



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Mutationssuche im *HFE* Gen bei PatientInnen mit Eisenüberladung
unklarer Genese

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Andrea Houdek
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): Biologie / Anthropologie
Betreuerin / Betreuer: Prim. Univ. Doz. Dr. Manuela Födinger

Wien, im April 2010

Danksagung

Mein größter Dank gebührt meinem Mann, Roland Houdek, der mir während meines gesamten Diplomstudiums die notwendige Kraft und Energie gab, dieses zu bewältigen und mich immer wieder aufgebaut und dazu ermutigt hat. Ohne seine wertvolle Unterstützung wäre es mir nicht möglich gewesen, das Studium der Anthropologie und diese Arbeit neben meinen beruflichen Verpflichtungen zu absolvieren.

Besonderer Dank gelten meiner Diplomarbeitsbetreuerin, Frau Prim. Univ. Doz. Dr. Manuela Födinger, und Frau Dr. Katharina Ruzicka für ihre sehr geschätzte Betreuung sowie Dipl.-MTA Corinna Eberle für ihre unverzichtbaren Hilfestellungen bei der Durchführung der Analysen.

Auch möchte ich Frau Mag. Anita Jallitsch für ihre fachliche Unterstützung bei der Auswertung der Resultate danken.

*„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.“*

Aristoteles, griechischer Philosoph, 384 – 322 v. Chr.

Inhaltsverzeichnis

1. 1. Abstract	7
1. 2. Zusammenfassung	9
2. Einleitung	11
2. 1. Eisenstoffwechsel	12
2. 1. 1. Regulation der Eisenresorption	13
2. 2. Das <i>HFE</i> Gen	15
2. 2. 1. Exons und Introns	16
2. 2. 2. Mutationen im <i>HFE</i> Gen	17
2. 2. 2. 1. <i>HFE</i> C282Y Mutation	17
2. 2. 2. 2. <i>HFE</i> H63D Mutation	18
2. 2. 2. 3. <i>HFE</i> S65C Mutation	19
2. 3. Das klinische Bild der hereditären Hämochromatose	19
2. 3. 1. Hereditäre Hämochromatose Typ 1	19
2. 3. 2. Hereditäre Hämochromatose Typ 2	20
2. 3. 3. Hereditäre Hämochromatose Typ 3	21
2. 3. 4. Hereditäre Hämochromatose Typ 4	21
2. 4. Diagnostik der hereditären Hämochromatose	24
2. 4. 1. Konventionelle diagnostische Parameter	24
2. 4. 2. Nichtinvasive Leber-Eisen-Quantifizierung	24
2. 4. 3. Molekulargenetische Diagnostik bei hereditärer Hämochromatose	25
2. 5. Therapie der hereditären Hämochromatose	25
2. 6. Ziel der Diplomarbeit	26
3. Material und Methoden	27
3. 1. Patienten und Ausgangsmaterial	27
3. 1. 1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
3. 2. Amplifikation der genomischen DNA mittels PCR	28
3. 3. Reinigung mittels Exo-SAP-IT-Verdau	31
3. 4. Sequenzreaktion	31
3. 5. Reinigung der Sequenzierprodukte vor der Kapillarelektrophorese	34
3. 6. Kapillarelektrophorese	35
3. 7. Mutationsanalyse	35

4. Resultate	37
4. 1. Detektion von Mutationen im <i>HFE</i> Gen	41
5. Diskussion	53
6. Appendix	57
6. 1. Oligonukleotidprimer für PCR-Amplifikation	57
6. 2. PCR-Produkte	57
6. 3. Aminosäuresequenz des HFE Proteins	58
6. 4. Liste der Mutationen	59
6. 5. Liste der Polymorphismen	61
6. 6. Literaturverweise	62
6. 7. Abkürzungsverzeichnis	64
6. 8. Curriculum vitae	67
6. 9. Referenzen	69

1. 1. Abstract

Background: Hereditary Hemochromatosis (OMIM: 235200) is a common autosomal recessive disorder of iron metabolism with a homozygous incidence of approximately 1:200 in the central- and north-European area.

Mutations in the *HFE* gene cause increased iron absorption in the gastrointestinal tract. Consequently the increased iron absorption leads to iron overload in a variety of organs of the human body. If untreated this disease results in organ damage which is characterized by liver cirrhosis and liver cancer, diabetes, cardiomyopathy, arthritis and hypogonadotropic hypogonadism. If detected at an early stage hereditary hemochromatosis can be treated successfully by phlebotomy. Detection of any mutations in the *HFE* gene by genetic diagnostics is a safe method and helps making a clear diagnosis.

Aim: The aim of this study was the evaluation of a new sequencing protocol which can be used routinely for the detection of mutations in the human *HFE* gene in patients with iron overload of unclear genesis.

Methods: In this study we used nucleotide sequence analysis as a very common method in molecular diagnostics for examination of the *HFE* gene in 23 patients with suspected hereditary hemochromatosis. The method was applied to search after mutations causing hereditary hemochromatosis. Source material was genomic DNA isolated from patients' whole blood and amplified by PCR prior to preparation for sequence analysis.

Results: In the present study a method for analysis of mutations in the *HFE* gene based on genomic DNA was established. The protocols developed allowed detection of two heterozygous exonic mutations R23H and L118L and three intronic mutations IVS2+4T>C, IVS4+48G>A und IVS4+115T>C which were present in heterozygous and homozygous form among 20 patients with suspected hereditary hemochromatosis. Among eight patients the five detected mutations were found in different combinations. Three patients did not show any mutations.

Summary: Our study demonstrates that the sequencing protocol based on genomic DNA can successfully be used for the detection of mutations in the *HFE* gene of patients with suspected hereditary hemochromatosis.

1. 2. Zusammenfassung

Hintergrund: Die hereditäre Hämochromatose (OMIM: 235200) ist mit einer Homozygotenhäufigkeit von etwa 1:200 eine sehr häufige Stoffwechselkrankheit im zentral- und nordeuropäischen Raum und folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Verursacht durch Mutationen im *HFE* Gen wird das Spurenelement Eisen vermehrt gastrointestinal absorbiert. Dies führt konsekutiv zu einer Eisenüberladung in verschiedenen Geweben des menschlichen Organismus. Unbehandelt kann die Erkrankung zu lebensbedrohlichen Organschädigungen führen, die sich durch Leberzirrhose und Leberkarzinome, Diabetes, Kardiomyopathie, Arthritis und hypogonadotropen Hypogonadismus kennzeichnen. Frühzeitig erkannt kann die hereditäre Hämochromatose mittels regelmäßiger Aderlasstherapie erfolgreich behandelt werden. Eine eindeutige Diagnosestellung ist nur durch den Mutationsnachweis im *HFE* Gen mit Hilfe molekulargenetischer Methoden möglich.

Ziel: Das Ziel dieser Studie war die Evaluierung eines neuen Sequenzierungsprotokolls, welches für die Mutationssuche im humanen *HFE* Gen bei PatientInnen mit Eisenüberladung unklarer Genese routinemäßig eingesetzt werden kann.

Methoden: Mittels Nukleotidsequenzanalyse wurde in dieser Arbeit die Sequenz des *HFE* Gens von 23 Patienten mit Verdacht auf hereditäre Hämochromatose untersucht und nach kausalen Mutationen gesucht. Ausgangsmaterial war aus Vollblut isolierte genomische DNA, die mittels PCR Amplifikation für die Sequenzanalyse aufbereitet wurde.

Ergebnisse: Es ist uns im Rahmen dieser Studie gelungen, ein Verfahren zur Mutationsanalyse im *HFE* Gen auf Basis der genomischen DNA zu etablieren. Wir konnten zwei heterozygote, exonische Mutationen R23H und L118L sowie drei intronische Mutationen IVS2+4T>C, IVS4+48G>A und IVS4+115T>C in heterozygoter und homozygoter Form bei insgesamt 20 Patienten mit Verdacht auf hereditäre Hämochromatose identifizieren. Bei acht Patienten wurden diese fünf Mutationen in unterschiedlicher Kombination gefunden. Drei Patienten wiesen keine Mutationen auf.

Fazit: Unsere Studie zeigt, dass das auf genomischer DNA basierende Sequenzierungsprotokoll für die Mutationssuche im *HFE* Gen bei PatientInnen mit Verdacht auf hereditäre Hämochromatose erfolgreich eingesetzt werden kann.

2. Einleitung

Der Begriff Hämochromatose wurde 1889 von dem Straßburger Pathologen Friedrich Daniel von Recklinghausen eingeführt, um die typischen Symptome dieser Erkrankung, wie etwa pathologisch braune Pigmentierungen der Organe zu beschreiben. Nach seiner Auffassung rührten diese Verfärbungen vom roten Blutfarbstoff Hämoglobin. [1]

1935 veröffentlichte John Henry Sheldon eine klassische Hämochromatose-Monographie und bewies darin, dass diese Krankheit genetisch determiniert ist und durch Eisenablagerungen im Gewebe induziert wird. [2]

Forschungstätigkeiten von Marcel Simon et al. [3] führten 1977 zu dem Ergebnis, dass es sich bei der hereditären Hämochromatose um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung handelte. Der Genlokus wurde auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 detektiert und liegt in unmittelbarer Nähe zu dem *HLA-A3* Gen, welches für das humane Leukozytenantigen (Serotyp A3) kodiert. Aufgrund dieser räumlichen Nähe wurde eine Assoziation beider Gene bzw. ihrer Regionen angenommen.

Schließlich wurde 1996 von John N. Feder et al. [4] mittels positioneller Klonierung das für die hereditäre Hämochromatose verantwortliche Gen, welches initial als *HLA-H* Gen bezeichnet wurde und später in *HFE* umbenannt wurde, identifiziert.

Seit der Entdeckung des *HFE* Gens nahm das Interesse der Forschung stets zu. Intensive wissenschaftliche Beschäftigungen mit diesem Gen, seiner Funktion im Eisenstoffwechsel sowie anderen daran beteiligten Genen konnten das Wissen über die hereditäre Hämochromatose im menschlichen Organismus in den vergangenen drei Jahrzehnten stets erweitern. Trotzdem ist bis heute die genaue Pathogenese der Eisenakkumulation bei Vorliegen einer homozygoten *HFE* Mutation nicht vollständig geklärt.

In Anlehnung an neuere Erkenntnisse darf davon ausgegangen werden, dass die progrediente Eisenüberladung der *HFE*-assoziierten Hämochromatose nicht ausschließlich aus einer pathologisch erhöhten Eisenresorption im Intestinum resultiert. Vielmehr herrscht hier eine komplexe Interaktion verschiedener zellulärer und humoraler Faktoren in einem systemischen Prozess.

Mit einer Heterozygotenhäufigkeit von 1:10 bis 1:20 und einer homozygoten Inzidenz von 1:100 bis 1:400 ist die hereditäre Hämochromatose nach wie vor die häufigste genetisch vererbte Stoffwechselerkrankung im mitteleuropäischen Raum. [5]

Mittels klinisch-chemischer Diagnostik kann die phänotypische Eisenüberladung bei Patienten mit Verdacht auf Hämochromatose dieser Krankheit zugeordnet werden. Eine präzisere, nichtinvasive Variante stellen molekulargenetische Untersuchungsmethoden dar, wie etwa die *HFE* Genotypisierung, wodurch die Diagnose der hereditären Hämochromatose sicher erstellt werden kann und die ursächlichen Mutationen im *HFE* Gen nachgewiesen werden können. [6] Jedoch zeigt sich, dass die phänotypische Symptomatik einer genetisch manifestierten Mutation in einem, an dem Eisenmetabolismus beteiligten Gen, wie dem *HFE* Gen, sehr variabel sein kann.

2. 1. Eisenstoffwechsel

Das Spurenelement Eisen (Fe) übernimmt im menschlichen Körper lebenswichtige Funktionen, wie Sauerstoffaufnahme und Sauerstofftransport, den mitochondrialen Elektronentransport in den Zellen sowie den gesamten Energiestoffwechsel. Der Eisenbestand des Körpers, der beim gesunden Menschen ca. 3–5 g beträgt, ist zu etwa 2/3 an Hämoglobin gebunden, 1/4 ist Speichereisen (Ferritin, Hämosiderin; bei Männern ca. 500–1000 mg, bei prämenopausalen Frauen etwa 300–400 mg [7]) und der Rest Funktionseisen (eisenhaltige Enzyme, Myoglobin). Im Durchschnitt werden dem erwachsenen, menschlichen Körper ca. 10 mg Eisen aus der Nahrung pro Tag zugeführt, wovon nur etwa 10–20% im Duodenum enteral resorbiert und in weiterer Folge metabolisiert werden. [8]

Beim Abbau von Hämoglobin in den Erythrozyten wird Eisen freigesetzt, das unter physiologischen Bedingungen erneut für die Synthese von sämtlichen Proteinen, die Funktionseisen enthalten, bereitgestellt wird. Diese effiziente Wiederverwertung des Eisens erklärt, weswegen nur 1–2 mg Eisen pro Tag aus der Nahrung im duodenalen Darmabschnitt resorbiert werden. [8] Durch den täglichen Verlust von ca. 1–2 mg Eisen über Urin, Stuhl, Galle und Schweiß sorgt der menschliche Organismus für eine Balance des Eisenhaushaltes. [9]

Ein höherer Eisenbedarf, der zum Beispiel nach Blutverlusten oder bei prämenopausalen Frauen während der Menstruation auftritt, wird durch eine adaptierte Steigerung der Eisenresorption gedeckt. Ebenso wird bei einem vollen Eisenspeicher die Aufnahme dieses Spurenelementes regulierend vermindert.

Da der menschliche Körper Eisen nicht aktiv ausscheiden kann, können weder eine genetisch determinierte, noch eine erworbene Form der Eisenüberladung physiologisch kompensiert werden. Eine, zum Beispiel, aus der hereditären Hämochromatose resultierende Dysbalance

des Eisens, die in Richtung Mehraufnahme verschoben wird, manifestiert sich klinisch in Eisenablagerungen in unterschiedlichen Geweben und Organen – vor allem in der Leber und Haut, im Pankreas und Herzen, aber auch in den Gelenken und endokrinen Organen. [10] Bedingt durch eine Fehlregulation der intestinalen Eisenabsorption wird die tägliche Aufnahme von Eisen inadäquat auf etwa 4–5 mg erhöht. [11] Dies führt dauerhaft zu anfangs reversiblen, später zu irreversiblen Organschäden. [12]

2. 1. 1. Regulation der Eisenresorption

Mit der Nahrung aufgenommenes Eisen wird zum Großteil von Mukosazellen in der Darmwand des Duodenums resorbiert und zu einem geringen Teil im kranialen Abschnitt des Jejunums. Es werden sowohl Häm-Eisen, als auch ionisiertes Eisen aufgenommen. Ionisiertes Eisen kann in Form von Fe^{2+} und Fe^{3+} im Darmlumen vorliegen.

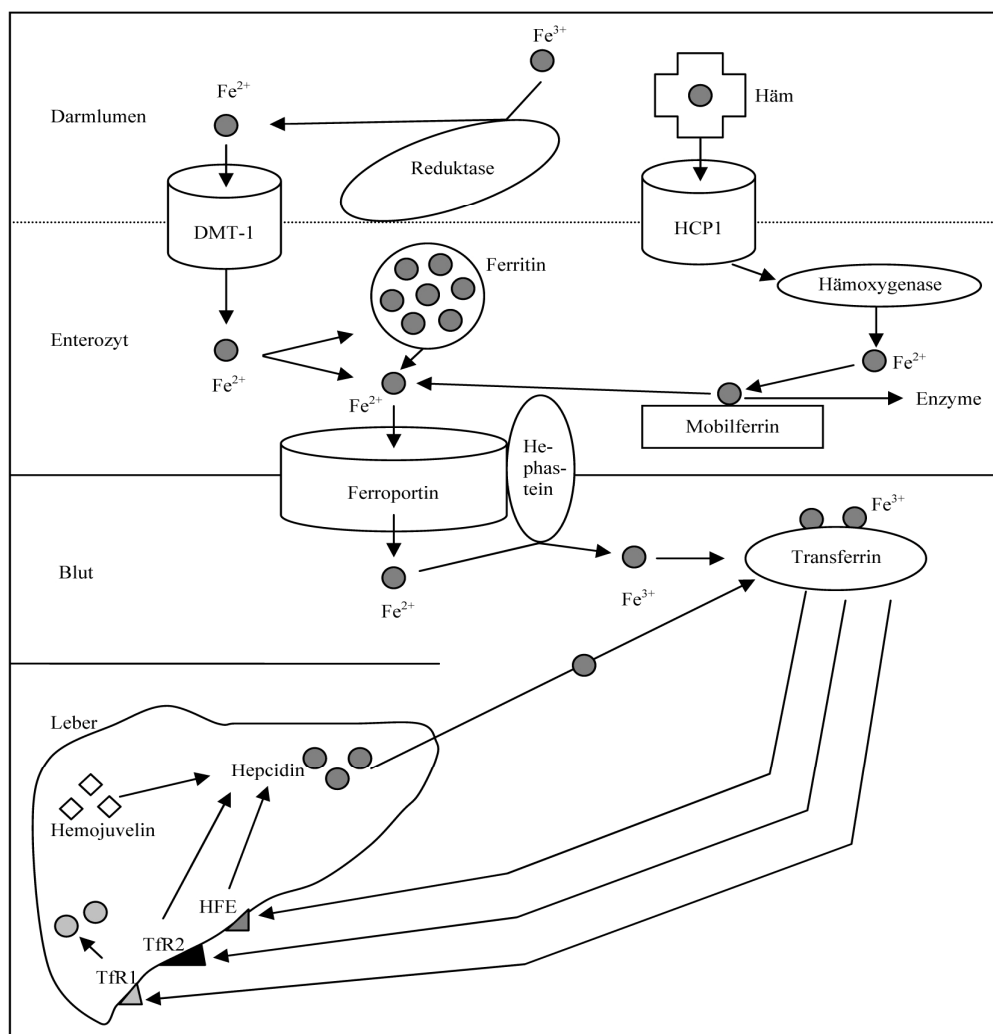


Abb. 2. 1.: Regulation des Eisenstoffwechsels, (in Anlehnung an Hastka et al. (2007) DGHO)

Das überwiegend in dreiwertiger Form aufgenommene Nahrungseisen wird von der Reduktase DCYTB (duodenal cytochrome b) an der luminalen Darmmembran in zweiwertiges Eisen konvertiert und mit Hilfe des Eisen-Transporters DMT-1 (divalent metal transporter 1) in die duodenalen Enterozyten aufgenommen (s. Abb. 2. 1., Seite 13). [13]

Häm-Eisen wird an den Häm-Rezeptor HCP-1 (heme carrier protein 1) an der luminalen Seite der Enterozyten gebunden, intrazellulär durch eine Hämoxygenase aus dem Porphyrinring abgespaltet und an das zytoplasmatische Protein Mobilferrin abgegeben. Dieses stellt Fe^{2+} bedarfsabhängig für die Produktion von eisenhaltigen Enzymen zur Verfügung (s. Abb. 2. 1.). Über den transmembranen Eisentransporter Ferroportin 1 gelangt zweiwertiges Eisen aus den Enterozyten in das Blut der Vena portae, der Pfortader. Bevor es zur Leber transportiert wird, wird es wieder zu dreiwertigem Eisen konvertiert. Dieser Valenzwechsel wird von der kupferhaltigen Ferrodixase Hephastein an der basolateralen Membran der Enterozyten durchgeführt. [13]

Für den Transport von Fe^{3+} zu den Hepatozyten und Makrophagen ist das intrahepatisch gebildete und im Plasma befindliche Protein Transferrin verantwortlich. Transferrin kann maximal zwei Eisenatome binden und diese zu Eisen speichernden Zellen befördern. Die Aufnahme von Transferrin gebundenem Eisen in den Leberzellen ist bedarfsadaptiert und wird über spezifische, transmembrane Transferrin-Rezeptoren (TfR1 und TfR2) reguliert.

Eisen wird in allen menschlichen Körperzellen durch Ferritin gespeichert. Ferritin ist ein wasserlöslicher Proteinkomplex, der aus einer Proteinhülle, dem Apoferritin, und einem Eisenoxyhydroxid-Kern besteht.

In den Makrophagen des Knochenmarks, der Leber und der Milz beteiligt sich der Eisen-Proteinkomplex Hämosiderin, ein Abbauprodukt des Ferritins, ebenso an der Speicherung von Eisen. [14]

Für die Regulation der Eisenaufnahme aus der Nahrung nimmt das in der Leber synthetisierte Peptidhormon Hepcidin eine zentrale Funktion ein. Indem es DMT-1 hemmend reguliert, reduziert es die Aufnahme von Eisen in die Enterozyten. Zudem vermindert es, durch Degradation von Ferroportin 1, die Freisetzung von Eisen aus den Enterozyten in das Blut der Pfortader. Die Expression und Freisetzung von Hepcidin wird in der Leber von den Transferrin-Rezeptoren TfR1 und TfR2 sowie von den Eisen regulierenden Proteinen HFE und Hemojuvelin kontrolliert. [15]

Um das intrazelluläre Eisen bedarfsadaptiert im Körper verteilen zu können und somit den Eisenhaushalt aufrecht zu erhalten, verfügt jede Zelle über ein Regulationssystem, das es ihr ermöglicht, Eisen, den Bedürfnissen entsprechend, aufzunehmen und zu speichern. Mit Hilfe von zytoplasmatischen, Eisen regulierenden Proteinen („Iron regulatory proteins“, IRP-1 und IRP-2), die mit spezifischen RNA-Strukturen, sogenannten „Iron responsive elements“ (IRE) interagieren, wird die Translation der am Eisenstoffwechsel beteiligten Moleküle feinreguliert und ein Gleichgewicht des Eisenbestandes hergestellt. [16]

2. 2. Das HFE Gen

Die menschliche Homöostase des Eisens beruht auf der koordinierten Funktion sämtlicher daran beteiligter Gene. Dazu gehört das *HFE* Gen (= Hämochromatose-Gen), welches sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (Lokus: 6p21.3), in unmittelbarer Nähe zum *HLA* Gen befindet (Datenbank OMIM: 235200). Es kodiert für ein transmembranöses Glykoprotein, das eine Länge von 348 Aminosäuren besitzt [17] und zur Familie der MHC Klasse I Proteine gezählt wird. [18] Das HFE Protein kann in nahezu allen Gewebearten nachgewiesen werden, findet sich jedoch vorwiegend in intestinalen und hepatischen Zellen.

Das HFE Protein besteht aus einer Signalsequenz aus 22 Aminosäuren, einer Peptidbindungsregion (α 1- und α 2-Domäne) und einer α 3-Domäne, die Ähnlichkeiten zu Immunglobulinen besitzt. Außerdem enthält das Protein einen transmembranösen Bereich und einen intrazytoplasmatischen Abschnitt.

Die α 1- und α 2-Domäne bilden eine Plattform aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen und zwei α -Helices. Diese Struktur ist an die α 3-Domäne gekoppelt, welche die Zellmembran durchzieht (s. Abb. 2. 2., Seite 16). [19]

Das HFE Protein wird gemeinsam mit β 2-Mikroglobulin an der Zelloberfläche exprimiert. Für die Expression ist die Aminosäure Cystein an Position 282 innerhalb der α 3-Domäne zuständig. Diese Aminosäure bindet über eine Disulfidbrücke an β 2-Mikroglobulin und schafft somit die Voraussetzung für die Expression des heterodimeren Moleküls.

Somit kann der HFE/ β 2-Mikroglobulin-Komplex an den Transferrin-Rezeptor TfR1 binden. TfR1 stellt den wichtigsten Rezeptor für Transferrin dar, wodurch die Transferrin vermittelte Eisenresorption im proximalen Abschnitt des Dünndarms reguliert wird. [20]

Die genaue Funktion des HFE Proteins bei der Aufnahme von Eisen ist nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass es keine Fähigkeit zur Peptidbindung und –präsentation besitzt.

Der Grund dafür liegt in einer einwärts orientierten Struktur der α_1 -Helix. Dies bedingt eine Einengung des zwischen der α_1 - und α_2 -Domäne gelegenen Spaltes, wodurch es Peptiden nicht möglich ist, eine Bindung mit dem HFE Protein einzugehen. [21]

Ende der 1990er Jahre wurde anhand von *in vitro* Untersuchungen gezeigt, dass das physiologisch normale HFE Protein die Liganden-Bindungsaffinität zu TfR1 herabsetzt. [22] Neueste Studien geben Grund zur Annahme, dass HFE die TfR1-vermittelte Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen in die Zelle begünstigt. [23] Es bedarf jedoch weiterer intensiver Forschungen, um die genaue Funktion des HFE Proteins diesbezüglich zu klären.

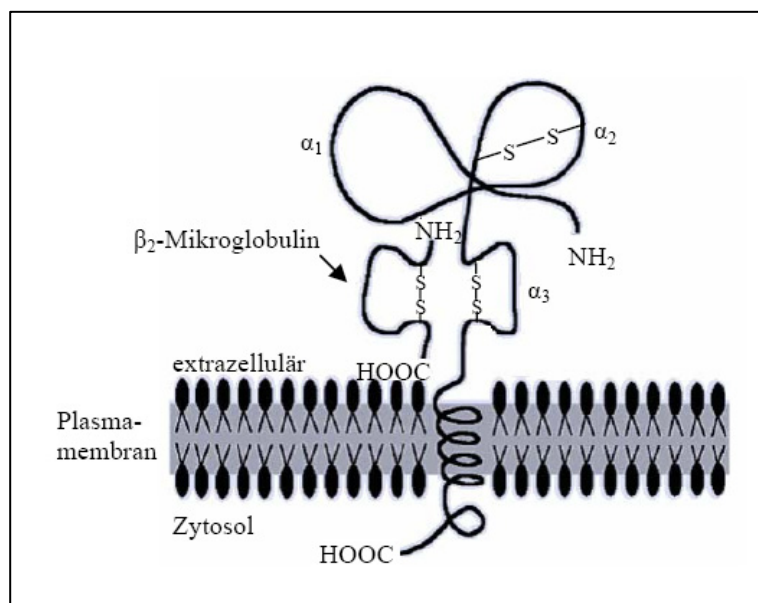


Abb. 2. 2.: Struktur des HFE Proteins mit drei Alpha-Domänen und seiner Assoziation mit β_2 -Mikroglobulin
(aus: Klinikarzt 2005; 34 (3): 62)

2. 2. 1. Exons und Introns des *HFE* Gens

Das *HFE* Gen ist auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert und erstreckt sich mit seinen Introns und Exons, die eine Gesamtlänge von 9612 Basen zeigen, von der Nukleotidposition 26195427 bis zur Nukleotidposition 26205038 dieses Chromosoms. [24]

Das *HFE* Gen besteht aus sieben Exons und sechs Introns und kodiert für 348 Aminosäuren. Der Großteil des Exons 6, welches aus 1056 Basenpaaren besteht, wird nicht translatiert. Exon 7 stellt kein Protein kodierendes Exon dar. Die Aminosäuresequenz des HFE Proteins kann Punkt 6.3. der Appendix entnommen werden.

2. 2. 2. Mutationen im HFE Gen

Die HFE-assoziierte, hereditäre Hämochromatose (HH1) stellt die häufigste, genetisch determinierte Lebererkrankung im nordeuropäischen Raum dar. [25] Ihre molekulare Ursache liegt in den meisten Fällen in einer Punktmutation im *HFE* Gen.

Die bislang nachgewiesenen, häufigen Mutationen im Hämochromatose-Gen bedingen eine Änderung in der Molekülstruktur des Proteins und führen zu dessen Funktionsbeeinträchtigung. Über komplexe Mechanismen wird eine vermehrte Eisenresorption im Darm induziert. Mangels effizienter Ausscheidungsmechanismen resultiert ohne Therapie durchschnittlich innerhalb der fünften Lebensdekade durch Akkumulation von Eisen eine Schädigung lebenswichtiger Organe.

Völkerkundliche Studien weisen auf eine keltische Abstammung der vor etwa 2000 Jahren im nordwestlichen Europa erstmals aufgetretenen *HFE* C282Y Mutation hin. Diese Annahme wird durch die höheren Prävalenzen, die in den keltischen Ländern, wie Schottland, England und Irland vorhanden sind, verstärkt. [26]. Die Ursache für den genetischen Defekt in der Evolution wird in einem Selektionsvorteil für Menschen mit höherer Eisenaufnahme in Regionen mit Eisenarmut gesehen. Zudem wird angenommen, dass die Mutation im *HFE* Gen vor allem den weiblichen Merkmalsträgern, die aufgrund der damals üblichen zahlreichen Schwangerschaften, der Laktation sowie der Menstruationszyklen, einen höheren Eisenbedarf hatten, einen Vorteil bot. Dieser erhöhte Eisenbedarf erklärt auch die im Vergleich zu Männern seltenere Manifestation der Hämochromatose bei Frauen. [27]

2. 2. 2. 1. HFE C282Y Mutation

Die im nordeuropäischen Raum am häufigsten auftretende Mutation bei Patienten, die an einer HFE-assoziierten Hämochromatose leiden, ist die Transition von Guanin nach Adenin an Nukleotidposition 845 im offenen Leserahmen des *HFE* Gens (G845A). Sie führt im korrespondierenden Polypeptid zu einer Substitution der Aminosäure Cystein 282 nach Tyrosin (C282Y). [28] Durch Zerstörung einer Disulfidbrücke in der $\alpha 3$ -Domäne des HFE Proteins verhindert die Mutation C282Y die korrekte Proteinfaltung und in weiterer Folge dessen Bindung an β_2 -Mikroglobulin (s. Abb. 2. 3., Seite 18). Dadurch wird die Expression des Proteinkomplexes an der Zelloberfläche nicht mehr ermöglicht. Dies führt letztendlich zu einer Fehlregulierung der intestinalen Eisenabsorption und wird als Ursache für den Großteil der HFE-assoziierten Hämochromatose Fälle angesehen. In Nordeuropa liegt die C282Y-Mutation bei etwa 5 von 1000 Personen in homozygoter Form vor [29].

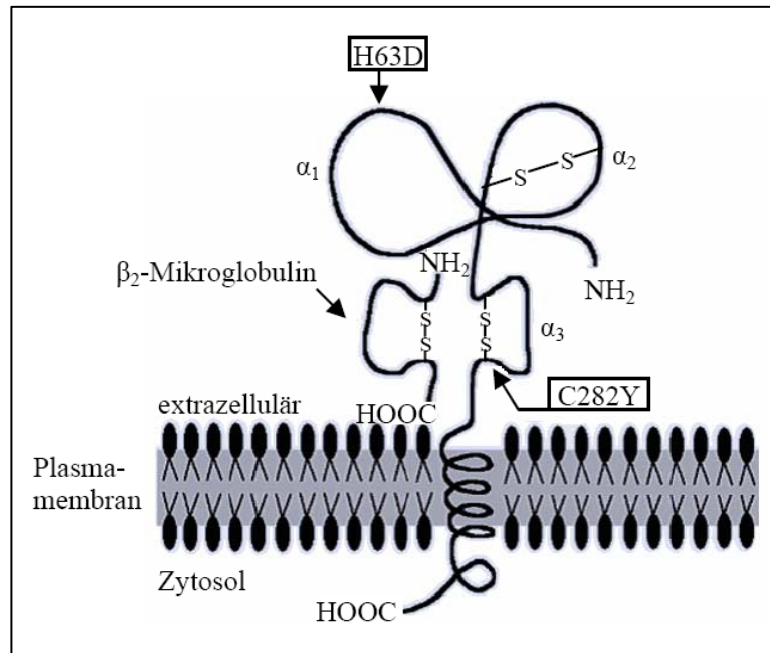


Abb. 2. 3.: Strukturmodell des HFE-Genproduktes und der zwei, für die Hämochromatose entscheidenden Mutationen: Cystein/ Tyrosin (C282Y) und Histidin/Asparaginsäure (H63D) (aus: Klinikarzt 2005; 34 (3): 62)

2. 2. 2. 2. HFE H63D Mutation

Eine weitere Mutation im *HFE* Gen, welche mit der hereditären Hämochromatose assoziiert ist, ist die Punktmutation H63D, die aus einem C/G-Austausch an der Nukleotidposition 187 besteht. Dies verursacht im Polypeptid einen Austausch der Aminosäure Histidin zu Asparaginsäure an Position 63 (H63D). [30] Im Unterschied zur C282Y-Mutation wird das HFE Molekül als Heterodimer exprimiert. Es ist jedoch aufgrund des Verlustes einer Histidin-Aspartat-Brücke in seiner Funktion gestört. Patienten mit homozygoter Mutation zeigen eine höhere Transferrinsättigung als Patienten ohne Mutation.

Die H63D-Mutation kann auch in Kombination mit der bereits erwähnten *HFE* C282Y Mutation als Compound-Heterozygotie C282Y/H63D auftreten. Etwa 1–2% dieser compound-heterozygoten Genträger werden für die Expression einer klassischen Hämochromatose als prädisponiert eingestuft. [31]

Liegt eine Homozygotie für das Allel C282Y bzw. die gemischte Heterozygotie C282Y/H63D vor, kann die Diagnose der hereditären Hämochromatose als gesichert gelten.

2. 2. 2. 3. HFE S65C Mutation

Die Transition von Serin nach Cystein in Nukleotidposition 65 (S65C) ist eine *HFE* Mutation, die einerseits in homozygoter Form, andererseits als Compound-Heterozygotie mit der Mutation H63D auftreten kann. Analysen von Mura et al. (1999) [32] zeigen, dass Patienten eine mildere Form der Hämochromatose zeigen können. Diese Mutation ist häufig, kommt jedoch seltener als die *HFE* C282Y und die *HFE* H63D Mutation vor.

Die genaue Auflistung aller bislang beschriebenen Mutationen im *HFE* Gen kann der Appendix 6. 4. entnommen werden.

2. 3. Das klinische Bild der hereditären Hämochromatose

Seit der Identifizierung des *HFE* Gens 1996 [33] ist bekannt, dass es sich bei der hereditären Hämochromatose nicht um eine monogenetische Erkrankung handelt, die ausschließlich aus einer Mutation im *HFE* Gen resultiert, sondern dass unterschiedliche genetische Veränderungen in verschiedenen Chromosomen vorliegen können, die eine pathologische Eisenüberladung induzieren.

Die hereditäre Hämochromatose wird derzeit in vier Haupttypen unterteilt, die durch Mutationen im *HFE* Gen, im *HJV* Gen bzw. im *HAMP* Gen, im *TfR2* Gen und im *SLC40A1* Gen verursacht werden. [34] Tab. 2. 1. (S. 22) und Tab. 2. 2. (S. 23) sollen einen Überblick über die derzeitige Klassifikation der hereditären Hämochromatose liefern.

2. 3. 1. Hereditäre Hämochromatose Typ 1

Als Typ 1 wird die klassische Hämochromatose, die mit Mutationen im *HFE* Gen assoziiert ist, klassifiziert. Sie ist die häufigste Form und tritt vor allem in nordeuropäischen Populationen auf, in denen die C282Y-Mutation eine hohe Allelfrequenz aufweist. [35]

Das Krankheitsbild der klassischen Hämochromatose kann sehr unterschiedlich sein. Erste Symptome sind im Allgemeinen ein Schwäche- bzw. Krankheitsgefühl. Diabetes mellitus, Leberzirrhose, endokrine Dysfunktionen und Kardiomyopathien sind ebenso Anzeichen für diese Erkrankung. Weitere Symptome können Arthritis, eine Hyperpigmentierung der Haut, Hypothyroidismus und hypogonadotroper Hypogonadismus sein. Patienten, die an hereditärer Hämochromatose Typ 1 erkranken, befinden sich meist in der fünften Lebensdekade, wobei Männer häufiger davon betroffen sind als Frauen (das Verhältnis von Mann zu Frau beträgt etwa 1:3).

Es wird angenommen, dass prämenopausale Frauen aufgrund von menstruationsbedingtem Blutverlust und Schwangerschaften eine Art von natürlichem Schutz bilden, der sie vor der klinischen Manifestation einer Eisenüberladung bewahrt. [36]

2.3.2. Hereditäre Hämochromatose Typ 2

Als hereditäre Hämochromatose Typ 2 wird die juvenile Hämochromatose bezeichnet, die ebenso wie Typ 1 eine autosomal-rezessive Erkrankung darstellt, jedoch viel seltener auftritt und nicht mit Mutationen im *HFE* Gen assoziiert ist. Die genetische Manifestation basiert auf Veränderungen sowohl im Chromosom 1, als auch im Chromosom 19. Aus diesem Grund wird die juvenile Hämochromatose in zwei Subtypen, 2A und 2B, unterteilt. [38]

Der **Subtyp 2A** beschreibt die Hämajuvelin-assoziierte Hämochromatose. Das entsprechende *HJV* Gen, ursprünglich als *HFE2* Gen bezeichnet, wurde im Jahr 2004 auf Chromosom 1 (1q21) identifiziert. [37] Es kodiert für das Protein Hämajuvelin, von dem angenommen wird, dass es regulatorische Funktionen im Eisenstoffwechsel einnimmt, indem es die Expression von Heparin über einen Signaltransduktionsweg, in Abhängigkeit des Eisenbestandes, moduliert. Labordiagnostische Untersuchungen an Patienten mit juveniler Hämochromatose zeigen niedrige Heparin-Werte sowie erhöhte Serum-Ferritin-Werte und Eisenakkumulationen in parenchymalen Zellen, vor allem in der Leber, im Herzen und in endokrinen Drüsen. Die Erkrankung wird oft bei Patienten in der zweiten und dritten Lebensdekade diagnostiziert. Der Krankheitsverlauf ist meist schneller und gravierender als bei Hämochromatose Typ 1-Patienten und zeichnet sich klinisch vorwiegend durch Kardiomyopathien und Hypogonadismus aus. Männer und Frauen sind von der Krankheit gleichermaßen betroffen.

Viel seltener als der Subtyp 2A wird der **Subtyp 2B** beobachtet. Hierbei handelt es sich um die Heparin-assoziierte Hämochromatose, die durch Mutationen im *HAMP* Gen auf Chromosom 19 (19q13.1) induziert wird. Das Heparin Molekül reguliert die Eisenausschüttung aus Enterozyten, Makrophagen und placentaren Zellen.

Aufgrund einer Mutation im kodierenden Gen wird die Struktur des Heparin Proteins verändert und bewirkt dessen Inaktivierung. Die funktionelle Konsequenz liegt in einer maximalen Eisenausschüttung aus dem Darm sowie der vermehrten Eisenausschüttung aus retikuloendothelialen Zellen. Die daraus resultierende Eisenüberladung in den Hepatozyten kann langfristig zu Leberfibrose und Leberzirrhose führen. Von klinischer Relevanz sind auch Kardiomyopathien sowie Hypogonadismus.

2. 3. 3. Hereditäre Hämochromatose Typ 3

Erstmals im Jahr 2000 wurde die Transferrin Rezeptor 2-assoziierte Hämochromatose (Typ 3) beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt war diese die erste hereditäre Hämochromatose-Form, die nicht einer *HFE* Mutation zugeordnet wurde. Das *TfR2* Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q22) und kodiert für den Transferrin Rezeptor 2, der für die Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen in die Zellen verantwortlich ist und sich an der Regulierung von Heparin beteiligt. TfR2 wird ausschließlich in der Leber exprimiert. Mutationen im *TfR2* Gen folgen einem autosomal-rezessiven Erbgang und führen zu einer Eisenüberladung in der Leber, gefolgt von den selben Symptomen, die, wie zuvor erwähnt, bei einer hereditären Hämochromatose vom Typ 1 vorgefunden werden können. Von klinischer Bedeutung sind erhöhte Serum-Eisen-Werte und Eisenakkumulationen in parenchymalen Zellen. [39]

2. 3. 4. Hereditäre Hämochromatose Typ 4

Die Ferroportin-assoziierte hereditäre Hämochromatose, die nach der Datenbank OMIM als Typ 4 klassifiziert wird, wird im Unterschied zu den Hämochromatose Typen 1–3 autosomal-dominant vererbt. Defekte im *SLC40A1* Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2q32) beeinträchtigen die Funktion des Eisentransport-Proteins Ferroportin im Blut und können dessen Funktionsverlust bewirken. Die Folge sind eine erhöhte intestinale Eisenabsorption sowie eine vermehrte Freisetzung von Eisen aus retikuloendothelialen Zellen. Die typischen Symptome sind jenen der *HFE* Hämochromatose ähnlich, jedoch meist milder. Ein Anstieg der Serum-Ferritin-Werte sowie eine erhöhte Transferrin-Sättigung sind wichtige Laborparameter zur Diagnose der Ferroportin-assoziierten Eisenüberladung. [40]

Aktuell gibt es vier verschiedene Formen der hereditären Hämochromatose (Typ 2A, 2B, 3 und 4), die auf Mutationen zurückzuführen sind, welche nicht im *HFE* Gen, sondern in verschiedenen Genen, auf unterschiedlichen Chromosomen auftreten. Diese Mutationen wurden in verschiedenen Populationen weltweit beschrieben und sind manchmal nur auf einzelne Familien beschränkt. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten der Hämochromatose Haupttypen wird ersichtlich, dass ihre Gene gemeinsam für die Regulation des Eisenstoffwechsels und die Aufrechterhaltung der Eisen-Homöostase verantwortlich sind. Eine Mutation in einem einzigen dieser Gene kann die Regulation des Eisenstoffwechsels beeinträchtigen und zu einer pathologischen Eisenüberladung führen.

Für das bessere Verständnis der Regulationsmechanismen werden weitere, intensive Forschungen an diesen Molekülen, ihren funktionellen Beziehungen zueinander sowie ihren Signaltransduktionswegen notwendig sein.

Tab. 2. 1: Überblick über die Klassifikation der hereditären Hämochromatose (HH) in vier Haupttypen, nach der Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) [41; 42]

	<i>HFE</i>- assoziierte HH	Juvenile HH		<i>TfR2</i>- assoziierte HH	Ferroportin- assoziierte HH
OMIM Klassifikation	Typ 1 (OMIM 235200)	Typ 2 Subtyp A (OMIM 602390)	Typ 2 Subtyp B (OMIM 606464)	Typ 3 (OMIM 604250)	Typ 4 (OMIM 606069)
Betroffenes Gen	<i>HFE</i>	<i>HJV (HFE2)</i>	<i>HAMP</i>	<i>TfR2</i>	<i>SLC40A1</i>
Chromosomale Lage	6p21.3	1q21	19q13.1	7q22	2q32
Genprodukt	HFE-Protein	Hemojuvelin	Hepcidin	TfR2	Ferroportin
Funktion des Genproduktes	Regulation der Expression von Hepcidin; Interaktion mit TfR1; möglicherweise Erleichterung der Aufnahme von Transferrin- gebundenem Eisen	Unbekannt; möglicherweise Regulation der Expression von Hepcidin	Hemmung der Freisetzung von Eisen aus den Enterozyten, Makrophagen und plazentaren Zellen	Möglicherweise Aufnahme von Eisen in die Hepatozyten	Export von Eisen aus den Enterozyten, Hepatozyten, Makrophagen und plazentaren Zellen
Modus der Vererbung	Autosomal- rezessiv	Autosomal- rezessiv	Autosomal- rezessiv	Autosomal- rezessiv	Autosomal- dominant
Hauptorgane der Eisen- akkumulation	Leber, endokrine Drüsen, Herz	Leber, endokrine Drüsen, Herz	Leber, endokrine Drüsen, Herz	Leber, endokrine Drüsen, Herz	Leber, Milz

Tab. 2. 2.: Überblick über die Klassifikation der hereditären Hämochromatose (HH) in vier Haupttypen nach der Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) [41; 43]

	<i>HFE</i>- assoziierte HH	Juvenile HH		<i>TfR2</i>- assoziierte HH	Ferroportin- assoziierte HH
Eisen- ablagerung	parenchymal	parenchymal	parenchymal	parenchymal	retikulo- endothelial
Potenzial der Schädigung der Organe	Variabel	Hoch	Hoch	Variabel	Niedrig
Reaktion auf therapeutische Phlebotomie	Exzellente; Abnahme des Serum-Ferritin- Wertes und der Transferrin- Sättigung	Exzellente; Abnahme des Serum-Ferritin- Wertes und der Transferrin- Sättigung	Exzellente; Abnahme des Serum-Ferritin- Wertes und der Transferrin- Sättigung	Exzellente; Abnahme des Serum- Ferritin- Wertes und der Transferrin- Sättigung	Mittelmäßig; rasche Abnahme der Transferrin- Sättigung mit bestehendem, hohen Serum- Ferritin-Wert
Risiko einer Anämie durch therapeutische Phlebotomie	Nein	Nein	Nein	Nein	Möglich bei prämenopausalen Frauen; erhöhtes Risiko einer Anämie nach einer aggressiven Phlebotomie- Behandlung
Alter bei Erstdiagnose	4. – 5. Lebensdekade	2. – 3. Lebensdekade	2. – 3. Lebensdekade	4. – 5. Lebensdekade	4. – 5. Lebensdekade

2. 4. Diagnostik der hereditären Hämochromatose

2. 4. 1. Konventionelle diagnostische Parameter

In der traditionellen klinisch-chemischen Diagnostik werden zur phänotypischen Beurteilung des menschlichen Eisenhaushaltes bei Verdacht auf eine Eisenüberladung die Eisenkonzentration und die Ferritinkonzentration im Plasma bzw. im Serum bestimmt sowie eine Analyse der Transferrin-Sättigung in wechselnden Kombinationen durchgeführt. Isolierte Analysen der Eisenkonzentrationen im Plasma bzw. Serum werden nicht empfohlen, da Eisenkonzentrationen, die sich im Normbereich befinden, eine Eisenüberladung nicht ausschließen können. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass erhöhte Eisenkonzentrationen gemessen werden, denen keine ursächliche Eisenspeicherkrankheit zugrunde liegt. [44]

In der Hämochromatose-Diagnostik ist die Transferrin-Sättigung der sensitivste Parameter zur Erfassung der Eisenüberladung. Die Transferrin-Eisen-Sättigung ist ein Maß für das im Körper zur Verfügung stehende Funktionseisen und wird nach folgender Formel berechnet: [45]

$$\text{Transferrin-Sättigung [\%]}: \frac{\text{Serumeisen } [\mu\text{mol/l}]}{\text{Transferrin im Serum } [\text{mg/dl}]} \times 398$$

Eine Eisenüberladung im menschlichen Organismus führt zu einer erhöhten Transferrin-Sättigung. Transferrin-Sättigungen beim nüchternen Patienten über 45% (bei prämenopausalen Frauen über 35%) sind ein sensitiver Hinweis für eine mögliche hereditäre Hämochromatose. [46]

2. 4. 2. Nichtinvasive Leber-Eisen-Quantifizierung

Eine nichtinvasive Methode zur Quantifizierung des Leber-Eisens stellt die Messung der magnetischen Suszeptibilität der Leber *in vivo* mittels SQUID-Biosuszeptometer dar (SQUID = supraconducting quantum interference device). [47]

Dazu wird ein kleines, hoch konstantes Magnetfeld außen an den Körper angelegt. Durch das paramagnetische Speichereisen in der Leber des Patienten wird eine Störung dieses Magnetfeldes induziert, dessen Größe gemessen und direkt in die Eisenkonzentration umgerechnet werden kann.

Trotz ihrer hohen Sensitivität und Schnelligkeit können mangels uniformer Eisenverteilung in der Leber bei dieser diagnostischen Methode Abweichungen vom Mittelwert auftreten.

Im Vergleich zur klassischen Leberbiopsie stellt die Messmethode mittels Biomagnetometer eine weitaus zuverlässigere Methode zur Leber-Eisen-Quantifizierung dar. [48]

2. 4. 3. Molekulargenetische Diagnostik bei hereditärer Hämochromatose

Mit Hilfe der Genotypisierung der beiden am häufigsten auftretenden Mutationen C282Y und H63D wird die Diagnose der hereditären Hämochromatose sowohl bei homozygoten C282Y-Erbträgern, als auch bei der Compound-Heterozygotie C282Y/H63D gesichert.

Unter anderem stehen folgende molekulargenetische Methoden zur Verfügung: [49]

- Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit nachfolgendem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)
- Allel-spezifische Amplifikation
- Real-time PCR-Verfahren
- Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (SSCP) mit Kapillarelektrophorese

Eine Kombination von konventionellen und molekulargenetischen Untersuchungsmethoden kann bei ca. 90% der Patienten mit phänotypischer Eisenüberladung die Ursache abklären. Wird in einem gendiagnostischen Verfahren keine Mutation im *HFE* Gen gefunden, kann in dringenden Fällen mittels Sequenzierung der Exonstrukturen sowie der Übergänge von Exons zu Introns eine seltene Mutation nachgewiesen werden.

2. 5. Therapie der hereditären Hämochromatose

Die effektivste Behandlungsmethode der hereditären Hämochromatose stellt die Phlebotomie dar. Mit einem wöchentlichen Blutentzugsvolumen von zirka 500 ml, welches in etwa einer Menge von 250 mg Eisen entspricht, soll eine lineare Abnahme der Leber-Eisenkonzentration erzielt werden. Bei der Blutentnahme muss der Hämatokrit – der Anteil der zellulären Bestandteile am Volumen des Blutes – berücksichtigt werden, um einer Anämie vorzubeugen. Das Therapieziel ist ein Serum-Ferritin-Wert von weniger als 50 ng/ml [50].

Durch wiederholende Messungen mittels eines Biomagnetometers können frühzeitig Abschätzungen der individuell vorhandenen Eisenreservoirs vorgenommen werden und der Fortgang der Aderlass-Therapie jederzeit objektiv geklärt werden.

2. 6. Ziel der Diplomarbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein System zur Mutationsanalyse bei PatientInnen mit Eisenüberladung unklarer Genese zu etablieren. Dieses System sollte die Mutationssuche im *HFE* Gen von PatientInnen, bei denen ein Verdacht auf hereditäre Hämochromatose bestand, ermöglichen.

Für die Durchführung der Sequenzanalyse des *HFE* Gens auf Basis der genomischen DNA wurde die Vorlage von Steiner et al. (2002) [51] verwendet. Michael Steiner publizierte im Jahr 2002 eine neue Mutation im *HFE* Gen. Mittels eines molekularen gendiagnostischen Verfahrens wurde in einem, an hereditärer Hämochromatose erkrankten, vietnamesischen Patienten eine neue, homozygote Mutation IVS5+1G/A an der Schnittstelle zwischen Exon 5 und Intron 5 gefunden. Der Patient wies keine der drei *HFE*-Mutationen C282Y, H63D und S65C auf, zeigte jedoch typische klinische Symptome einer hereditären Hämochromatose.

Anlehnend an die Vorlage von Steiner et al. [51] wurde ein Mutationsanalyse-Verfahren im *HFE* Gen etabliert und an anonymisierten PatientInnen, bei denen im Rahmen einer zuvor bereits durchgeführten Genanalyse keine der *HFE* Mutationen C282Y, H63D und S65C detektiert wurde, getestet.

3. Material und Methoden

3. 1. Patienten und Ausgangsmaterial

Von 23 Patienten, die biochemische Zeichen einer Eisenüberladung aufwiesen, wurde bereits zuvor im Rahmen der Routinediagnostik nach den im nordeuropäischen Raum häufigsten, *HFE*-assoziierten Mutationen C282Y, H63D und S65C gesucht.

Da die Proben keine dieser Mutationen aufwiesen, wurde im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit mittels eines entsprechenden PCR Systems und einer implizierten Sequenzanalyse nach weiteren Mutationen gesucht, die im Zusammenhang mit der hereditären Hämochromatose stehen könnten.

Prinzipiell setzt sich eine Mutationsanalyse mittels Sequenzierung aus folgenden technischen Schritten zusammen:

1. Isolierung der DNA
2. PCR zur Amplifizierung des zu sequenzierenden Gens, in dem die Mutation vermutet wird
3. Reinigung der PCR Produkte
4. Sequenzreaktion / Sequenzanalyse via PCR
5. Reinigung der sequenzierten PCR-Produkte
6. Sequenzanalyse mittels Kapillarelektrophorese
7. Mutationsanalyse via Software, durch Vergleich der Basensequenz der Proben mit einer Referenzsequenz, die keine Mutation enthält (= Wildtyp)

Aufgrund dessen, dass von den 23 Patienten anonymisiertes Restmaterial vorhanden war, war das Ausgangsmaterial für diese Studie somit bereits im Labor vorhandene DNA.

Als Mutationskontrolle diente eine heterozygote Probe eines ebenso anonymisierten Patienten, welche die Mutationen C282Y und H63D trug. Die aus Vollblut isolierte DNA dieses Patienten sowie ein gesundes Vergleichskollektiv standen bereits zur Verfügung.

3. 1. 1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Durchführung einer Sequenzanalyse ist die Amplifizierung der zu untersuchenden Genabschnitte mittels PCR Voraussetzung, um genügend Material für die Sequenzierung zu erhalten. Das Prinzip der PCR besteht darin, einen bestimmten DNA-Abschnitt durch die gezielte Auswahl von Primern enzymatisch zu amplifizieren. In sogenannten PCR-Cyclern wird mittels eines automatisierten Zyklusverfahrens, das aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Syntheseschritt besteht, binnen kurzer Zeit eine große Anzahl von Kopien an DNA-Abschnitten produziert. Für eine erfolgreiche Amplifikationsreaktion sind die Mischung der notwendigen Komponenten nach einem Standardprotokoll (PCR Mastermix) sowie die Programmierung des PCR-Cyclers (Eingabe der Temperaturen, der Dauer der einzelnen Teilschritte sowie der Anzahl der Zyklen) entscheidend.

3. 2. Amplifikation der genomischen DNA mittels PCR

Für die Amplifikation der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Exons 1–6 des *HFE* Gens wurden die in der Vorlage von Steiner et al. [51] beschriebenen Primer verwendet. Ihre Sequenzen können der Tabelle 3. 1. entnommen werden.

Primer	Sequenz 5' → 3'	PCR Produkt Größe, bp	Annealing- Temperatur, ° C
Ex 1 fw	CAACAACACCCCTTCAGGAT	297	61
Ex 1 rv	TGAGCAGGTCCTCCAAAGTT		61
Ex 2 fw	ACATGGTTAAGGCCTGTTGC	264	61
Ex 2 rv	GCTCCCACAAGACCTCAGAC		61
Ex 3 fw	CTTGGGGATGGTGGAAATAG	276	61
Ex 3 rv	GAGCAACCTCCTCCACTCTG		61
Ex 4 fw	GGTCCAGTCTTCCTGGCAAGG	276	61
Ex 4 rv	GCACTCCTCTTAACCCCAATAG		61
Ex 5 fw	GATGAGAGCCAGGAGCTGAG	114	61
Ex 5 rv	CCCTGGGGCAGAGGTACT		61
Ex 6 fw	GGTTTGTGATGCCTCTTTCC	1056	56
Ex 6 rv	TGGGGAAATCTTTTGTGAGGA		56

Tab. 3. 1.: Primer für Amplifizierung des *HFE* Gens, nach Steiner et al. [52]

bp = Basenpaare, Ex = Exon, fw = forward, rv = reverse

Für die Amplifizierung der sechs Primerpaare wurde zuerst ein PCR-Gradient für jedes Exon des *HFE* Gens gesondert durchgeführt. Dadurch konnten die optimalen Bedingungen für die PCR Systeme eruiert werden, die auf folgenden Angaben (s. Tab. 3. 2. und 3. 3.) basierten:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	15 sec	} 35x
Annealing	56°C	30 sec	
	61°C		
Extension	72°C	45 sec	
Finale Extension	72°C	7 min	
Finale	4°C	Unendlich	

Tab. 3. 2.: PCR-Protokoll

Primer	Annealing-Temperatur, °C
Ex 1 fw / Ex 1 rv	61
Ex 2 fw / Ex 2 rv	61
Ex 3 fw / Ex 3 rv	61
Ex 4 fw / Ex 4 rv	61
Ex 5 fw / Ex 5 rv	61
Ex 6 fw / Ex 6 rv	56

Tab. 3. 3.: Annealing-Temperaturen; Ex = Exon, fw = forward, rv = reverse

Für die optimale Durchführung der jeweiligen PCR von Exon 1–6 wurde folgendes Protokoll für den PCR-Mastermix verwendet:

Mastermix	1x	
10x HF Puffer ohne MgCl ₂	2,5	µl
25mM MgCl ₂	1,5	µl
dNTP Mix (LOT Nr.: 302144)	2,0	µl
HFE Exon 1–6 Primer fw (10pmol/µl)	2,5	µl
HFE Exon 1–6 Primer rv (10pmol/µl)	2,5	µl
HFE Enzym (3,5U/µl) (LOT Nr.: H08012)	0,2	µl
HPLC Wasser	12,8	µl
Total	24	µl
DNA unverdünnt	1	µl

Die Protokolle (25µl-Ansätze) wurden mit den Thermocyclern Multicycler PTC 200-1 und PTC 200-3 (MJ Research) erstellt.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation wurde nach der jeweiligen abgeschlossenen PCR das PCR-Produkt mit Hilfe der Gelelektrophorese, die zusammen mit einem entsprechenden Längenmarker und einer Negativprobe durchgeführt wurde, auf seine Basenlänge und Reinheit untersucht.

Für die Gelkontrolle wurden jeweils 3 µl PCR Produkt mit 1µl 5x loading buffer gemischt. In der ersten Spur des 6%-igen Polyacrylamid Gels wurden 3µl *MspI* Längenmarker pipettiert. In den daneben befindlichen Spuren wurden jeweils 3µl der PCR-Produkte aufgetragen. Abschließend folgte die Negativkontrolle in einer eigenen Spur. Bei einer Stärke von 175 Volt wurde das beladene Polyacrylamid Gel für 45 min der Elektrophorese zugeführt. Unmittelbar danach wurde das Gel für 15 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green in einer Wanne gefärbt, um die DNA-Banden auf dem Gel nachweisen zu können, und dieses auf dem UV Transilluminator fotografiert. Anschließend wurden die Bandenmuster hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität beurteilt.

3. 3. Reinigung mittels Exo-SAP-IT-Verdau

Nachdem die PCR-Amplifikation für alle sechs *HFE* Exons erfolgreich abgeschlossen war, wurden die PCR-Produkte für die Sequenzanalyse gereinigt und enzymatisch aufbereitet. Dazu wurden sie einem Exonuklease- und Shrimps-alkalischer Phosphatase-Verdau (ExoSAP-IT) im Thermocycler PTC 200-1 unterzogen.

Protokoll der enzymatischen Reinigung der PCR-Produkte:

	Volumen
PCR-Produkt	10 μ l
ExoSAP-IT (LOT Nr.: 116776)	4 μ l
Gesamtvolumen	14 μ l

Schritt	Temp.	Zeit
Enzyminkubation	37°C	30 min
Enzyminaktivierung	80°C	15 min
Finale	4°C	Unendlich

Nach dem enzymatischen Reinigungsvorgang mittels ExoSAP-IT wurde abermals eine Gelelektrophorese zur Kontrolle durchgeführt. Dazu wurden jeweils 2 μ l des PCR-Produktes bzw. des Low DNA Mass Ladder-Markers mit 1 μ l 5x loading buffer gemischt und auf ein 6%-iges Polyacrylamid Gel aufgetragen. Bei 150 Volt und einer Laufzeit von 40 min wurden die PCR-Produkte ihrer Größe nach aufgetrennt. Nach einer 15-minütigen Färbeprozedur mit Sybr Green wurden die fertigen Gele wieder im UV Transilluminator fotografiert, um den Reinigungsschritt qualitativ zu überprüfen und abschätzen zu können, welches Volumen an gereinigtem PCR-Produkt für eine optimale Nukleotidsequenzanalyse benötigt werde.

3. 4. Sequenzreaktion

Um die Basensequenz der DNA bestimmen zu können, existieren unterschiedliche Sequenzierverfahren, wobei im Prinzip sowohl der kodierende, als auch der nicht kodierende DNA-Strang sequenziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzreaktionen mittels der „Cycle Sequencing“ Technik, einer Modifikation der DNA-Sequenziermethode nach F. Sanger et al. (1977) [53], durchgeführt.

Neben DNA, Primern, thermostabiler DNA-Polymerase und vier dNTPs sind weitere Komponenten, und zwar vier, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs sowie Puffer mit Magnesium- und Kalium-Ionen dazu notwendig.

Bei dieser Methode wird der zu analysierende Abschnitt des DNA-Doppelstranges, der als Matrize für die Synthese neuer DNA-Fragmente dient, zuerst durch Erhitzung denaturiert und in zwei Einzelstränge aufgeteilt. Ausgehend vom Sequenzierprimer, der an den komplementären DNA-Strang bindet, wird dieser, durch Anfügen von dNTPs mit Hilfe der DNA-Polymerase solange linear verlängert, bis zufälligerweise und abhängig von der komplementären Base ein Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTPs = ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) eingebaut wird. Der Einbau eines ddNTPs verursacht einen Kettenabbruch, da aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe an seinem 3'-C-Atom kein weiteres Nukleotid an den komplementären DNA-Strang eingefügt werden kann. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die endständig mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung im Sequenzierer werden die Farbstoffmoleküle der DNA-Fragmente beim Passieren eines Detektionsfensters von einem Laserstrahl angeregt, wodurch sie Fluoreszenzsignale senden. Die Abfolge dieser Signale entspricht der Basensequenz des untersuchten DNA-Stranges. Mit Hilfe einer Sequenzanalyse-Software kann ein farbiges Schema der DNA-Sequenz erstellt werden.

Für die Nukleotidsequenzanalyse wurden jene, unter Punkt 6. 1. im Appendix der vorliegenden Arbeit, aufgelisteten Oligonukleotidprimer verwendet. Für die Durchführung der Sequenzreaktionen wurde der ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet.

Protokoll für die Sequenzreaktion von *HFE* Exon 1–6 (jeweils 10 µl-Ansatz):

Mastermix	1x
RRM (1,6µl Magic Dye + 0,4µl Big Dye)	2 µl
HFE Exon 1–6 fw + rv Primer (1,6pmol/µl)	2 µl
5x Puffer	1,5 µl
HPLC Wasser (variabel)	2,5 µl
Total	8 µl
PCR-Produkt	2 µl

Durch Vergleich der Fragmentlängen der PCR-Produkte nach dem ExoSAP-IT-Verdau mit dem Low DNA Mass Ladder-Längenmarker wurde ein entsprechendes Volumen der Proben für die Sequenzreaktion eingesetzt, wobei folgende Faustregel berücksichtigt wurde:

$$\frac{\text{Fragmentlänge (in bp)}}{50} = \text{Menge in ng}$$

Um unsere 10µl-Ansätze konstant zu halten, wurde, je nach Volumen des PCR-Produktes, das entsprechende Volumen an HPLC Wasser eingesetzt, wobei die PCR-Produkte prinzipiell auf eine Konzentration von 1,5–5 ng/µl mit HPLC Wasser verdünnt werden sollten.

Die Sequenzreaktion wurde an den Thermocyclern Multicycler 200-1 und 200-3 unter den in Tabelle 3. 4. aufgelisteten Bedingungen durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	96°C	1 min	
Denaturierung	96°C	10 sec	} 25x
Amplifikation	56°C	5 sec	
Extension	60°C	4 min	
Finale	4°C	Unendlich	

Tab. 3. 4.: Protokoll PCR-Amplifikation – Cycle Sequencing

3. 5. Reinigung der Sequenzierprodukte vor der Kapillarelektrophorese

Um ein optimales Sequenzierergebnis zu erhalten, ist es notwendig, die Produkte der Sequenzreaktion vor der Nukleotidsequenzanalyse aufzureinigen. Dies wurde mittels Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit der Firma Millipore durchgeführt. Bei diesem Arbeitsschritt werden die Sequenzproben mit Hilfe eines Vakuumverteilers durch Vakuumfiltration von überschüssigen Farbstoff-Terminatoren und Salzen, die bei der Kapillarelektrophorese störend wirken, befreit.

Praktisch wurden die Sequenzansätze folgendermaßen durchgeführt:

Zuerst wurden die Sequenzreaktionen mit 25µl Injection Solution verdünnt, mit der elektronischen Pipette 3–5 Mal gemischt und anschließend auf den Boden der Wells der SEQ96 Platte transferiert. Da nicht alle 96 Wells der Platte gebraucht wurden, wurden die unbenutzten Wells mit einem Klebeband luftdicht abgedeckt, um einen optimalen Vakuumaufbau zu gewährleisten.

Als nächstes wurde der Vakuumverteiler an den Schlauch der Vakuumpumpe angesteckt, der Schlauch mit dem Plastikventil verschlossen und die Reinigungsplatte auf den Vakuumverteiler aufgesetzt.

Nach Einschaltung der Vakuumpumpe und Öffnen des Plastikventils am Schlauch wurden die Proben bei einem Unterdruck von 20–25mmHg vier Minuten filtriert, bis alle Wells vollständig entleert waren. Prinzipiell sollte ein Übertrocknen durch zu langes Filtrieren vermieden werden.

Das Plastikventil wurde wieder geschlossen, die Vakuumpumpe abgeschaltet und die Platte vom Vakuumverteiler entfernt, nachdem sich das Vakuum vollständig abgebaut hatte. Zum Druckausgleich wurde das Ventil wieder geöffnet.

Anschließend wurde die Unterseite der Reinigungsplatte auf einem Papierhandtuch leicht abgeklopft, bevor in einem zweiten Waschschrift nochmals 25µl Injection Solution in die Filterwells pipettiert wurden, und die Vakuumfiltration, wie oben erläutert, ein weiteres Mal durchgeführt wurde.

Nach der zweiten Filtration wurde die Platte abermals auf einem Papiertuch vorsichtig abgeklopft und die gereinigten Sequenzproben mit 25µl Injection Solution resuspendiert.

Beim Resuspendieren wurde folgendermaßen vorgegangen:

Das gewünschte Endvolumen von 25µl Injection Solution wurde in die Wells der Reinigungsplatte so pipettiert, dass mit der Pipette die Proben 20 Mal auf- und abpipettiert wurden, ehe sie in eine frische 96Well-Sequenzplatte transferiert wurden.

Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Lufteinschlüsse im Endvolumen vorhanden waren, da die Kapillaren des automatisierten Sequencers „ABI PRISM[®] 3130 Genetic Analyzers“ (Fa. Applied Biosystems) beim Ziehen von Luft zerstört werden.

Nach der Benutzung wurde der Vakuumverteiler unter fließendem, deionisiertem Wasser gereinigt.

3. 6. Kapillarelektrophorese

Nach der Aufreinigung der Sequenzierprodukte wurden die Proben auf eine Sequenzplatte transferiert, um in weiterer Folge mittels Kapillarelektrophorese im ABI PRISM[®] 3130 Genetic Analyzer in einem automatisierten Prozess analysiert zu werden. Mit Hilfe des Arbeitsprogrammes Data Collection Software Version 2.0 wurden die gewonnenen Sequenzierdaten auf der Festplatte eines Windows NT Computers gespeichert.

3. 7. Mutationsanalyse

Nachdem die Sequenzierdaten in das Softwareprogramm SeqScope Version 2.5 (ABI PRISM[®] 3130) eines Analysecomputers importiert wurden, fanden die Auswertung und Befundung der analysierten DNA-Sequenzen mit Hilfe dieses Programmes statt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Signalintensitäten einen Wert zwischen 100 und 1000 aufwiesen.

Die Nukleotidsequenzen wurden mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Referenzsequenz (GenBank Accession Number: NC_007592) verglichen und eine Mutationsanalyse durchgeführt. Bei der Auswertung der Basen waren nicht automatisch identifizierte Basen farblich rot markiert. Diese wurden nach einer visuellen Nachkontrolle und eindeutiger Zuordnung der Peaks manuell beurteilt. War eine präzise Beurteilung der Peaks mangels Qualität nicht möglich, wurde die Sequenzreaktion wiederholt und erneut beurteilt.

4. Resultate

Für die Etablierung unseres PCR-Systems und die Mutationsanalyse im *HFE* Gen wurde anonymisiertes Restmaterial von 23 Patienten verwendet, welches bereits als isolierte DNA zur Verfügung stand. Als heterozygote Kontrolle wurde die DNA eines weiteren anonymisierten Patienten herangezogen. Eine anonyme Negativkontrolle stand ebenfalls zur Verfügung.

Nach der Vorlage von Steiner et al. [54] wurde, unter Verwendung der darin beschriebenen Primer, zuerst ein PCR-Gradient erstellt, anhand dessen sich herausstellte, dass die optimale Annealing-Temperatur für die *HFE* Exons 1 bis 5 bei 61° C lag und für Exon 6 bei 56° C.

Nach einem Standard PCR-Protokoll wurde, unter Verwendung der jeweiligen spezifischen Primer, die PCR-Amplifikation aller gDNA-Abschnitte durchgeführt (vergl. Kap. 3. 2.). Mit Hilfe der daran angeschlossenen Polyacrylamidelektrophorese wurde anhand der Stärke und Schärfe der jeweiligen Bande die Qualität der DNA beurteilt. Damit wurde bestätigt, dass die optimalen Bedingungen für die PCR-Amplifikation erfasst worden waren, da die Amplifikation bei allen sechs Exons des *HFE* Gens einwandfrei funktioniert hatte.

Die Abbildungen 4. 1. und 4. 2. zeigen das Ergebnis der Polyacrylamidelektrophorese nach erfolgter PCR-Amplifikation von Exon 5.

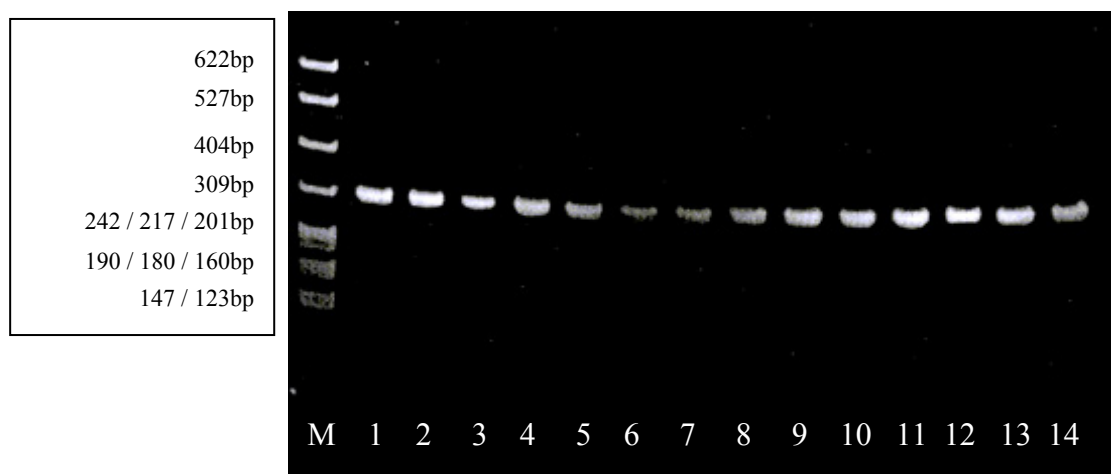


Abb. 4. 1.: Polyacrylamidelektrophorese nach PCR im Exon 5; Proben: 1 bis 14 = anonymisierte Patienten mit Verdacht auf hereditäre Hämochromatose; M = Längenmarker *MspI*

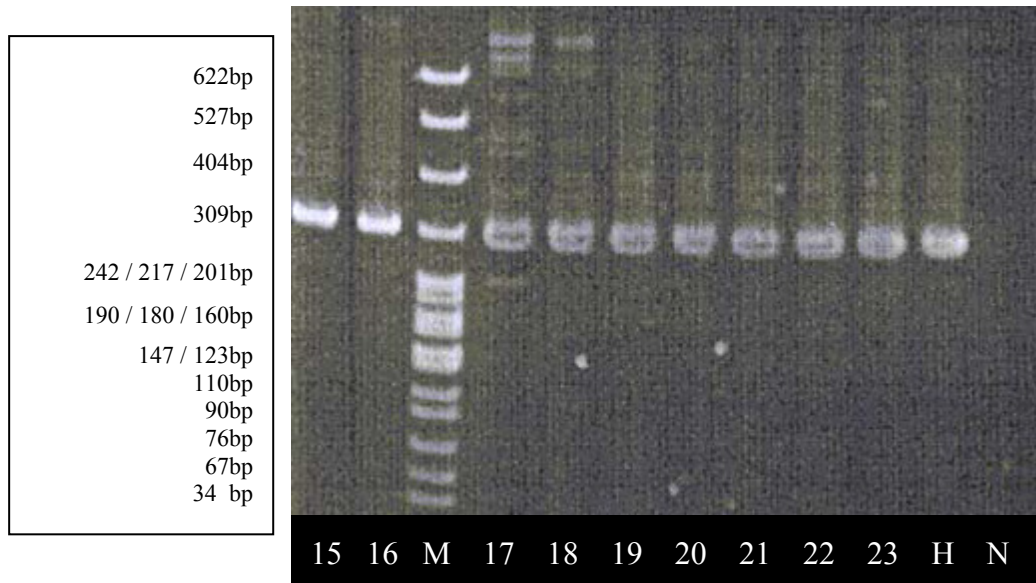


Abb. 4. 2.: Polyacrylamidelektrophorese nach PCR im Exon 5; Proben: 15 bis 23 = anonymisierte Patienten mit Verdacht auf hereditäre Hämochromatose Typ 1; M = Längenmarker *MspI*; H = heterozygote Kontrolle; N = Negativkontrolle; bp = Basenpaare

Nach der erfolgreichen PCR-Amplifikation aller Proben in den Exons 1 bis 6 wurden die PCR-Produkte weiter verarbeitet. Vor der Sequenzanalyse erfolgte die Reinigung mittels ExoSAP-IT-Verdau. Die folgenden Abbildungen 4. 3. bis 4. 6. zeigen die qualitativ zufriedenstellenden Gelkontrollen für die Exons 1, 2, 3 und 5, die anschließend an den Reinigungsschritt folgten.



Abb. 4. 3.: Gelkontrolle nach ExoSAP-IT-Reinigung der PCR-Produkte im Exon 1; Proben: 1 bis 14 (Proben 15 – 23, H und N ohne Abbildung); M = Längenmarker (Low DNA Mass Ladder der Fa. Invitrogen); H = heterozygote Kontrolle; N = Negativkontrolle

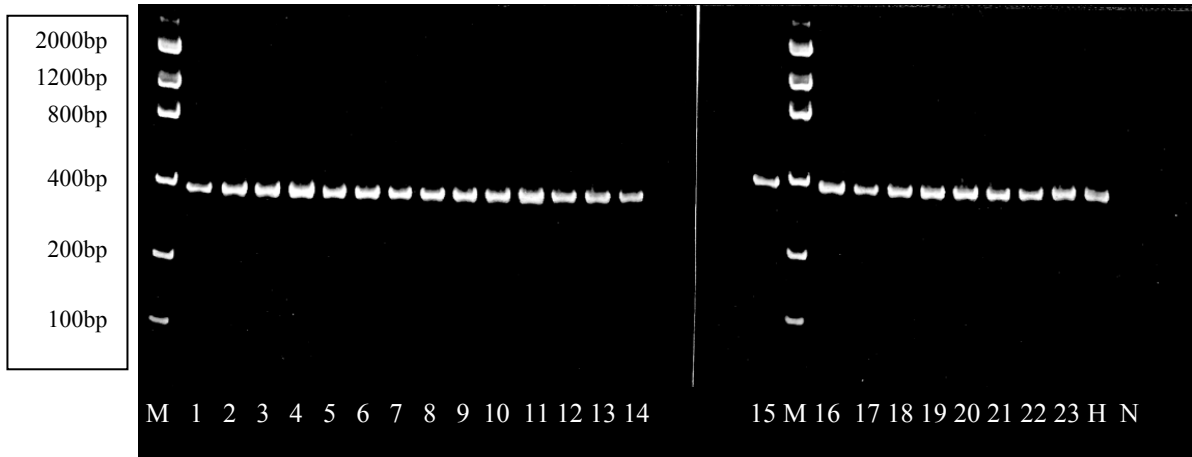


Abb. 4. 4.: Gelkontrolle nach ExoSAP-IT-Reinigung der PCR-Produkte im Exon 2; Proben: 1 bis 23; M = Längenmarker; H = heterozygote Kontrolle; N = Negativkontrolle

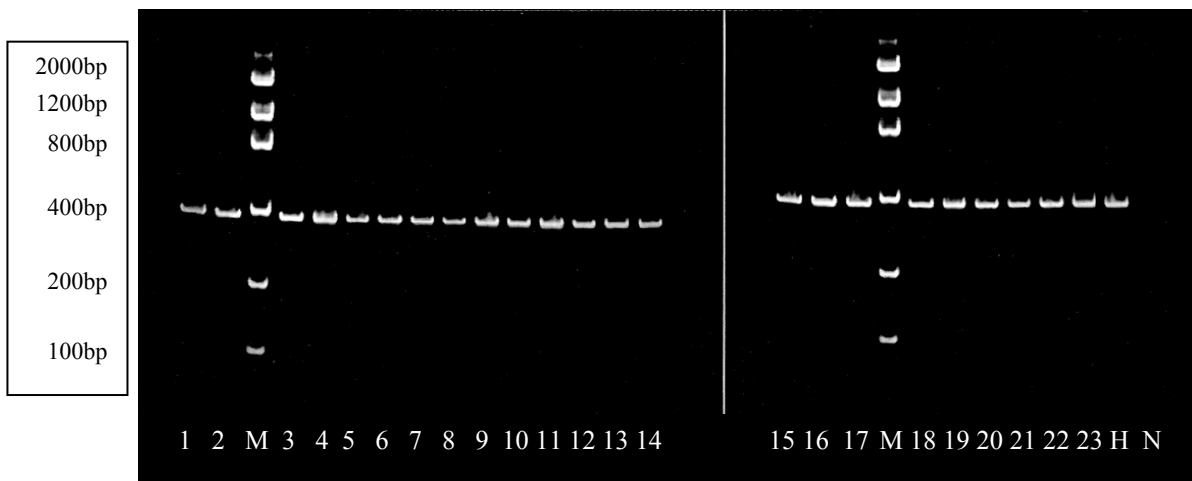


Abb. 4. 5.: Gelkontrolle nach ExoSAP-IT-Reinigung der PCR-Produkte im Exon 3; Proben: 1 bis 23; M = Längenmarker; H = heterozygote Kontrolle; N = Negativkontrolle

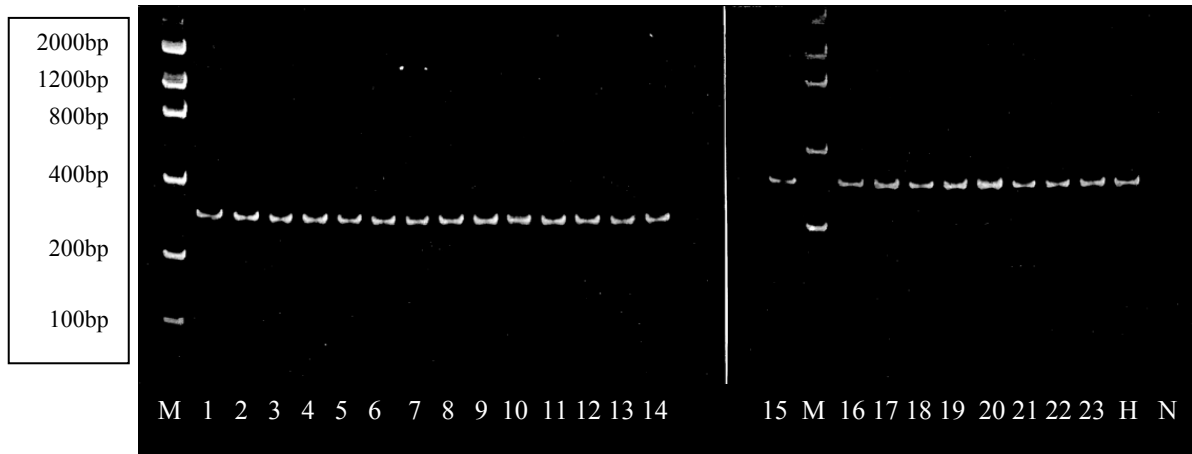


Abb. 4. 6.: Gelkontrolle nach ExoSAP-IT-Reinigung der PCR-Produkte im Exon 5; Proben: 1 bis 23; M = Längenmarker; H = heterozygote Kontrolle; N = Negativkontrolle

4. 1. Detektion von Mutationen im *HFE* Gen

Unter den 23 untersuchten Patienten wiesen drei in allen Exons und angrenzenden Intron-Abschnitten des *HFE* Gens keine Mutationen auf. Die übrigen 20 Patienten wurden bezüglich Veränderungen in der Nukleotidsequenz positiv getestet und zeigten mindestens eine Mutation, wobei es sich hier hauptsächlich um eine Mutation in einem Intron handelte.

Im Exon 1 konnte eine bis dato in der Literatur nicht beschriebene, heterozygote Mutation 5228G>A, R23H identifiziert werden (siehe Abb. 4. 7.). An der Nukleotidposition 5228 fand eine Substitution der Base Guanin zu Adenin statt. Dies verursacht eine Änderung des Kodontripletts CGC zu CAC. CGC kodiert für die Aminosäure Arginin, während CAC für Histidin kodiert. Somit entsteht eine Änderung der Aminosäureabfolge im Exon 1, die möglicherweise zu einer Änderung in der dreidimensionalen Struktur des HFE Proteins führen kann.

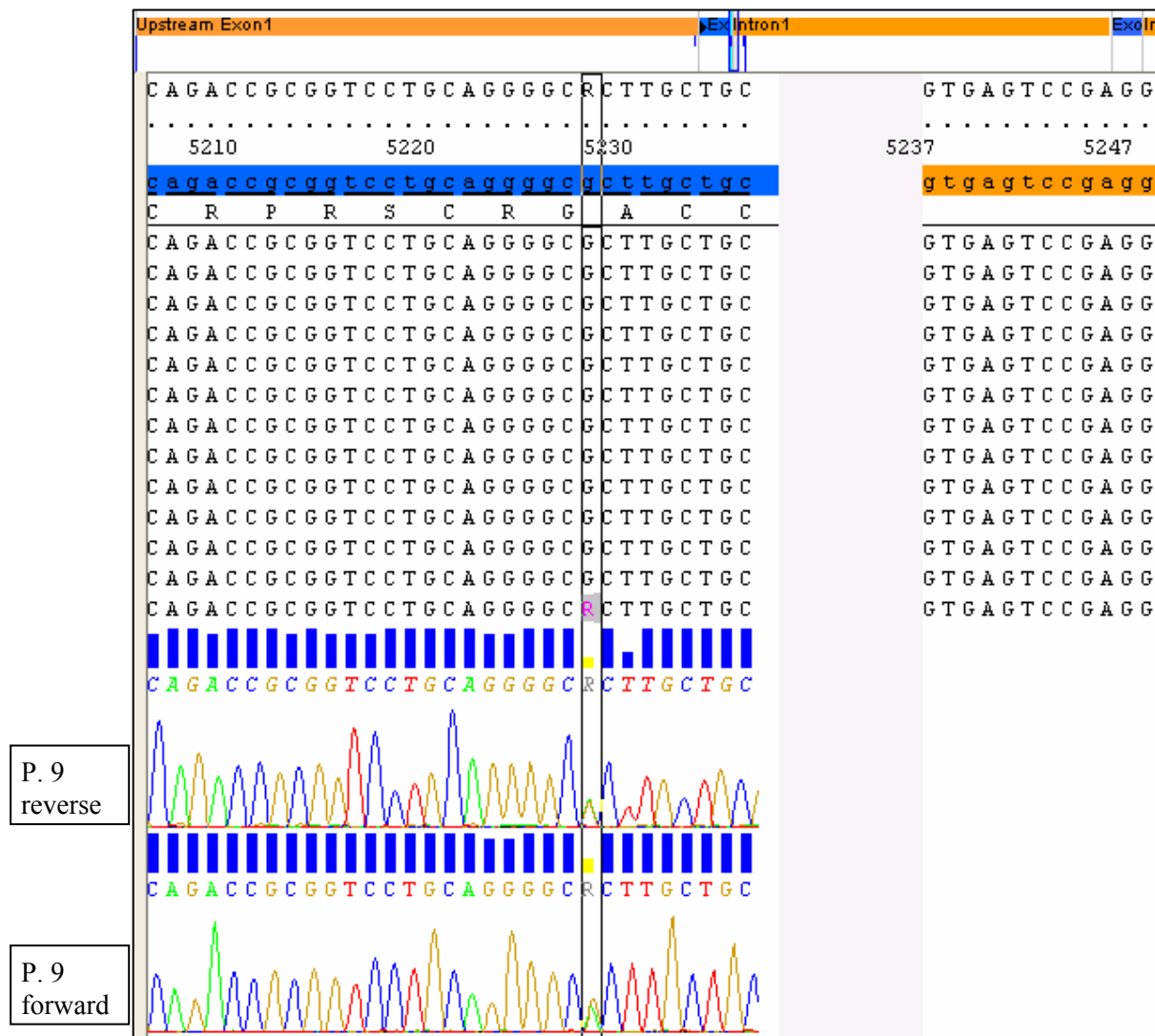


Abb. 4. 7.: Heterozygote R23H Mutation des Patienten 9 im *HFE* Exon 1; P. = Patient

Im Übergangsbereich zwischen Intron 1 und Exon 2 sowie im gesamten Exon 2 wurden in allen 23 Proben keine Mutationen detektiert. Die heterozygote Kontrollprobe zeigte den „Single Nukleotid Polymorphismus“ (= SNP) 8671C>G, H63D, im Exon 2 (ohne Abb.) und lieferte damit eine Bestätigung der korrekten Durchführung der Sequenzierung sowie der Sequenzanalyse.

Im Intron 2 gelang es, den bereits bekannten Polymorphismus 8828T>C, IVS2+4T>C (siehe Abb. 4. 8. und Abb. 4. 9.) in 11 von 23 Patienten sowie in der heterozygoten Kontrollprobe zu detektieren. Unter den 11 positiven Proben wiesen zehn die genannte Mutation in einer heterozygoten Form auf, eine Probe war in beiden Allelen mutiert (siehe Abb. 4. 9.). Die Mutation IVS2+4T>C wird als „interveniend sequence“ (= IVS) Mutation bezeichnet und stellt eine Spleißing-Mutation dar.

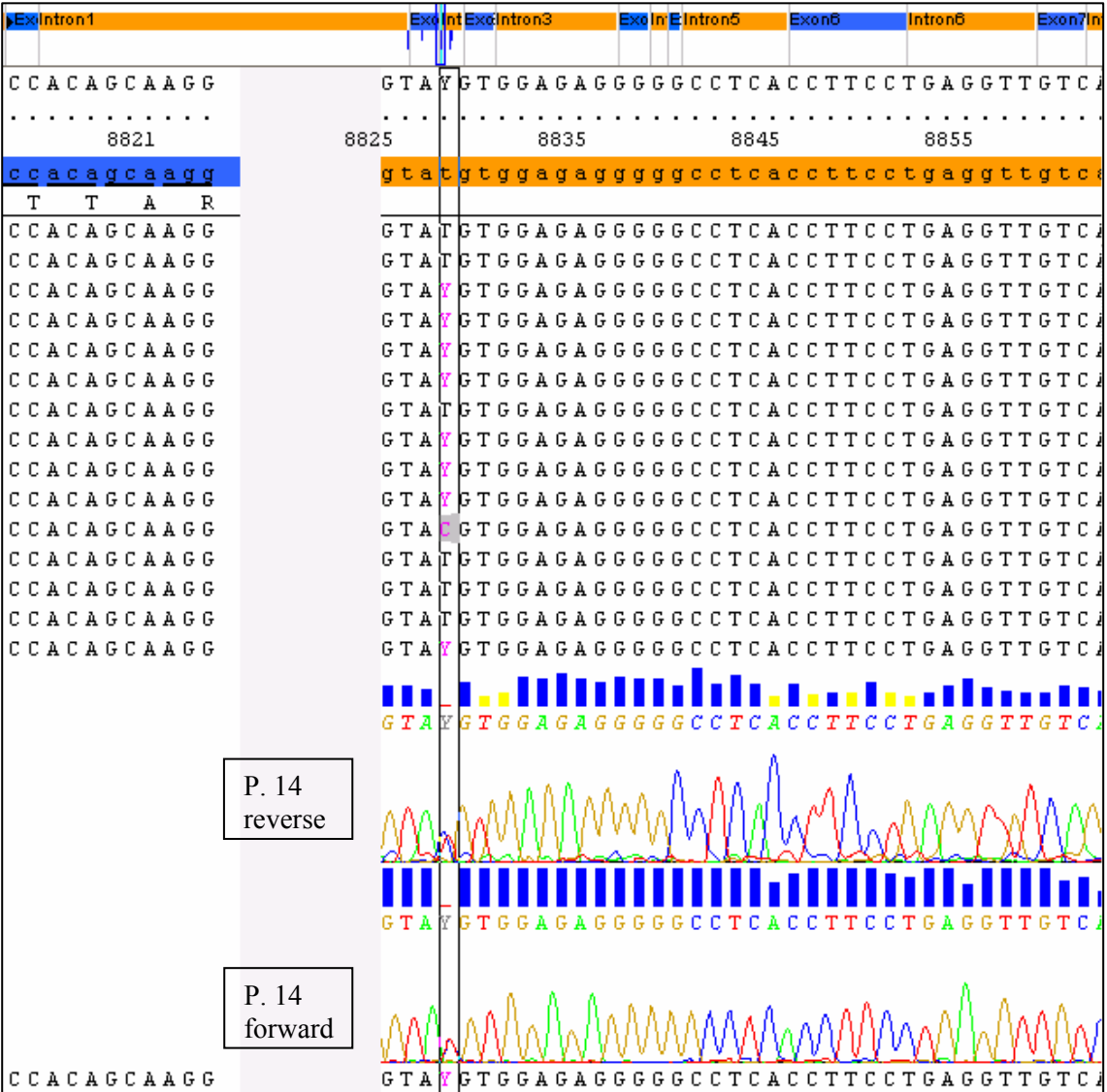


Abb. 4. 8.: Heterozygote IVS2+4T>C Mutation des Patienten 14 im Intron 2 des *HFE* Gens; P. = Patient

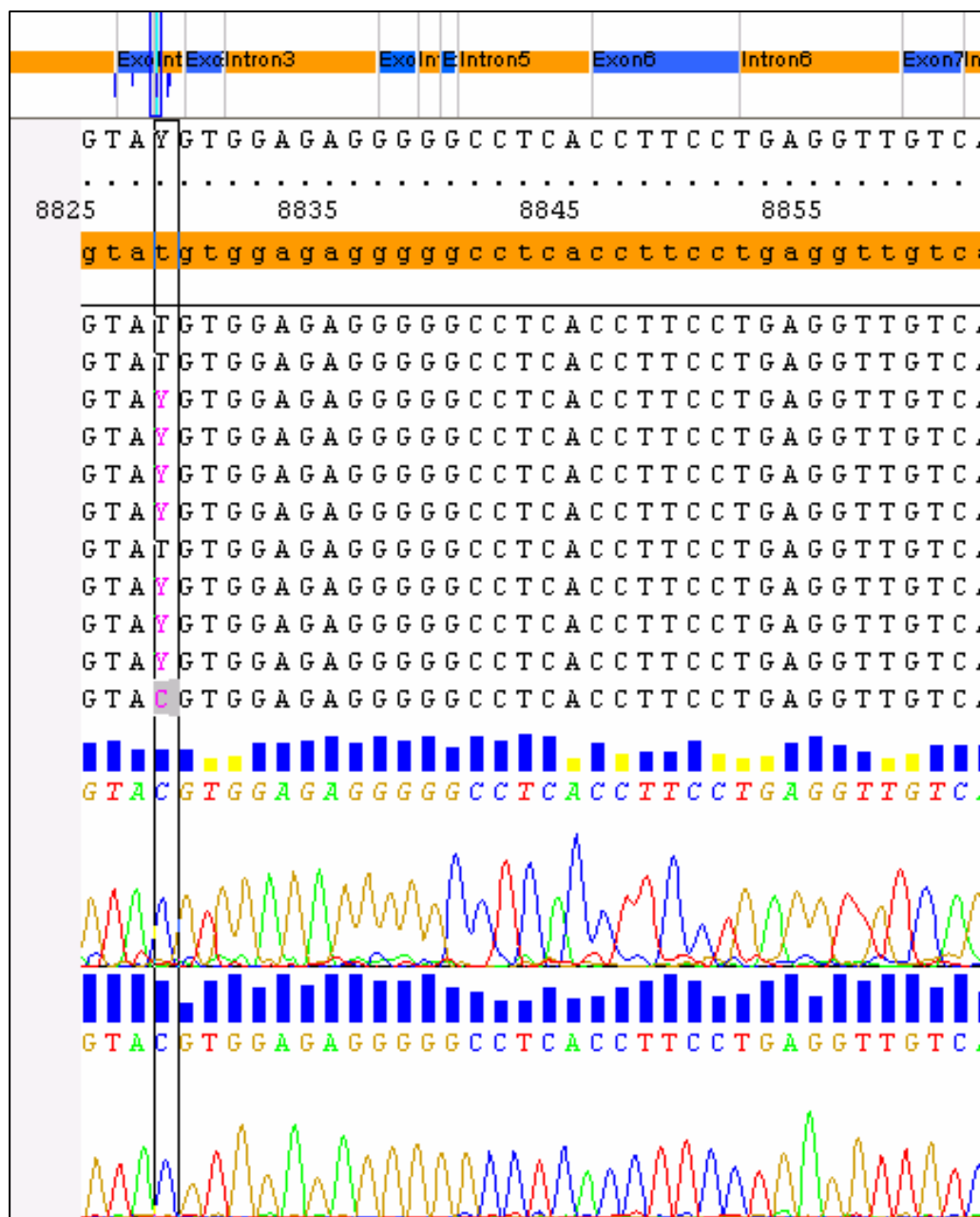


Abb. 4. 9.: Homozygote IVS2+4T>C Mutation des Patienten 10 im Intron 2 des *HFE* Gens;
P. = Patient

Im Exon 3 des Patienten P. 3 wurde die Mutation 9047G>A, L118L identifiziert (siehe Abb. 4. 10.). Trotz des Basenaustausches in der kodierenden DNA induziert diese Mutation keine Änderung in der Aminosäureabfolge, da beide Kodontripletts CTG und CTA für die Aminosäure Leucin kodieren, wodurch die Proteinstruktur des HFE Proteins unverändert bleibt.

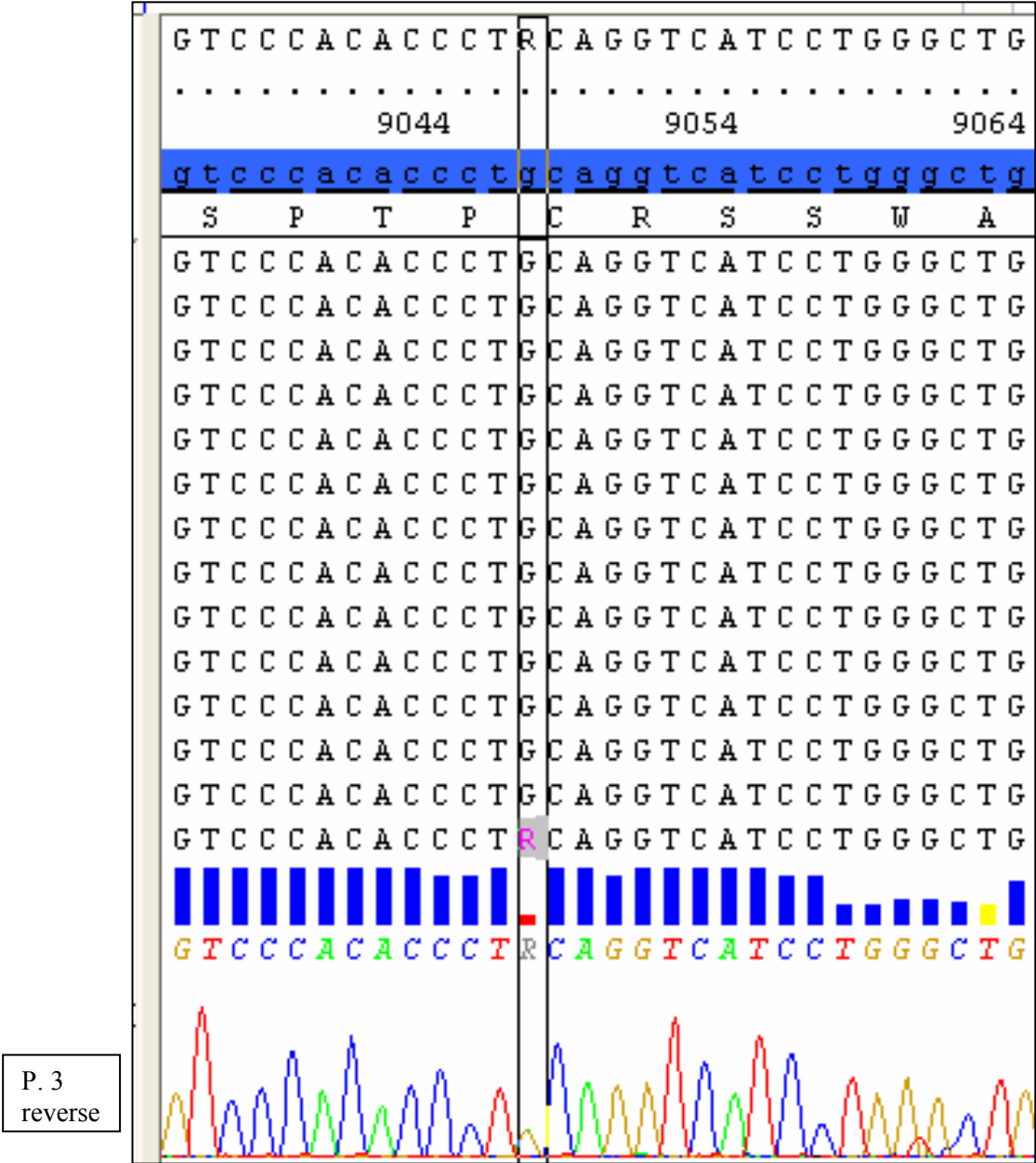


Abb. 4. 10.: Heterozygote L118L Mutation des Patienten 3 im *HFE* Exon 3; P. = Patient

Im Exon 4 wurde ein weiterer SNP in der heterozygoten Kontrolle gefunden, der die im nordeuropäischen Raum am häufigsten auftretende *HFE* Mutation C282Y darstellt (siehe Kap. 2. 2. 2. 1). Der Basenaustausch an der Nukleotidposition 845 der kodierenden DNA führt zu einer Änderung der Aminosäure Cystein nach Tyrosin, die im HFE Protein eine Strukturänderung auslöst.

Des Weiteren wurden im Intron 4 zwei weitere Mutationen detektiert. Die erste Mutation, 10728G>A, IVS4+48G>A wiesen 13 von 23 Patienten auf. Darunter zeigten 11 dieser Patienten eine heterozygote Form der Mutation auf (siehe Abb. 4. 11.), die anderen beiden Patienten hatten eine homozygote IVS4+48G>A Mutation (s. Abb. 4. 12.). Der Nukleotid-austausch von Guanin zu Adenin an der Nukleotidposition 10728 der genomischen DNA ist ein bereits beschriebener intronischer Polymorphismus im *HFE* Gen.

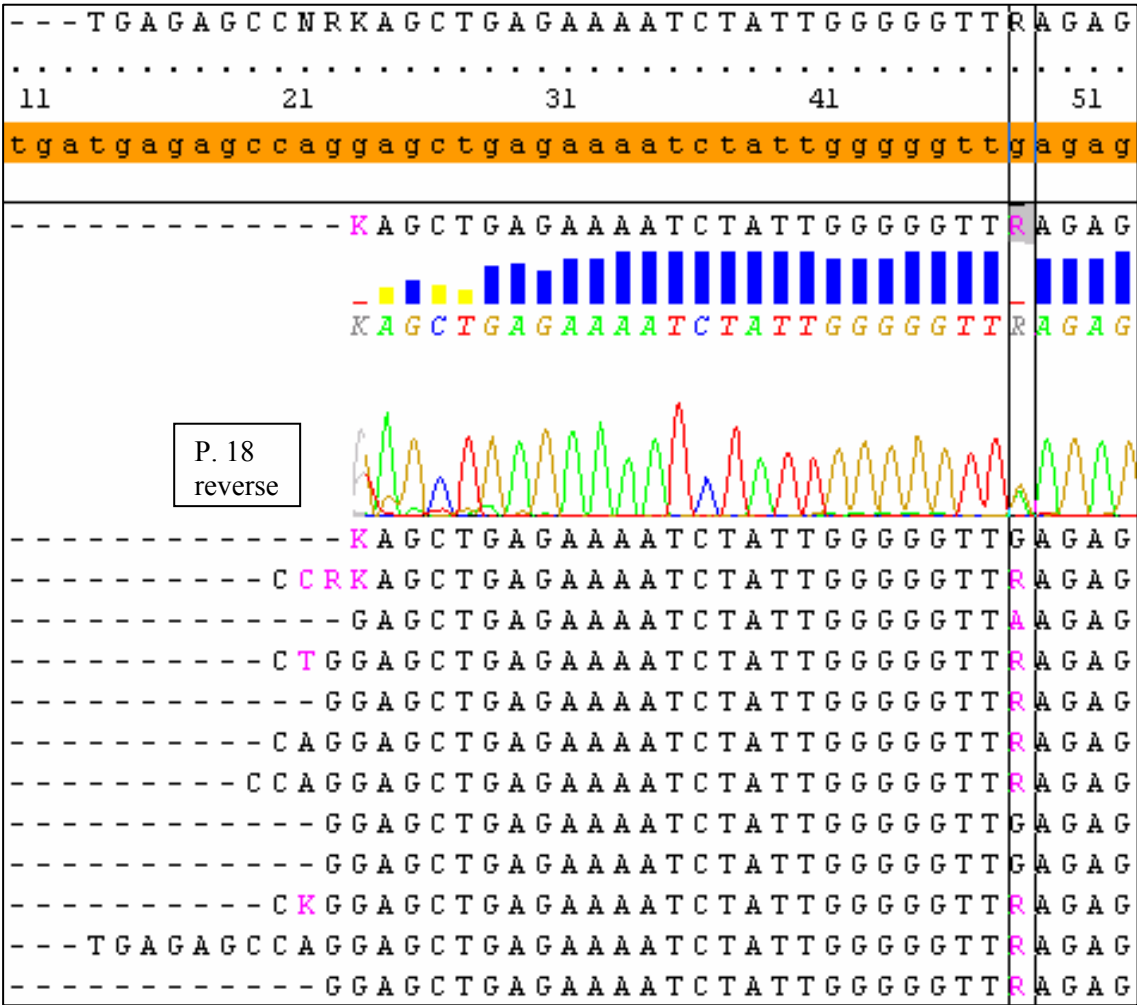


Abb. 4. 11.: Heterozygote IVS4+48G>A Mutation des Patienten 18 im Intron 4 des *HFE* Gens; P. = Patient

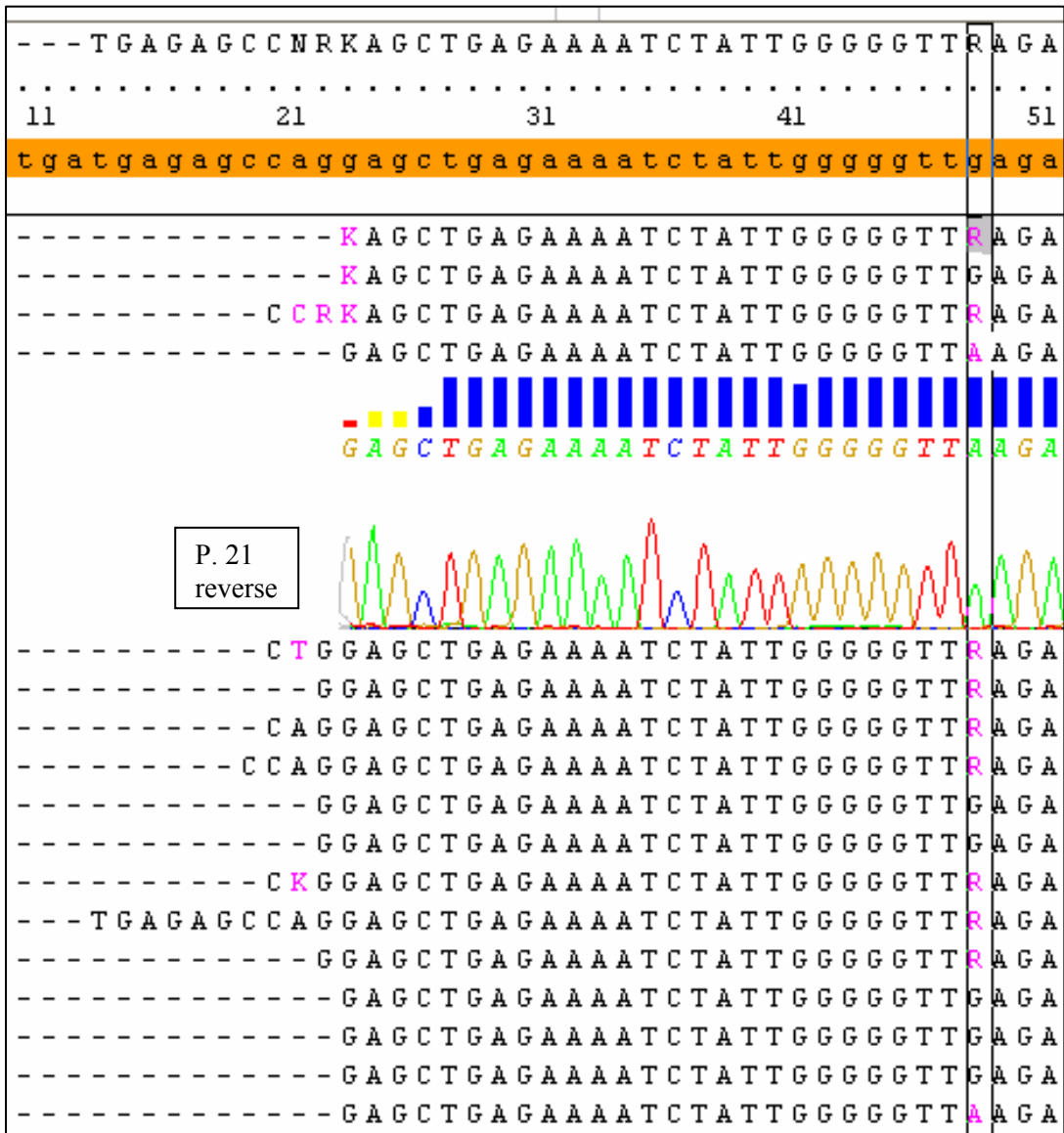


Abb. 4. 12.: Homozygote 10728G>A Mutation des Patienten 21 im Intron 4 des *HFE* Gens;
P. = Patient

Die zweite, im Intron 4 gefundene Mutation, 10795T>C, IVS4+115T>C, ist ebenso eine bereits bekannte Mutation, die bei 8 von 23 Patienten nachgewiesen werden konnte. In sieben Fällen lag der Nukleotidaustausch von Thymin zu Cytosin in einer heterozygoten Form vor (siehe Abb. 4. 13.) und in einem Fall als homozygote Mutation (siehe Abb. 4. 14.).

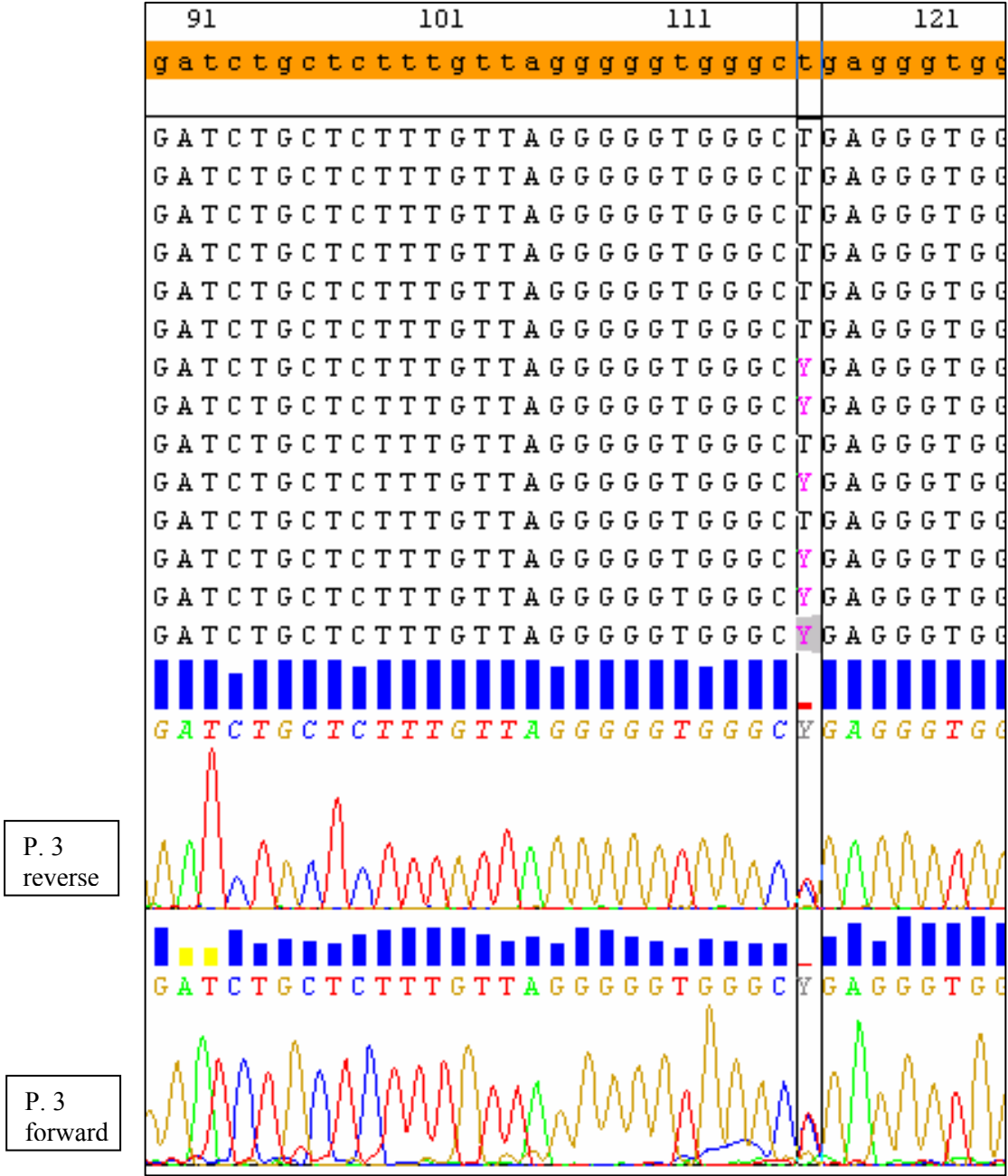


Abb. 4. 13.: Heterozygote IVS4+115T>C Mutation des Patienten 3 im Exon 5 des *HFE* Gens; P. = Patient

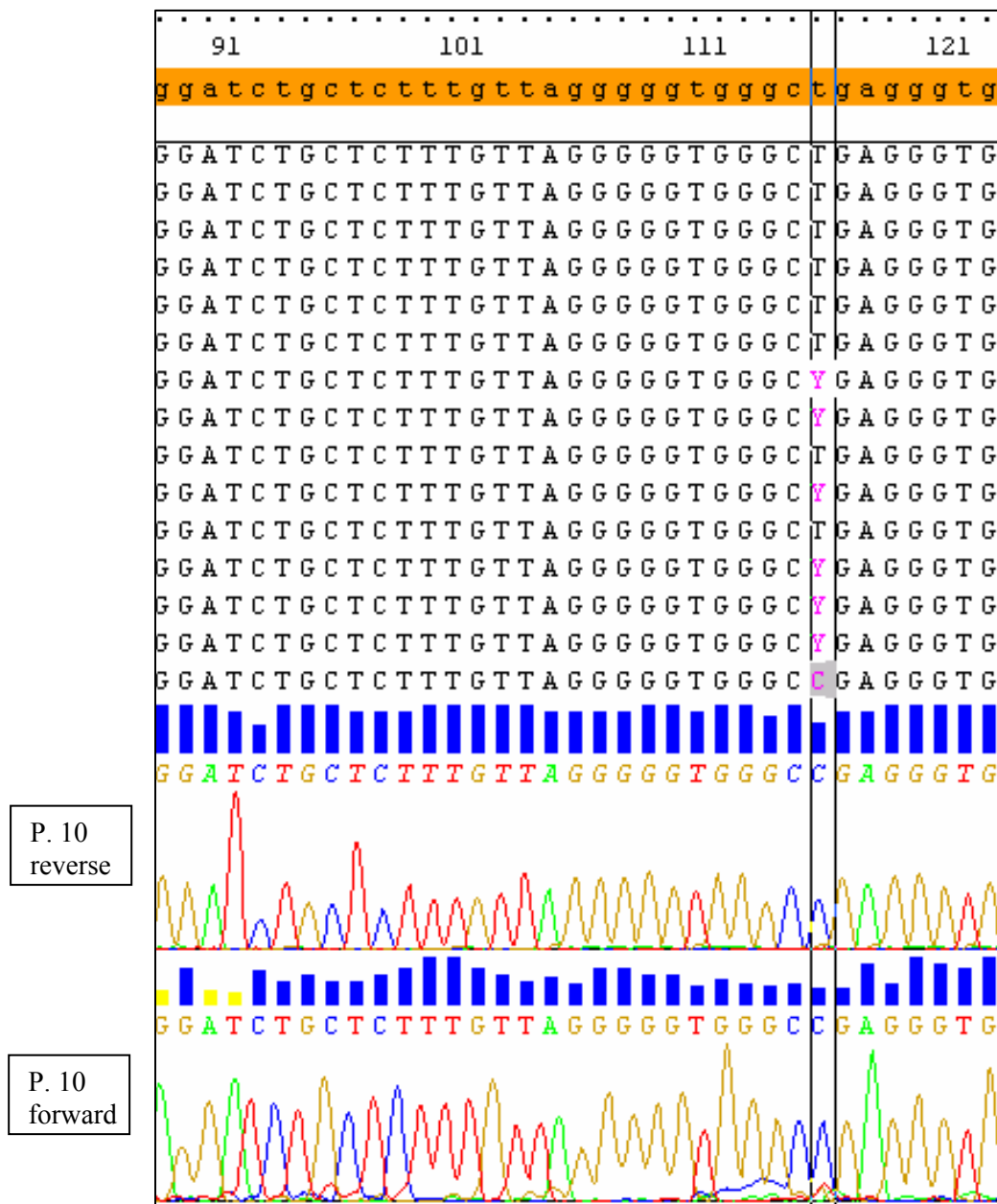


Abb. 4. 14.: Homozygote 10795T>C Mutation des Patienten 10 im Intron 4 des *HFE* Gens;
 P. = Patient

Im Appendix 6. 4. wurde eine aktuelle Mutationsliste erstellt, die mehr als 30 Mutationen beinhaltet. Appendix 6. 5. enthält eine Liste der Polymorphismen der Exons 1 bis 6 sowie der Polymorphismen der Introns und nicht-kodierenden 5'-Region.

Die folgenden Tabellen 6. 1. und 6. 2. sollen eine Übersicht über die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzanalyse liefern und das häufige Auftreten von Mutationen in den einzelnen Abschnitten des *HFE* Gens zeigen. Im Intron 4 wurde in vier Proben eine Koinzidenz von zwei heterozygoten Mutationen (IVS4+48G>A und IVS4+115T>C) gefunden, die als kombinierte Heterozygotie bezeichnet wird (s. Tab. 6. 2.).

Probe	Exon 1	Intron 1	Exon 2	Intron 2	Exon 3	Intron 3
1	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
2	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
3	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	1 Het. Mut. (L118L)	WT
4	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
6	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
7	WT	WT	WT	WT	WT	WT
8	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
9	1 Het. Mut. (R23H)	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
10	WT	WT	WT	1 Hom. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
11	WT	WT	WT	WT	WT	WT
12	WT	WT	WT	WT	WT	WT
13	WT	WT	WT	WT	WT	WT
14	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
15	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
16	WT	WT	WT	WT	WT	WT
17	WT	WT	WT	WT	WT	WT
18	WT	WT	WT	WT	WT	WT
19	WT	WT	WT	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT
20	WT	WT	WT	WT	WT	WT
21	WT	WT	WT	WT	WT	WT
22	WT	WT	WT	WT	WT	WT
23	WT	WT	WT	WT	WT	WT
H	WT	WT	1 Het. Mut. (H63D)	1 Het. Mut. (IVS2+4T>C)	WT	WT

Tab. 6. 1.: Resultate der Sequenzanalyse im *HFE* Gen, Exon 1 bis Intron 3

Het. Mut. = heterozygote Mutation; Hom. Mut. = homozygote Mutation; WT = Wildtyp

H = Heterozygote Kontrollprobe

Ziffer vor der Bezeichnung einer Mutation = Anzahl der gefundenen Mutationen

Probe	Exon 4	Intron 4	Exon 5	Intron 5	Exon 6
1	WT	2 Het. Mut. IVS4+48G>A; IVS4+115T>C	WT	WT	WT
2	WT	WT	WT	WT	WT
3	WT	1 Het. Mut.	WT	WT	WT
4	WT	WT	WT	WT	WT
5	WT	2 Het. Mut. IVS4+48G>A; IVS4+115T>C	WT	WT	WT
6	WT	1 Het. Mut. IVS4+115T>C	WT	WT	WT
7	WT	1 Het. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
8	WT	2 Het. Mut. IVS4+48G>A; IVS4+115T>C	WT	WT	WT
9	WT	2 Het. Mut. IVS4+48G>A; IVS4+115T>C	WT	WT	WT
10	WT	1 Hom. Mut. IVS4+115T>C	WT	WT	WT
11	WT	WT	WT	WT	WT
12	WT	1 Hom. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
13	WT	1 Het. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
14	WT	1 Het. Mut. IVS4+115T>C	WT	WT	WT
15	WT	WT	WT	WT	WT
16	WT	1 Het. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
17	WT	WT	WT	WT	WT
18	WT	1 Het. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
19	WT	WT	WT	WT	WT
20	WT	1 Het. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
21	WT	1 Hom. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
22	WT	1 Het. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
23	WT	1 Het. Mut. IVS4+48G>A	WT	WT	WT
H	1 Het. Mut. C282Y	WT	WT	WT	WT

Tab. 6. 2.: Resultate der Sequenzanalyse im *HFE* Gen, Exon 4 bis Exon 6

Het. Mut. = heterozygote Mutation; Hom. Mut. = homozygote Mutation; WT = Wildtyp

H = Heterozygote Kontrollprobe

Ziffer vor der Bezeichnung einer Mutation = Anzahl der gefundenen Mutationen

Tab. 6. 2.: Identifizierte Mutationen im *HFE* Gen

Genort	Basenaustausch gDNA	Aminosäure- Austausch	Mutation	Hämochromatose-Kollektiv (heterozygot / homozygot)
Exon 1	5228G>A	Arg23His	R23H	1 von 23 (1 / 0)
Intron 2	8828T>C	IVS2+4T>C		11 von 23 (10 / 1)
Exon 3	9047G>A	Leu118Leu	L118L	1 von 23 (1 / 0)
Intron 4	10728G>A	IVS4+48G>A		13 von 23 (11 / 2)
Intron 4	10795T>C	IVS4+115T>C		8 von 23 (7 / 1)

5. Diskussion

Um die charakteristische Symptomatik der hereditären Hämochromatose Typ 1 auf molekulargenetischer Ebene abzuklären, wird zumeist das Vorliegen der beiden, im nord- und zentraleuropäischen Raum am häufigsten vorkommenden und für diese Erkrankung prädisponierenden Mutationen – die Mutation C282Y in Exon 4 und die Mutation H63D in Exon 2 – untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde ein Kollektiv von 23 anonymisierten Patienten mit Verdacht auf hereditäre Hämochromatose zusammengestellt. Zuvor durchgeführte molekulargenetische Untersuchungen konnten keine entsprechenden Mutationen in den Exons 2 und 4 nachweisen. Aus diesem Grund wurde eine Nukleotidsequenzanalyse auf Basis genomischer DNA im humanen *HFE* Gen durchgeführt.

Mit diesem Analyseverfahren gelang es, drei intronische Mutationen, IVS2+4T>C, IVS4+48G>A und IVS4+115T>C im *HFE* Gen, nachzuweisen. Darüber hinaus wurden zwei neue heterozygote Mutationen identifiziert, *HFE* 5228G>A, R23H in Exon 1 und *HFE* 9047G>A, L118L in Exon 3.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, ein auf genomischer DNA basierendes System zur Mutationsanalyse im *HFE* Gen zu etablieren, welches eine sichere Methode zum Nachweis von Mutationen im *HFE* Gen darstellt. Der Vorteil dieses diagnostischen Verfahrens liegt in der raschen und einfachen Durchführbarkeit. Aus Vollblut isolierte, genomische DNA wird mittels PCR amplifiziert und nach einer enzymatischen Reinigung und Aufbereitung einer Sequenzanalyse unterzogen, bei der beide Allele getestet werden können. Dadurch können klinische Symptome zugeordnet werden und zudem heterozygote und homozygote Mutationsträger differenziert werden.

Ein weiterer Vorteil der Sequenzanalyse von genomischer DNA liegt in der Detektierbarkeit von Mutationen, die zwischen zwei Exons liegen können, so genannten intronischen Mutationen. Derartige Sequenzvarianten können zu Fehlern beim Spleißvorgang führen und Störungen bei der Prozessierung der prä-mRNA induzieren, welche in einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion resultieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl nach Mutationen in den Exons des *HFE* Gens gesucht, als auch die Exon-Intron-Grenzen analysiert.

Vor der Durchführung der PCR-Amplifikation wurde ein Gradient zur Ermittlung der idealen Annealing Temperaturen der Oligonukleotidprimer vorgenommen. Dazu wurden Primer nach der Vorlage von Steiner et al. [54] verwendet, deren Nukleotidsequenzen der Tabelle 6. 1. im Kapitel 6 entnommen werden können. Sowohl die Ergebnisse des Gradienten als auch die der PCR-Amplifikation waren zufrieden stellend und erlaubten die Sequenzierung aller 23 zu untersuchenden Proben. Im Rahmen der daran anschließenden Sequenzanalyse wurden insgesamt fünf Mutationen im *HFE* Gen detektiert.

Die Mutation IVS2+4T>C wurde erstmals von de Villiers et al. [55] beschrieben und stellt eine mögliche Spleißing-Mutation an der Grenze zwischen Exon 2 und Intron 2 des *HFE* Gens dar. Bedingt durch die Substitution der Base Thymin zu Cytosin an der Nukleotidposition 8828 wird eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *RsaI* gebildet. Die Änderung der Nukleotidsequenz steht in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für eine Hyperferritinämie und ist ein neutraler Polymorphismus. [56]

Von 23 Patienten wiesen insgesamt elf diese Mutation auf (= 48%). Zehn Patienten waren heterozygote Träger (darunter Acht als kombinierte heterozygote Träger), eine Person war homozygot. Diese Person trug neben der genannten Mutation noch die *HFE* Mutation IVS4+115T>C, für die sie auch homozygot war.

Neben dem Polymorphismus IVS2+4T>C wurden zwei weitere intronische Mutationen detektiert, die sich im Intron 4 vieler Patienten befanden. Die Mutation IVS4+48G>A wurde von Totaro et al. [57] erstmals beschrieben und stellt eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *MseI* dar. Diese Sequenzvariation, die auch als 5569G/A Polymorphismus bekannt ist, wurde in 13 von 23 Proben gefunden, das einer Frequenz von über 56% entspricht. Unter diesen 13 Patienten hatten neun Proben nur diese einzige Mutation, zwei davon in homozygoter Form. Drei weitere Proben zeigten eine kombinierte Heterozygotie der Mutationen IVS4+48G>A, IVS2+4T>C und IVS4+115T>C. Eine Probe trug zusätzlich zu diesen drei Mutationen noch die Mutation R23H im Exon 1.

Die Mutation IVS4+115T>C, erstmals von de Villiers et al. [58] erwähnt, stellt für das Restriktionsenzym *Hae*III eine Schnittstelle dar. Es wird jedoch angenommen, dass der Basenaustausch, welcher der Mutation IVS4+115T>C zugrunde liegt, keine Konsequenzen für ein Spleißing trägt. [55]

Neben den drei bereits beschriebenen intronischen Mutationen IVS2+4T>C, IVS4+48G>A und IVS4+115T>C wurde in der DNA eines einzigen Patienten eine vierte Mutation, und zwar die heterozygote Punktmutation 5228G>A, R23H im Exon 1 identifiziert. Die Transition von Guanin zu Adenin induziert in der Aminosäuresequenz eine Substitution von Arginin zu Histidin. Änderungen der Aminosäureabfolge können die Konsequenz einer modifizierten Proteinstruktur tragen, die wiederum zu einer von der Normalfunktion abweichenden Funktion führen kann. Eine Mutation wie R23H kann mit dem phänotypischen Krankheitsbild der hereditären Hämochromatose assoziiert werden. Diese Mutation wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben. Intensive Untersuchungen bezüglich der Auswirkung der neu entdeckten Mutation R23H auf das Erscheinungsbild der Erkrankung werden notwendig sein, um die eindeutige Assoziation bestätigen zu können.

Im Exon 3 des *HFE* Gens wurde bei einer Person die bis *dato* noch nicht in der Literatur beschriebene, heterozygote Mutation 9047G>A, L118L gefunden. Da die Kodontripletts CTG und CTA für dieselbe Aminosäure kodieren, tritt hier keine Änderung der Aminosäuresequenz ein und in Folge keine Modifikation der dreidimensionalen Struktur des HFE Proteins. Die mit einer Hämochromatose assoziierenden Symptome können bei diesem Patienten möglicherweise auf seine zusätzlich vorhandenen Mutationen IVS2+4T>C und IVS4+115T>C zurückgeführt werden.

In drei Proben konnte keine krankheitsrelevante *HFE* Mutation gefunden werden. Die Ursache der klinischen Symptomatik dieser Patienten kann möglicherweise auf eine Mutation zurückgeführt werden, die sich in einem anderen Gen befindet, dessen Protein ebenso an der Regulation des Eisenhaushaltes beteiligt ist. Diesbezüglich wären weitere Analysen der entsprechenden Gene von Notwendigkeit. Es existieren jedoch auch Fälle, die Pietrangelo et al. [59] beschrieben haben, in denen eine phänotypische Eisenüberladung, kombiniert mit den typischen klinischen, biochemischen und histopathologischen Kriterien für die Diagnose der hereditären Hämochromatose, existiert, denen aber keine ursächliche Mutation im *HFE* Gen zugrunde liegt.

Routinemäßig werden für die Abklärung einer Eisenüberladung biochemische Parameter eingesetzt. Zu diesen Parametern zählen erhöhte Serum-Eisen-Werte von über 170–200 µg/dl (Normalwert: 40–160 µg/dl), eine erhöhte Transferrin-Eisen-Sättigung von über 45–100% (Normalwert: 20–45%), Serum-Ferritin-Werte von über 1000 µg/dl (Normalwert: 35–235 µg/dl) und erhöhtes Lebereisen von 2,0–10,5 mg/g (Normalwert: 0,1–0,5 mg/g). [60] Für die Abklärung einer hereditären Hämochromatose ist die Transferrin-Sättigung der Schlüsselparameter. [61]

Exonische sowie intronische Mutationen im *HFE* Gen, wie z. B. IVS2+4T>C, können zu einer Änderung der Transferrin-Eisen-Sättigung sowie der Serum-Ferritin-Konzentration führen, weswegen biochemische Untersuchungen ein wichtiges Kriterium für genetisch determinierte Erkrankungen darstellen. Eine effektivere Methode stellt jedoch die DNA-Diagnostik dar. Die in der vorliegenden Diplomarbeit durchgeführte Sequenzanalyse im *HFE* Gen ist ein guter Beweis dafür, wie hilfreich diese Methode zur Mutationssuche ist: in 87% der Fälle konnten wir die Ursache der Eisenüberladung klären. Darüber hinaus ist es gelungen, in dieser Arbeit für alle sechs kodierenden Exons des *HFE* Gens ein gut funktionierendes und fehlerfreies Protokoll zur Mutationsanalyse auf Basis genomischer DNA zu etablieren, welches nun für die routinemäßige Untersuchung von Mutationen im *HFE* Gen eingesetzt werden kann.

6. Appendix

6. 1. Oligonukleotidprimer für PCR-Amplifikation

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Primersysteme und die Nukleotidsequenzen der einzelnen Primer.

Primer	5' – 3'	Exon
HFE 1	CAACAACACCCCTTCAGGAT	1
HFE 2	TGAGCAGGTCCTCCAAAGTT	1
HFE 3	ACATGGTTAAGGCCTGTTGC	2
HFE 4	GCTCCACAAGACCTCAGAG	2
HFE 5	CTTGGGGATGGTGGAAATAG	3
HFE 6	GAGCAACCTCCTCCACTCTG	3
HFE 7	GGTCCAGTCTTCCTGGCAAGG	4
HFE 8	GCACTCCTCTTAACCCCAATAG	4
HFE 9	GATGAGAGCCAGGAGCTGAG	5
HFE 10	CCCTGGGGCAGAGGTACT	5
HFE 11	GGTTTGTGATGCCTCTTTCC	6
HFE 12	TGGGGAAATCTTTTTGAGGA	6

Tab. 6. 1.: Quelle: Steiner et al., Gastroenterology 122 (2002), 790

Ungerade Nummerierungen der Primer bezeichnen forward-Primer, gerade Zahlen stellen reverse-Primer dar.

6. 2. PCR-Produkte

PCR-Produkt	Fragmentlänge	Nukleotidposition (nach GenBank Acc. No.: NT_007952)
HFE Ex 1	297 bp	4940 5236
HFE Ex 2	264 bp	8561 8824
HFE Ex 3	276 bp	9034 9309
HFE Ex 4	276 bp	10405 ... 10698
HFE Ex 5	114 bp	10839 ... 10952
HFE Ex 6	1056 bp	11906 ... 12961

Tab. 6. 2.: Fragmentlängen der PCR-Produkte in Basenpaaren (bp)

6. 3. Aminosäuresequenz des HFE Proteins

Insgesamt sind 348 Aminosäuren am Aufbau des HFE Proteins beteiligt. In der Abb. 6. 3. ist die Aminosäuresequenz des HFE Proteins dargestellt.

10	20	30	40	50	60
MGPRARPALL	LLMLLQTAVL	QGRLLRSHSL	HYLFMGASEQ	DLGLSLFEAL	GYVDDQLFVF
70	80	90	100	110	120
YDHESRRVEP	RTPWVSSRIS	SQMWLQLSQS	LKGWDHMFTV	DFWTIMENHN	HSKESHTLQV
130	140	150	160	170	180
ILGCEMQEDN	STEGYWKYGY	DGQDHLEFCP	DTLDWRAAEP	RAWPTKLEWE	RHKIRARQNR
190	200	210	220	230	240
AYLERDCPAQ	LQQLLELGRG	VLDQQVPPLV	KVTHHVTSSV	TTLRCRALNY	YPQNITMKWL
250	260	270	280	290	300
KDKQPMDAKE	FEPKDVLPNG	DGTYYQGWITL	AVPPGEEQRY	TCQVEHPGLD	QPLIVIWEPS
310	320	330	340		
PSGTLVIGVI	SGIAVFFVIL	FIGILFIILR	KRQGSRGAMG	HYVLAERE	

Abb. 6. 3.: Aminosäuresequenz des HFE Proteins

Die Kurzbezeichnungen der in Abb. 6. 3. aufgezeigten Aminosäuren sind in Tabelle 6. 3. aufgelistet.

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

Tab. 6. 3. Nomenklatur der proteinogenen Aminosäuren inkl. der Drei-Buchstaben-Bezeichnung (nach IUPAC) sowie der Ein-Buchstaben-Bezeichnung

6. 4. Mutationsliste

	Genort	Nukleotid-Austausch cDNA	Codon-Austausch	Aminosäure-Austausch	Mutationsbezeichnung
1	5'UTR	-7T>C			-7T>C
2	Ex 1	18G>C	AGGc-AGC	Arg 18→Ser	R6S
3	Ex 2	84C>T	CACt-CAT	His 84→His	H28H
4	Ex 2	157G>A	cGTG-ATG	Val 157→Met	V53M
5	Ex 2	175G>A	cGTG-ATG	Val 175→Met	V59M
6	Ex 2	187C>G	tCAT-GAT	His 187→Asp	H63D
7	Ex 2	189T>C	CATg-CAC	His 189→His	H63H
8	Ex 2	193A>T	gAGT-TGT	Ser 193→Cys	S65C
9	Ex 2	196C>T	tCGC-TGC	Arg 196→Cys	R66C
10	Ex 2	68ΔT			V68ΔT
11	Ex 2	211C>T	cCGA-TGA	Arg 211→Term	R74X
12	Ex 2	277G>C	aGGG-CGG	Gly 277→Arg	G93R
13	Ex 2	277del			G93fs
14	Ex 2	314T>C	ATT-ACT	Ile 314→Thr	I105T
15	In 2				IVS2+4T>C
16	Ex 3	381A>C	CAAg-CAC	Gln 381→His	Q127H
17	Ex 3	160ΔC			P160ΔC
18	Ex 3	502G>C	gGAG-CAG	Glu 502→Gln	E168Q
19	Ex 3	502G>T	gGAG-TAG	Glu 502→Term	E168X
20	Ex 3	506G>A	TGG-TAG	Trp 506→Term	W169X
21	Ex 3	527C>T	GCC-GTC	Ala 527→Val	A176V
22	In 3				IVS3+1G>T
23	Ex 4	636G>C			V212V
24	Ex 4	673G>A	CGG-CAG	Arg 673→Gln	R224G
25	Ex 4	814G>T	tGTA-TTA	Val 814→Leu	V272L
26	Ex 4	829G>A	aGAG-AAG	Glu 829→Lys	E277K
27	Ex 4	845G>A	TGC-TAC	Cys 845→Tyr	C282Y
28	Ex 4	845G>C	TGC-TCC	Cys 845→Ser	C282S
29	Ex 4	848A>C	CAG-CCG	Gln 848→Pro	Q283P
30	Ex 4	884T>C	GTG-GCG	Val 884→Ala	V295A
31	In 4				IVS4+37A>G
32	In 4				IVS4+109A>G
33	In 4				IVS4+115T>C

34	Ex 5	989 G>T	AGG-ATG	Arg 989→Met	R330M
35	In 5				IVS5+1G>A

Δ = Leserahmen-Mutation aufgrund der Deletion eines Nukleotids

IVS = „intervening sequence“; Splice site Mutation (= Schnittstellenmutation an der Exon-Intron-Grenze)

UTR = untranslated region; Mutation in einer nicht-kodierenden Region eines Exons

Weitere bekannte Mutationen (nach HGMD):

- 1 Mutation im Regulationsbereich:
Sequenz: GGAGATTTAACGGGGACGTGCGGCCAGAGCT(TC)GGGGAAATGG
GCCCGCGAGCCAGGCCGGCG -7 in Relation zum Initiationscodon
- 1 große Deletion: 22 bp cd 50, Nukleotidposition 370
- 4 kleine Deletionen: t.del203 (Codon 67, Exon 2)
c.del277 (Codon 92, Exon 2)
c.del471 (Codon 156, Exon 3)
c.del478 (Codon 159, Exon 3)

6. 5. Liste der Polymorphismen

	Exon	Nukleotid-Austausch cDNA	Aminosäure-Austausch
1	Ex 2	157G>A	Val53Met
2	Ex 2	193A>T	Ser65Cys
3	Ex 2	277G>C	Gly93Arg
4	Ex 2	314T>C	Ile105Thr
5	Ex 3	381A>C	Gln127His
6	Ex 4	845G>A	Cys282Tyr
	Intron	Sequenzvariante	Restriktionsenzym
1	5' Noncoding	-1206G>C	<i>BbvI</i>
2	5' Noncoding	-970T>G	–
3	5' Noncoding	-825G>A	<i>CviJI</i>
4	5' Noncoding	-467G>C	<i>MaeII, AflIII</i>
5	In 1	IVS1+112A>T	–
6	In 1	IVS1+1156G>T	<i>BmrI</i>
7	In 1	IVS1-680A>T	–
8	In 2	IVS2+4T>C	<i>RsaI</i>
9	In 4	IVS4+37A>G	<i>MseI</i>
10	In 4	IVS4+48G>A	<i>MseI</i>
11	In 4	IVS4-50A>G	<i>FokI</i>
12	In 4	IVS4-44T>C	<i>Sau96I</i>
13	In 5	IVS5+14A>G	–
14	In 5	IVS5-398G>T	<i>EspI, DdeI</i>
15	In 5	IVS5-47A>G	<i>BanI, NlaI</i>
16	In 6	IVS6+426A>G	<i>BsemJ</i>

Ex = Exon; In = Intron; 5' Noncoding = nicht kodierender Abschnitt in der 5'-Region

6. 6. Literaturverweise

ad 1)	Steiner et al. (2003) J La. Med 27, 266
ad 2)	Beutler (2000) Genet Testing 4, 95-6
ad 3)	Simon et al. (1977) New Engl J Med 297, 1017-21
ad 4)	Feder et al. (1996) Nat Genet 13, 399-408
ad 5)	Steiner et al. (2003) J Lab Med 27, 267
ad 6)	Steiner et al. (2003) J Lab Med 27, 271
ad 7)	Hastka et al. (2007) DGHO Anämien, 1
ad 8)	Steiner et al. (2005) klinikarzt 34, 61
ad 9)	Nielsen et al. (1998) Dt. Ärzteblatt 95, 2914
ad 10)	Steiner et al. (2005) Klinikarzt 34, 61
ad 11)	Nielsen et al. (1998) Dt. Ärzteblatt 95, 2912
ad 12)	Steiner et al. (2003) J Lab Med 27, 269
ad 13)	Hastka et al. (2007) DGHO Anämien, 3
ad 14)	Hastka et al. (2007) DGHO Anämien, 4
ad 15)	Hastka et al. (2007) DGHO Anämien, 3
ad 16)	Hastka et al. (2007) DGHO Anämien, 4
ad 17)	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HFE
ad 18)	Lebron et al. (1998) Cell 93, 111
ad 19)	Lyon et al. (2001) Clin Chemistry 47, 1149
ad 20)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2387
ad 21)	Lebron et al. (1998) Cell 93, 112
ad 22)	Lebron et al. (1999) J Mol Biol 294, 239-45
ad 23)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2387
ad 24)	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HFE
ad 25)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2383-84
ad 26)	Merryweather-Clarke et al. (2000) Genet Testing 4, 183
ad 27)	Lyon et al. (2001) Clin Chemistry 47, 1148
ad 28)	Feder et al. (1996), Nat Gen 13, 403
ad 29)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2384
ad 30)	Merryweather-Clarke et al. (2000) Genet Testing 4, 183
ad 31)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2384
ad 32)	Mura et al. (1999) Blood 93, 2502
ad 33)	Feder et al. (1996) Nat Genet 13, 399-408
ad 34)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2385
ad 35)	Subramaniam (2007) World J Gastroenterol 13, 4690
ad 36)	Lyon et al. (2001) Clin Chemistry 47, 1147-48
ad 37)	Papanikolaou (2004) 36, 77-82
ad 38)	Subramaniam (2007) World J Gastroenterol 13, 4691

ad 39)	Subramaniam (2007) World J Gastroenterol 13, 4693
ad 40)	Subramaniam (2007) World J Gastroenterol 13, 4694
ad 41)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez
ad 42)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2385
ad 43)	Subramaniam (2007) World J Gastroenterol 13, 4691
ad 44)	Steiner et al. (2005) Klinikarzt 34, 63
ad 45)	Hastka et al. (2007) DGHO Anämien, 10
ad 46)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2392
ad 47)	Nielsen et al. (1998) Dt. Ärzteblatt 95, 2917
ad 48)	Nielsen et al. (1998) Dt. Ärzteblatt 95, 2918
ad 49)	Steiner et al. (2003) J Lab Med 27, 271
ad 50)	Tavill (2001) Hepatology 33, 1324-25
ad 51)	Steiner et al. (2002) Gastroenterology 122, 789-95
ad 52)	Steiner et al. (2002) Gastroenterology 122, 790
ad 53)	Jansohn (2007) Gentech. Methoden, Elsevier Verlag, 555-67
ad 54)	Steiner et al. (2002) Gastroenterology 122, 790
ad 55)	De Villiers et al. (1999) Hum Mol Gen 8, 1518
ad 56)	Curcio et al. (2008) European J of Haematology 8, 344
ad 57)	Totaro et al. (1997) Mol Cell Probes 11, 229
ad 58)	De Villiers et al. (1999) Hum Mol Gen 8, 1518
ad 59)	Pietrangelo et al. (1999) N Engl J Med 341, 725-32
ad 60)	Graf et al. (2000) J Lab Med 24, 231
ad 61)	Pietrangelo (2004) N Engl J Med 350, 2392

6. 7. Abkürzungsverzeichnis

A	= Symbol für Aminosäure Alanin
A	= Symbol für Base Adenin
Abb.	= Abbildung
α	= alpha
Arg	= Arginin
β	= beta
bp	= Basenpaare
bzw.	= beziehungsweise
C	= Symbol für Base Cytosin
°C	= Grad Celcius
d	= Tag
DCYTB	= duodenal cytochrom b
ddATP	= Didesoxyadenintriphosphat
ddCTP	= Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	= Didesoxyguanintriphosphat
ddNTP	= Didesoxynukleosidtriphosphat
ddTTP	= Didesoxytyrosintriphosphat
DMT-1	= divalent metal transporter 1
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
dATP	= Desoxyadenintriphosphat
dCTP	= Desoxycytosintriphosphat
dGTP	= Desoxyguanintriphosphat
dNTP	= Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	= Desoxytyrosintriphosphat
Ex	= Exon
ExoSAP-IT-Verdau	= Exonuklease und Shrimps-alkalische-Phosphatase-Verdau
Fa.	= Firma
Fe	= chemisches Zeichen für Eisen
Fe ²⁺	= zweifach positiv geladenes Eisen-Atom
Fe ³⁺	= dreifach positiv geladenes Eisen-Atom
fs	= frameshift (=Verschiebung des Leserasters)
fw	= forward primer (Vorwärtsprimer: 5' nach 3')

G	= Symbol für Aminosäure Glycin
G	= Symbol für Base Guanin
g	= Gramm
gDNA	= genomische Desoxyribonukleinsäure
Glu	= Glutaminsäure
h	= Stunde
Hg	= chemisches Zeichen für Quecksilber
HCP-1	= heme carrier protein 1
<i>HFE</i> Gen	= Synonym für Hämochromatose Gen
HGMD	= Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff
HH	= Hereditäre Hämochromatose
HH1	= Hereditäre Hämochromatose Typ 1
<i>HJV</i> Gen	= Hemojuvelin Gen
HLA-A3	= Humanes Leukozyten Antigen-A3
HPLC	= high performance liquid chromatography = Hochflüssigkeitschromatographie
HPLC Wasser	= Hochflüssigkeitschromatographie-Wasser (= speziell gereinigt)
I	= Symbol für Aminosäure Isoleucin
i. e.	= in example (zum Beispiel)
inkl.	= inklusive
In	= Intron
IRE	= Iron Response Elements
IUPAC	= International Union of Pure and Applied Chemistry
IVS	= intervenient sequence
Kap.	= Kapitel
L	= Liter
LOT-Nummer	= Chargennummer
M	= Symbol für Aminosäure Methionin
mg	= Milligramm
mg/dl	= Milligramm pro Deziliter
MgCl ⁻	= Magnesiumchlorid
min	= Minute
µg/l	= Mikrogramm pro Liter

µl	= Mikroliter
ml	= Milliliter
mM	= Millimol
µmol/L	= Mikromol pro Liter
mmHg	= Millimeter Quecksilbersäule
<i>MspI</i>	= Längenmarker
Na	= chemisches Zeichen für Natrium
ng	= Nanogramm
OMIM	= Online Mendelian Inheritance in Man (Datenbank)
PAA	= Polyacrylamid
PCR	= Polymerase-Kettenreaktion
pmol/µl	= Picomol pro Microliter
%	= Zeichen für Prozent
R	= Symbol für Aminosäure Arginin
RFLP	= Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rv	= reverse primer (Rückwärtsprimer: 3' nach 5')
S	= Symbol für Aminosäure Serin
S.	= Seite
s.	= siehe
sec	= Sekunde
SNP	= Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
splice	= Spleißmutation
SQUID	= Supraconducting Quantum Interference Device
T	= Symbol für Aminosäure Threonin
T	= Symbol für Base Tyrosin
Tab.	= Tabelle
Temp.	= Temperatur
TfR1	= Transferrin Rezeptor 1
TfR2	= Transferrin Rezeptor 2
UV Transilluminator	= Transilluminator mit ultraviolettem Licht
vergl.	= vergleiche
Xp	= kurzer Arm des Chromosoms X
Xq	= langer Arm des Chromosoms X
z. B.	= zum Beispiel

6. 8. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Andrea Houdek

1200 Wien, Dresdner Straße 62/1/10

Geburtsdatum: 22.05.1978

Familienstand: verheiratet

Staatsbürgerschaft: Österreich

Schulbildung

3. 6. 1997	Matura, Höhere Internatsschule des Bundes Wien, Österreich
1990 – 1997	Gymnasium, Höhere Internatsschule des Bundes Wien, Österreich
1988 – 1990	Gymnasium, Deutsche Schule Stockholm, Schweden
1986 – 1988	Grundschule, Deutsche Schule Stockholm, Schweden
1985 – 1986	Volksschule, Hegelgasse Wien, Österreich

Universitäre Ausbildung

03/1999 – dato	Diplomstudium Biologie an der Universität Wien, Studienzweig Anthropologie, Schwerpunkt Humangenetik
10/2002 – dato	Diplomstudium Molekulare Biologie, Universität Wien
1998 – 1999	Studium Rechtswissenschaften, Universität Wien
1997 – 1998	Studium Anglistik und Amerikanistik, Soziologie, Universität Wien

Studienzweig Anthropologie – Schwerpunkt Humangenetik:

Einführung in die Gentechnologie (2 SWS)

Gentechnik für Mediziner (4 SWS)

Genanalysen in der Klinischen Chemie (2 SWS)

Grundlagen der Entwicklungsgenetik des Menschen (2 SWS)

Genetik für Mediziner (4 SWS)

Molekulargenetische Diagnostik – Grundlagen und Anwendungen (2 SWS)

Übung IIIA – Molekularbiologische Laborarbeiten (8 SWS)

Seminar zur Übung IIIA (2 SWS)

Anwendungen molekularbiologischer Techniken I (1 SWS)

Studiengang Anthropologie – Wahlfächer:

Physiologische Grundlagen für Humanbiologen (4 SWS)

Histologie und Embryologie für Humanbiologen I (2 SWS)

Übungen zur Histologie und Embryologie für Humanbiologen I (2 SWS)

Übungen zur Histologie und Embryologie für Humanbiologen II (2 SWS)

Spezielle Fragen der Reproduktionsbiologie (1 SWS)

Anthropologisches Praktikum II (2 SWS)

Epigenetische Merkmalsvariationen und pathologische Veränderungen am Skelett (2 SWS)

Molekulare Genetik und molekularbiologische Labordiagnostik für Mediziner (2 SWS)

Molekularbiologische Untersuchungsmethoden; praktisches Arbeiten – Einsatz zur Diagnostik im Labor (5 SWS)

6. 9. Referenzen

1. Hastka J. (korr), Heimpel H., Metzgeroth G.
Eisenmangel und Eisenmangelanämie
Leitlinien, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie; 2007: 1–22
2. Pietrangelo A.
Hereditary Hemochromatosis – A New Look at an Old Disease
N Engl J Med 2004; 350: 2383–97
3. Beutler E.
Hemochromatosis Population Screening: A Current Status Report
Genetic Testing 2000, 4 (2): 95–96
4. Steiner M., Meier P., Schuff-Werner P.
Hereditary Hemochromatosis: New Data and Controversies
J Lab Med 2003; 27 (7/8): 266–276
5. Steiner M., Ocran K., Genschel J., et al.
A Homozygous *HFE* Gene Splice Site Mutation (IVS5+1 G/A) in a Hereditary Hemochromatosis Patient of Vietnamese Origin
Gastroenterology 2002; 122 (3): 789–795
6. Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., et al.
A novel MHC class-I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis
Nat Genet 1996; 13: 399–408
7. Simon M., Bourel M., Genetet B., Fauchet R., et al.
Idiopathic hemochromatosis. Demonstration of recessive transmission and early detection by family HLA typing
N Engl J Med 1977; 297: 1017–1021

8. Nielsen P., Fischer R., Engelhardt R., et al.
Neue Möglichkeiten in der Diagnose der hereditären Hämochromatose
Deutsches Ärzteblatt 1998; 95 (46): A-2912–2921
9. Lyon E., Frank E.L.
Hereditary Hemochromatosis Since Discovery of the HFE Gene
Clinical Chemistry 2001; 47 (7): 1147–1156
10. Steiner M., von Ahsen N.
Den Verdacht auf eine hereditäre Hämochromatose früh und nichtinvasiv bestätigen
Kliniker 2005; 34 (3): 61–65
11. Lebron J.A., West A. P. Jr, Bjorkman P. J.
The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor
J Mol Biol 1999; 294: 39–45
12. Subramaniam N.
Non-HFE haemochromatosis
World J Gastroenterol 2007; 13 (35): 4690–4698
13. Lebron J.A., et al.
Crystal Structure of the Hemochromatosis Protein HFE and Characterization of Its Interaction with Transferrin Receptor
Cell 1998; 93: 111–123.
14. Jansohn M.
Gentechnische Methoden
Elsevier Verlag 2007: S. 555–567
15. Merryweather-Clarke A., Pointon J., Jouanolle A., Rochette J., Robson K.
Geography of HFE C282Y and H63D Mutation
Genetic Testing 2000; 4 (2): 183–202

16. Mura C., Raguenes O., Ferec C.
HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis
Blood 1999; 93: 2502–2505

17. Feder J.N., et al.
A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis
Nat Genetics 1996; 13: 399–408

18. Papanikolaou G., et al.
Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis
Nat Genet 2004; 36: 77–82

19. de Villiers J. N. P., Hillermann R., Loubser L., Kotze M.
Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in haemochromatosis and porphyria
Human Molecular Genetics 1999; 8 (8): 1517–1522

20. Graf N., Stuhmann M.
Hämochromatose – eine lebensbedrohliche Erkrankung mit einfacher Diagnose und Therapie
J Lab Med 2000; 24 (5): 229–235

21. Douabin V., Moirand R., Jouanolle A.-M., Brissot P., Le Gall J.-Y., Deugnier Y., David V.
Polymorphisms in the HFE Gene
Hum Hered 1999; 49: 21–26

22. Silbernagel S.
Taschenatlas der Physiologie
Georg Thieme Verlag 2001: 90

23. Pointon J., Wallace D., Merryweather-Clarke A. T., Robson K.
Uncommon Mutations and Polymorphisms in the Hemochromatosis Gene
Genetic Testing 2000; 4 (2): 151–161
24. Curcio M., Fornaciari S., Mariotti M. L., Chelazzi S., Scatena F., Presciuttini S.
Haplotype analysis of the H63D, IVS2+4t/c, and C282Y polymorphisms of the HFE gene reveals rare events of intragenic recombination
European Journal of Haematology 2008; 8 (4): 277–368
25. Pietrangelo A., Montosi G., Totaro A., Garuti C., Conte D., Cassanelli S., Fraquelli M., Sardini C., Vasta F., Gasparini P.
Hereditary Hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene
N Engl J Med 1999; 341: 725–732
26. Totaro A., Grifa A., Carella M., D’Ambrosio L., Valentino M., Roth M. P., Borot N., Coppin H., Roetto A., Camaschella C., Gasparini P.
Hereditary hemochromatosis; a HpaI polymorphism within the HLA-H gene
Mol Cell Probes 1997; 11: 229–230
27. Tavill Anthony S.
Diagnosis and Management of Hemochromatosis
Hepatology 2001; 33 (5): 1321–1328
28. **<http://ghr.nlm.ncbi>**.
29. **<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HFE>**
30. **<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/varvu?gene>**