

---

## **1 Einleitung**

Die molekulargenetischen Untersuchungen wie Genomanalyse, Genkartierung und Mutationsanalyse, welche die Identifikation von Genen und Polymorphismen ermöglichen, haben sich in den letzten 10 bis 15 Jahren aufgrund neuerer und schnellerer Verfahren etabliert. Hierbei hat die Aufklärung z.B. des menschlichen Genoms und die Sequenzierung einer Vielzahl einfacherer Genome von Modellorganismen wie *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* bedeutende Fortschritte gemacht. Hingegen ist leider die Kenntnis der Genome landwirtschaftlicher Nutztiere vergleichsweise bescheiden. In den letzten Jahrhunderten bezogen sich die Selektionskriterien in der Tierzucht vornehmlich auf die quantitative Genetik. Heute profitiert die moderne Tierzucht von der Molekularbiologie und der Anwendung molekulargenetischer Verfahren, wie beispielsweise die Testverfahren auf Streßanfälligkeit beim Schwein (FUJII et al., 1991; BRENIG und BREM, 1992) und die PrP-Varianten beim Schaf (KUTZER et al., 2002) zeigen.

Obwohl man in diesem Bereich in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen hat, gibt es hier noch erheblichen Forschungsbedarf. Die Entdeckung genetischer Dispositionen für wesentliche Leistungsmerkmale und die Entwicklung genetischer Nachweisverfahren für die meisten wirtschaftlich bedeutenden Erbkrankheiten verstärken diese Notwendigkeit. Zum Erreichen dieser Ziele ist allerdings zuerst die genaue Kenntnis der Genome Voraussetzung. Die hier präsentierte Arbeit soll daher einen Beitrag zur molekulargenetische Analyse der Erbkrankheit Porphyrie in Form Porphyria cutanea tarda (PCT) beim Schaf liefern.

Porphyrie wird durch verschiedene Enzymdefekte in der Hämbiosynthese verursacht, wobei die PCT durch einen Defekt des fünften Enzyms Uroporphyrinogen-Decarboxylase (Uro-D) hervorgerufen wird. Die PCT als häufigste Porphyrie beim Mensch (KÖSTLER und DOSS, 1995; BULAJ et al., 2000; PHILLIPS et al., 2001b; EGGER et al., 2002) wird mit einer großen Inzidenzvariation von 0,003% bis 1% beim Mensch angegeben (FRITSCH et al., 1998; KRAJNC et al., 1998; HOEGL et al., 1996; GOERZ, 1979a; IPPEN, 1973; KÖSTLER et al., 1988; DOSS, 1990).

Wegen der geringen Bedeutung, die diese Erkrankung im Bewusstsein von Landwirten und Schlachthoftierärzten hat, wird ihr gar keine oder nur minimale Aufmerksamkeit geschenkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Überprüfung der klinischen, histologischen und laborchemischen Parameter eines an PCT erkrankten Schafes, zum anderen das Uro-D-Gen zu charakterisieren und darüber hinaus die krankheitsverursachenden Polymorphismen zu bestimmen. Weiterhin wurde das Uro-D Protein sowohl vom gesunden als auch vom kranken Tier exprimiert und anschließend die chromosomale Lokalisation des Gens bestimmt.

---

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Historische Entwicklungskennnisse der Porphyrie**

Zum ersten Mal hat der Biochemiker THUDICHUM (1867) die rote Fluoreszenz des eisenfreien Hämatins beschrieben und dieses Cruentine genannt. Einige Jahre später wurde es im Rahmen weiterer Untersuchungen von HOPPE-SEYLER (1871) als „Hämatoporphyrin“ bezeichnet. Im Jahr 1874 wurden von BAUMSTARK die ausgeschiedenen Pigmente im Urin eines Patienten untersucht und als Urofuscohämin isoliert. Er interpretierte seine Befunde als „unklare Störung der Hämbiosynthese“ (BAUMSTARK, 1874).

Nach der Einführung von Sulfonal als Hypnotikum wurde bei den Patienten eine neue Erkrankung, die toxische Form der akuten Porphyrie, entdeckt und im Urin ein hämatoporphyrinähnlicher Farbstoff nachgewiesen. Dadurch konnte FRIEDENREICH (1892) drei klinische Symptome feststellen: dunkelbrauner Urin, abdominaler Schmerz und Paresen.

Die Porphyrinforschung hat sich um die Jahrhundertwende stärker weiterentwickelt, da es den Biochemikern gelungen war, das Hämatoporphyrin näher zu charakterisieren und Protoporphyrin sowie Koproporphyrin zu isolieren. Bei dem Patienten Mathias Petry, der im Jahre 1925 mit 32 Jahren an dieser Krankheit starb, hat GÜNTHER (1911) eine der bedeutendsten Porphyrinuntersuchungen durchgeführt und seinen Befund mit der Bezeichnung Hämatoporphyrin als Überbegriff einer ganzen Gruppe von Porphyrien beschrieben. Durch weitere Urinuntersuchungen von Petry hat der Nobelpreisträger FISCHER (1925) mit Einbezug der morphologischen Diagnosen von BORST eine weitere Differenzierung der Porphyrine dargestellt. 1929 haben BORST und KÖNIGSDÖRFER einen umfassenden Bericht über die Porphyrine herausgegeben und dabei die Krankheit Porphyrie genannt, dadurch wurde der Begriff „Hämatoporphyrin“ abgelöst und der Ausdruck Porphyrie setzte sich durch. (BORST und KÖNIGSDÖRFER, 1929).

Bei landwirtschaftlichen Nutztieren wurden die ersten pathologischen Befunde anhand zweier Fälle von BROUVIER (1883), sowie REMY und BROUVIER (1888) beschrieben. Sie hatten nach der Schlachtung der Tiere eine komplette schokoladenbraune Pigmentierung der Knochen beobachtet. MOSELMAN und HEBRANT (1898) untersuchten die Knochen einer Färse, die geschlachtet worden war, weil das Tier nicht fressen wollte, und fanden sämtliche Knochen rotbraun verfärbt. SCHENK (1901) und COLBERG (1902) berichteten außer der Pigmentierung der Knochen zusätzlich über die Verfärbung der Zähne bei einer Kuh und einem drei Tage alten Kalb. Bis 1913 wurde insgesamt 15 Fälle betroffener Rinder und Schweine in der Literatur beschrieben, wobei die Mehrzahl der Autoren ein Blutfarbstoffderivat im Pigment feststellen konnten (SCHMEY, 1913). MOSELMAN und HEBRANT (1898) interpretierten ihre Befunde nach chemischen und spektroskopischen Untersuchungen als Melanin. BALL (1900) sprach von einem Hämoglobinderivat und POULSEN (1910)

und SCHMEY (1913) ermittelten dieses als Hämatoporphyrin, eine Tatsache, die TAPPEINER (1885) bereits bei einem Schwein festgestellt hatte, was jedoch von seinen Zeitgenossen anfangs nicht beachtet worden war und damit lange Jahre in Vergessenheit geriet.

Die Krankheitsfälle wurden im achtzehnten Jahrhundert sowohl bei Menschen als auch bei Tieren als Ochronose bezeichnet, bis POULSEN (1910) zum ersten Mal einen völligen Unterschied zwischen Mensch- und Tierochronose feststellen konnte. JOEST (1926) bezeichnete diese Krankheit bei Tieren als Hämochromatose und SCHMEY (1913), MARAEY (1928) und COHRS (1931) bezeichneten dieselbe als Osteohämochromatose. Anschließend wurden zum ersten Mal von FOURIE (1936) die klinischen und pathologischen Befunde von kranken Rindern in Südafrika beschrieben und diese als „Congenital Porphyrinuria“ (Pink Tooth) bezeichnet. Seine Untersuchungen bezogen sich auf 13 Elterntiere und ihre Nachkommen bei der Shorthornrasse, wobei 77% der Tiere männlich und 23% weiblich waren. 1939 ermittelte er die Congenital Porphyrinuria als einen rezessiven Erbgang. Weiterhin beschrieben RIMINGTON (1936), RIMINGTON und ROETS (1937) die biochemischen Beobachtungen bei den gleichen Tieren.

**Tabelle 1:** Auftreten der Porphyrie bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Autor und Erscheinungsjahr	Spezies	Standort	Porphyrien
FOURIE, 1936	Rind (SH)	Südafrika	KP
RIMINGTON, 1936	Rind (SH)	Südafrika	KP
FOURIE und RIMINGTON, 1938	Rind (HF)	Südafrika	KP
RAILSBACK, 1938	Rind (Hereford)	USA (Missouri)	KP
FOURIE, 1939	Rind (SH)	Südafrika	KP
KINSLEY, 1939	Rind (Herford)	USA (Arkansas)	KP
CLARE und STEPHENS, 1944	Schwein	Neuseeland	KP
JORGENSEN und WITH, 1955	Schwein, Rind	Dänemark	KP
AMOROSO et al., 1957	Rind (SH)	England	KP
ROSS, 1957	Rind (SH)	England	KP
MADDEN et al., 1958	Rind (HF)	USA (Michigan)	KP
NESTEL, 1958	Rind	Jamaika	KP
RHODE und CORNELIUS, 1958	Rind (HF)	USA (Kalifornien)	KP
WASS und HOYTE, 1965	Rind (HF, SH)	USA (Minnesota)	KP
HAYDON, 1975	Rind	Kanada	KP
RUTH et al., 1977	Rind (KT)	USA (Minnesota)	PP
GONZALES et al., 1979	Rind (HF)	Chile	KP
ICHIJO et al., 1980	Rind	Japan	KP
YAMASHITA et al., 1980	Schwein	Japan	KP
LAUVERGNE und PINAULT, 1991	Rind (Limousin)	Frankreich	PP
OPSOMER und DEKRUIF, 1991	Rind	Niederland	KP
HEALY et.al, 1992	Rind (Limousin)	Australien	PP
BUCHANAN und CRAWSHAW, 1995	Rind (Limousin)	Frankreich	PP
ROELS et al., 1995	Schwein	Belgien	PP+CP
JENKINS et al., 1998	Rind	USA (Alabama)	PP

SH: Shorthornrasse  
 HF: Holstein-Friesian  
 KT: Kreuzungstiere

KP: Kongenitale Porphyrie  
 PP: Protoporphyrinurie  
 CP: Coproporphyrinurie

Weitere Einzelfälle wurden beim Rind in zunehmendem Maße in den 50iger Jahren bei der Shorthornrasse in Großbritannien und Dänemark, aber auch bei der Rasse Holstein-Friesian in den USA beobachtet. In den 90er Jahren kam diese Erkrankung am häufigsten bei rot- und schwarzbunten Rindern mit Holstein-Friesian-Anteil vor (HERZOG, 1991). Das erste Auftreten der Porphyrie beim Schwein wurde 1944 von CLARE und STEPHENS in Neuseeland beschrieben. Beim Schaf sind zum ersten Mal Fälle in Neuseeland sowie Norwegen und weitere in den USA beobachtet worden (WIESNER, 1953), wobei keine genauen Angaben in der Literatur beschrieben wurden. Tabelle 1 fasst die bekannt gewordenen Fälle von Porphyrie bei landwirtschaftlichen Nutztieren zusammen.

## 2.2 Pathobiochemie in der Hämbiosynthese

Die Hämbiosynthese mit mehrfachen Porphyrinen als Zwischenprodukten erfolgt in einer auf Mitochondrien und Cytosol verteilten Reaktionsfolge. Bei der ersten Untersuchung der Stoffwechselwege zeigten SHEMIN und RITTENBERG (1945, zit. nach VOET und VOET, 1992), daß alle C- und N-Atome im Häm von Acetat und Glycin stammen. Die erste Phase der Hämbiosynthese findet im Mitochondrium statt, wobei eine Kondensation von Succinyl-CoA mit Glycin durch  $\delta$ -Aminolävulinat-Synthase (ALA-S) als Schlüsselenzym der Hämbiosynthese geschieht. Dabei wird durch Decarboxylierung das  $\delta$ -Aminolävulinat (ALA) gebildet. Das gebildete  $\delta$ -Aminolävulinat tritt aus den Mitochondrien aus; die weiteren Reaktionsschritte bis zur Coproporphyrinogen-Oxidase verlaufen dann im Cytosol. Innerhalb des Mitochondriums führen die enzymatischen Reaktionen von Protoporphyrinogen über das Protoporphyrin zum Häm (JUNGERMANN und MÖHLER, 1980; LENINGER et al., 1994).

In der Hämbiosynthese garantieren verschiedene Regulationsmechanismen eine genau auf den Bedarf abgestimmte Synthese des Häms (KÖSTLER und DOSS, 1993). Der Ausfall einer oder mehrerer Regulationsmechanismen kann eine Bildung unphysiologischer Porphyrine zur Folge haben oder zum Einsetzen einer Porphyrinsynthese in Organen führen, in denen sie physiologischerweise beim Erwachsenen nicht stattfindet. In der Pathologie sind solche Regulationsstörungen als Porphyrien bekannt, und können eine heterogene Gruppe von Krankheiten verursachen (BUDDECKE, 1989; MOORE, 1993). Diese Stoffwechselkrankheiten sind vorwiegend hereditär bedingt (ANDERSON et al., 2001; GROSS et al., 2000) oder entstehen aus dem Zusammenwirken genetischer und exogener Faktoren. Die genetisch bedingten Verminderungen bei den sieben Enzymen, von der  $\delta$ -Aminolävulinsäure-Dehydratase bis zur Ferrochelatase, korrespondieren dabei mit den pathogenetischspezifischen Typen von Porphyrien. In Abbildung 1 sind die Hämbiosynthese und Porphyrien mit den zugrunde liegenden Enzymen zu erkennen.