatik seiner Erkrankung neurologisch ist und dass die Erkrankung im Alter von 25 Jahren diagnostiziert wurde. Ein genauer Zeitpunkt der Primärsymptomatik ist nicht bekannt. Zum Zeitpunkt der Diagnose war die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration mit einem Wert von 2 mg/dl und einem Referenzbereich von 26 bis 58 mg/dl auf 7,7% des unteren Normwertbereichs verringert. Die Kupfer-Serum-Konzentration entsprach ebenfalls nicht der eines gesunden Patienten. Sie war mit einem Wert von 37 µg/dl bei einem Referenzbereich zwischen 70 und 140 µg/dl auf 52,9% der unteren Normwertgrenze verringert. Die Kupferausscheidung im Urin zeigte mit einem Wert von 126 µg bei einem Referenzbereich von 2 bis 80 µg/d eine Erhöhung der Konzentration auf das 1,6fache des oberen Normwertes an.

#### **4.2.33 Die G1341R-Mutation im Exon 20**

Bei einem ägyptischen Geschwisterpaar wurde die G1341R-Mutation als homozygote Veränderung im Exon 20 identifiziert. Bei beiden Patienten, einem Jungen und einem Mädchen, wurde eine primär hepatische Manifestation des Morbus Wilson diagnostiziert. Sie entwickelten im Kindesalter durchschnittlich vor Vollendung des zehnten Lebensjahres eine klinische

Symptomatik. Zum Zeitpunkt der Diagnostik zeigten beide Patienten mit Werten von 7,7 und 8 mg/dl bei einem Referenzbereich von 15 bis 60 mg/dl eine verminderte Coeruloplasmin-Konzentration im Serum. Bei einem durchschnittlichen Wert von 7,85 mg/dl ergibt sich daraus eine Verringerung auf 52,3% des unteren Normwertes. Die Messung des Kupfers im Urin des Jungen über 24 Stunden erreichte eine Konzentration von 3200 µg, was bei einem Referenzbereich von 15-50 µg/24h eine 64fache Erhöhung des oberen Grenzwertes angibt. Zusätzlich zu den genannten Laborwerten wurde bei dem Jungen ein Kayser-Fleischer-Ring entdeckt. Das Geschwisterpaar hat zwei Cousins, die unter unidentifizierten Lebererkrankungen leiden. Über das Mädchen ist weiter bekannt, dass bei ihr eine Leberbiopsie durchgeführt wurde. Gesehen wurden septale fibrotische Bänder, Zellen mit veränderten Sinusoiden, makro- und mikroversikulären Veränderungen der Hepatozyten und minimale zytoplasmatische Granulationen, welche sich mit der Orcein-Färbung anfärben ließen.

### 4.3 Kayser-Fleischer-Ring und die Primärsymptomatik



*Abbildung 20: Die Abbildung bietet einen Überblick über die Verteilung der Primärsymptomatik bei Patienten von denen die Existenz bzw. das Nichtvorhandensein eines Kayser-Fleischer-Ringes bekannt ist.*

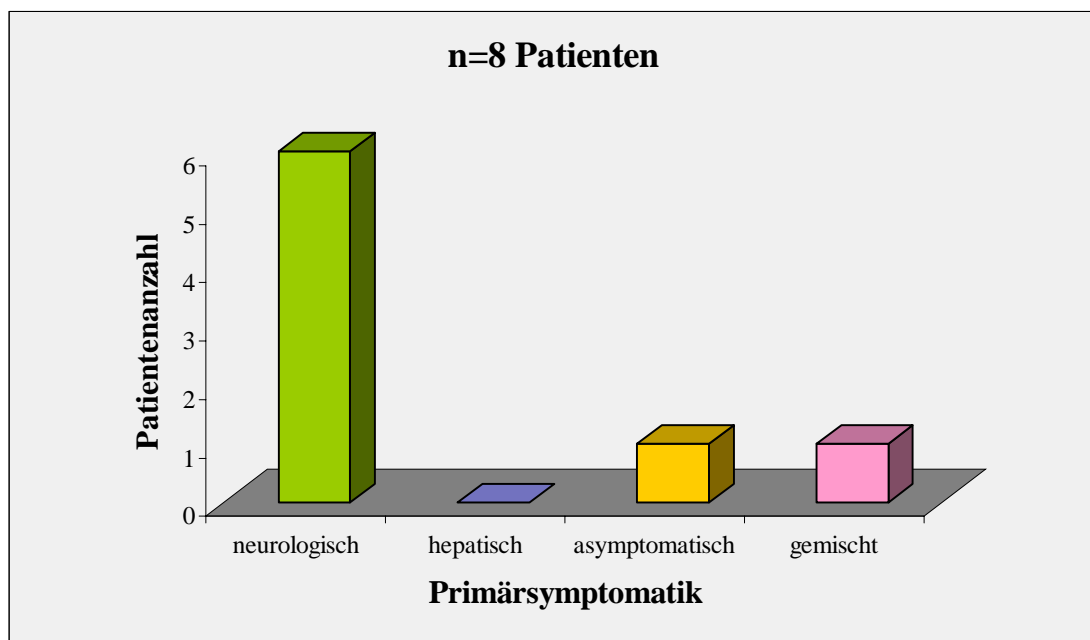
Von 169 Patienten existieren Daten bezüglich der Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes. Bei 109 Patienten wurde ein Kayser-Fleischer-Ring diagnostiziert, während bei den anderen 60 Patienten keiner gefunden wurde. Unter den 109 Patienten, denen ein Kayser-Fleischer-Ring nachgewiesen wurde, ist von 87 Patienten die Primärsymptomatik bekannt. Vier dieser Patienten sind asymptomatisch, 36 leiden an der primär hepatischen Form der hepatolentikulären Degeneration und weitere 37 Patienten weisen klinisch eine primär neurologische Manifestation auf. Zehn Patienten zeigen klinisch sowohl das Bild einer hepatischen als auch einer neurologischen Symptomatik. Von 45 der 60 Patienten, bei welchen kein Kayser-Fleischer-Ring gefunden wurde, existieren Informationen bezüglich der Primärsymptomatik des Morbus Wilson. Insgesamt 15 dieser Patienten sind asymptomatisch. Eine primär hepatische Manifestation der hepatolentikulären Degeneration weisen 26 Patienten auf, während die verbleibenden vier Patienten eine gemischte, also sowohl eine hepatische als auch eine neurologische, Symptomatik aufweisen. Eine rein neurologische Primärsymptomatik wurde unter diesen Patienten nicht beobachtet.

## 4.4 HFE-Genotyp und die Primärsymptomatik

Die Hereditäre Hämochromatose ist in Deutschland mit einer Prävalenz homozygoter Erbträger von 1:205 bis 1:420 die am häufigsten auftretende Erbkrankheit [85]. Es handelt sich hierbei um eine Störung der intestinalen Eisenresorption, welche zu einer Eisenablagerung in verschiedenen Organen führt. Besonders betroffen sind hierbei die Parenchymzellen von Leber, Pankreas, Hypophyse, Gonaden, Herz und Gelenken. Funktionsbeeinträchtigungen und toxische Zellschädigungen sind die Folge dieser Überlagerung [86]. Als krankheitsverursachend gelten neben anderen Loci im Chromosom 6 die Mutationen C282Y und H63D im *HFE*-Gen [87].

Bei 348 Patienten, die im Rahmen der Diagnostik des Morbus Wilson genetisch untersucht wurden, wurde zusätzlich eine Genotypisierung des *HFE*-Gens durchgeführt, welche bei 93 Patienten mindestens eine Mutation aufzeigte.

### 4.4.1 Die C282Y-Mutation

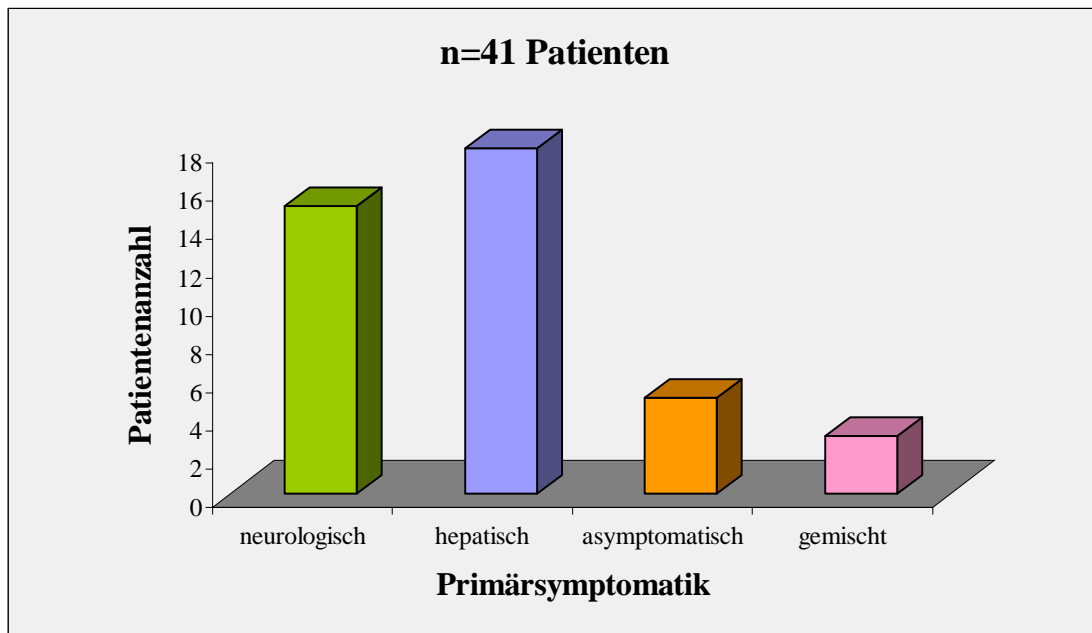


*Abbildung 21:* Die Abbildung stellt die Anzahl und Verteilung der Patienten, bei denen die C282Y-Mutation im *HFE*-Gen identifiziert wurde, bezüglich ihrer Primärsymptomatik dar.

Die C282Y-Mutation wurde bei insgesamt 17 Patienten als alleinige heterozygote Veränderung entdeckt. Von acht dieser Patienten ist die Primärsymptomatik der hepatolentikulären Degeneration bekannt. Die genauere Verteilung ist der Abbildung 21 zu entnehmen. Bei sechs der Patienten ist eine neurologische Primärsymptomatik bekannt, während keiner der Patienten

eine hepatische Primärsymptomatik aufweist. Ein Patient zeigte klinisch eine gemischte, d.h. sowohl eine hepatische als auch eine neurologische, Primärsymptomatik. Ein Patient war zum Zeitpunkt der Diagnostik der hepatolentikulären Degeneration asymptomatisch. Bei weiteren drei Patienten wurde die Mutation als compound heterozygote Mutation im *HFE*-Gen identifiziert. Diese Patienten werden im Kapitel 4.4.3 beschrieben.

#### 4.4.2 Die H63D-Mutation



*Abbildung 22: Die Abbildung stellt die Anzahl und Verteilung der Patienten, bei denen die H63D-Mutation im HFE-Gen identifiziert wurde, bezüglich ihrer Primärsymptomatik dar.*

Die H63D-Mutation wurde bei 70 Patienten identifiziert. Bei 61 dieser Patienten war sie als alleinige heterozygote Veränderung vorzufinden, während sie bei fünf als homozygote Veränderung identifiziert wurde. Bei den anderen vier Patienten kam sie zusammen mit einer anderen Mutation, also als compound heterozygote Mutation, vor. Diese Patienten werden nachfolgend beschrieben. Von 41 Patienten der insgesamt 66 Patienten, welche die H63D-Mutation entweder als alleinige heterozygote Mutation oder als homozygote Veränderung tragen, ist die Primärsymptomatik der hepatolentikulären Degeneration bekannt. Eine neurologische Primärsymptomatik weisen 18 Patienten auf. Eine primär hepatische Manifestation der hepatolentikulären Degeneration zeigen 15 untersuchte Personen. Drei Patienten leiden sowohl an hepatischen als auch an neurologischen Symptomen, also an einer gemischten Primärsymptomatik, und fünf weitere Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnostik des Morbus Wilson asymptomatisch.

#### **4.4.3 Compound heterozygote Mutationen**

Bei insgesamt vier Patienten wurden im *HFE*-Gen zwei unterschiedliche Mutationen identifiziert. Bei drei Patienten fand man sowohl die C282Y-Mutation als auch die H63D-Mutation. Das klinische Bild ist nur von einem dieser Patienten bekannt, welcher unter der primär neurologischen Manifestation des Morbus Wilson leidet. Bei einem Patienten, dessen klinisches Bild durch eine primär hepatische Manifestation geprägt ist, wurde im *HFE*-Gen sowohl die H63D- als auch die S65C-Mutation identifiziert.

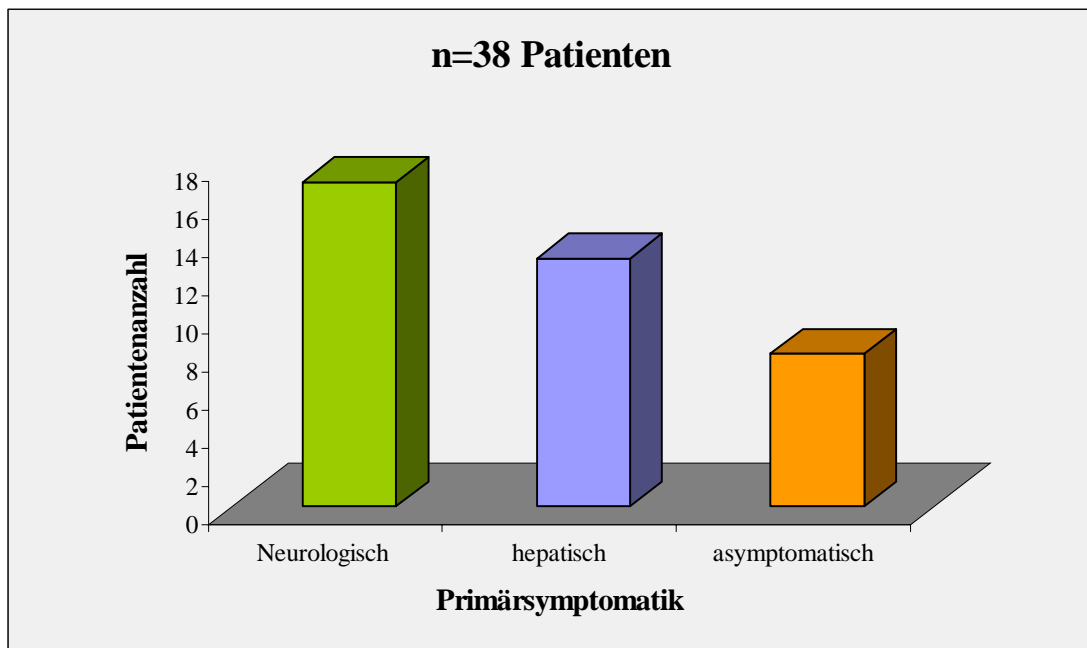


## **4.5 APOE-Genotyp und die Primärsymptomatik**

Es sind drei unterschiedliche Allele, E 2, E 3 und E 4, auf dem *APOE*-Locus bekannt. Diese drei Typen können sowohl als homozygote Formen oder auch als heterozygote Formen auftreten. Durch eine Punktmutation entstehen aus dem Wildtyp E 3 die beiden anderen Allele E 2 und E 4 [88]. Am häufigsten tritt mit einem Anteil von 55% der Phänotyp 3/3 auf. Der Phänotyp 3/4 tritt in unserer Population mit einem Anteil von 26% am zweithäufigsten auf. Nur bei einem Prozent wird der Typus 2/2 nachgewiesen. Das Apolipoprotein E hat eine Kontrollfunktion bezüglich des Katabolismus von Chylomikronen, VLDL-Remnants und ApoE-HDL. Diese Kontrollfunktion wird ermöglicht durch die Eigenschaft von ApoE sowohl an den ApoE- als auch an den ApoB/E-(LDL-) Rezeptor zu binden. Bei ApoE 3 und E 4 ist diese Fähigkeit gleichstark vorhanden, während ApoE 2 deutlich weniger Affinität gegenüber dem Rezeptor zeigt. ApoE 2/2 tritt oft als eine familiäre Dysbetalipoproteinämie beim Vorliegen genetischer Defekte in Erscheinung, führt aber auch zu einem relativ niedrigen Cholesterinspiegel. ApoE 4 wird mit einem verfrühten Auftreten von Artherosklerose in Zusammenhang gebracht und kann über dies hinaus zu einem erhöhten Serumcholesterin führen. ApoE kommt in fast allen Lipoproteinfraktionen vor, ist im VLDL allerdings mit einem besonders hohen Anteil vertreten. Die Serum-Konzentration des ApoE korreliert mit der der Triglyceride. Die höchsten ApoE-Serum-Konzentrationen werden bei Patienten mit familiärer Dysbetalipoproteinämie beobachtet. Bei Herzinfarktpatienten ist außerdem bekannt, dass das ApoE-HDL deutlich vermindert ist [89].

Die genetische Untersuchung des *APOE*-Locus im Zusammenhang mit dem Morbus Wilson begründet sich auf der Annahme, dass das Vorhandensein des Apolipoprotein E 4 zu einer Verschlechterung neurologischer Erkrankungen wie Alzheimer, Epilepsie und cerebraler Traumata führt. Der Präsenz von Apolipoprotein E 3 wird hingegen eine neuroprotektive Wirkung nachgesagt. Bei Untersuchungen von Patienten, die homozygote Träger der H1069Q-Mutation sind und außerdem den *APOE*-Genotyp 3/3 tragen, zeigten diese einen späteren Zeitpunkt der Erstsymptomatik. Ebenfalls war die Ausprägung der neurologischen und hepatischen Manifestation geringer im Vergleich zu Patienten mit einem anderen *APOE*-Genotyp [81].

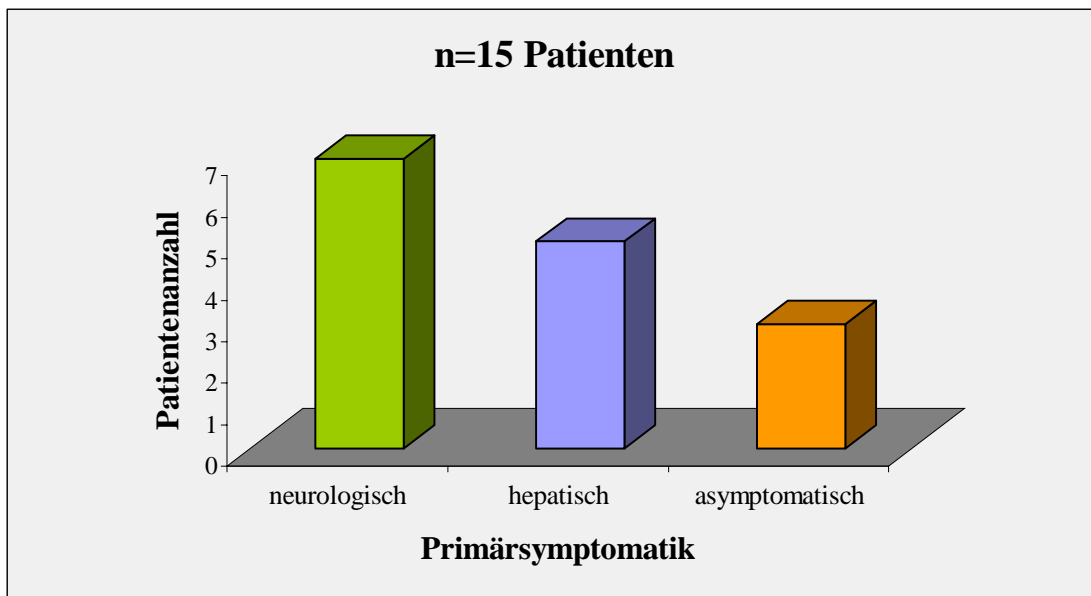
#### 4.5.1 APOE 3/3-Genotyp



*Abbildung 23: Die Abbildung stellt die Anzahl und Verteilung der Patienten, die den APOE-Genotyp 3/3 tragen, bezüglich ihrer Primärsymptomatik dar.*

Insgesamt wurde bei 76 genetisch untersuchten Patienten homozygot das Allel *APOE* 3 identifiziert. Über 38 dieser Patienten bestehen Informationen bezüglich ihrer Primärsymptomatik. An der primär neurologischen Form der hepatolentikulären Degeneration leiden 17 dieser Patienten, während 13 genetisch untersuchte Personen klinisch primär das Bild einer hepatischen Manifestation zeigen. Acht untersuchte Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnostik asymptomatisch. Das durchschnittliche Alter der Erstmanifestation liegt unter 30 Patienten bei  $18,4 \pm 7,2$  Jahren.

#### 4.5.2 APOE 4/3-Genotyp



*Abbildung 24:* Die Abbildung stellt die Anzahl und Verteilung der Patienten, die den APOE-Genotyp 4/3 tragen, bezüglich ihrer Primärsymptomatik dar.

Bei insgesamt 17 genetisch untersuchten Personen wurde der APOE 4/3-Genotyp identifiziert. Bei 15 dieser Personen sind Informationen bezüglich ihrer Primärsymptomatik bekannt. So weiß man, dass sieben Patienten primär an der neurologischen Form des Morbus Wilson leiden. Weitere fünf Patienten haben eine primär hepatische Manifestation der hepatolentikulären Degeneration. Bei drei genetisch untersuchten Patienten fand sich zum Zeitpunkt der Diagnostik keine klinische Symptomatik. Das durchschnittliche Alter der Erstmanifestation liegt unter zwölf Patienten bei  $14,4 \pm 5,1$  Jahren.

#### 4.5.3 APOE 3/2-Genotyp

Dieser heterozygote Typus wurde durch die genetische Untersuchung bei insgesamt 13 Patienten entdeckt. Zu keinem dieser Patienten sind Informationen über die Primärsymptomatik und den Zeitpunkt der Erstsymptomatik des Morbus Wilson bekannt.

#### 4.5.4 APOE 4/4-Genotyp

Zwei der genetisch untersuchten Patienten weisen den APOE 4/4-Genotyp auf. Einer der Patienten ist primär an der neurologischen Form der hepatolentikulären Degeneration erkrankt, während der andere Patient klinisch primär die hepatische Form des Morbus Wilson zeigt. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei diesen Patienten bei 18,5 Jahren.

## 5. DISKUSSION

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Identifikation der krankheitsverursachenden Mutationen im *ATP7B*-Gen. Insgesamt wurden 718 Patienten aus zwölf Ländern zu diesem Zweck genetisch untersucht, wobei sich die Vielfalt der krankheitsverursachenden Mutationen darstellte. Insgesamt 145 Mutationen, von denen 61 bereits bekannt und weitere 84 bisher noch nicht beschrieben sind, wurden identifiziert. Jedes Land wurde einzeln betrachtet, um eventuelle Hotspots und Gewichtungen bezüglich der identifizierten Mutationen innerhalb eines Landes zu erkennen. Teilweise existieren bereits Untersuchungen innerhalb einzelner Länder, welche hier benannt und zum Vergleich der gewonnenen Resultate dieser Arbeit herangezogen werden. Speziell betrachtet werden hierfür die am häufigsten aufgetretenen Mutationen innerhalb eines Landes.

Repräsentative Aussagen sind vor allem über Länder, aus denen größere Patientenzahlen genetisch untersucht wurden, zu erwarten. Bei Ländern mit kleineren Patientenzahlen sind die Aussagen eher richtungsweisend als absolut zu beurteilen. Generell ist bekannt, dass die am häufigsten identifizierte Mutation in Europa die H1069Q-Mutation ist, während die R778L-Mutation in Asien am häufigsten identifiziert wird [90].

Die H1069Q-Mutation, welche unter den 283 genetisch untersuchten polnischen Patienten die am stärksten vertretene Mutation ist, wurde unter 405 veränderten Allelen 296-mal und somit mit einer Frequenz von 69% identifiziert. Dieses Ergebnis weicht nicht gravierend von einer Untersuchung von Czlonkowska, Rodo *et al.* ab, bei welcher unter 85 genetisch untersuchten Patienten die H1069Q-Mutation auf 125 von 170 Chromosomen analysiert wurde, was einen prozentualen Anteil dieser Mutation von 73% an der Gesamtzahl der identifizierten Mutationen beschreibt [29].

Unter den 146 genetisch untersuchten deutschen Patienten wurde, unter insgesamt 207 veränderten Chromosomen, 100-mal die H1069Q-Mutation identifiziert, was einer Allel-Frequenz von 48% entspricht. Dieses Ergebnis weicht ab von einer Untersuchung von Caca, Ferenci *et al.*, bei der insgesamt 82 ostdeutsche Patienten genetisch untersucht wurden und bei welcher die H1069Q-Mutation eine Allel-Frequenz von 63% erreichte [31]. Die unterschiedliche Allel-Frequenz begründet sich höchstwahrscheinlich durch die unterschiedlich große Patientenzahl, so dass die Aussage dieser Arbeit als realistischer angesehen werden kann.

Unter 107 brasilianischen Patienten wurden insgesamt 172 Mutationen identifiziert. Am stärksten war die 3402delC-Mutation vertreten, welche 53-mal identifiziert wurde, was einem prozentualen Anteil von 30% dieser Mutation an der Gesamtanzahl der 172 gefundenen genetischen Veränderungen entspricht. Dieses Ergebnis kommt dem Ergebnis von Deguti, Genschel *et al.* gleich, bei welchem die *frameshift*-Mutation 3402delC mit einer Allel-Frequenz von 30,8% unter 60 untersuchten Patienten identifiziert wurde [78]. Die genetische Untersuchung der brasilianischen Patienten, welche bei Deguti *et al.* beschrieben sind, wurde in der Charité durchgeführt, so dass es sich somit um die selben Patienten handelt. Die Allel-Frequenz der 3402delC Mutation, welche in ihrem prozentualen Wert nicht durch die fast doppelt so große Patientenzahl verändert wurde, wird somit in ihrer Richtigkeit bestärkt. Die mit einer Allel-Frequenz von 19% am zweithäufigsten auftretende L708P-Mutation zeigte in der bereits oben benannten Untersuchung eine Frequenz von 14,1%. Die prozentualen Unterschiede ergeben sich aus der unterschiedlich großen Patientenanzahl. Da in dieser Arbeit fast doppelt so viele Patienten beschrieben werden wie bei Deguti *et al.*, ist anzunehmen, dass das Ergebnis dieser Arbeit realistischer ist. Des Weiteren wurde im südamerikanischen Raum von Verlez-Pardo *et al.* über die T1232P-Mutation im Exon 17 als eine populationspezifische Mutation berichtet, welche bei kolumbianischen Patienten entdeckt wurde [91]. Diese Mutation wurde unter den brasilianischen Patienten, welche in dieser Arbeit betrachtet wurden, insgesamt viermal identifiziert. Sie wurde bei keinem in dieser Arbeit betrachteten Patienten außerhalb Brasiliens identifiziert, was die Annahme von Verlez-Pardo *et al.*, dass es sich hierbei um eine populationspezifische Mutation handeln könnte, bestätigen würde.

Eine genetische Untersuchung von 44 an Morbus Wilson erkrankten Chinesen ergab, dass die R778L-Mutation unter den identifizierten Mutationen mit einem Anteil von 28,4% stark vertreten war [80]. Unter den 51 in dieser Arbeit betrachteten Patienten erreichte diese Mutation nur eine Allel-Frequenz von 19%. Trotzdem ist sie, wie auch bei Wu *et al.* beobachtet, die am häufigsten unter den chinesischen Patienten identifizierte Mutation. Die mit 24% am zweithäufigsten auftretende Mutation P992L ist unter den Patienten der oben genannten Untersuchung nicht erwähnt. Dafür wird dort die Mutation T935M im Exon 12, welche bei keinem der in dieser Arbeit betrachteten Patienten identifiziert wurde, als weiterer Hotspot unter den an Morbus Wilson erkrankten Chinesen angesehen. Regionale Unterschiede könnten für die Unterschiede der Mutationsspektren ursächlich sein. Gegenüber der westlichen Population, bei welcher bei einem klinischen Verdacht auf Morbus Wilson zunächst die Exons 14 und 18 betrachtet werden sollten, sollten bei chinesischen Patienten zuerst die Exons 8 und 12 auf mögliche Mutationen untersucht werden [80].

Aus dem Iran wurden 30 Patienten genetisch untersucht. Das Mutationsspektrum dieser Patienten ist sehr heterogen, so dass nur schwer von einer Gewichtung auf eine bestimmte Mutation gesprochen werden kann. Unter 45 veränderten Allelen wurden insgesamt 21 verschiedene Mutationen identifiziert, von denen 14 bereits bekannt waren, während die anderen sieben bisher noch nicht beschrieben worden sind. Die am stärksten vertretenen Mutationen sind die bereits bekannten Mutationen N1270S, D642H und Q1142X. Die beiden erstgenannten Mutationen wurden insgesamt sechsmal identifiziert und waren mit einer Frequenz von 13 % vertreten, während die Q1142X-Mutation mit einer Frequenz von 11% vertreten war und insgesamt fünfmal identifiziert wurde. Vergleiche zu anderen Ergebnissen sind nicht möglich, da bisher keine vergleichbaren Untersuchungen von iranischen Patienten existieren.

Aus Ägypten wurden insgesamt 28 Patienten genetisch untersucht, wobei 50 veränderte Allele identifiziert wurden. Wie unter den aus dem Iran stammenden Patienten stellt sich auch hier ein sehr heterogenes Mutationsspektrum dar. Insgesamt wurden 21 verschiedene Mutationen identifiziert, worunter sich neun bereits bekannte und 12 bisher noch nicht beschriebene Mutationen befanden. Am häufigsten wurden die bisher noch nicht bekannten Mutationen 3373\_3374del2 und H1126P, welche beide auf demselben betroffenen Allel vorkommen, beobachtet. Dieses veränderte Allel wurde insgesamt achtmal identifiziert und ist unter den ägyptischen Patienten demnach mit einer Frequenz von 16% vertreten. Am zweithäufigsten ist unter den ägyptischen Patienten die H1069Q-Mutation mit einer Allel-Frequenz von 10 % vertreten. Vergleiche zu anderen Untersuchungen sind nicht möglich, da über ägyptische, an Morbus Wilson erkrankte Patienten bisher keine vergleichbaren Untersuchungen zu finden sind. Al Jumah *et al.* beschrieb Patienten aus Saudi Arabien und kam zu dem Schluss, dass in dieser ethnischen Gruppe besonders die Exons 8, 19 und 21 von Mutationen betroffen sind, was er daran feststellte, dass bei 50% der genetisch untersuchten Patienten auf einem der Exons eine Mutation gefunden wurde. Speziell die Mutationen im Exon 21, welche in 18 Fällen beobachtet worden seien, und die im Exon 19, welche in einem Fall beobachtet wurde, seien nur in dieser Population zu finden. Es wurden speziell nur vier identifizierte Mutationen genannt, obwohl sehr viel mehr gefunden wurden. Diese sind: Ser744Pro im Exon 8, 4193delC im Exon 21, Gly1341Ser im Exon 19 und Glu1399Arg im Exon 21. Bei 32% der Patienten aus Saudi-Arabien konnte eine Mutation im Exon 21 ausgemacht werden [92].

Unter 18 genetisch untersuchten Patienten aus Litauen wurden insgesamt 15 veränderte Allele identifiziert. Vier verschiedene Mutationen wurden gefunden, unter denen die H1069Q-Mutation mit einer Allel-Frequenz von 67% zehnmal identifiziert wurde. Vergleiche sind aufgrund fehlender Informationen über speziell aus Litauen stammende, an Morbus Wilson erkrankte

Patienten nicht möglich. Generell ist bekannt, dass die H1069Q-Mutation die am häufigsten identifizierte Mutation in Europa ist, was auch aus dieser Arbeit deutlich hervorgeht. Sie wird in Europa mit einer Allel-Frequenz von bis zu 65% identifiziert [31, 64, 76, 93]. Betrachtet man speziell Osteuropa, zeigt sich ein ähnliches Bild. So wurde die H1069Q-Mutation in Russland mit einer Allel-Frequenz von 49% [31, 94] und in dieser Arbeit in Deutschland mit einer Allel-Frequenz von 48%, in Polen mit einer Allel-Frequenz von 69% und in Serbien mit einer Allel-Frequenz von 31% unter den an Morbus Wilson erkrankten Patienten identifiziert.

Unter 13 genetisch untersuchten Griechen, von denen ein Großteil aus Kreta stammt und von denen bereits bei Dedoussis *et al.* berichtet wurde, waren auf 17 Chromosomen Veränderungen vorzufinden [95]. Es wurden nur vier verschiedene Veränderungen, die ähnlich häufig vertreten waren, identifiziert. Festgestellt wurden die bereits bekannten Mutationen Q289X und 845delT, die 397delT-Mutation und ein sowohl durch die G1176R- als auch durch die I1148T-Mutation, genetisch verändertes Allel. In der Literatur finden sich in einer Untersuchung von Loudianos, Lovicu *et al.*, bei welcher 24 griechische Familien genetisch untersucht wurden, zwar auch die beiden erstgenannten Mutationen und die I1148T-Mutation, während die H1069Q-Mutation mit einer Frequenz von 28,5% als am häufigsten vertretene Mutation identifiziert wurde [95, 96]. Die H1069Q-Mutation wurde unter den in dieser Arbeit betrachteten Patienten nicht beobachtet. Die anderen beiden unter diesen Patienten identifizierten Mutationen wurden allerdings von Loudianos, Lovicu *et al.* nicht erwähnt.

Aus Serbien wurden zehn Patienten genetisch untersucht. Auf 13 Chromosomen wurden sechs verschiedene Mutation identifiziert, von denen die A1003T- und die H1069Q-Mutation am stärksten vertreten waren. Sie traten mit einer Frequenz von 37% und 31% auf. Die anderen Mutationen, die R616Q-Mutation, die 2304insC-Mutation, die I1102T-Mutation und die bisher noch nicht beschriebene 2645\_2646del2-Mutation, wurden alle nur einmal identifiziert. In einer Untersuchung von Loudianos, Kostic *et al.*, bei der 35 jugoslawischen Patienten betrachtet wurden, wurden alle fünf genannten, bereits bekannten Mutationen ebenfalls identifiziert. Allerdings weicht die Frequenz ihres Auftretens deutlich von den Ergebnissen dieser Arbeit ab. Aussagekräftiger ist in diesem Fall die zuvor genannte Untersuchung aufgrund der größeren Patientenanzahl. Die Frequenz des Auftretens der H1069Q-Mutation beträgt dort 48,9%, die der 2304insC- Mutation 11,4%, die der R616Q-Mutation und die der A1003T -Mutation jeweils 5,7% [75].

Unter 14 genetisch untersuchten Patienten aus Rumänien wurde auf insgesamt zwölf veränderten Allelen zehnmal die H1069Q-Mutation identifiziert. Die anderen beiden Allele waren durch die 2304insC-Mutation verändert. Unter den Patienten dieses Landes kann von einem deutlichen

Schwerpunkt der H1069Q-Mutation gesprochen werden. Literaturvergleiche sind auch hier nicht möglich, da entsprechende Untersuchungen nicht existieren. Hier kann nur wieder gesagt werden, dass die H1069Q-Mutation, wie bei der Beschreibung Litauens bereits erwähnt, die am häufigsten identifizierte Mutation in Osteuropa ist. Diese Aussage bestätigt sich durch das Ergebnis der genetischen Untersuchung der rumänischen Patienten.

Aus der Slowakai wurden 13 Patienten genetisch untersucht. Insgesamt wurden 20 veränderte Allele, von denen 17 durch die H1069Q-Mutation und drei durch die bisher noch nicht beschriebene M1359T-Mutation verändert waren, identifiziert. In diesem Fall kann ebenfalls von einer starken Gewichtung der H1069Q-Mutation gesprochen werden. Auch zu den an Morbus Wilson erkrankten Patienten der Slowakai gibt es speziell keine vergleichbaren Untersuchungen. Eine Untersuchung von Cauza, Ulrich-Pur *et al.*, bei welcher genetische Veränderungen vor allem österreichischer Patienten untersucht wurden, betrachtete zusätzlich auch Patienten aus Tschechien, Ungarn und der Slowakai. Dort ist beschrieben, dass acht von zwölf H1069Q-homozygoten Patienten aus diesen Ländern stammen, während compound heterozygote Patienten geographisch gestreuter gefunden wurden [58]. Vrabelova *et al.* berichtete von einer Untersuchung, bei der insgesamt 227 Patienten, welche überwiegend aus Tschechien aber auch aus der Slowakai stammen, genetisch untersucht wurden. Die H1069Q-Mutation erreichte eine Allel-Frequenz von 57% [97]. Diese Beobachtung bestärkt die starke Gewichtung auf die H1069Q-Mutation unter den slowakischen Patienten, welche in dieser Arbeit in einer vergleichsweise kleinen Patientengruppe beobachtet wurde.

Aus den U.S.A. wurden nur vier Patienten genetisch untersucht, unter denen nur bei zwei Patienten jeweils eine Mutation identifiziert wurde. Hierbei handelte es sich um die R1319X-Mutation und die noch nicht bekannte I1148N-Mutation. Aufgrund der kleinen Patientenzahl lassen sich über die Patienten der U.S.A. keine repräsentativen Aussagen machen. Auch für Patienten der U.S.A. war keine vergleichbare Untersuchung auffindbar, so dass an dieser Stelle keine Aussage über die Verteilung verschiedener Mutationen an Morbus Wilson erkrankter Patienten der U.S.A. gemacht werden kann.

Der zweite Teil dieser Arbeit betrachtet die klinische Symptomatik der Patienten, bei denen die gleiche Mutation auf beiden Chromosomen im *ATP7B*-Gen identifiziert wurde. Insgesamt 221 der 718 genetisch untersuchten Patienten sind homozygote Träger von insgesamt 45 verschiedenen Mutationen. Umstritten ist bis heute, ob man klare Zusammenhänge zwischen der Homozygotie einer Mutationen und Tendenzen des klinischen Bildes feststellen kann, da verschiedene Untersuchungen unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Eine Untersuchung von



Panagiotakaki *et al.*, welche sich mit einer eventuellen Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Morbus Wilson befasst, beschreibt, dass sich Patienten mit einer homozygoten *missense*-Mutation von denen mit einer homozygoten *frameshift*- oder *nonsense*-Mutation besonders bezüglich des Alters der Erstmanifestation und der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration unterscheiden. So zeigten Träger der *missense*-Mutationen H1069Q und R969Q durchschnittlich höhere Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen gegenüber homozygoten Trägern einer *frameshift*- oder *nonsense*-Mutation und erkrankten verhältnismäßig später [73]. Panagiotakaki *et al.* beschreibt außerdem, dass sich keine Unterschiede der einzelnen Kupfer-Parameter zwischen homozygoten Trägern einer *missense*-Mutation im Vergleich mit denen, die auf beiden Chromosomen die selbe *frameshift*- oder *nonsense*-Mutation tragen, ergeben. Die phänotypische Ausprägung begründet sich durch die unterschiedliche Veränderung der DNA. Während durch *nonsense*- und *frameshift*-Mutationen sehr instabile mRNA produziert wird, die in den meisten Fällen zu nichtfunktionalen Proteinen führt [73, 74, 98], bleibt z.B. durch die H1069Q-Mutation eine Restfunktion im *ATP7B*-Gen erhalten [14, 75]. Die Vermutung einer eher hepatischen Manifestation der hepatolentikulären Degeneration im Zusammenhang mit der homozygoten Trägerschaft einer anderen Mutation wird bei Hermann *et al.* ebenfalls genannt [76]. Während Shah *et al.* berichtet, dass die Annahme einer Korrelation zwischen einzelnen Mutationen und einer bestimmten klinischen Symptomatik nicht zu unterstützen sei und die Ausprägung des klinischen Bildes auch durch die Varietät der Genetik, die Epigenetik und Umwelt- und Umgebungsfaktoren beeinflusst sei, nimmt Thomas *et al.* an, dass sich die Heterogenität des Phänotyps eben durch die genetische Vielfalt der über 200 im *ATP7B*-Gen identifizierten Mutationen begründet [64, 76, 99]. Zusätzlich wird bei Hermann *et al.* erwähnt, dass einzelne Mutationen nicht allein ursächlich für die klinische Symptomatik sein können, da Familienmitglieder mit identischen Mutationen teilweise Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung aufweisen [39, 76].

Um eine eventuelle Genotyp-Phänotyp-Korrelation feststellen zu können, wurde in dieser Arbeit das Alter der Erstmanifestation, die Primärsymptomatik, die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes, die Familienanamnese und das Ergebnis einer eventuellen Leberhistologie sowie Laborparameter, wie die Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen, die Serum-Kupfer-Konzentrationen und die Kupfer-Konzentrationen im Urin, der Patienten, die homozygote Träger einer bestimmten Mutation sind, betrachtet. Anhand von 33 Patientengruppen, die sich jeweils aus Patienten, welche die gleiche Mutation homozygot tragen, zusammensetzen, sollten eventuelle Genotyp-Phänotyp-Korrelationen herausgefunden werden. Da die meisten der Patientengruppen sehr klein sind und 17 davon sogar nur aus einem Patienten bestehen, wird die

Beurteilung zunächst genereller gefasst. Die Patienten, die homozygote Träger verschiedener *missense*-Mutationen sind oder die verschiedene *nonsense*-, *frameshift*- oder *splice site*-Mutationen homozygot tragen, werden jeweils aufgrund der selben Mutationsart zusammengefasst. Folgende Mutationen, denen jeweils die Patientenanzahl homozygoter Träger in Klammern hinzugefügt ist, werden hier phänotypisch beurteilt: *Missense*-Mutationen: H1069Q (124), L708P (11), R418W (1), L549P (1), D642H (2), R778G (2), D765N (1), I857T (1), P992L (4), T977M (4), A1003T (2), G1061E (1), H1126P (4), G1069E (1), F1094L (1), I1148T (1), N1270S (4), L1299R (1), G1341R (2). *Nonsense*-Mutationen: E396X (2), Q289X (2), Q680X (2), S932X (1), L936X (1), Q1124X (2). *Frameshift*-Mutationen: 3402delC (19), 845delT (2), 2296dupA (4), 3472\_3482del11 (1), 3697delC (1), 3649\_3654del6 (1), 3713\_3714del2 (1). *Splice site*-Mutation: IVS18-2A>G (1).

Das durchschnittliche Alter der Erstsymptomatik konnte von 28 Patientengruppen ermittelt werden. Von diesen Gruppen sind 17 durch die Homozygotie einer *missense*-Mutation, fünf durch die einer *nonsense*-Mutation, weitere fünf durch die einer *frameshift*- und eine durch die einer *splice site*-Mutation bedingt. Vergleicht man die Daten der Patientengruppen mit *missense*-Mutationen mit denen mit anderen Mutationsarten, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. In keiner der beiden Gruppen werden Häufungen des Zeitpunkts der Erstmanifestation in einem bestimmten Altersabschnitt ersichtlich. Die Homozygotie einer *missense*-Mutation führt sowohl zu einer Erkrankung im Kindesalter, wobei das durchschnittlich jüngste Erstmanifestationsalter mit 9,5 Jahren bei der Homozygotie der T977M-Mutation ermittelt wurde, als auch zu einem späten Erstmanifestationsalter mit bis zu durchschnittlich 26,6 Jahren, welches unter den homozygoten Trägern der H1069Q-Mutation ermittelt wurde. Ähnlich stellt sich die Verteilung der Erstmanifestation der anderen Mutationen dar. Während ein Patient, welcher homozygoter Träger der 3649\_3654del6-Mutation ist, bereits im Alter von weniger als drei Jahren erkrankte, zeigte ein anderer Patient, welcher die 3713\_3714del2-Mutation auf beiden Chromosomen im *ATP7B*-Gen trägt, ein Erstmanifestationsalter von 25 Jahren.

Die Primärsymptomatik ist von insgesamt 79 Patienten, die homozygote Träger einer *missense*-Mutation sind, bekannt. Insgesamt leiden 34 dieser Patienten unter einer primär neurologischen Symptomatik, 30 an einer hepatischen Primärsymptomatik, sieben an sowohl einer hepatischen als auch an einer neurologischen Primärsymptomatik, während weitere acht Patienten zum Zeitpunkt der Diagnostik asymptomatisch waren. Unter den Patienten, die homozygote Träger einer *nonsense*-, *frameshift* oder *splice site*- Mutation sind, ist die Primärsymptomatik von 24 Patienten bekannt. Zehn dieser Patienten leiden unter einer hepatischen Primärsymptomatik und acht unter einer neurologischen. Sechs Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnostik

asymptomatisch. Obwohl sich das Verhältnis zwischen neurologischer und hepatischer Primärsymptomatik in beiden Gruppen ähnelt, erkennt man doch unter den Patienten mit einer homozygoten *missense*-Mutation eine Tendenz zum Überwiegen einer neurologischen Primärsymptomatik, während sich unter den anderen Patienten eher ein leichtes Überwiegen der hepatischen Primärsymptomatik zeigt. Betrachtet man speziell die phänotypische Ausprägung der *frameshift*-Mutationen, zeigt sich ein deutliches Überwiegen der neurologischen Primärsymptomatik, was im Gegensatz zu den Beobachtungen von Seidel *et al.* und Panagiotakaki *et al.* steht [73, 100]. Die Patienten mit *nonsense*-Mutationen zeigten gegensätzlich dazu phänotypisch keinen Fall einer neurologischen Primärsymptomatik, sondern zeigten mit Ausnahme weniger, welche zum Zeitpunkt der Diagnostik asymptomatisch waren, das Bild einer hepatischen Primärsymptomatik.

Eine signifikante geschlechterspezifische Gewichtung ist sowohl unter den Trägern einer homozygoten *missense*-Mutationen als auch unter den Patienten, die eine andersartige Mutation homozygot auf beide Chromosomen tragen, nicht zu erkennen. Generell sind mit einer leichten Tendenz mehr Männer als Frauen mit einer homozygoten Mutation in dieser Arbeit betrachtet worden. Dieses Verhältnis ist unter den homozygoten Trägern einer *nonsense*-Mutation am deutlichsten.

Die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes sowie eine positive Familienanamnese ist unter den Patienten, die homozygote Träger einer *missense*-, *frameshift*-, *nonsense*- oder *splice site*-Mutation sind, überwiegend. Dass bei allen Mutationsarten jedoch auch negative Familienanamnesen bekannt sind, kann dafür sprechen, dass die Mutationen alleine nicht zwangsläufig zu einer klinischen Symptomatik führen müssen.

Leberbiopsieergebnisse, welche von Homozygoten zwölf unterschiedlicher Mutationen, unter denen sich sechs *missense*-Mutationen, zwei *nonsense*- und vier *frameshift*-Mutationen befinden, bekannt sind, liefern sehr heterogene Ergebnisse. Bei allen Mutationsgruppen wurden sowohl fibrotische Veränderungen, makro- und mikrovakuoläre Steatosis, Zirrhose, noduläre Transformationen als auch das Bild einer Fettleber und einer chronischen, teilweise aktiven Hepatitis beobachtet. Die durchschnittlichen Kupferspeicherungen im untersuchten Lebergewebe reicht von 10facher bis 24,9facher Erhöhung gegenüber der Normwertkonzentration.

Von 28 dieser Gruppen, von denen 16 homozygote Träger einer *missense*-Mutation, fünf einer *nonsense*- und sieben einer *frameshift*-Mutation sind, bestehen bezüglich der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration Informationen. Die Patientengruppen der homozygoten Träger der 16 *missense*-Mutationen zeigen ein sehr heterogenes Bild der Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen. Drei Gruppen zeigten durchschnittlich Werte, welche auf 10% oder weniger

der Konzentration eines Gesunden herabgesunken waren. Weitere fünf Gruppen erreichten durchschnittlich eine Coeruloplasmin-Serum-Konzentration von 11% bis 20% der bei einem Gesunden zu erwartenden Konzentration. Zwei Gruppen erreichten durchschnittlich 21% bis 30% der normalen Konzentration. Drei Gruppen lagen mit den durchschnittlichen Konzentrationen zwischen 41% und 50%. Jeweils eine Patientengruppe erreichte 51 bis 60% bzw. 71% bis 80% der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration eines Gesunden. Bei einem Patienten, welcher der einzige Vertreter seiner Gruppe ist, lag die Konzentration im Normbereich. Bei *frameshift*- und *nonsense*-Mutationen bot sich ein homogeneres Bild. In keiner der Patientengruppen zeigte sich durchschnittlich eine Coeruloplasmin-Serum-Konzentration, welche mehr als 30% der bei einem Gesunden zu erwartenden Konzentration erreichte. Sechs der zwölf Patientengruppen, die sich aus Patienten zusammensetzen, welche durch die homozygote Präsenz einer *nonsense*- oder *frameshift*- Mutation erkrankten, zeigten Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen von 11% bis 20% der zu erwartenden Konzentration. Drei Patientengruppen, welche alle durch die homozygote Präsenz einer *frameshift*-Mutation bedingt sind, erreichten nur 10% oder weniger der normalen Konzentration. Eine Patientengruppe mit einer *nonsense*- und zwei mit einer *frameshift*-Mutationen erreichten durchschnittlich 21% bis 30% der Konzentration eines Gesunden.

Die Auswertung der Serum-Kupfer-Konzentrationen der einzelnen Patientengruppen ergab ebenfalls ein sehr heterogenes Bild. Insgesamt sind diesbezüglich von 21 Patientengruppen verschiedener homozygoter Mutationen Informationen vorhanden. Diese teilen sich auf in 13 Gruppen homozygoter Träger einer *missense*-Mutation, zwei Gruppen mit homozygoten Trägern einer *nonsense*-Mutation und sechs Gruppen, die sich jeweils aus homozygoten Trägern unterschiedlicher *frameshift*-Mutationen zusammensetzen. Die durchschnittlichen Serum-Kupfer-Konzentrationen der Patientengruppen mit einer homozygoten *missense*-Mutation reichen von 10% bis 78,6% der Konzentration eines Gesunden. Die durchschnittliche Serum-Kupfer-Konzentration von acht dieser Gruppen liegt zwischen 41% und 70% der Konzentration eines Gesunden. Die durchschnittlichen Konzentrationen der Gruppen der Träger einer *frameshift*- oder *nonsense*-Mutation erreichen Konzentrationen von 8,2% bis 52,9% der Konzentration eines Gesunden.

Die Veränderungen der Kupfer-Konzentration im Urin lässt ebenfalls keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation erkennen. Insgesamt sind Ergebnisse 24 verschiedener Patientengruppen, die sich unterteilen durch die Homozygotie von 17 *missense*-Mutationen, drei *nonsense*- und sechs *frameshift*-Mutationen, bekannt. Die durchschnittlichen Konzentrationen der einzelnen *missense*-Homozygoten-Gruppen reichen von im Normbereich liegenden Konzentrationen bis hin zur

12fachen Konzentrationserhöhung gemessen an der Konzentration eines Gesunden. Eine Patientengruppe, die allerdings auch nur aus einem einzigen Patient besteht, zeigt das Bild einer 64fachen Konzentrationserhöhung, wobei es sich hier höchstwahrscheinlich um einen Ausreißer handelt. Auch die Patientengruppen der homozygoten Träger der *frameshift*- und *nonsense*-Mutation zeigen ein heterogenes Bild. Die durchschnittlichen Konzentrationen siedeln sich vom Normbereich bis hin zu 8,9fachen Konzentrationserhöhungen an.

Betrachtet man nun die oben beschriebenen Parameter, wird deutlich, dass das klinische Bild aller Mutationsarten sehr heterogen ist. Man kann also nicht sagen, dass eine bestimmte Mutationsart zu einer bestimmten klinischen Symptomatik führt, da prinzipiell alle Manifestationsformen bei *missense*-, *nonsense*- oder *frameshift*-Mutationen möglich sind. Phänotypische Unterschiede der einzelnen Mutationsarten werden aus diesen Daten zusammenfassend in der Primärsymptomatik, der Coeruloplasmin-Serum-Konzentration und der Serum-Kupfer-Konzentration ersichtlich. Es kann anhand der in dieser Arbeit betrachteten Daten angenommen werden, dass eine genotypisch homozygote *missense*-Mutation eher zu einer neurologischen Primärsymptomatik führt, während eine andersartige Mutation eher zu einer primär hepatischen Symptomatik führt. Außerdem sind sowohl die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration als auch die Serum-Kupfer-Konzentration tendenziell bei der homozygoten Trägerschaft einer *missense*-Mutation nicht so stark vermindert wie bei Patienten mit einer homozygoten *frameshift*- oder *nonsense*-Mutation. Um genauere Aussagen bezüglich einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation machen zu können, sollte man einzelne Mutationen in ihrer klinischen Ausprägung betrachten. Dieses Vorhaben gestaltet sich aufgrund der Seltenheit der Erkrankung (Prävalenz: 1:30.000) und des großen Mutationsspektrums (über 250 Mutationen) im *ATP7B*-Gen, welches eine große Vielfalt an Genotypen verursacht, äußerst schwierig. Eventuelle mutationsspezifische klinische Erscheinungsbilder können nur erkannt werden, wenn eine größere Patientengruppe der selben homozygoten Mutation betrachtet werden kann. Dieses gelang in dieser Arbeit für die H1069Q-, die 3402delC- und die L708P-Mutation.

Die wohl am häufigsten im Zusammenhang mit Morbus Wilson beschriebene Mutation ist die H1069Q-Mutation, welche in Europa unter den an Morbus Wilson erkrankten Patienten mit einer Allel-Frequenz von 65% auftritt [64, 76, 93]. Das klinische Bild bei der Homozygotie dieser Mutation ist laut einiger Untersuchungen gekennzeichnet durch einen, verglichen mit dem klinischen Bild anderer Mutationen oder dem Krankheitsbild compound heterozygoter Patienten, verhältnismäßig späten Krankheitsbeginn und das Überwiegen einer neurologischen Primärsymptomatik, sowie durch einen milderen Verlauf der hepatischen Symptomatik und ein Überwiegen weiblicher Patienten. [29, 30, 76, 99, 101]. Zu dem Ergebnis der späten

Erstmanifestation und einer häufigeren neurologischen Primärsymptomatik verglichen mit Trägern anderer Mutationen kamen auch Caca *et al.*, Panagiotakaki *et al.*, Loudianos *et al.* und Stapelbroeck *et al.*, wobei letzterer angibt, keinen Unterschied bezüglich der Geschlechterverteilung feststellen zu können. [31, 73, 75, 77]. Panagiotakaki *et al.* beschreibt ebenfalls abweichend von der angeführten These, dass trotz des verhältnismäßig größeren Anteils an Patienten mit neurologischer Primärsymptomatik, verglichen mit der Phänotypie anderer homozygoter Mutationen, unter 17 homozygoten pädiatrischen Patienten die Mehrheit an einer hepatischen Primärsymptomatik leidet [73]. Shah *et al.* beschrieb ein relativ ausgeglichenes Verhältnis bezüglich der Primärsymptomatik unter den H1069Q homozygoten Patienten beobachtet zu haben [64]. Loudianos *et al.* erwähnte zusätzlich die mögliche Ungenauigkeit der Aussagen der späten Erstmanifestation und der überwiegenden neurologischen Primärsymptomatik durch den Schwerpunkt der Patienten übermittelnden und diagnostizierenden Kliniken, welcher z.B. im Fall der jugoslawischen Patienten in der Neurologie Erwachsener liegt [75]. Außerdem wird der Umstand der durchschnittlich späten Erstmanifestation zusätzlich durch die Restfunktion der ATPase7B erklärt, welche bei dieser homozygoten Mutation im *ATP7B*-Gen gewährleistet ist [14, 75].

In dieser Arbeit wurden 124 Patienten, die homozygote Träger der H1069Q-Mutation sind, betrachtet. Das Alter der Erstmanifestation liegt durchschnittlich bei  $26,6 \pm 10,3$  Jahren. Von insgesamt 62 Patienten, deren Primärsymptomatik bekannt ist, leiden 31 Patienten klinisch unter der primär neurologischen Form der hepatolentikulären Degeneration und erkrankten durchschnittlich erst im Alter von  $30,8 \pm 8,7$  Jahren. Unter 19 Patienten mit einer hepatischen Primärsymptomatik hingegen zeigte sich ein niedrigeres Erstmanifestationsalter bezüglich des Gesamtdurchschnitts der Patienten, die homozygote Träger dieser Mutation sind. Diese Patienten erkrankten durchschnittlich im Alter von  $25,1 \pm 7,9$  Jahren. Insgesamt fünf Patienten, die sowohl unter der hepatischen als auch unter der neurologischen Form des Morbus Wilson leiden, erkrankten durchschnittlich im Alter von  $21,1 \pm 14,2$  Jahren. Diese Ergebnisse unterstützen die oben genannten Aussagen einiger Autoren bezüglich des verhältnismäßig späten Zeitpunktes der Erstmanifestation und des Überwiegen der neurologischen Primärsymptomatik. Erwähnt werden muss allerdings, dass ein großer Teil der genetisch untersuchten Patienten aus Polen von einer neurologischen Klinik übermittelt wurde, was dieses Ergebnis beeinflusst. Das oben benannte Ungleichgewicht bezüglich der Geschlechterverteilung unter denen für diese Mutation homozygote Patienten bestätigt sich durch diese Arbeit nicht. Von 124 Patienten ist von 118 das Geschlecht bekannt. Der Anteil männlicher und weiblicher Patienten teilt sich exakt in jeweils 50%. Interessant ist allerdings, dass unter den Patienten mit einer neurologischen

Primärsymptomatik die Anzahl männlicher Patienten deutlich überwiegt (21 Männer, 10 Frauen), während unter den Patienten mit einer hepatischen Primärsymptomatik deutlich mehr Frauen als Männer gesehen wurden (16 Frauen, drei Männer). Caza *et al.* beobachtete in einer Untersuchung von insgesamt 39 homozygoten Patienten aus Sachsen die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes in 82% der Fälle [31]. Auch dieses Ergebnis kann durch diese Arbeit mangels Daten nicht bestätigt werden, da nur von 16 Patienten Informationen diesbezüglich existieren, von denen allerdings nur bei sieben Patienten ein Kayser-Fleischer-Ring diagnostiziert wurde. Die Coeruloplasmin-Konzentration im Serum war bei den Patienten mit dieser homozygoten Mutation durchschnittlich auf 50,6% der Konzentration eines Gesunden verringert, was im Vergleich zu Patienten, die Träger anderer homozygoter Mutationen sind, verhältnismäßig milde ausfällt. Auch hier zeigten sich Unterschiede bezüglich der Primärsymptomatik. Während die Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik eine Konzentrationsverringering auf durchschnittlich 44,3% der Konzentration eines Gesunden zeigten, ergab die Auswertung der Patienten mit einer hepatischen Primärsymptomatik eine durchschnittliche Konzentrationsverringering auf 51% der normalen Konzentration. Die durchschnittliche Serum-Kupfer-Konzentration lag bei den Patienten mit dieser homozygoten Mutation bei 72,1% der Konzentration eines Gesunden, was wiederum eine verhältnismäßig milde Verringerung anzeigt. Es ergaben sich nur geringfügige Unterschiede unter den Patienten mit unterschiedlicher Primärsymptomatik. Die Kupfer-Konzentration im Urin der H1069Q-Homozygoten war durchschnittlich 4,1fach erhöht, was im Verhältnis zu anderen homozygoten Patienten keine besonders auffällige bzw. nur eine leichte Erhöhung anzeigte. Unter den Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik war die Kupfer-Konzentration im Urin fünffach erhöht, während sie unter den Patienten mit einer hepatischen Primärsymptomatik nur 3,3fach erhöht war. Bei acht von zehn Patienten, bei denen eine Leberbiopsie durchgeführt wurde, zeigte sich sowohl das Bild einer Fettleber als auch das einer Fibrose. Der durchschnittliche Kupfergehalt des Lebergewebes ist unter den Patienten, über die diesbezüglich Informationen vorhanden sind, 11,4fach erhöht.

Die 3402delC-Mutation, welche in dieser Arbeit unter den brasilianischen Patienten die am häufigsten identifizierte Mutation ist und unter den polnischen und deutschen Patienten mit einer Allel-Frequenz von 8% und 4% als zweithäufigste Mutation und außerdem auch in Litauen identifiziert wurde, wurde bei 19 Patienten als homozygote Veränderung des *ATP7B*-Gens identifiziert. Ihr Auftreten wurde außerhalb Brasiliens, wo sie mit einer Allel-Frequenz von 30% unter den an Morbus Wilson erkrankten Patienten auftrat, außerdem in Russland, wo die

Mutation mit einer Allel-Frequenz von 19% auftrat, in Schweden, in Nordamerika und in Ostdeutschland beschrieben [31, 32, 64, 78, 102]. Über eine eventuelle Genotyp-Phänotyp-Korrelation sind bisher keine eindeutigen Erkenntnisse bekannt. So beschreibt Caza *et al.* die Schwierigkeit der Erhebung eindeutiger Aussagen bezüglich einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei dieser Mutation aufgrund des seltenen Auftretens der Mutation im ostdeutschen Raum [31]. Seidel *et al.* betont nur, dass die homozygote Präsenz einer *frameshift*-Mutation eher in einem Zusammenhang mit einer hepatischen Primärsymptomatik gesehen werden kann, was sich bei der Auswertung der in dieser Arbeit betrachteten homozygoten Träger der 3402delC-Mutation nicht zeigte [100]. Deguti *et al.* beschrieb bereits die selben Patienten, welche in dieser Arbeit betrachtet wurden. Dort wird die phänotypische Heterogenität bei der Präsenz des selben Genotyps betont, welche anzeigt, dass die Mutation als solche nicht allein verantwortlich für das klinische Bild gemacht werden kann [78]. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Erstsymptomatik liegt bei den Patienten, die homozygote Träger dieser Mutation sind, bei 15,8  $\pm$  2,4 Jahren. Bezüglich der Primärsymptomatik ergaben sich im Alter der Erstsymptomatik keine signifikanten Unterschiede. Unter elf Patienten, von denen Angaben bezüglich der Primärsymptomatik bekannt sind, leiden sieben Patienten unter der neurologischen Form der hepatolentikulären Degeneration und drei Patienten unter der primär hepatischen Manifestation. Ein Patient ist asymptomatisch. Die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes wurde bei neun Patienten diagnostiziert. Dieses Ergebnis muss allerdings kritisch betrachtet werden, da nicht bekannt ist, bei wie vielen der 19 Patienten eine entsprechende ophthalmologische Untersuchung durchgeführt wurde. Dem zufolge ist nicht bekannt, bei wie vielen Patienten diese Untersuchung negativ ausgefallen ist. Das Geschlechterverhältnis ist bei diesen Patienten, wie auch bei der oben beschriebenen H1069Q-Mutation ausgeglichen. Von 15 Patienten, von denen acht Frauen und sieben Männer sind, ist das Geschlecht bekannt. Die durchschnittliche Coeruloplasmin-Serum-Konzentration ist unter den Patienten, die die 3402delC-Mutation auf beiden Chromosomen tragen, durchschnittlich auf 22,8% der Konzentration eines Gesunden verringert. Unter den Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik war die Konzentration zum Zeitpunkt der Diagnostik stärker verringert (11,8%) als bei denen mit einer primär hepatischen Symptomatik (15%). Die Serum-Kupfer-Konzentration war unter diesen Patienten auf durchschnittlich 40,1% der Konzentration eines Gesunden verringert, wobei sich auch hier eine stärkere Verringerung unter den Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik (38,8%) im Gegensatz zu denen mit einer hepatischen Manifestation (59,3%) des Morbus Wilson zeigte. Das Bild einer stärkeren Ausprägung der Erkrankung im Zusammenhang einer neurologischen Primärsymptomatik bezüglich der Laborwerte zeigte sich auch bei der Messung des



Kupfergehalts im Urin. Während die Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik durchschnittlich 11,6fach erhöhte Kupfer-Konzentrationen im Urin aufwiesen, zeigten die Patienten mit einer hepatischen Primärsymptomatik durchschnittlich nur eine 2,2fache Konzentrationserhöhung. Insgesamt ergab sich durchschnittlich eine 6,6fache Konzentrationserhöhung. Nur von einem Patienten ist das Ergebnis einer Leberbiopsie bekannt, was eine 13,3fach erhöhte Kupferspeicherung ergab.

Die L708P-Mutation, welche 19% der unter den brasilianischen Patienten identifizierten Mutationen ausmacht und zusätzlich auch einmal unter den deutschen Patienten identifiziert wurde, wurde bei elf brasilianischen Patienten als homozygote Veränderung im *ATP7B*-Gen entdeckt. Diese Mutation wurde bereits im Zusammenhang mit Patienten aus Gran Canaria, wo die Mutation ihren Ursprung haben könnte, berichtet [103]. Außerdem wurde von Deguti *et al.* berichtet, dass bei Patienten mit dieser Mutation vermehrt eine Nephrokalzinose beobachtet wurde, was dort aber nicht in zwingendem Zusammenhang gesehen wird. Wie bei der 3402delC-Mutation bereits erwähnt, stellte Deguti *et al.*, welche unter anderem dieselben Patienten mit dieser Mutation beschrieb, generell eine deutliche Heterogenität des klinischen Bildes bei Patienten des selben Genotyps fest. [78, 103]. Zwei der untersuchten Patienten, die genotypisch homozygot für diese Mutation sind, sind Frauen, weitere sechs sind Männer. Von sieben der Patienten ist die Primärsymptomatik bekannt: Drei Patienten leiden an der neurologischen und zwei an der hepatischen Manifestation des Morbus Wilson, während weitere zwei Patienten zum Zeitpunkt der Diagnostik asymptomatisch waren. Allein diese Beobachtung bestätigt die von Deguti *et al.* bereits benannte Heterogenität des Phänotyps. Das Alter der Erstsymptomatik liegt unter fünf Patienten, von denen Informationen bezüglich dessen vorhanden sind, bei 15,6 Jahren, wobei erstaunlicherweise der durchschnittliche Zeitpunkt der Erstsymptomatik bei den Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik (17,7) später ist, als bei den Patienten mit einer hepatischen Primärsymptomatik (14,5). Aufgrund der relativ kleinen Patientenzahl ist allerdings anzunehmen, dass dieses Ergebnis nicht als generelle Tendenz zu werten ist, sondern eher individuelle Unterschiede herausstellt. Von vier Patienten ist die Existenz eines Kayser-Fleischer-Ring bekannt, während bei anderen drei die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Rings ausgeschlossen wurde. Bei sechs Patienten ist ein familiäre Vorgeschichte bekannt. Die Coeruloplasmin-Serum-Konzentration ist durchschnittlich auf 24,1% der Konzentration eines Gesunden verringert. Die Serum-Kupfer-Konzentrationen dieser Patienten sind durchschnittlich auf 68,9% der Konzentration eines Gesunden verringert, während die Urin-Kupfer-Konzentrationen durchschnittlich auf das 2,4fache erhöht sind. Eine genauere Betrachtung der

Laborparameter bezüglich der Primärsymptomatik ist bei den Patienten mit dieser homozygoten Mutation aufgrund der relativ kleinen Patientenzahl nicht möglich.

Vergleicht man die drei oben beschriebenen Mutationen, fällt auf, dass sich die H1069Q-Mutation in ihrer phänotypischen Ausprägung besonders bezüglich des Alters der Erstmanifestation und der Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen von den anderen beiden Mutationen unterscheidet. Die Tatsache, dass sowohl die H1069Q-Mutation als auch die L708P-Mutation zu den *missense*-Mutationen gehört, hätte vermuten lassen, dass sich die Mutationen in ihrem phänotypischen Bild mehr ähneln, als sie es tatsächlich tun. Die *frameshift*-Mutation 3402delC, von welcher erwartet werden könnte, dass sie sich, verglichen mit den anderen beiden Mutationen, in ihrem phänotypischen Bild von beiden unterscheidet, ähnelt bezüglich des Alters der Erstsymptomatik und der durchschnittlichen Coeruloplasmin-Serum-Konzentration der L708P-Mutation. Die Tatsache, dass die 3402delC- und die L708P-Mutation hauptsächlich unter den Patienten Brasiliens identifiziert wurde, führt zu der Annahme, dass die Krankheit auch durch Umgebungsfaktoren und andere äußere Umstände beeinflusst wird. Deguti *et al.* sprach aufgrund der phänotypischen Heterogenität unter Patienten mit dem selben Phänotyp bereits an, dass Umweltfaktoren und genetische und epigenetische Faktoren diesbezüglich durchaus eine Rolle spielen können. Bohnen und Kaffee sind Nahrungsmittel mit einem hohen Kupfergehalt, welche in Brasilien viel verzehrt werden [78] und was sich dementsprechend phänotypisch auswirken könnte.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchung bezüglich eines Kayser-Fleischer-Ringes stellt sich heraus, dass bei der Mehrheit der Patienten, bei denen eine diesbezügliche Untersuchung stattgefunden hat, ein solcher auch vorgefunden wurde. 100% der Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik, die diesbezüglich untersucht wurden, hatten zum Zeitpunkt der Diagnostik einen Kayser-Fleischer-Ring. Bei der Mehrheit der Patienten mit einer hepatischen und einer gemischten Primärsymptomatik, also sowohl einer hepatischen als auch einer neurologischen, wurde die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes nachgewiesen. Bei der Mehrzahl der zum Zeitpunkt der Diagnostik asymptomatischen Patienten wurde kein Kayser-Fleischer-Ring diagnostiziert. Ferenci beschreibt, dass ein Kayser-Fleischer-Ring in 95% der Fälle unter Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik vorhanden ist, während er bei Patienten ohne neurologische Symptomatik nur in 50 bis 60% der Fälle auszumachen ist und bei asymptomatischen Patienten nur in 10% der Fälle diagnostiziert wird [90]. Die in dieser Arbeit angegebenen Tendenzen bezüglich der Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes innerhalb der

Patientengruppen unterschiedlicher Primärsymptomatik kommt dem Ergebnis von Ferenci sehr nah, was für die Realität dieser Ergebnisse spricht. Shah *et al.* kam zu einem anderen Ergebnis. Unter den von ihm betrachteten Patienten war bei jedem unbehandelten Patienten unabhängig von der krankheitsverursachenden Mutation zum Zeitpunkt der Diagnostik eine Kupfer-Ablagerung in der Kornea zu erkennen [64]. Caca *et al.* betrachtete die Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes nur bezüglich des genotypischen Bildes. Er sah Unterschiede in der Präsenz eines Kayser-Fleischer-Ringes bei H1069Q Homozygoten (82%), compound Heterozygoten (62%) und Patienten mit anderen Mutationen (31%), wobei er sich nicht auf die Verteilung innerhalb der Patientengruppen der einzelnen Primärsymptomatik bezieht [31]. Abschließend ist zu sagen, dass ein Kayser-Fleischer-Ring bei einem Großteil der an Morbus Wilson erkrankten Patienten zu finden ist. Unterschiede der Häufigkeit der Diagnostik eines solchen Kayser-Fleischer-Ringes können sich höchstwahrscheinlich durch den Schwerpunkt der diagnostizierenden Klinik ergeben, so dass z.B. in neurologischen Zentren mehr Patienten mit einem Kayser-Fleischer-Ring diagnostiziert werden.

Die oben bereits erwähnte Überlegung von Deguti *et al.*, dass andere genetische Faktoren außerhalb des *ATP7B*-Gens Einfluss auf den Phänotyp des Morbus Wilson haben können [78], führte zur genetischen Untersuchung des *HFE*-Gen und des *APOE*-Locus in Hinblick auf mögliche Auswirkungen auf die Primärsymptomatik des Morbus Wilson.

Im *HFE*-Gen sind zwei Mutationen bekannt, die C282Y- und die H63D-Mutation, welche zu einer Störung des Eisenstoffwechsels führen können. Patienten die C282Y homozygot oder C282Y/H63D compound heterozygot sind, erkranken an der hereditären Hämochromatose [84]. Die Hereditäre Hämochromatose ist mit einer Prävalenz von 1:205 bis 1:410 die häufigste Erbkrankheit [85]. Die intestinale Eisenresorption ist hierbei gestört, was zu einer Eisenüberlagerung vieler Organe, insbesondere auch der Leber, führt, und damit toxische Zellschädigungen bis hin zum Zelluntergang verursachen kann [86]. Patienten, die nur die C282Y-Mutation aufweisen, weisen normalerweise keine vermehrte Eisenspeicherung auf, solange keine anderen Krankheiten der Leber, wie z.B. Hepatitis C oder eine alkoholinduzierte Leberschädigung, vorhanden sind [84, 104]

Tatsächlich zeigten sich unterschiedliche Tendenzen bezüglich der Primärsymptomatik des Morbus Wilson beim alleinigen heterozygoten Nachweis der C282Y-Mutation gegenüber dem heterozygoten oder homozygoten Nachweis der H63D-Mutation im *HFE*-Gen. Während keiner der C282Y heterozygoten Patienten eine rein hepatische Primärsymptomatik aufweist und der Großteil der Patienten an der primär neurologischen Form des Morbus Wilson leidet, zeigt sich

unter den H63D heterozygoten und homozygoten Patienten ein relativ ausgeglichenes, leicht zur hepatischen Primärsymptomatik neigendes, Verhältnis zwischen neurologischer und hepatischer Primärsymptomatik. Zu den C282Y/H63D compound heterozygoten Patienten, bei denen durch den Nachweis dieser genetischen Veränderung zusätzlich zum Morbus Wilson die hereditäre Hämochromatose diagnostiziert wurde, kann mangels Daten keine Tendenz der Primärsymptomatik angegeben werden. Bekannt ist von einem Patienten, dass er unter einer neurologischen Primärsymptomatik leidet.

Interessant ist bei diesem Ergebnis, dass die mögliche Überlegung, dass eine oder zwei Mutationen im *HFE*-Gen bei Morbus Wilson Patienten aufgrund der möglichen doppelten Veränderung des Leberstoffwechsels eher mit der hepatischen Manifestation des Morbus Wilson einhergehen, hier nicht bestätigt wird. Dies bestärkt die von Morisson *et al.* beschriebene Aussage, dass die alleinige heterozygote C282Y-Mutation im *HFE*-Gen nicht zu einer Störung des Eisenstoffwechsels führt [84, 104]. Erhardt *et al.* berichtete, dass bei Patienten, bei denen der Morbus Wilson kontrolliert ist, nur ein homozygotes Vorhandensein der C282Y-Mutation den Eisenstoffwechsel beeinflusst [83].

Der *APOE*-Locus wird aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeiten des Genotyps und der damit verbundenen unterschiedlichen Apolipoproteine E und deren Auswirkung auf das Nervensystem untersucht. Während die Anwesenheit des Apolipoprotein E 4 eine degenerative Erkrankungen des ZNS wie z.B. Morbus Alzheimer verstärkt, wird dem Apolipoprotein E 3 eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben. Schiefermeier *et al.*, Stapelbroeck *et al.* und Wang *et al.* berichteten von einem verhältnismäßig späten Erstmanifestationsalter bei Patienten mit dem *APOE*-Genotyp 3/3 verglichen mit anderen *APOE*-Genotypen [77, 81, 82].

Bei der genetischen Untersuchung des *APOE*-Genotyps im Zusammenhang mit der Primärsymptomatik und dem Zeitpunkt der Erstmanifestation ergaben sich nur für die Genotypen 3/3 und 4/3 aufgrund ausreichender Daten repräsentative Ergebnisse. Unter den Patienten beider *APOE*-Genotypen zeigte sich ein heterogenes Bild bezüglich der Primärsymptomatik, welches allerdings durch ein leichtes Überwiegen der Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik gekennzeichnet ist. Interessant ist, dass bei verhältnismäßig vielen asymptomatischen Patienten einer der beiden *APOE*-Genotypen identifiziert wurde, was die Beobachtung von Schiefermeier *et al.*, welche eine neuroprotektive Wirkung des Apolipoproteins E 3 vermutete, unterstützen könnte [81]. Das Alter der Erstsymptomatik lag durchschnittlich unter den Patienten des *APOE*-Genotyps 3/3 bei  $18,4 \pm 7,2$  Jahren, was verglichen mit den Patienten des *APOE*-Genotyps 4/3 verhältnismäßig spät ist, da diese Patienten durchschnittlich im Alter von  $14,4 \pm 5,1$  Jahren erkrankten. Auch hier bestätigt sich die

Aussage von Schiefermeier *et al.* und Stapelbroeck *et al.*, welche dem Vorhandensein des Apolipoprotein E 3 eine neuroprotektive Funktion und somit einen späteren Krankheitsbeginn zuschreiben [77, 81].

Um genauere Erkenntnisse bezüglich möglicher Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sammeln zu können, müsste man größere Patientenkollektive, welche genotypisch homozygot die gleiche Mutation im *ATP7B*-Gen tragen, phänotypisch untersuchen, was sich aufgrund der großen Heterogenität im *ATP7B*-Gen unter den an Morbus Wilson erkrankten Patienten sehr schwierig gestaltet. Trotzdem sollten diese Untersuchungen angestrebt werden, um durch ein genaueres Verständnis der phänotypischen Ausprägung einzelner Mutationen oder Mutationsarten die Erkrankung schnellstmöglich zu erkennen und adäquat zu behandeln. Der Vermutung, dass Umweltfaktoren, Ernährung und andere Gen-Loci Einfluss auf die phänotypische Präsentation des Morbus Wilson haben können, sollte weiterhin nachgegangen und genauer untersucht werden. Auch dieser Untersuchung wäre zuträglich, Patienten des gleichen Genotyps in Hinblick auf die gerade erwähnten Faktoren zu untersuchen und diesbezüglich zu vergleichen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Dissertation beschäftigte sich mit der Untersuchung möglicher Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei Patienten mit diagnostiziertem Morbus Wilson.

Morbus Wilson ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, welche durch Mutationen im *ATP7B*-Gen auf dem Chromosom 13 bedingt ist. Bisher wurden über 250 verschiedene Mutationen identifiziert, welche durch Veränderungen des *ATP7B*-Gens die Funktion der kupfertransportierenden ATPase, für die das Gen kodiert, beeinträchtigen können. Durch diese Störung des Kupfermetabolismus kann es zu toxischer Kupferakkumulation und damit verbundenen Funktionsstörungen der Leber, des ZNS, der Augen, der Nieren und anderer Organe kommen.

Insgesamt 718 Personen wurden als Index-Patienten oder als Verwandte dieser Index-Patienten genetisch untersucht, wobei 146 verschiedene Mutationen im *ATP7B*-Gen identifiziert wurden. Unter diesen befanden sich 61 bereits bekannte und 85 bisher noch nicht beschriebene Mutationen. Dieses Ergebnis bestätigt die große Heterogenität krankheitsverursachender Mutationen im *ATP7B*-Gen.

Wie erwartet ergaben sich innerhalb der einzelnen Länder Unterschiede bezüglich der Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Mutationen. Während in den mittel- und osteuropäischen Ländern die H1069Q-Mutation am häufigsten identifiziert wurde, fand sich in Ägypten, Iran und Griechenland ein sehr heterogenes Mutationsspektrum, dem keine eindeutige Gewichtung auf eine bestimmte Mutation zu entnehmen war. In Brasilien hatten die Mutationen 3402delC und L708P die höchste Allel-Frequenz, während in China die Mutationen R778L und P992L am häufigsten identifiziert wurden.

Aufgrund der großen Heterogenität des Genotyps im *ATP7B*-Gen gestaltete sich die Untersuchung möglicher Genotyp-Phänotyp-Korrelationen schwierig. In dieser Arbeit wurden 33 unterschiedliche Mutationen phänotypisch betrachtet. Aufgrund der oft sehr kleinen Patientengruppen, die sich aus Patienten des gleichen homozygoten Genotyps zusammensetzen, wurden zunächst generell *missense*-Mutationen in ihrem phänotypischen Bild gegenüber der phänotypischen Ausprägung anderer Mutationen betrachtet. Tendenziell konnte hierbei beobachtet werden, dass homozygote Träger einer *missense*-Mutation gegenüber denen mit einer *nonsense*- oder *frameshift*-Mutation weniger stark verringerte Coeruloplasmin-Serum-Konzentrationen und Kupfer-Serum-Konzentrationen aufweisen. Homozygote Träger einer *missense*-Mutation leiden tendentiell öfter unter einer neurologischen Primärsymptomatik,

während andere Mutationsarten phänotypisch öfter mit einer hepatischen Primärsymptomatik einhergehen. Genotyp-Phänotyp-Korrelationen waren aufgrund der ausreichend großen Patientenzahl nur für die H1069Q-Mutation, die 3402delC- und mit Einschränkung für die L708P-Mutation zu erkennen. Die H1069Q-Mutation geht nach den Beobachtungen dieser Arbeit mit verhältnismäßig milden Veränderungen der Laborparameter, einem ausgeglichenen Geschlechterverhältnis und einem verhältnismäßig späten Krankheitsbeginn ( $26,6 \pm 10,3$  Jahre) einher, welcher unter den Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik, die unter den H1069Q homozygoten Patienten überwiegt, zu einem noch späteren Alter der Erstmanifestation führt ( $30,8 \pm 8,7$  Jahre). Die 3402delC-Mutation führt verglichen mit der H1069Q-Mutation phänotypisch zu einem früheren Zeitpunkt der Erstsymptomatik ( $15,8 \pm 2,4$  Jahre) und zu stärkeren Veränderungen der betrachteten Laborparameter. Das Geschlechterverhältnis ist auch hier ausgeglichen. Die neurologische Primärsymptomatik überwiegt auch unter den Patienten mit dieser homozygoten Mutation. Die L708P-Mutation führt ebenfalls zu einem relativ frühen Alter der Erstmanifestation (15,6 Jahre).

Ein Kayser-Fleischer-Ring ist beim Großteil der symptomatischen Patienten vorhanden, wobei er unter den Patienten mit einer neurologischen Primärsymptomatik, die diesbezüglich untersucht und in dieser Arbeit betrachtet wurden, immer diagnostiziert wurde.

Die Überlegung, dass das alleinige Vorhandensein der C282Y- oder der H63D-Mutation im *HFE*-Gen zu einer eventuelle Beeinflussung des Phänotyps des Morbus Wilson in Hinblick auf ein verstärktes Auftreten einer hepatischen Primärsymptomatik führt, kann hier nicht bestätigt werden. Der *APOE*-Genotyp kann, nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu urteilen, Einfluss auf die Primärsymptomatik haben. So haben Patienten mit dem Genotyp *APOE* 3/3 einen späteren Krankheitsbeginn. Außerdem sind verhältnismäßig viele Patienten mit diesem Genotyp asymptomatisch, was die Annahme der neuroprotektiven Wirkung des Apolipoprotein E 3 bestätigt.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Mercer, J. F. und Llanos, R. M. (2003): Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals, *J Nutr* 133 [5 Suppl 1], Seite 1481S-4S.
- [2] Loudianos, G. und Gitlin, J. D. Wilson's disease, Seite 353-64.
- [3] Tao, T. Y. und Gitlin, J. D. (2003): Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease, *Hepatology* 37 [6], Seite 1241-7.
- [4] Gitlin, J. D. (2003): Wilson disease, *Gastroenterology* 125 [6], Seite 1868-77.
- [5] Langner, C. und Denk, H. (2004): Wilson disease, *Virchows Arch* 445 [2], Seite 111-8. Epub 2004 Jun 17.
- [6] El-Youssef, M. (2003): Wilson disease, *Mayo Clin Proc* 78 [9], Seite 1126-36.
- [7] Schaefer, M.; Hopkins, R. G.; Failla, M. L. und Gitlin, J. D. (1999): Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver, *Am J Physiol* 276 [3 Pt 1], Seite G639-46.
- [8] Sternlieb, I. und Scheinberg, I. H. (1972): Radiocopper in diagnosing liver disease, *Semin Nucl Med* 2 [2], Seite 176-88.
- [9] Hellman, N. E. und Gitlin, J. D. Ceruloplasmin metabolism and function, Seite 439-58. Epub 2002 Apr 4.
- [10] Bingham, M. J.; Ong, T. J.; Ingledew, W. J. und McArdle, H. J. (1996): ATP-dependent copper transporter, in the Golgi apparatus of rat hepatocytes, transports Cu(II) not Cu(I), *Am J Physiol* 271 [5 Pt 1], Seite G741-6.
- [11] Nagano, K.; Nakamura, K.; Urakami, K. I.; Umeyama, K.; Uchiyama, H.; Koiwai, K.; Hattori, S.; Yamamoto, T.; Matsuda, I. und Endo, F. (1998): Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease, *Hepatology* 27 [3], Seite 799-807.
- [12] Walker, J. M.; Tsivkovskii, R. und Lutsenko, S. (2002): Metallochaperone Atox1 transfers copper to the NH<sub>2</sub>-terminal domain of the Wilson's disease protein and regulates its catalytic activity, *J Biol Chem* 277 [31], Seite 27953-9. Epub 2002 May 23.
- [13] Mercer, J. F. (2001): The molecular basis of copper-transport diseases, *Trends Mol Med* 7 [2], Seite 64-9.
- [14] Payne, A. S.; Kelly, E. J. und Gitlin, J. D. (1998): Functional expression of the Wilson disease protein reveals mislocalization and impaired copper-dependent trafficking of the common H1069Q mutation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [18], Seite 10854-9.
- [15] Schmidt, H. H.-J. (2003): Diagnostik und Therapie des Morbus Wilson, *Deutsches ÄrzteBlatt* 4, Seite A-192-197.
- [16] Stremmel, W.; Meyerrose, K. W.; Niederau, C.; Hefter, H.; Kreuzpaintner, G. und Strohmeyer, G. (1991): Wilson disease: clinical presentation, treatment, and survival, *Ann Intern Med* 115 [9], Seite 720-6.
- [17] Steindl, P.; Ferenci, P.; Dienes, H. P.; Grimm, G.; Pabinger, I.; Madl, C.; Maier-Dobersberger, T.; Herneth, A.; Dragosics, B.; Meryn, S.; Knoflach, P.; Granditsch, G. und Gangl, A. (1997): Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge, *Gastroenterology* 113 [1], Seite 212-8.
- [18] Mohler, M.; Wagner, V. und Stremmel, W. (1998): [Hereditary liver diseases. Recent molecular genetic aspects], *Dtsch Med Wochenschr* 123 [15], Seite 466-71.
- [19] Giagheddu, A.; Demelia, L.; Puggioni, G.; Nurchi, A. M.; Contu, L.; Pirari, G.; Deplano, A. und Rachele, M. G. (1985): Epidemiologic study of hepatolenticular degeneration (Wilson's disease) in Sardinia (1902-1983), *Acta Neurol Scand* 72 [1], Seite 43-55.



- [20] Wilson, SAK (1912): Progressiv lenticular degeneration: A familiar nervous disease associated with cirrhosis of the liver, *Brain* 34, Seite 295-509.
- [21] Wilson, SAK (1912): Progressiv lenticular degeneration: a familiar nervous disease associated with cirrhosis of the liver, *Lancet* 1, Seite 1115-1119.
- [22] Walshe, JM (1956): Penicillamin, a new oral therapy for Wilson's Disease, *Am J Med* 21, Seite 487-492.
- [23] Frydman, M.; Bonne-Tamir, B.; Farrer, L. A.; Conneally, P. M.; Magazanik, A.; Ashbel, S. und Goldwicht, Z. (1985): Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [6], Seite 1819-21.
- [24] Bull, P. C.; Thomas, G. R.; Rommens, J. M.; Forbes, J. R. und Cox, D. W. (1993): The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene, *Nat Genet* 5 [4], Seite 327-37.
- [25] Tanzi, R. E.; Petrukhin, K.; Chernov, I.; Pellequer, J. L.; Wasco, W.; Ross, B.; Romano, D. M.; Parano, E.; Pavone, L.; Brzustowicz, L. M. und et al. (1993): The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene, *Nat Genet* 5 [4], Seite 344-50.
- [26] Petrukhin, K.; Lutsenko, S.; Chernov, I.; Ross, B. M.; Kaplan, J. H. und Gilliam, T. C. (1994): Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions, *Hum Mol Genet* 3 [9], Seite 1647-56.
- [27] Petrukhin, K.; Fischer, S. G.; Pirastu, M.; Tanzi, R. E.; Chernov, I.; Devoto, M.; Brzustowicz, L. M.; Cayanis, E.; Vitale, E.; Russo, J. J. und et al. (1993): Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene, *Nat Genet* 5 [4], Seite 338-43.
- [28] Cox, Diane Wilson Disease Database, [www.medgen.med.ualberta.ca/database.html](http://www.medgen.med.ualberta.ca/database.html)
- [29] Czlonkowska, A.; Rodo, M.; Gajda, J.; Ploos van Amstel, H. K.; Juyn, J. und Houwen, R. H. (1997): Very high frequency of the His1069Gln mutation in Polish Wilson disease patients, *J Neurol* 244 [9], Seite 591-2.
- [30] Maier-Dobersberger, T.; Ferenci, P.; Polli, C.; Balac, P.; Dienes, H. P.; Kaserer, K.; Datz, C.; Vogel, W. und Gangl, A. (1997): Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction, *Ann Intern Med* 127 [1], Seite 21-6.
- [31] Caca, K.; Ferenci, P.; Kuhn, H. J.; Polli, C.; Willgerodt, H.; Kunath, B.; Hermann, W.; Mossner, J. und Berr, F. (2001): High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis, *J Hepatol* 35 [5], Seite 575-81.
- [32] Riordan, S. M. und Williams, R. (2001): The Wilson's disease gene and phenotypic diversity, *J Hepatol* 34 [1], Seite 165-71.
- [33] Britton, R. S. (1996): Metal-induced hepatotoxicity, *Semin Liver Dis* 16 [1], Seite 3-12.
- [34] Mansouri, A.; Gaou, I.; Fromenty, B.; Berson, A.; Letteron, P.; Degott, C.; Erlinger, S. und Pessayre, D. (1997): Premature oxidative aging of hepatic mitochondrial DNA in Wilson's disease, *Gastroenterology* 113 [2], Seite 599-605.
- [35] Schilsky, M. L. (2002): Diagnosis and treatment of Wilson's disease, *Pediatr Transplant* 6 [1], Seite 15-9.
- [36] Buiakova, O. I.; Xu, J.; Lutsenko, S.; Zeitlin, S.; Das, K.; Das, S.; Ross, B. M.; Mekios, C.; Scheinberg, I. H. und Gilliam, T. C. (1999): Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation, *Hum Mol Genet* 8 [9], Seite 1665-71.
- [37] Wang, X. W.; Hussain, S. P.; Huo, T. I.; Wu, C. G.; Forgues, M.; Hofseth, L. J.; Brechot, C. und Harris, C. C. (2002): Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma, *Toxicology* 181-182, Seite 43-7.

- [38] Hussain, S. P.; Raja, K.; Amstad, P. A.; Sawyer, M.; Trudel, L. J.; Wogan, G. N.; Hofseth, L. J.; Shields, P. G.; Billiar, T. R.; Trautwein, C.; Hohler, T.; Galle, P. R.; Phillips, D. H.; Markin, R.; Marrogi, A. J. und Harris, C. C. (2000): Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [23], Seite 12770-5.
- [39] Gollan, J. L. und Gollan, T. J. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects, Seite 28-36.
- [40] Harada, M. (2002): Wilson disease, *Med Electron Microsc* 35 [2], Seite 61-6.
- [41] Stremmel, W. (1992): [Diagnostic characteristics of acute hepatic failure in fulminant Wilson's disease], *Z Gastroenterol* 30 [2], Seite 162.
- [42] Sternlieb, I. (1984): Wilson's disease: indications for liver transplants, *Hepatology* 4 [1 Suppl], Seite 15S-17S.
- [43] Nazer, H.; Ede, R. J.; Mowat, A. P. und Williams, R. (1986): Wilson's disease: clinical presentation and use of prognostic index, *Gut* 27 [11], Seite 1377-81.
- [44] Kenngott, S. und Bilzer, M. (1998): Inverse correlation of serum bilirubin and alkaline phosphatase in fulminant Wilson's disease, *J Hepatol* 29 [4], Seite 683.
- [45] Ferenci, P. (2004): Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease, *Aliment Pharmacol Ther* 19 [2], Seite 157-65.
- [46] Hermann, W.; Tietze, F.; Villmann, T.; Grahmann, F. und Wagner, A. (2000): [Clinical and fine motor therapy assessment in Wilson disease], *Nervenarzt* 71 [12], Seite 970-4.
- [47] Hermann, W.; Gunther, P.; Hahn, S.; Dietrich, J.; Villmann, T.; Eggers, B. und Wagner, A. (2002): [Cerebral MRI and evoked potentials in Wilson disease. Comparison of findings in patients with neurological follow-up], *Nervenarzt* 73 [4], Seite 349-54.
- [48] Becker, M. und Rohrschneider, K. (1997): [Ocular manifestations of Wilson disease], *Ophthalmologie* 94 [11], Seite 865-70.
- [49] Fleischer, B. (1903): Zwei weitere Fälle grünlicher Verfärbung der Kornea, *Klin Mbl Augenheilk* 41, Seite 489-491.
- [50] Kayser, B. (1902): Über einen Fall von angeborener grünlicher Verfärbung der Kornea, *Klin Mbl Augenheilk* 40, Seite 22-25.
- [51] Saito, T. (1987): Presenting symptoms and natural history of Wilson disease, *Eur J Pediatr* 146 [3], Seite 261-5.
- [52] Walshe, J. M. und Yealland, M. (1992): Wilson's disease: the problem of delayed diagnosis, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55 [8], Seite 692-6.
- [53] Gitlin, N. (1998): Wilson's disease: the scourge of copper, *J Hepatol* 28 [4], Seite 734-9.
- [54] Schilsky, M. L. und Sternlieb, I. (1997): Overcoming obstacles to the diagnosis of Wilson's disease, *Gastroenterology* 113 [1], Seite 350-3.
- [55] Ludwig, J.; Moyer, T. P. und Rakela, J. (1994): The liver biopsy diagnosis of Wilson's disease. Methods in pathology, *Am J Clin Pathol* 102 [4], Seite 443-6.
- [56] Oder, W.; Prayer, L.; Grimm, G.; Spatt, J.; Ferenci, P.; Kollegger, H.; Schneider, B.; Gangl, A. und Deecke, L. (1993): Wilson's disease: evidence of subgroups derived from clinical findings and brain lesions, *Neurology* 43 [1], Seite 120-4.
- [57] Takahashi, W.; Yoshii, F. und Shinohara, Y. (1996): Reversible magnetic resonance imaging lesions in Wilson's disease: clinical-anatomical correlation, *J Neuroimaging* 6 [4], Seite 246-8.
- [58] Cauza, E.; Ulrich-Pur, H.; Polli, C.; Gangl, A. und Ferenci, P. (2000): Distribution of patients with Wilson disease carrying the H1069Q mutation in Austria, *Wien Klin Wochenschr* 112 [13], Seite 576-9.
- [59] Witt, H. und Landt, O. (2001): Rapid detection of the Wilson's disease H1069Q mutation by melting curve analysis with the LightCycler, *Clin Chem Lab Med* 39 [10], Seite 953-5.

- [60] Figus, A.; Angius, A.; Loudianos, G.; Bertini, C.; Dessi, V.; Loi, A.; Deiana, M.; Lovicu, M.; Olla, N.; Sole, G. und et al. (1995): Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations, *Am J Hum Genet* 57 [6], Seite 1318-24.
- [61] Genschel, J.; Sommer, G.; Haas, R.; Buettner, C.; Bochow, B.; Manns, M.; Lochs, H. und Schmidt, H. H. (2000): Three novel mutations, c314C>A, C778insC, and c1285+2T>A, in exon 2 of the Wilson disease gene, *Hum Mutat* 16 [3], Seite 278.
- [62] Genschel, J.; Czlonkowska, A.; Sommer, G.; Buettner, C.; Bochow, B.; Lochs, H. und Schmidt, H. (2001): Three novel mutations (P760L, L1305P, Q1351Stop) causing Wilson disease, *Hum Mutat* 17 [2], Seite 156.
- [63] Haas, R.; Gutierrez-Rivero, B.; Knoche, J.; Boker, K.; Manns, M. P. und Schmidt, H. H. Mutation analysis in patients with Wilson disease: identification of 4 novel mutations. Mutation in brief no. 250. Online, Seite 88.
- [64] Shah, A. B.; Chernov, I.; Zhang, H. T.; Ross, B. M.; Das, K.; Lutsenko, S.; Parano, E.; Pavone, L.; Evgrafov, O.; Ivanova-Smolenskaya, I. A.; Anneren, G.; Westermarck, K.; Urrutia, F. H.; Penchaszadeh, G. K.; Sternlieb, I.; Scheinberg, I. H.; Gilliam, T. C. und Petrukhin, K. (1997): Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses, *Am J Hum Genet* 61 [2], Seite 317-28.
- [65] Cichon, G.; Schmidt, H. H.; Benhidjeb, T.; Loser, P.; Ziemer, S.; Haas, R.; Grewe, N.; Schnieders, F.; Heeren, J.; Manns, M. P.; Schlag, P. M. und Strauss, M. (1999): Intravenous administration of recombinant adenoviruses causes thrombocytopenia, anemia and erythroblastosis in rabbits, *J Gene Med* 1 [5], Seite 360-71.
- [66] Cichon, G.; Boeckh-Herwig, S.; Schmidt, H. H.; Wehnes, E.; Muller, T.; Pring-Akerblom, P. und Burger, R. (2001): Complement activation by recombinant adenoviruses, *Gene Ther* 8 [23], Seite 1794-800.
- [67] Ott, M.; Schmidt, H. H.; Cichon, G. und Manns, M. P. Emerging therapies in hepatology: liver-directed gene transfer and hepatocyte transplantation, Seite 81-7.
- [68] Condomina, J.; Zornoza-Sabina, T.; Granero, L. und Polache, A. (2002): Kinetics of zinc transport in vitro in rat small intestine and colon: interaction with copper, *Eur J Pharm Sci* 16 [4-5], Seite 289-95.
- [69] Lee, D. Y.; Brewer, G. J. und Wang, Y. X. (1989): Treatment of Wilson's disease with zinc. VII. Protection of the liver from copper toxicity by zinc-induced metallothionein in a rat model, *J Lab Clin Med* 114 [6], Seite 639-45.
- [70] Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Grider, A.; Nostrant, T.; Cousins, R. J. und Brewer, G. J. (1992): Treatment of Wilson's disease with zinc: X. Intestinal metallothionein induction, *J Lab Clin Med* 120 [3], Seite 380-6.
- [71] Scheinberg, I. H.; Jaffe, M. E. und Sternlieb, I. (1987): The use of trientine in preventing the effects of interrupting penicillamine therapy in Wilson's disease, *N Engl J Med* 317 [4], Seite 209-13.
- [72] Brewer, G. J.; Johnson, V.; Dick, R. D.; Kluin, K. J.; Fink, J. K. und Brunberg, J. A. (1996): Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate. II. Initial therapy in 33 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy, *Arch Neurol* 53 [10], Seite 1017-25.
- [73] Panagiotakaki, E.; Tzetis, M.; Manolaki, N.; Loudianos, G.; Papatheodorou, A.; Manesis, E.; Nousia-Arvanitakis, S.; Syriopoulou, V. und Kanavakis, E. (2004): Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B), *Am J Med Genet A* 131A [2], Seite 168-73.
- [74] Frischmeyer, P. A. und Dietz, H. C. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease, Seite 1893-900.

- [75] Loudianos, G.; Kostic, V.; Solinas, P.; Lovicu, M.; Dessi, V.; Svetel, M.; Major, T. und Cao, A. (2003): Characterization of the molecular defect in the ATP7B gene in Wilson disease patients from Yugoslavia, *Genet Test* 7 [2], Seite 107-12.
- [76] Hermann, W.; Caca, K.; Eggers, B.; Villmann, T.; Clark, D.; Berr, F. und Wagner, A. Genotype correlation with fine motor symptoms in patients with Wilson's disease, Seite 97-101.
- [77] Stapelbroek, J. M.; Bollen, C. W.; van Amstel, J. K.; van Erpecum, K. J.; van Hattum, J.; van den Berg, L. H.; Klomp, L. W. und Houwen, R. H. (2004): The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis, *J Hepatol* 41 [5], Seite 758-63.
- [78] Deguti, M. M.; Genschel, J.; Cancado, E. L.; Barbosa, E. R.; Bochow, B.; Mucenic, M.; Porta, G.; Lochs, H.; Carrilho, F. J. und Schmidt, H. H. (2004): Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients, *Hum Mutat* 23 [4], Seite 398.
- [79] Wu, Z. Y.; Wang, N.; Lin, M. T.; Fang, L.; Murong, S. X. und Yu, L. (2001): Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in chinese patients with Wilson disease, *Arch Neurol* 58 [6], Seite 971-6.
- [80] Wu, Z.; Wang, N.; Murong, S. und Lin, M. (2000): Identification and analysis of mutations of the Wilson disease gene in Chinese population, *Chin Med J (Engl)* 113 [1], Seite 40-3.
- [81] Schiefermeier, M.; Kollegger, H.; Madl, C.; Polli, C.; Oder, W.; Kuhn, H.; Berr, F. und Ferenci, P. (2000): The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease, *Brain* 123 [Pt 3], Seite 585-90.
- [82] Wang, X. P.; Wang, X. H.; Bao, Y. C. und Zhou, J. N. (2003): Apolipoprotein E genotypes in Chinese patients with Wilson's disease, *QJM* 96 [7], Seite 541-2.
- [83] Erhardt, A.; Hoffmann, A.; Hefter, H. und Haussinger, D. (2002): HFE gene mutations and iron metabolism in Wilson's disease, *Liver* 22 [6], Seite 474-8.
- [84] Morrison, E. D. und Kowdley, K. V. (2000): Genetic liver disease in adults. Early recognition of the three most common causes, *Postgrad Med* 107 [2], Seite 147-52, 155, 158-9.
- [85] Schöffski O, Schmidtke J, Stuhmann M (1999): Towards the implementation of population-based hemochromatosis screening in Germany, *Genetics in Medicine* 1 [2], Seite 75.
- [86] Matern, S. (1994): Primäre Hämochromatose, Claasen M, Diehl V, Kochsiek K, *Innere Medizin* 3. neubearbeitete Auflage Seite 843-846, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
- [87] Feder, J. N.; Gnirke, A.; Thomas, W.; Tsuchihashi, Z.; Ruddy, D. A.; Basava, A.; Dormishian, F.; Domingo, R., Jr.; Ellis, M. C.; Fullan, A.; Hinton, L. M.; Jones, N. L.; Kimmel, B. E.; Kronmal, G. S.; Lauer, P.; Lee, V. K.; Loeb, D. B.; Mapa, F. A.; McClelland, E.; Meyer, N. C.; Mintier, G. A.; Moeller, N.; Moore, T.; Morikang, E.; Prass, C. E.; Quintana, L.; Starnes, S. M.; Schatzman, R. C.; Brunke, K. J.; Drayna, D. T.; Risch, N. J.; Bacon, B. R. und Wolff, R. K. (1996): A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis, *Nat Genet* 13 [4], Seite 399-408.
- [88] Hixson, J. E. und Vernier, D. T. (1990): Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI, *J Lipid Res* 31 [3], Seite 545-8.
- [89] Schmitz G., Hermann W. (1995): Labordiagnostik von Hyper- und Dyslipoproteinämien, Schwandt P., Richter W. O., *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen* Seite 488-519, Schattauer, Stuttgart, New York.
- [90] Ferenci, P. (2004): Pathophysiology and clinical features of Wilson disease, *Metab Brain Dis* 19 [3-4], Seite 229-39.

- [91] Velez-Pardo, C.; Rio, M. J.; Moreno, S.; Ramirez-Gomez, L.; Correa, G. und Lopera, F. (2004): New mutation (T1232P) of the ATP-7B gene associated with neurologic and neuropsychiatric dominance onset of Wilson's disease in three unrelated Colombian kindred, *Neurosci Lett* 367 [3], Seite 360-4.
- [92] Al Jumah, M.; Majumdar, R.; Al Rajeh, S.; Awada, A.; Al Zaben, A.; Al Traif, I.; Al Jumah, A. R. und Rehana, Z. (2004): A clinical and genetic study of 56 Saudi Wilson disease patients: identification of Saudi-specific mutations, *Eur J Neurol* 11 [2], Seite 121-4.
- [93] Ferenci, P. (1999): Wilson's disease, *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31 [5], Seite 416-25.
- [94] Ivanova-Smolenskaya, I. A.; Ovchinnikov, I. V.; Karabanov, A. V.; Deineko, N. L.; Poleshchuk, V. V.; Markova, E. D. und Illarioshkin, S. N. (1999): The His1069Gln mutation in the ATP7B gene in Russian patients with Wilson disease, *J Med Genet* 36 [2], Seite 174.
- [95] Dedoussis, G. V.; Genschel, J.; Sialvera, T. E.; Bochow, B.; Manolaki, N.; Manios, Y.; Tsafantakis, E. und Schmidt, H. (2005): Wilson disease: high prevalence in a mountaineous area of crete, *Ann Hum Genet* 69 [Pt 3], Seite 268-74.
- [96] Loudianos, G.; Lovicu, M.; Solinas, P.; Kanavakis, E.; Tzetis, M.; Manolaki, N.; Panagiotakaki, E.; Karpathios, T. und Cao, A. Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and the identification of six novel mutations, Seite 399-402.
- [97] Vrabelova, S.; Letocha, O.; Borsky, M. und Kozak, L. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease.
- [98] Tzetis, M.; Efthymiadou, A.; Doudounakis, S. und Kanavakis, E. (2001): Qualitative and quantitative analysis of mRNA associated with four putative splicing mutations (621+3A-->G, 2751+2T-->A, 296+1G-->C, 1717-9T-->C-D565G) and one nonsense mutation (E822X) in the CFTR gene, *Hum Genet* 109 [6], Seite 592-601. Epub 2001 Nov 6.
- [99] Thomas, G. R.; Forbes, J. R.; Roberts, E. A.; Walshe, J. M. und Cox, D. W. (1995): The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences, *Nat Genet* 9 [2], Seite 210-7.
- [100] Seidel, J.; Caca, K.; Schwab, S. G.; Berr, F.; Wildenauer, D. B.; Mentzel, H. J.; Horn, N. und Kauf, E. Disturbed copper transport in humans. Part 2: mutations of the ATP7B gene lead to Wilson disease (WD), Seite OL149-57.
- [101] Houwen, R. H.; Juyn, J.; Hoogenraad, T. U.; Ploos van Amstel, J. K. und Berger, R. (1995): H714Q mutation in Wilson disease is associated with late, neurological presentation, *J Med Genet* 32 [6], Seite 480-2.
- [102] Waldenstrom, E.; Lagerkvist, A.; Dahlman, T.; Westermark, K. und Landegren, U. (1996): Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing, *Genomics* 37 [3], Seite 303-9.
- [103] Garcia-Villarreal, L.; Daniels, S.; Shaw, S. H.; Cotton, D.; Galvin, M.; Geskes, J.; Bauer, P.; Sierra-Hernandez, A.; Buckler, A. und Tugores, A. (2000): High prevalence of the very rare Wilson disease gene mutation Leu708Pro in the Island of Gran Canaria (Canary Islands, Spain): a genetic and clinical study, *Hepatology* 32 [6], Seite 1329-36.
- [104] Bulaj, Z. J.; Griffen, L. M.; Jorde, L. B.; Edwards, C. Q. und Kushner, J. P. (1996): Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis, *N Engl J Med* 335 [24], Seite 1799-805.

## 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
µmol	Mikromol
A/Ala	Alanin
ApoCP	Apocoeeruloplasmin
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C/Cys	Cystein
Ca.	Circa
conc.	concentration
CP	Coeruloplasmin
CT	Computertomographie
Cu	Kupfer
Cu	Kupfer
d	Tag
d.h.	das heisst
D/Asp	Aspartat
ddNTP	Didesoxinukleotide
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dITP	Desoxiinosintriphosphat
dl	Deziliter
DNA	desoxyribonucleid acid
dNTP	Desoxinukleotide
dNTP	Desoxinukleotide
E/Glu	Glutamat
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
F/Phe	Phenylalanin
g	Gramm
G/Gly	Glycin
h	Stunden
H/His	Histidin
HDL	high density lipoprpteins
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.NB	im Normbereich
I/Ile	Isoleucin
ins	Insertion
IVS	invariant sequence
K/Lys	Lysin

## Abkürzungsverzeichnis

---

kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
l	Liter
L/Leu	Leucin
LDL	low density lipoproteins
LTx	Lebertransplantation
M/Met	Methionin
mg	Milligramm
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
N/Asn	Aspargin
neg.	negativ
nm	Nanometer
p.o.	per os
PCR	Polymerase- Ketten- Reaktion
pos.	positiv
Pro/P	Prolin
Q/Gln	Glutamin
R/Arg	Arginin
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.u.	siehe unten
S/Ser	Serin
sat.	Saturation = Sättigung
SI	Système International d'Unités
T/Thr	Threonin
TETA	Triethylentetramin
TG	Trockengewicht
Tm	Transmembranregion
TSR	Template Suppression Reagent
u.a.	unter anderem
U.S.A.	United States of America
UV	Ultra violett
V	Volt
V/Val	Valin
VLDL	very low density lipoproteins
W/Trp	Tryptophan
X	Stop Codon
Y/Tyr	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9. ANHANG

### 9.1 Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Hartmut H.-J. Schmidt von der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, erstellt.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hartmut H.-J. Schmidt für die Überlassung des Themas, die mir zur Verfügung gestellten Mittel und für die kompetente und tatkräftige Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. H. Lochs danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation in seiner Abteilung.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Janine Büttner für die kompetente und ausgesprochen hilfsbereite Betreuung und die vielen wertvollen Anregungen und Tips bedanken, ohne die das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ebenfalls gilt mein ausgesprochener Dank Bettina Bochow und Renita Weltrich für die umfangreiche technische Assistenz.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester dafür danken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mich in jeglicher Hinsicht meines Werdegangs unterstützt und bestärkt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinem lieben Vater, der mir das Medizinstudium ermöglicht hat, wofür ich ihm unendlich dankbar bin.



## **9.2 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Benita v. Heyden

### **9.3 Erklärung**

„Ich, Benita Elisabeth Christine von Heyden, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Morbus Wilson“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“