

Bettina Katrin Stühler
Dr. med.

Mutationsanalyse des *MURRI*-Gens von 63 Patienten mit Morbus Wilson

Geboren am 12.05.1979 in Werneck
Staatexamen am 29.11.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Stremmel

Beim Morbus Wilson handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Störung des Kupferstoffwechsels, bei welcher Mutationen im *ATP7B*-Gen zu einer mangelhaften biliären Kupferausscheidung führen. Dies bedingt Kupferablagerungen und Intoxikationserscheinungen in verschiedenen Organen, besonders in Leber und Gehirn. Das klinische Erscheinungsbild des Morbus Wilson ist sehr vielfältig. Selbst unter Patienten mit identischen Mutationen besteht eine hohe klinische Variabilität. Es ist daher anzunehmen, dass zusätzliche endo- und exogene Faktoren den Krankheitsverlauf modulierend beeinflussen. Als Favoriten für genetische Einflussgrößen gelten Gene, deren Produkte im menschlichen Kupferstoffwechsel ebenfalls eine Rolle spielen.

2002 konnte *MURRI* als krankheitsauslösendes Gen für eine bei Bedlington Terriern mit hoher Prävalenz vorkommende autosomal-rezessiv vererbte Kupferspeichererkrankung identifiziert werden. Auch wenn die genaue Funktion von *MURRI* noch geklärt werden muss, deutet vieles darauf hin, dass das *MURRI*-Produkt bei der biliären Kupferausscheidung eine Rolle spielt. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme der *MURRI*-Konzentration in Zellkultur zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Kupferkonzentration führt und dass *MURRI* spezifisch mit der Wilson-ATPase interagiert. Mutationen im *MURRI*-Gen von Wilson-Patienten könnten sich daher modulierend auf den Krankheitsverlauf auswirken bzw. bei Patienten mit erst einer oder keiner detektierten *ATP7B*-Mutation Ursache für eine dem Morbus Wilson ähnliche Erkrankung sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *MURRI*-Gen von 63 Wilson-Patienten durch direktes Sequenzieren analysiert. Hierfür wurde genomische Patienten-DNA aus EDTA-Vollblut isoliert, die drei Exons des *MURRI*-Gens inklusive der angrenzenden intronischen Sequenzen mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Bei zwei Patientinnen (P1 und P2) wurde zum Ausschluss von Spleißmutationen zusätzlich RNA mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Frischblut gewonnen und nach der Amplifikation des offenen Leserahmens von *MURRI* die erhaltenen cDNA-Amplifikate ebenfalls sequenziert.

Bei 19 der 63 untersuchten Wilson-Patienten wurden Nukleotidvarianten im *MURRI*-Gen nachgewiesen. 17 von diesen zeigten jeweils eine Veränderung heterozygot, bei zwei der Patienten (P1 und P2) wurden zwei verschiedene Alterationen compound-heterozygot detektiert.

Insgesamt konnten hierbei vier neue Nukleotidvarianten identifiziert und zwei bereits in der Datenbank beschriebene Veränderungen bestätigt werden: drei Variationen in den das Exon 2 flankierenden intronischen Sequenzabschnitten (Intron1: IVS1-35A>T; Intron2: IVS2+14_15delAA, IVS2+63G>A), ein Transversion in Exon 2 (435A>T) und die beiden bereits beschriebenen Substitutionen in Exon 3 (492T>C (Asn164), 662G>C).

Bei keiner der drei exonischen Veränderungen waren Auswirkungen auf die zu erwartende Aminosäuresequenz, bei keiner der drei intronischen Veränderungen Konsequenzen auf Spleißvorgang oder Transkription nachweisbar.

Daher konnte die Hypothese, Mutationen im *MURRI*-Gen könnten ein dem Morbus Wilson ähnliches Krankheitsbild bei Patienten mit nur einer bzw. keiner identifizierten *ATP7B*-Mutation hervorrufen, bei den in dieser Arbeit untersuchten Probanden verworfen werden.

Bezüglich der Substitution 492T>C in Exon 3 war jedoch Folgendes zu beobachten: der heterozygote Genotyp GAT/GAC war in der untersuchten Gesamtgruppe mit einem früheren Beginn neurologischer Symptome (17,0 versus 29,8 Jahre) und in der Untergruppe der H1069Q-Homozygoten sowohl mit einer zeitigeren Gesamtpräsentation (11,8 versus 18,8 Jahre), als auch einer früheren hepatischen (8,5 versus 16,4 Jahre) und neurologischen (14,0 versus 27,0 Jahre) Erstmanifestation assoziiert. Daher kann aufgrund dieser Arbeit die Hypothese generiert werden, dass es sich bei dem heterozygoten Status GAT/GAC um einen Marker für eine frühere Krankheitsmanifestation handelt und somit über die wenigen bekannten Marker hinaus ein neuer Marker identifiziert werden konnte, der den Krankheitsverlauf von Patienten mit Morbus Wilson beeinflussen kann. Hieraus leitet sich die Hoffnung ab, wenn sich dieser Marker in anderen Kollektiven bestätigen sollte, den Krankheitsverlauf von Wilson-Patienten besser vorhersagen zu können und somit Screening und Intensität der Therapie besser anpassen zu können.

Darüber hinaus bleibt es eine wichtige Aufgabe, nach anderen Modulatoren zu forschen, um die Hintergründe der großen klinischen Variabilität des Morbus Wilson weiter entschlüsseln zu können.