

3. ERGEBNISSE

3.1 Resultate Methode 1 (DGGE)

Die Diagnostik mittels der DGGE umfasste zwei Schwestern. Für die Patientin M.K., Patientin Nr.1, ergab sich durch eine vorangegangene labormedizinische Untersuchung mit erhöhten Werten für Porphobilinogen und δ -Aminolävulinsäure, bei normaler Aktivität der erythrozytären Porphobilinogendesaminase, der Verdacht auf die AIP der varianten Form (vAIP).

Die DGGE wurde eingesetzt, um das Vorliegen einer fraglichen Mutation in Exon 1 oder Intron 1 bestätigen zu können, was die typische Lokalisation der Mutation bei der varianten Form der AIP ist (Grandchamp *et al.*, 1989b). Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an eine zuvor durchgeführte Analyse mit DGGE bei varianter AIP. Die zuvor identifizierte vAIP-Probe (Petrides, 1998), für die eine Mutation im Übergang von Exon 1 zu Intron 1 bereits identifiziert wurde, diente als Referenz und Orientierung bei der Optimierung der DGGE. Die Durchführung der DGGE erfolgte nach den Vorgaben der Anleitung von Bio-Rad und in Anlehnung an eine frühere Veröffentlichung (Puy *et al.*, 1997b).

Die besten Resultate gelangen mit einem Gel, das einen Konzentrationsgradienten von 40%–70% hatte. Nachdem die Mutation der Indexpatientin identifiziert worden war, wurde auch ihre Schwester untersucht. Schon der Vergleich der Bandenmuster bewies das Vorliegen der gleichen Mutation (**Abbildung 14 und 15**).

Auf die Gele wurden aufgetragen: die Wildtyp-Sequenz (1), die Positiv-Probe einer bereits untersuchten Patientin (2), die neu identifizierte Probe (3) und eine Probe mit Verdacht auf AIP, der sich nicht bestätigte (4) (**Abbildung 14**).

In **Abbildung 15** ist dasselbe Bandenmuster zu sehen. Es zeigen sich vier Linien aufgrund der Heterozygotie der DNA bei vorliegender Mutation (erklärt in **Abbildung 16**). Hier handelt es sich um das Ergebnis der DGGE im Falle der Schwester der Index-Patientin. Auf das Gel aufgetragen ist die Wildtyp-Sequenz (1) und die Probe der Betroffenen (2).

Man kann deutlich die verschiedenen Bandenmuster sehen. Eine Bande, wenn sich die homozygoten Wildtyp-DNA-Stränge zusammenlagern und mehrere Banden, wenn sich die Wildtypsequenz und die Mutationssequenz sowohl homozygot, als auch heterozygot verbinden (**Abbildung 16**).

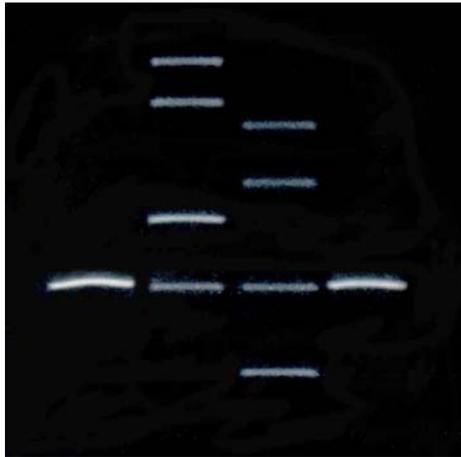


Abbildung 14: DGGE Resultat 1;
1 und 4 = negativ Probe, 2 = positiv Probe, 3 =Propositus
(eigene Abbildung)

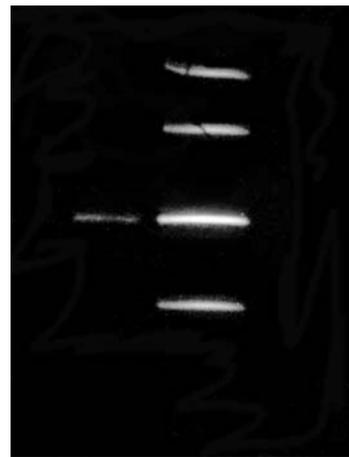


Abbildung 15: DGGE Resultat 2;
1= negativ Probe, 2 =Propositus
(eigene Abbildung)

Im Fall der Wildtypsequenz, wo nur ein Allel für die PBGD vorliegt, zeigt sich in der DGGE eine Bande, da sich bei der Denaturierung und anschließender, neuerlicher Anlagerung nur eine homoduplexe Bande bilden kann. Wenn „WT“ für Wildtyp-DNA steht, „for“ (forward) und „rev“ (reverse) für die zwei Leserichtungen der DNA (sense – antisense), dann ergibt sich im Fall einer Mutation nach der Denaturierung folgendes Bild:

es kann sich WTfor und WTrev verbinden (Bande 1), AIPfor und AIPrev (Bande 2), WTfor und AIPrev (Bande 3) und AIPfor und WTrev (Bande 4). So kann es zur Ausbildung von vier Banden in der Elektrophorese bei DGGE kommen (**Abbildung 16**).

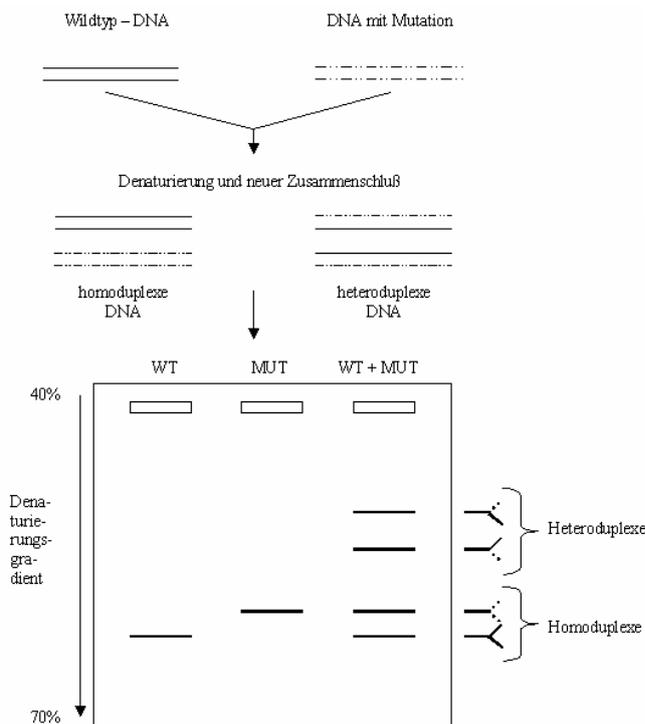


Abbildung 16:
Erklärung der Bandenschemata
WT – Wildtyp, MUT – mutierte DNA
(nach www.biorad.com)

Nachdem die DGGE ein positives Resultat erbracht hatte (**Abbildung 14 und 15**), wurde Exon 1 sequenziert und eine bisher unbekannte Mutation, die zur varianten Form der AIP führt, identifiziert (**Abbildung 17**).

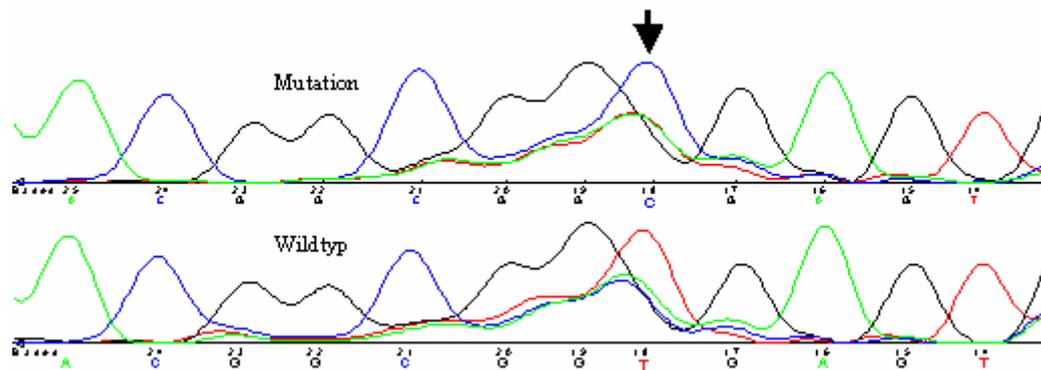


Abbildung 17: Sequenz der Mutation im Exon 1 im Vergleich mit der Wildtypsequenz (eigene Abbildung)

Bei beiden Patientinnen, Patient Nr.1, M.K., und ihrer Schwester, lag derselbe Gendefekt vor: es ist eine Mutation am Übergang von Exon 1 zu Intron 1, und betrifft das zweite Basenpaar im Intron: in Position 33+2 liest sich der Gencode GCG statt GTG. Diese Mutation, T zu C, aktiviert eine kryptische, d.h. verdeckte Stelle für das Spleißen 67 Basenpaare weiter im Verlauf der Leserichtung der DNA (downstream) im Intron 1. Das führt zu einer Rahmenverschiebung und einer vorzeitigen Stop-Sequenz im Exon 4.

3.2 Resultate Methode 2 (SEA)

Der Aufbau der DGGE ist mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden. Nachdem die Methode etabliert worden war, mußte für jede Exonanalyse ein Arbeitstag veranschlagt werden. Außerdem bedeutete ein positives Resultat bei der DGGE-Untersuchung, daß der Abschnitt des Gens, der in der DGGE getestet worden war, in einem zweiten Schritt sequenziert werden mußte, um die Mutation zu identifizieren.

Aus einer vorangegangenen Studie zur AIP (Puy *et al.*, 1997b) war zu ersehen, daß Mutationen der PBGD bisher in bestimmten Exons häufiger identifiziert worden waren als in anderen.

Diese Umstände führten zu der Überlegung, sich die statistisch ungleiche Verteilung der Mutationen innerhalb der Exons zunutze zu machen. Amplifiziert und sequenziert wurden

zunächst die Exons, in deren Sequenzen bisher die meisten Mutationsträger gefunden worden waren. Bei fehlendem Mutationsnachweis wurden die nächsthäufig betroffenen Exons untersucht, und so fort. So sollte möglichst schnell und mit geringem Aufwand ein Resultat erzielt werden.

Untersucht wurden 8 Patienten, die Anzeichen der klassischen Form der AIP hatten.

Im ersten Schritt wurden die Exons 10, 12 und 14 einer Probe, mit einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

4 Individuen wurden als Träger einer Mutation in Exon 10 identifiziert:

Patient Nr.11, M. M.: 499 C→T;

Patient Nr.12, E. M.-S.: 500 G→A;

Patient Nr.13, T. T.: 517 C→T;

Patient Nr.14, M. U.: 517 C→T.

In den Exons 12 und 14 befanden sich keine Mutationen.

Im nächsten Schritt wurden die Exons 4, 7 und 13 der Patienten untersucht, die im vorangegangenen Schritt kein positives Ergebnis hatten. Ein Patient hatte eine Mutation in Exon 7:

Patient Nr.5, D. K.: 331 G→A.

Die restlichen Patienten wurden zunächst in Exons 3, 5+6 und 9 untersucht, wobei ein Patient eine Mutation in Exon 6 hatte:

Patient Nr. 3, M. SK.: 218-219 del AG,

und ein Patient eine Mutation in Exon 9 aufwies:

Patient Nr. 8, S.A.: 445 C→T.

Für eine Patientin wurden die Exons 8, 11 und 15 PCR-amplifiziert und sequenziert; es lag eine Mutation in Exon 15 vor:

Patient Nr.20, S. P.: 1067 ins CGGCA.

Die Annahme, daß die meisten Mutationen auf den Exons und Introns 10, 12 und 14 gefunden würden hatte sich bestätigt, betrachtet man die Ergebnisse der Methode 2 für sich (**Tabelle 12**). In der vorangegangenen Studie waren 39 von 78 Mutationen auf diesen Genabschnitten identifiziert worden, das entspricht 50% der Mutationen (Puy *et al.*, 1997b). Von den

Mutationen, die innerhalb der vorliegenden Arbeit mit der Methode 2 identifiziert worden waren, wurden 4 von 8 auf den Exons 10,12 und 14 gefunden, was auch 50% entspricht. Die Hälfte der Mutationen der 8 Patienten waren bereits nach der ersten Sequenzierung identifiziert worden.

Betrachtet man alle untersuchten 20 Patienten, war auch das Exon 15 überdurchschnittlich häufig betroffen. Wie erwartet war es nicht nötig, die Patienten auf eine Mutation im Exon 1 zu prüfen, die PBGD-Genmutationen waren bereits auf anderen Exons oder Introns identifiziert worden.

Tabelle 12: Vergleich von Resultaten (eigene Tabelle)

Mutationen in den Exons 10 – 12 – 14	
Literatur (Puy <i>et al.</i> , 1997b)	Methode 2 - diese Arbeit
50% der Patienten	50% der Patienten

3.3 Resultate Methode 3 (EIS)

Neben den dargestellten AIP-Patienten waren auch Proben von Patienten untersucht worden, deren Symptome zu dem Verdacht einer AIP-Erkrankung geführt hatten, was sich jedoch als falsch herausstellte.

Dennoch gaben diese Fälle den Anstoß zu der Überlegung, das PBGD-Gen möglichst genau zu untersuchen. Auch die Introns sollten in größerem Maße als bisher sequenziert werden. Daher wurde als dritte Methode bei 11 Patienten, die labormedizinisch auf AIP getestet worden waren, eine Sequenzierung des PBGD-Gens vorgenommen, die fast das gesamte PBGD-Gen umfasste. Einen derart großen Anteil des gesamten PBGD-Gens zur Diagnostik in die Untersuchung miteinzubeziehen, war in der medizinischen Literatur bis dahin noch nicht erwähnt worden.

Folgende Mutationen wurden entdeckt:

- im Exon 5: Patient Nr. 2, W. L.: 181 G→C;
- im Intron 6: Patient Nr. 4, A. A.: 267 – 61 del GAAGGGGT;
- im Intron 7: Patient Nr.6, B. B.: 345 – 1 G→C;

im Exon 8: Patient Nr.7, U. K.: 346 C→T;
im Intron 9: Patient Nr.9, I. K.: 498 + 15 G→T
im Intron 9: Patient Nr.10, P. S.: 499 – 13 del 14bp ins TGA;
im Exon 12: Patient Nr.15, O. L.: 674 G→A;
zwei im Intron 13: Patient Nr.16, K. K.: 825 + 1 G→C und
Patient Nr.17, I. V.-A.: 825 + 2 T→C;
im Intron 14: Patient Nr.18, A. N.: 913-2 A→G und
zwei im Exon 15: Patient Nr.6, B. B.: 962 G→A und
Patient Nr.19, K. H.: 1067 del A.

Der Patient B.B. (Patient Nr. 6) erwies sich als Träger von zwei Mutationen, die in verschiedenen Genabschnitten liegen.

3.4 Familienanalyse

Nachdem die Mutation eines Patienten identifiziert worden war, wurde den Verwandten der oder des Betroffenen die PBGD-Genanalyse angeboten, um bisher latent verlaufene Fälle von AIP aufdecken zu können. Die Familienanalyse konnte bei fünf Familien mit unterschiedlicher Beteiligungsrate der Angehörigen durchgeführt werden. Insgesamt wurden weitere 29 Personen untersucht, wovon 10 Individuen als Träger einer PBGD-Mutation identifiziert werden konnten.

- In der Familie von Patientin Nr.1, M. K., wurden 5 Angehörige untersucht und eine weitere Merkmalsträgerin entdeckt. Außer der bereits beschriebenen Mutation bei einer ihrer Schwestern, waren die anderen untersuchten Familienmitglieder nicht betroffen (**Abbildung 18**).

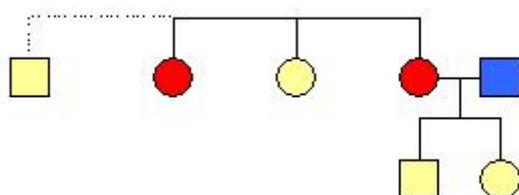


Abbildung 18: Stammbaum der Patientin Nr.1; rot: AIP-Träger; gelb: untersucht und gesund; blau: nicht untersucht; eckig: männlich; rund: weiblich; durchgezogene Linie: Verwandte ersten Grades und Partner; gestrichelte Linie: Verwandte zweiten Grades (eigene Abbildung).

3.5 Zusammenfassung der Resultate

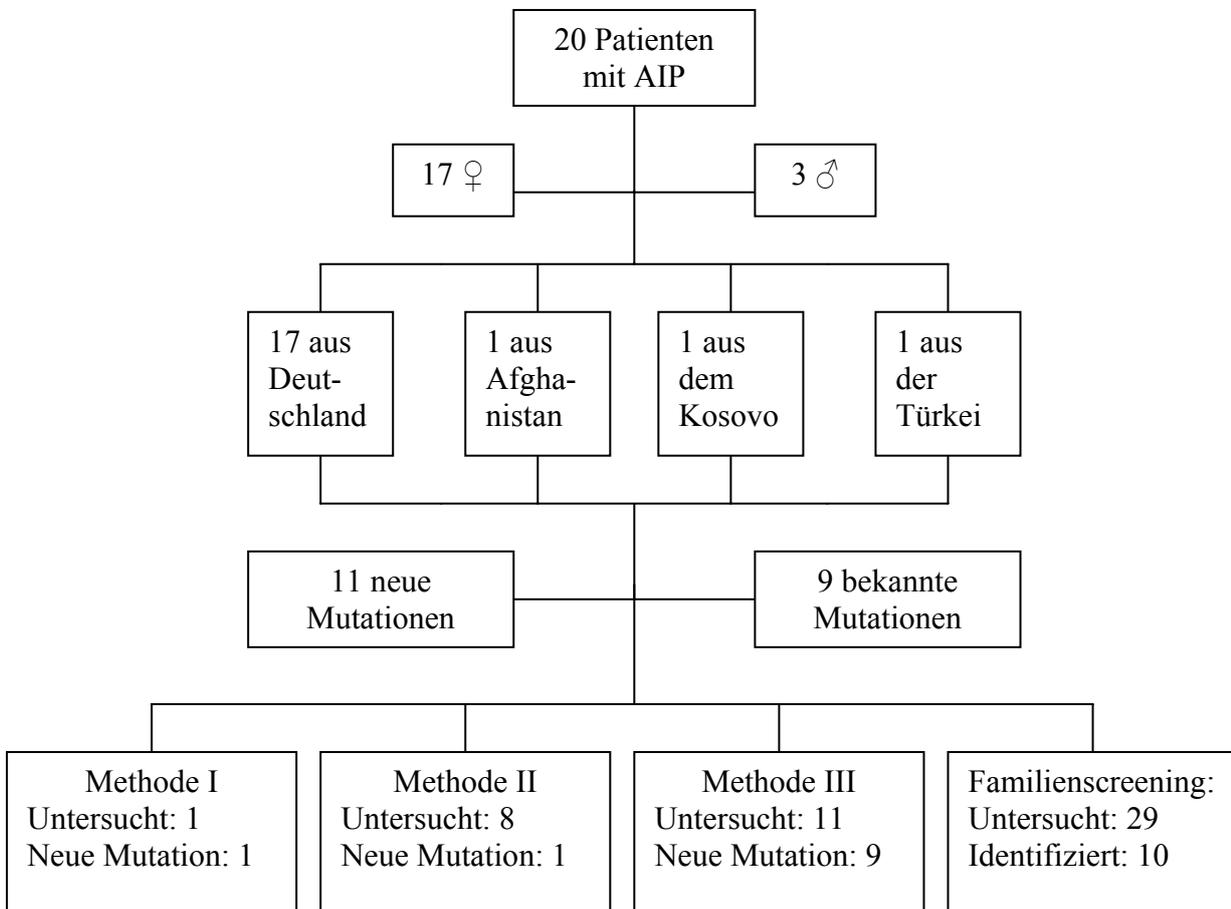


Abbildung 20: Baumdiagramm Patientenanalyse; ♀- Frauen, ♂- Männer (eigene Abbildung)

Die molekularbiologische Diagnostik wies alle Untersuchten als Träger einer Mutation aus. Nachdem das Resultat der Analyse vorlag, wurden Familienanalysen angeboten. Zusammenfassend wurden in 20 Personen 20 verschiedene Mutationen identifiziert (**Tabelle 13**). Die 20 Personen waren nicht miteinander verwandt, dennoch trugen zwei Patienten dieselbe Mutation (Mutation 13 laut **Tabelle 13**). Bei einem Patienten, B. B., konnten zwei unterschiedliche Mutationen identifiziert werden (Mutation 6 und Mutation 18). Von den 20 Mutationen waren 9 Mutationen schon publiziert worden, 11 waren bisher noch unentdeckt geblieben.

Zusätzlich wurde ein neuer Polymorphismus in zwei nicht verwandten Individuen entdeckt.

Tabelle 13: Resultate der Genanalysen (Von Brasch *et al.*, 2004)

Mutationen und Polymorphismen des PBGD-Gens

MUTATIONEN

M #	P #	Initialen	Exon / Intron	Nukleotidsubstitution	Nukleotidaustausch (nt)	Aminosäurenaustausch	M-Typ	Referenz
1	1	M. K.	IVS 1	33+2 T→C	gtg→gcg	STOPcodon +41	SD	Diese Arbeit
2*	2	W. L.	5	181 G→C	GAC→CAC	D61H	MS	Diese Arbeit
3	3	M. SK.	6	218-219 del AG		FS→Stop + 9	FS	Gu et al. (1994)
4*	4	A. A.	IVS 6	267-61 del 8bp	del gaaggggt	Exon 7 deletion ?	SD ?	Diese Arbeit
5	5	D. K.	7	331 G→A	GGA→AGA	G111R	MS	Gu et al. (1993)
6*	6	B. B.	IVS 7	345-1 G→C	cag→cac	Exon 8 deletion	SD	Diese Arbeit
7*	7	U. K.	8	346 C→T	GCG→GTG	R116W	MS	Gu et al. (1993)
8	8	S. A.	9	445 C→T	CGA→TGA	R149X	NS	Kaappinen et al. (1995)
9*	9	I. K.	IVS 9	498+15 G→T	aag→aat	Exon 9 deletion ?	SD ?	Diese Arbeit
10*	10	P. S.	IVS 9	499-13 del 14bp ins TGA	del caactctcca-cagC ins tgA	Exon 10 deletion ?	SD ?	Diese Arbeit
11	11	M. M.	10	499 C→T	CGG→TGG	R167W	MS	Gu et al. (1992)
12	12	E. M.-S.	10	500 G→A	CGG→CAG	R167Q	MS	Delfau et al. (1990)
13	13 + 14	T. T. + M. T.	10	517 C→T	CGG→TGG	R173W	MS	Lee and Anvret (1991)

M #	P #	Initialen	Exon / Intron	Nukleotidsubstitution	Nukleotidaustausch (nt)	Aminosäurenaustausch	M-Typ	Referenz
14*	15	O. L.	12	674 G→A	CGA→CAA	R225Q	MS	Floderus et al. (2002)
15*	16	K. K.	IVS 13	825+1 G→C	gta→cta	Exon 13 deletion	SD	Diese Arbeit
16*	17	I. V.-A.	IVS 13	825+2 T→C	gta→gca	Exon 13 deletion	SD	Diese Arbeit
17*	18	A. N.	IVS 14	913-2 A→G	cag→cgg	Splice site mutation	SD	Floderus et al. (2002)
18*	6	B. B.	15	962 G→A	CGT→CAT	R321H in cis	MS	Diese Arbeit
19*	19	K. H.	15	1067 del A	CAG→C'GC	frameshift codon 356	MS	Diese Arbeit
20	20	S. P.	15	1067 ins CGGCA	5bp insertion: CGGCA	TAA abolished FS→Stop+90	FS	Diese Arbeit

POLYMORPHISMEN

7	U. K.	7	303 C→T	CCC→CCT	P101P	Diese Arbeit
9*	I. K.	7	303 C→T	CCC→CCT	P101P	Diese Arbeit

Legende: neuentdeckte Mutationen erscheinen **fettgedruckt**, * - große Anteile des PBGD-Gens wurden sequenziert (EIS), SD - splicing deficit, MS - missense mutation, FS – frame shift mutation, NS - nonsense mutation, M# - Mutationsnummer, P# - Patientnummer, M-Typ – Art der Mutation, ? – assumed effect according to literature