

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Onkologie und Hämatologie
Charité Campus Mitte
Charité – Universitätsmedizin Berlin
und dem
Hämatologisch-Onkologischen Zentrum
München

DISSERTATION

Genanalyse bei Patienten mit Akuter Intermittierender Porphyrrie

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor Medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Léon von Brasch

aus São Paulo

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. E. Petrides

2. Prof. Dr. med. Ch. Bühler

3. Prof. Dr. med. J. Frank

Datum der Promotion: 27. September 2006

Datum der Urkundenverleihung: 15. Dezember 2006

Gewidmet ist diese Arbeit **R. + A. + N. + I.**

und Eglantine

DANKSAGUNGEN

Ganz besonders danke ich meinem Mentor, Prof. Dr. med. Petro E. Petrides, für den freundschaftlichen und wohlwollenden Umgang mit mir und seine große Geduld und Hilfsbereitschaft.

Nur mit seiner Unterstützung war es mir möglich gewesen, einen Forschungsaufenthalt in einem hämatologischen Labor der Stanford University in Kalifornien zu realisieren. Das war für mich eine wichtige Erfahrung und all das Positive, was mir dadurch widerfuhr, steht mit ihm in Verbindung.

Auch seiner Frau, Dr. med. Maria Beykirch, danke ich für den herzlichen Umgang.

Dr. rer. medic. Chuanbing Zang danke ich für seine Anleitungen und Hilfe in den Laboratorien der Hämatologie der Charité.

Für ihre Mitarbeit, ihre hilfreichen Anmerkungen, ihre Unterstützung und ihr offenes Ohr bei Fragen meinerseits möchte ich mich bei Dr. med. Georg und Dr. med. Christian Freiherren von Bodman, Dr. rer. nat. Haverkamp, Dr. med. Bernhard Hoppe, Dr. rer. nat. Krüger, Dr. rer. nat. Schlechte, PD Dr. med. Schönberg, Dr. med. Felix Graf Spiegel und Frau Dr. med. Wekerle bedanken.

An dieser Stelle danke ich auch meiner Familie für alle erdenkliche Unterstützung.

Zuletzt danke an H.S.

München im Januar 2005

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Hämbiosynthese	Seite 4
Abbildung 2: 3D-Struktur der PBGD	Seite 5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PBGD	Seite 5
Abbildung 4: Dipyrrolmethan	Seite 6
Abbildung 5: Cofaktor im Enzym gebunden	Seite 6
Abbildung 6: Hämbiosyntheseschritt, katalysiert durch die PBGD	Seite 7
Abbildung 7: PBGD – mRNA und Aminosäuresequenz	Seite 8
Abbildung 8: Schema des Spleißens	Seite 9
Abbildung 9: Schaubild des Hämbiosynthesedefektes bei AIP	Seite 11
Abbildung 10: Prinzip des PBGD-Aktivitätstests	Seite 24
Abbildung 11: PCR-Produkte im Agarosegel nach der Elektrophorese	Seite 32
Abbildung 12: DGGE- Gerät von BioRad®	Seite 34
Abbildung 13: Schema der sequenziellen Exon-Analyse	Seite 38
Abbildung 14: DGGE Resultat 1	Seite 42
Abbildung 15: DGGE Resultat 2	Seite 42
Abbildung 16: Erklärung der Bandenschemata	Seite 42
Abbildung 17: Sequenz der Mutation im Exon 1	Seite 43
Abbildung 18: Stammbaum der Patientin Nr.1	Seite 46
Abbildung 19: Stammbaum der Patientin Nr.14	Seite 47
Abbildung 20: Baumdiagramm Patientenanalyse	Seite 48
Abbildung 21: Diagnosealgorithmus	Seite 53
Tabelle 1: Symptome bei AIP und ihre Häufigkeit	Seite 17
Tabelle 2: Charakteristika der Symptome	Seite 17
Tabelle 3: Übersicht Porphyrien und Klinik	Seite 21
Tabelle 4: Unterscheidungsprofil AIP – andere Porphyrien	Seite 21
Tabelle 5: Krankheitsbilder mit AIP-Ähnlichkeit	Seite 22
Tabelle 6: Differentialdiagnose – AIP, metabolische Störungen	Seite 23
Tabelle 7: Diagnostische Verfahren zur AIP-Diagnostik	Seite 25
Tabelle 8: Patientendaten	Seite 28
Tabelle 9: Liste der PCR- und Sequenzierungs- Primer	Seite 36
Tabelle 10: Primer-Sequenzen für Methode 3	Seite 39
Tabelle 11: Sequenzierungsprimer für Methode 3	Seite 40
Tabelle 12: Vergleich von Resultaten	Seite 45
Tabelle 13: Resultate der Genanalysen	Seite 49
Tabelle 14: Mutationen – Geographie	Seite 55
Tabelle 15: Liste aller PBGD-Mutationen (Stand 12/2004)	Seite 59
Tabelle 16: Internetlinks zur AIP	Seite 80

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Rückblick	1
1.2 Akute Intermittierende Porphyrrie – Übersicht	3
1.2.1 Kontext	3
1.2.1.1 Hämbiosynthese	3
1.2.1.2 PBGD – die Funktion des Enzyms.....	4
1.2.2 Pathobiochemische Grundlagen der AIP	7
1.2.2.1 PBGD – vom Gen zum Enzym	7
1.2.2.2 Hämbiosynthesedefekt	10
1.2.2.3 ALA und PBG	11
1.2.2.4 Möglicher Einfluss von Hämproteinen	13
1.2.3 AIP auslösende Faktoren.....	14
1.2.4 Diagnostik	15
1.2.4.1 Symptome als Hinweis auf AIP	15
1.2.4.2 Labormedizinische Diagnostik.....	19
1.2.4.2.1 Messung der ALA- und PBG-Ausscheidung.....	19
1.2.4.2.2 Andere Ursachen erhöhter ALA- und PBG-Spiegel.....	20
1.2.4.2.3 PBGD- Aktivitätstest.....	23
1.2.4.3 Genetische Diagnostik.....	24
1.3 Fragestellungen	26
2. PATIENTEN UND METHODEN	27
2.1 Patienten	27
2.2 Methoden	30
2.2.1 Methode 1 – Denaturierende Gradientengel Elektrophorese (DGGE)	30
2.2.1.1 DNA-Extraktion – DGGE	30
2.2.1.2 PCR – DGGE	31
2.2.1.3 DGGE.....	33
2.2.1.4 Sequenzierung – DGGE	34
2.2.2 Methode 2 – Sequenzielle Exonanalyse (SEA).....	35
2.2.2.1 DNA-Extraktion – SEA	35
2.2.2.2 PCR – SEA.....	35
2.2.2.3 Strategie – SEA	37
2.2.2.4 Sequenzierung – SEA.....	38
2.2.3 Methode 3 – Exon-Intron Sequenzierung (EIS).....	39
2.2.3.1 DNA – EIS	39
2.2.3.2 PCR – EIS	39
2.2.3.3 Sequenzierung – EIS	40

3. ERGEBNISSE	41
3.1 Resultate Methode 1 (DGGE)	41
3.2 Resultate Methode 2 (SEA)	43
3.3 Resultate Methode 3 (EIS).....	45
3.4 Familienanalyse	46
3.5 Zusammenfassung der Resultate	48
4. DISKUSSION	51
4.1 Bedeutung dieser Arbeit	51
4.2 Abwägungen zur AIP-Diagnostik	51
4.3 Abwägung zu den genanalytischen Ansätzen dieser Studie	54
4.4 Erläuterungen zu den Resultaten	55
4.5 Genotyp-Phänotyp-Beziehungen	57
4.6 Liste aller PBGD-Mutationen (Stand 12/2004) (eigene Liste).....	59
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. REFERENZEN	67
7. LINKS	80
8. VERÖFFENTLICHUNGEN	81
9. CURRICULUM VITAE	82
10. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	83

9. CURRICULUM VITAE

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.

10. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

21. Januar 2005

Léon v. Brasch