

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 412 282 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 799/2000
(22) Anmeldetag: 08.05.2000
(42) Beginn der Patentdauer: 15.05.2004
(45) Ausgabetag: 27.12.2004

(51) Int. Cl.⁷: **C12Q 1/68**

(30) Priorität:
02.05.2000 AT A 766/2000 beansprucht.

(73) Patentinhaber:
VIENNALAB LABORDIAGNOSTIKA GMBH
A-1110 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN UND SONDE ZUR DIAGNOSE VON HÄMOCHROMATOSE

AT 412 282 B

(57) Erfindungsgemäß wird bei einem Verfahren zur Diagnose von Hämochromatose eine biologische Probe auf Vorliegen einer G → A Mutation am Nukleotid 506 und/oder einer G → T Mutation am Nukleotid 502 und/oder einer G → C Mutation am Nukleotid 502 des HFE-Gens untersucht. Erfindungsgemäße Sonden sind fähig, mit dem HFE-Gen im Bereich des Nukleotids 506, bei Vorliegen einer G → A Mutation und/oder im Bereich des Nukleotids 502, bei Vorliegen einer G → T Mutation und/oder mit dem HFE-Gen im Bereich des Nukleotids 502, bei Vorliegen der G → C Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren.

Die Erfindung betrifft Verfahren zur genetischen Diagnose von Hämochromatose sowie Sonden zur genetischen Diagnose von Hämochromatose.

Hämochromatose ist durch eine Störung im Eisenstoffwechsel des menschlichen Körpers gekennzeichnet, die zu einer Eisenüberladung führt. Das überschüssige Eisen lagert sich in einer Vielzahl von Organen ab und verursacht irreversible Schäden und daraus resultierende Krankheiten. Da die klinischen Symptome der Hämochromatose oft erst im Alter von 40, 50 oder mehr Jahren auftreten, dann aber schon irreversible Organschäden vorliegen können, gibt es viele Befürworter einer präsymptomatischen Diagnostik. Umso mehr als durch regelmäßigen Aderlass das übermäßig aufgenommene Eisen einfach entfernt werden kann.

Für die genetische Diagnose von Hämochromatose wurde bisher im HFE-Gen auf zwei Mutationen untersucht, nämlich C282Y und H63D.

Die H63D Mutation ist eine C → G Mutation im Codon 63 und verwandelt die Aminosäure 63 von Histidin in Asparaginsäure. Da die Häufigkeit dieser Mutation bei der allgemeinen Bevölkerung hoch ist, ist ihre Rolle in Bezug auf die Diagnose von Hämochromatose unsicher.

Ein weitaus besseres Kriterium für die Diagnose von Hämochromatose ist die C282Y Mutation, die in 65 bis 95% der Betroffenen gefunden wird. Sie ist eine G → A Mutation am Nukleotid 845 des open reading frame des HFE-Gens, die die Aminosäure 282 von Cystein in Tyrosin verwandelt. Der Anteil jener Hämochromatose-Patienten, welche keine C282Y Mutation tragen, variiert und ist z.B. in Italien höher als in nordeuropäischen Ländern. Es ist daher wichtig, neben den bekannten Mutationen jene genetischen weiteren Ursachen im HFE-Gen und in anderen Genen zu finden, welche in Patienten zur Eisenüberladung führen können.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, weitere Möglichkeiten zu finden, genetische Ursachen für Hämochromatose zu diagnostizieren.

Die im Folgenden angeführten Nukleotidpositionen entsprechen der Nomenklatur von Feder et al (1996) (1).

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass eine biologische Probe auf Vorliegen einer G → A Mutation am Nukleotid 506 und/oder einer G → T Mutation am Nukleotid 502 des HFE-Gens untersucht wird. Diese Mutationen wurden bei Untersuchungen an Hämochromatose Familien in Italien gefunden. Die Mutation G → A am Nukleotid 506 bewirkt die Umwandlung der zugeordneten Aminosäure 169 von Tryptophan in ein Stopcodon, ebenso wie die Mutation G → T am Nukleotid 502 die Umwandlung der zugeordneten Aminosäure 168 von Glutaminsäure in ein Stopcodon bewirkt.

Oder es wird eine biologische Probe auf Vorliegen einer G → C Mutation am Nukleotid 502 des HFE-Gens untersucht. Die Mutation G → C am Nukleotid 502 bewirkt die Umwandlung der zugeordneten Aminosäure 168 von Glutaminsäure in Glutamin.

Als biologische Probe kann dabei Blut, Gewebs-Biopsie, Mundhöhlenabstrich, Fruchtwasser etc. verwendet werden, wobei die biologische Probe, je nach Auswahl des an sich bekannten Untersuchungsverfahrens, ebenfalls bekannten Vorbehandlungen unterworfen wird.

Vorzugsweise wird die biologische Probe auch auf Vorliegen einer C282Y Mutation und/oder einer H63D Mutation untersucht, so dass auch bei Vorliegen nur einer der nunmehr fünf bekannten Mutationen im HFE-Gen die Diagnose von Hämochromatose erfolgen kann.

Wird die biologische Probe auch auf Vorliegen von Nukleinsäuren untersucht, deren HFE-Gen die genannten Mutationen nicht aufweist, läßt sich nachweisen, ob die Mutationen heterozygot oder homozygot vorliegen.

Die Untersuchung kann in an sich bekannter Weise durch Sequenzierung der aus der biologischen Probe erhaltenen Nukleinsäure durchgeführt werden.

Oder die biologische Probe wird mit mindestens einer Sonde, die fähig ist mit dem HFE-Gen im Bereich des Nukleotids 506 bei Vorliegen der G → A Mutation und/oder im Bereich des Nukleotids 502, bei Vorliegen der G → T Mutation und/oder im Bereich des Nukleotids 502, bei Vorliegen der G → C Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren, in Kontakt gebracht und es wird überprüft, ob entsprechende Hybridisierungsprodukte vorliegen.

Wenn die biologische Probe auch auf Vorliegen einer C282Y und/oder einer H63D Mutation untersucht werden soll, wird die biologische Probe mit mindestens einer weiteren Sonde in Kontakt gebracht, die fähig ist, mit dem Bereich bzw. den Bereichen des HFE-Gens zu hybridisieren, der bzw. die die C282Y Mutation und/oder die H63D Mutation trägt, oder fähig ist, mit den entspre-

chenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren und es wird überprüft, ob entsprechende Hybridisierungsprodukte vorliegen.

Um zu unterscheiden, ob die Mutationen heterozygot oder homozygot vorliegen, wird vorzugsweise die biologische Probe mit mindestens einer weiteren Sonde in Kontakt gebracht, die fähig ist, mit einem der gleichen Bereiche zu hybridisieren, wenn keine Mutation vorliegt.

Alternativ kann die biologische Probe mittels Antikörper auf Vorliegen eines verkürzten HFE-Proteins untersucht werden, wobei dieses verkürzte Protein durch Abbruch der Translation durch das Stopcodon entsprechend der G → A Mutation am Nukleotid 506 und/oder der G → T Mutation am Nukleotid 502 des HFE-Gens gebildet wird. Weiters kann die biologische Probe mittels Antikörper auf Vorliegen eines HFE-Proteins herkömmlicher Länge untersucht werden, um heterozygote von homozygoten Fällen zu unterscheiden. Die Analyse kann mittels Enzymimmunoassay, durch histo-chemische Verfahren oder Western-Blot erfolgen.

Derzeit werden eine Vielzahl von Verfahren zur Analyse von Mutationen verwendet, unter anderem RFLP (restriction fragment length polymorphism), PCR-SSP (PCR with sequence-specific primers), Allelespezifische Oligonukleotidhybridisierung, SSCP (single-strand conformation polymorphism), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), OLA (oligonucleotide ligation assay), Echtzeit-Fluoreszenz-PCR und DNA Sequenzierung. Wenn RNA untersucht wird, kann das z.B. mittels sog. "NAS-BA" erfolgen oder es kann auch RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden, dann mit PCR amplifiziert und anschließend charakterisiert werden. All diese bekannten Analyseverfahren können für das erfindungsgemäße Diagnoseverfahren herangezogen werden.

Die erfindungsgemäße Sonde zur Diagnose von Hämochromatose anhand einer Mutation im HFE-Gen ist fähig, mit dem HFE-Gen im Bereich des Nukleotids 506 bei Vorliegen der G → A Mutation und/oder im Bereich des Nukleotids 502 bei Vorliegen der G → T Mutation und/oder im Bereich des Nukleotids 502 bei Vorliegen einer G → C Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren.

Die folgenden Beispiele beschreiben mögliche Ausführungsformen für erfindungsgemäße Verfahren zur genetischen Diagnose von Hämochromatose.

BEISPIEL 1:

DNA Isolation und Amplifikation:

DNA wurde aus antikoaguliertem Blut unter Verwendung herkömmlicher Extraktionsverfahren (Miller et al., 1988) (10) oder kommerziell erhältlicher Reagenzien (GenXtract DNA extraction system, ViennaLab, Wien, AT) isoliert. Die Exon 3-Sequenzen des HFE-Gens wurden in einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Primer 5'-GGA TTG GAG AGC AGC AGA AC-3' und 5'-AAA CTC CAA CCA GGG ATT CC-3' amplifiziert. Jeder Primer wurde mit einer Endkonzentration von 0,4 µM in 1xPCR Puffer enthaltend 1,5mM Mg²⁺, 200 µM dNTPs (Epicentre, Madison, WI), und 0,02 U/µl AmpliTaq DNA Polymerase (PE Biosystems, Foster City, CA) verwendet. Ein Thermozyklierprogramm mit 30 Zyklen (94°C für 15s, 58°C für 30s und 72°C für 30s) wurde durchgeführt mit dem GeneAmp PCR System 2400 (PE Biosystems, Foster City, CA).

Sequenzieren:

Die PCR Produkte wurden mit "Centricon-100"-Säulen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gereinigt. Die amplifizierte und gereinigte DNA wurde mit UV-Spektrophotometrie quantifiziert und anschließend sequenziert unter strikter Einhaltung des Protokolls aus "BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - with AmpliTaq DNA Polymerase, FS" (PE Applied Biosystems) für die ABI Prism instrumentation (PE Applied Biosystems).

BEISPIEL 2:

Im Folgenden wird über die erfolgreiche Anwendung der reversen Hybridisierung berichtet, um einen Screeningtest zur Diagnose von HFE-Mutationen zu schaffen. Der Test ist rasch und einfach durchzuführen, der Automatisierung zugänglich und flexibel bezüglich zur Ergänzung neuer Mutationen.

Materialien und Methoden

DNA Isolierung und Amplifizierung

DNA wurde aus antikoaguliertem Blut mittels Standard-Extraktionsmethoden (Miller et al., 1988) (10) oder unter Verwendung kommerziell erhältlicher Reagenziensets (GenXtract DNA Extraction System, ViennaLab) isoliert. Abschnitte aus den Exons 2, 3 und 4 des HFE-Gens wurden in einer einzelnen Multiplex-PCR Reaktion mit 5'-biotinyliertem Primern (Feder et al., 1996 (1) Jeffrey et al., 1999 (32); Douabin et al., 1999 (31)) amplifiziert. Jeder der Primer wurde in einer Endkonzentration von 0,4 µM in 1x PCR-Puffer zuzüglich 1,5 mM Mg²⁺, 200 µM dNTPs (Epicentre, Madison WI) und 0,02 U/µl AmpliTaq DNA-Polymerase (PE Biosystems, Foster City, CA) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde am GeneAmp PCR System 2400 (PE Biosystems) einem Temperaturprogramm von 30 Zyklen (94°C für 15s, 58°C für 30s und 72°C für 30s) unterworfen.

Herstellung der Teststreifen

Das Prinzip des enzymatischen Verlängerns ("Tailing") und Immobilisierens von sequenzspezifischen Hybridisierungs sonden wurde bereits früher beschrieben (Saiki et al., 1989) (34). Sonden von 16 bis 24 Nukleotiden in Länge, spezifisch entweder für das Wildtyp- oder das mutierte Allel einer Mutation, wurden aus einer HFE Datenbanksequenz (GenBank Zugangsnummer Z92910) ausgewählt und mittels eines Phosphoramidit-Standardverfahrens synthetisiert. Ein 3'-poly(dT)-Schwanz ("tail") von 300-500 Nukleotiden wurde enzymatisch durch Inkubation der Oligonukleotide (200 pmol) in Gegenwart von 60 U Terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) und 150 nmol dTTP (Epicentre) für 8h bei 37°C angehängt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM EDTA beendet, und die Tailingeffizienz mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Poly(dT)-geteilte Sonden wurden mittels einer speziell angefertigten Schlitzapparatur als parallel Linien von 1 mm Breite auf Nitrozellulose-Membranblätter (Whatman, Maidstone, UK) aufgetragen, getrocknet und über Nacht bei 60°C fixiert ("Backen"). Zusätzlich wurde ein 5'-biotinyliertes Kontroll-Oligonukleotid zur Überprüfung der Detektionsreagenzien aufgetragen. Aus den fertigen Membranblättern wurden zuletzt 3 mm breite Teststreifen geschnitten.

Die ausgewählten Sonden sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1

Linie	Spezifität der Sonde	Mutation	Zitat
1	(Kontrolle)		
2	nt 157 G>A (Exon 2)	V53M	de Villiers et al.1999 (7)
3	nt 187 C>G (Exon 2)	H63D	Feder et al., 1996 (1)
4	nt 189 T>C (Exon 2)	H63H	de Villiers et al.1999 (7)
5	nt 193 A>T (Exon 2)	S65C	Mura et al., 1999 (9)
6	nt 381 A>C (Exon 3)	Q127H	de Villiers et al.1999 (7)
7	nt 502 G>C (Exon 3)	E168Q	vorliegende Erfindung
8	nt 502 G>T (Exon 3)	E168Stop	vorliegende Erfindung
9	nt 506 G>A (Exon 3)	W169Stop	vorliegende Erfindung
10	nt 845 G>A (Exon 4)	C282Y	Feder et al., 1996 (1)
11	Wildtyp nt 157		
12	Wildtyp nt 187-193		
13	Wildtyp nt 381		
14	Wildtyp nt 502-506		
15	Wildtyp nt 845		

Reverse Hybridisierung und Detektion

Der gesamte Vorgang der Hybridisierung und Detektion wurde in individuellen Vertiefungen einer dünnwandigen Plastik-Inkubationswanne durchgeführt (Bio-Rad, Hercules, CA). Gleiche Volumina (10 µl) an PCR-Produkt und Denaturierungslösung (400 mM NaOH, 10 mM EDTA) wurden gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das alkalische Reaktionsgemisch

wurde mit Na-Phosphatpuffer, pH 7, neutralisiert, ein Teststreifen wurde eingelegt und für 30 min bei 45°C in einem Schüttelwasserbad hybridisiert. Nach drei stringenten Waschschritten bei 45°C wurden gebundene PCR-Fragmente mittels Streptavidin-Alkalischer-Phosphatase und Farbsubstraten (NBT/BCIP) nachgewiesen. Im Falle einer positiven Reaktion war nach 15 min Inkubationsdauer bei Raumtemperatur eine violette Färbung sichtbar.

Ergebnisse

Ein Multiplex-PCR System wurde etabliert, um biotinylierte DNA-Fragmente aus den Exons 2, 3 und 4 des HFE-Gens in einer einzigen Amplifizierungsreaktion zu erhalten. Um mögliche Fehler beim Typisieren der C282Y-Mutation aufgrund eines intronischen Polymorphismus (5569 G > A) an der Bindungsstelle des ursprünglichen reversen Primers von Feder et al. (1996)(1) zu vermeiden, wurde das Exon 4-Fragment gemäß Jeffrey et al. (1999)(32) modifiziert.

Zur Entwicklung des Revers-Hybridisierungsassays wurden von Individuen, die folgende exonische HFE-Mutationen trugen, DNA-Proben gesammelt: V53M, H63D, H63H, S65C, Q127H, E168Stop, W169Stop und C282Y (Tabelle 1). Darüberhinaus wurde eine bisher unbekannte Mutation im Exon 3 (Nukleotid 502 G>C oder E168Q), welche in einer 79-jährigen kaukasischen Frau aus Südafrika identifiziert worden war, in den Test eingebaut. Diese Frau war außerdem heterozygot für die H63D-Mutation, und ihr Serum-Ferritin war zum Zeitpunkt der Testung mäßig erhöht (242 ng/ml; Referenzbereich: 12-119 ng/ml). Ansonsten waren keine auffälligen klinischen Symptome nachweisbar, allerdings war eine familiäre Häufung von sowohl Herzerkrankungen als auch unterschiedliche Arten von Krebserkrankungen bekannt. Die E168Q-Mutation wurde ursprünglich mittels Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP) Analyse (de Villiers et al. 1999 (7)) identifiziert und anschließend durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Eine Reihe von möglichen Sonden zwischen 16 und 24 Nukleotiden in Länge spezifisch entweder für das Wildtyp- oder das mutierte Allel einer der Mutationen, wurde aus der GenBank-Sequenz für HFE ausgewählt. Nach enzymatischem poly(dT)-tailing wurden die Oligonukleotide auf eine Nitrozellulose-Membran als Anordnung paralleler Linien aufgetragen und mittels Backen fixiert. Zuletzt wurden einzelne Teststreifen aus dem Membranblatt ausgeschnitten. Amplifizierungsprodukte der verschiedenen DNA Proben, welche alle neun Mutationen umfassten, wurden mit den vorläufigen Teststreifen unter gleichen und exakt kontrollierten Stringenzbedingungen hybridisiert. Gebundene biotinylierte Sequenzen wurden mittels Streptavidin-Enzym-Konjugat und Farbreaktion nachgewiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Sonden ausgewählt, die unter gleichen und standardisierten Bedingungen spezifisch entweder das Wildtyp- oder das mutierte Allel erkannten, und das Design des endgültigen Teststreifens festgelegt. Eine biotinylierte Kontrollsonde, welche unabhängig von der Anwesenheit hybridisierender DNA ein positives Testergebnis liefern sollte, wurde zur Überprüfung der Detektionsreagenzien zusätzlich aufgetragen. Einige beispielhafte Ergebnisse mit verschiedenen Proben, die sowohl Wildtyp- als auch mutierte HFE Allele enthalten, sind in Figur 1 dargestellt. In Fig. 1 sind Teststreifen gezeigt (siehe Tabelle 1 bezüglich Anordnung der Sonden) nach Hybridisierung mit verschiedenen amplifizierten DNAs und Farbreaktion. Folgende Proben wurden verwendet: nichtmutiert (Spur 1), V53M (Spur 2), H63D/H63D (Spur 3), H63H (Spur 4), S65C (Spur 5), S65C/S65C (Spur 6), H63D/S65C (Spur 7), H63D/Q127H (Spur 8), H63D/E168Q (Spur 9), H63D/W169Stop (Spur 10), E168Stop/C282Y (Spur 11), C282Y (Spur 12), H63D/C282Y (Spur 13), S65C/C282Y (Spur 14), C282Y/C282Y (Spur 15), negative PCR Kontrolle (Spur 16).

Eine Reihe unterschiedlicher Methoden, darunter Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP), PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP), Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden, SSCP, Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese (DGGE), Oligonukleotid-Ligationsassay (OLA), Echtzeit-Fluoreszenz-PCR, und DNA-Sequenzierung, werden derzeit für den Nachweis von HFE Mutationen angewandt (Feder et al., 1999 (1); Jazwinska et al., 1996 (2); Oberkanins et al., 1997 (3); Steffensen et al., 1998 (4); Bollhalder et al., (5); Christiansen et al., 1999 (6); de Villiers et al., 1999 (7); Mangasser-Stephan et al., 1999 (8); Mura et al., 1999 (9)). Die meisten dieser Techniken sind in ihrer Kapazität, mehr als eine Mutation pro Ansatz nachzuweisen, sehr beschränkt, wodurch eine umfassende genetische Analyse sehr arbeitsaufwendig werden kann. Andererseits sind informativere Methoden, wie z.B. DNA-Sequenzierung, für routinediagnostische Laboratorien mit hohem Probendurchsatz ungeeignet. Wir haben erfolgreich die

Technik der reversen Hybridisierung angewandt, um neun verschiedene HFE Mutationen gleichzeitig in einem einzigen experimentellen Ansatz nachzuweisen. In der Vergangenheit war diese Methode bereits öfter zur Genotypisierung komplexer Erbkrankheiten, wie etwa Zystischer Fibrose (Chehab and Wall, 1992 (30)) und Thalassämie (Maggio et al., 1993 (33)) sowie infektiöser Agentien, wie Hepatitis C Virus (Stuyver et al., 1993 (35)) verwendet worden.

Das Färbemuster einer Mutanten- und der dazugehörigen Wildtyp-Sonde erlaubt die Unterscheidung von drei möglichen Genotypen: keine Mutation liegt vor, wenn nur die Wildtyp-Sonde gefärbt ist, in Heterozygoten sind beide Signale sichtbar, während in homozygot mutierten Proben ausschließlich die Mutanten-Sonde positiv ist. Dasselbe gilt im Prinzip für die Mehrzahl von Heterozygoten für zwei unterschiedliche Mutationen (Fig.1, Spuren 8-11, 13, 14). Allerdings enthält das HFE-Gen zumindest zwei Regionen, eine davon in Exon 2 (Nukleotide 187-193) und die andere in Exon 3 (Nukleotide 502-506), innerhalb derer mehrere Mutationen in unmittelbarer Nachbarschaft gefunden worden waren. Da die Hybridisierungs sonden in diesem Bereich mehr als eine Mutation abdecken, ist kein Wildtyp-Signal sichtbar, wenn zwei Mutationen aus der gleichen Region (z.B. H63D und S65C) auf unterschiedlichen Chromosomen in derselben Probe vorkommen (Fig. 1, Spur 7). Das Auftreten zweier benachbarter Mutationen auf einem Chromosom würde wiederum zu einem anderen Muster führen, ein solcher Fall wurde bisher allerdings noch nicht beobachtet.

Der hier beschriebene Revers-Hybridisierungsassay ist geeignet, ein wertvolles Hilfsmittel für die Routinediagnostik von unterschiedlichen HFE Mutationen zu werden. Durch die Verwendung einer einzigen Multiplex-PCR Amplifizierungsreaktion und vorproduzierter, gebrauchsfertiger Teststreifen ist die Methode einfach und zuverlässig und kann von der Blutabnahme bis zum fertigen Resultat innerhalb weniger Stunden durchgeführt werden. Für hohen Probendurchsatz kann die Testung mit Hilfe im Handel erhältlicher Geräte, wie z.B. dem profiBlot II T (TECAN AG, Hombrechtikon, Schweiz), automatisiert werden. Die Zahl der vom gegenwärtigen Test erfassten Mutationen lässt sich leicht erhöhen, indem die gleiche Strategie für die Auswahl neuer, zusätzlicher Hybridisierungs sonden angewandt wird.

BEISPIEL 3:

Weiters wird eine Untersuchung von fünf nicht verwandten italienischen Patienten beschrieben.

Hintergrund und Fragestellung:

Die meisten Hämochromatose-Patienten nordeuropäischer Abstammung sind homozygot für die C282Y Mutation des HFE-Gens. In Italien jedoch ist eine große Anzahl von Patienten mit Eisenüberladung nicht homozygot für C282Y, weshalb vermutet wurde, dass diesen Fällen andere Mutationen oder genetische Veränderungen zugrunde liegen.

Methoden:

Fünf C282Y heterozygote, nicht verwandte Patienten italienischer Abstammung und mit klassischem Phänotyp einer Hämochromatose wurden untersucht. Die codierenden Abschnitte sowie die Exon-Intron Übergänge des HFE Gens wurden analysiert. Die Haplotypen aller Patienten auf Chromosom 6p wurden mit den Mikrosatelliten D6S265, D6S105 und D6S1281 bestimmt.

Ergebnisse:

Zwei neue Nonsense-Mutationen des HFE-Gens wurden im Exon 3 des C282Y-negativen Chromosomes identifiziert: Die erste eine G → T Mutation im Codon 168 wurde in drei Patienten und die zweite eine G → A Mutation im Codon 169 in den anderen nachgewiesen.

Jede der beiden Nonsense Mutationen wurde in C282Y-heterozygoten, nicht verwandten Patienten mit klassischem Hämochromatose Phänotyp aus Italien gefunden. Das bestätigt die Annahme, dass der genetische Hintergrund von Hämochromatose in Italien weniger homogen ist als in nordeuropäischen Ländern und dass in C282Y- oder H63D-heterozygoten Patienten mit Eisenüberladung weitere Mutationen vorliegen. Dieses Ergebnis ist von praktischer Bedeutung für die Diagnose von Hämochromatose und für Strategien zum Screening.

Einleitung

Hereditäre Hämochromatose (HH) (11) ist eine sehr häufige autosomal-rezessive Erkrankung, welche durch erhöhte Aufnahme von Eisen und progressive Eisenüberladung charakterisiert ist (12). Das HFE-Gen wurde 1996 identifiziert und zwei Mutationen, C282Y und H63D, wurden

ursprünglich beschrieben (1). Die meisten Patienten mit HH sind homozygot für C282Y (1, 13, 14, 15). 5 - 7% der Fälle sind C282Y/H63D gemischtheterozygot (1, 16) und weisen ebenso wie die sehr seltenen H63D homozygoten Fälle meist eine abgeschwächte Form der Hämochromatose auf (17). Ein geringer Anteil der Fälle mit HH Phänotyp ist heterozygot für C282Y oder H63D oder weder für C282Y noch für H63D. Diese Fälle scheinen in Südeuropa häufiger zu sein als in Nordeuropa (18, 19). In einer kollaborativen Studie an 188 italienischen Patienten mit HH Phänotyp konnte in 28% auf einem der Chromosomen keine Mutation identifiziert werden (19). Das Vorliegen von anderen HFE Mutationen, anderen 6p-assoziierten Mutationen oder aber das Vorhandensein einer anderen Form genetisch bedingter Eisenüberladung, welche nicht auf Chromosom 6 lokalisiert sind, wurde in manchen dieser Fälle vermutet (19, 20, 21).

Drei weitere HFE Mutationen wurden heterozygot und gemeinsam mit C282Y in einzelnen Fällen mit klassischer HH gefunden; eine Splice-Mutation (IVS3 + 1G→T), verbunden mit dem obligaten Ausfall von Exon 3 (22) und zwei Missense-Mutationen (I105T und G93R) in der $\alpha 1$ Domäne, welche vermutlich die Bindung des HFE Proteins an den Transferrin-Rezeptor beeinflusst (23). Die Missense-Mutation S65C wurde gehäuft auf sowohl C282Y- als auch H63D-negativen HH Chromosomen lokalisiert gefunden und es wird vermutet, dass S65C im Zusammenhang mit C282Y oder H63D die Ursache für eine weitere milde Form von HH ist (9). Weitere Missense-Mutationen wurden beschrieben, aber ihre Bedeutung für die Pathogenese von HH ist nicht bekannt (7).

Mit diesem Stand des Wissens wurde an C282Y heterozygoten italienischen Patienten mit klassischem HH Phänotyp die Hypothese geprüft, ob andere HFE Mutationen in nicht C282Y-mutierten Chromosomen als Ursache für den vollständig ausgeprägten Phänotyp gefunden werden können. Hier wird die Untersuchung von fünf dieser Patienten beschrieben.

Materialien und Methoden

Patienten

Fünf C282Y-heterozygote und H63D negative Probanden aus Italien mit HH wurden untersucht. Alle wiesen phänotypische Merkmale klassischer homozygoter HH auf:

1. Erhöhte Transferrin-Sättigung (>50% nach Fasten) und erhöhte Konzentration von Serum-Ferritin;
2. Hepatozelluläre Hemosiderin-Ablagerungen dritten und vierten Grades nach Scheuer et al.(24);
3. Leber-Eisenindex ≥ 2 , Anämie, chronische Hepatitis B und C sowie überdurchschnittlicher Alkoholkonsum sowie Bluttransfusionen konnten ausgeschlossen werden.

Von allen Patienten und deren Verwandten liegen Einverständniserklärungen zur Studie vor.

Klinische Untersuchungen

Fibrose und Zirrhose wurden durch Biopsie der Leber befundet. Alle Zirrhosen waren vom Typ A nach Child. Das Vorliegen von klinischen Symptomen einer HH wurden nach beschriebenen Kriterien befundet (25). Transferrin-Sättigung und Serum-Ferritin wurden nach Standardmethoden bestimmt. Leber-Eisenkonzentrationen (hepatic iron concentration, "HIC") wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt (Perkin-Elmer S2380, Nowak, CT) und daraus der Leber-Eisenindex (hepatic iron index, "HII") (Verhältnis von HIC [$\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht] zu Alter [Jahre]) berechnet. Die Gesamtmenge an durch Aderlass (IR) entferntem Eisen wurde, wie beschrieben, bestimmt (25). Die geographische Abstammung der Patienten wurde bis in die vierte Elterngeneration ermittelt.

Molekulare Untersuchungen

Genomische DNA wurde aus peripheren Blutzellen isoliert. Die C282Y und H63D Mutationen wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, "PCR") und Verdau mit den Restriktionsenzymen Rsa I bzw. Bcl I untersucht (18). Die Mikrosatelliten Marker D6S265, D6S105 und D6S1281 wurden, wie beschrieben eingesetzt (26). HLA-A Antigene wurden in Mikrolymphotoxizitätstests bestimmt. Haplotypen wurden entsprechend den Verteilungen der Marker in den Familien erstellt.

Die vollständige kodierende Sequenz sowie die Exon-Intron Grenzen des HFE-Gens wurden mittels PCR amplifiziert, wie von Carella et al. (18) beschrieben. Die Nukleotidsequenz beider DNA-Stränge wurde in allen Probanden und in jenen Verwandten mit identen, C282Y-negativen Chromosomen bestimmt mittels Dideoxy-Kettenbestimmungsreaktion mit Sequenase 2.0 (USB Amersham, Cleveland, Ohio) und ^{35}S - α -dATP nach dem Protokoll des Herstellers. Die Reaktions-

ansätze wurden über 6%ige denaturierende Polyacrylamidgele elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographiert. Die gleichen Primer wurden sowohl für die PCR als auch die Sequenzreaktion eingesetzt.

Als weitere Bestätigung für die neuen Mutationen (siehe Ergebnisse) wurde ein Re-striktionsfragment-Längenpolymorphismus durchgeführt (restriction fragment length polymorphism, "RFLP"). Da die beiden Mutationen weder eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme generierten noch zerstörten, wurde der die Mutationen tragende Abschnitt von Exon 3 mit PCR amplifiziert und zwar unter Verwendung von Oligonukleotiden mit veränderter Ausrichtung entsprechend jeder Mutation (Bria-F: 5'TGGCCCACCAAGCTGGACT 3'; Dom-F: 5'GCCTGGCCCACCAAACTG 3'), dass dabei für jede Mutation eine informative Restriktionsenzymchnittstelle für BsrSI in der normalen ("wild-Typ") HFE Sequenz entstand. Der Antisense-Primer war gleich wie für die Sequenzreaktion.

In Tabelle 2 sind die klinischen Daten und die Eisen-Werte der fünf Probanden dargestellt.

Tabelle 2 - Daten der fünf Probanden mit Hämochromatose

	Sex	Alter Jahre	TS %	SF µg/L	Scheuer's Grad	HIC µmol/g	HII	IR g	klinische Komplikationen
1	M	48	96	694	4	238	4.9	4	keine
2	M	47	79	1206	4	359	7.6	23	C
3	M	42	86	608	3	144	3.4	3.6	keine
4	M	50	106	2740	4	425	8.5	21	C,H,D
5	M	66	100	1351	4	421	5.4	-	C,H,A,D

Legende: TS = Transferrin-Sättigung; SF = Serum Ferritin;
HIC = Leber-Eisenkonzentration; HII = Leber-Eisenindex;
IR = ausgeschiedenes Eisen; C = Leberzirrhose;
H = Hypogonadismus; A = Arthropathie; D = Diabetes

Drei Patienten (1, 2 und 3) stammen aus einem Tal im Nordwesten (Ossola) und zwei (4 und 5) aus der Umgebung von Monza (Brianza). Durch Sequenzanalyse des HFE-Gens wurden zwei neue Nonsense-Mutationen im Exon 3 in heterozygotem Status identifiziert. Die erste, ein G nach T Austausch im Codon 168 (GAG→TAG, Glu→Stop) wurde in Probanden aus dem Ossola Tal gefunden. Die zweite, ein G nach A Austausch im Codon 169 (TGG→TAG, Trp→Stop) wurde in Probanden aus der Region Brianza gefunden. Die neuen Mutationen wurden deshalb HFE-Ossola und HFE-Brianza nach der Herkunft der Probanden benannt.

In Familie 1 wurde ein betroffener Bruder mit gleichem Chromosom 6p-Haplotyp und den gleichen HFE Mutationen wie der Proband befundet. Sein HIC war 176,2 µmol/g und der HII war 3,92.

Die zwei neuen Mutationen waren in vollständigem Kopplungs-Ungleichgewicht mit C282Y und H63D Mutationen. HFE-Ossola war mit dem Haplotyp D6S265-3, HLA-A24, D6S105-5 und D6S1281-6 in Familie 1 und 2 assoziiert, während in Familie 3 der Haplotyp davon abwich in den Markern D6S265 und HLA-A, was auf ein Rekombinationsereignis zwischen HLA-A und D6S105 schließen läßt. HFE-Brianza war mit Haplotyp D6S265-3, HLA-A24, D6S105-6 und D6S1281-6 assoziiert.

In diesem Manuskript werden fünf C282Y heterozygote Patienten italienischer Abstammung mit klassischer HH und zwei neuen Nonsense-Mutationen im HFE-Gen beschrieben. Die beiden Mutationen führen zu einem Stop Codon an Position 502 und 506 des offenen Leserahmens (nt 502 GAG→TAG und nt 506 TGG→TAG) und in weiterer Folge zu Proteinen mit Fehlen der α3 Domäne, der transmembranalen Domäne und des cytoplasmatischen Abschnitts. Diese Mutationen bewirken vermutlich im Gegensatz zu C282Y eine vollständige Funktionsstörung des HFE Proteins vergleichbar mit der partiellen Deletion von Exon 4 in HFE-defizienten Mäusen (27, 28). Folglich könnten die so mutierten Allele die Funktion von Null-Allelen tragen. Es kann vermutet werden, dass die Kombinationen dieser Mutationen mit einem heterozygoten C282Y zu einem

stark ausgeprägten Phänotyp führt. Drei der fünf Probanden (2, 4 und 5) wiesen auch schwere Krankheitsbilder auf mit hohem Ausmaß an Eisenüberladung und HH-bedingten klinischen Beschwerden. Proband 3 wies einen weniger ausgeprägten Phänotyp auf; vermutlich da er seit zehn Jahren regelmäßig Blut spendete, während Proband 1 und sein betroffener Bruder ebenfalls einen wenig ausgeprägten Phänotyp ohne offensichtlich schützende Faktoren, wie Blutverlust oder verschlechterte Absorption, aufweisen. Es besteht also phänotypisch Heterogenität in diesen Patienten, die sowohl auf Umweltfaktoren als auch auf genetischen Faktoren beruhen können. Die Existenz von den Phänotyp in C282Y-homozygoten Patienten modulierenden Genen in der Region um D6S105 wurde postuliert (25, 29), aber weitere Studien sind notwendig, um den Genotyp-Phänotyp Zusammenhang in HH Patienten besser erklären zu können.

Sowohl HFE-Ossola als auch HFE-Brianza heterozygote Patienten wiesen keine erhöhten Eisenwerte auf, darauf hinweisend, dass auch eine Mutation nicht zu einer Eisenüberladung im heterozygoten Zustand führt. Auch die heterozygote Kombination von HFE-Ossola oder HFE-Brianza mit H63D zeigte kein Zeichen von Eisenüberladung. Da aber diese Probanden Frauen oder sehr jung waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass, wie bei C282Y, die Kombination einer dieser beiden Nonsense Mutationen mit H63D oder einer anderen "milden" HFE Mutation zu einem HH Phänotyp mit niedriger Penetranz führt (17).

Dieses ist die erste Beschreibung von Nonsense-Mutationen im HFE-Gen und auch der erste Befund über mehrere nichtverwandte von HH betroffenen Trägern einer heterozygoten C282Y mit einer anderen Mutation als H63D. Die beiden hier beschriebenen Mutationen entstanden wahrscheinlich in den genannten nördlichen Regionen Italiens und haben sich vermutlich durch einen "Founder-Effekt" verbreitet. Da in den beiden geographischen Regionen zwischen den betroffenen Familien bis in die vierte Generation keine Blutsverwandtschaft vorliegt, sollten die beiden Mutationen vor weit mehr als hundert Jahren entstanden sein. Die Untersuchung der HFE Allel-Frequenzen in HH Patienten aus diesen beiden italienischen Regionen Ossola und Brianza zeigte, dass die heterozygote Kombination von C282Y mit HFE Brianza oder HFE Ossola gleich häufig oder häufiger ist als mit H63D. C282Y/HFE-Ossola wurde in 25% der Probanden aus Ossola gefunden (C282Y/H63D in 8,3%) und sowohl C282Y/HFE-Brianza als auch C282Y/H63D in 8,4% der HH Probanden aus Brianza. Während die geringe Häufigkeit von C282Y/H63D heterozygoten Kombinationen mit einer niedrigen Penetranz dieses Genotyps assoziiert ist (von 0,44% bis 1,5% in unterschiedlichen Populationen) (17), wird angenommen, dass die Genotypen C282Y/HFE-Brianza oder C282Y/HFE-Ossola eine 100%ige Penetranz aufweisen, aufgrund der Schwere beider Mutationen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass HH in Italien nicht so homogen ist wie in Nordeuropa und weisen hin auf das mögliche Vorhandensein anderer HFE-Mutationen, die in unterschiedlichen Ländern verschieden relevant sind. Das Wissen um diese Mutationen sollte wichtige Konsequenzen für die Diagnose und das Screening von HH implizieren.

Literatur

1. Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F., Domingo R., Ellis M.C., Fullan A., Hinton L.M., Jones N.L., Kimmel B.E., Kronmal G.S., Lauer P., Lee V.K., Loeb D.B., Mapa F.A., McClelland E., Meyer N.C., Mintier G.A., Moeller N., Moore T., MoriKang E., Prass C.E., Quintana L., Starnes S.M., Schatzman R.C., Brunke K.J., Drayana D.T., Risch N.J., Bacon B.R., Wolff R.K.. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399-408.
2. Jazwinska, E.C., Cullen, L.M., Busfield, F., Pyper, W.R., Webb, S.I., Powell, L.W., Morris, C.P., and Walsh, T.P. (1997). Haemochromatosis and HLA-H. *Nature Genet.* 14, 249-251.
3. Oberkanins C., Kazemi-Shirazi L., Kury F., Polli C., Maier-Dobersberger T., Yeganehfar C., and Ferenci P. (1997). Genotyping of the hereditary haemochromatosis mutation (HLA-H:C282Y) in microtiter plates. *Am. J. Hum. Genet.* 61, A225 (Suppl.).
4. Steffensen R., Varming K., and Jersild C. (1998). Determination of gene frequencies for two common haemochromatosis mutations in the Danish population by a novel polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Tissue Antigens* 52, 230-235.
5. Bollhalder M., Mura C., Landt O., and Maly F.E. (1999). LightCycler PCR assay for simultaneous detection of the H63D and S65C mutations in the HFE hemochromatosis gene based on opposite melting temperature. *Clin. Chem.* 45, 2275-2278.

6. Christiansen L., Bygum A., Thomsen K., Brandrup F., Horder M. and Petersen N.E. (1999). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the hemochromatosis (HFE) gene: impact of HFE gene mutations on the manifestation of porphyria cutanea tarda. *Clin. Chem.* 45, 2025-2026.
7. Villiers J.N., Hillermann R., Loubser L., Kotze M.J. Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in haemochromatosis and porphyria. *Hum Mol Genet* 1999;8:1517-22.
8. Mangasser-Stephan K., Tag C., Reiser A., and Gressner A.M. (1999). Rapid genotyping of haemochromatosis gene mutations on the LightCycler with fluorescent hybridization probes. *Clin. Chem.* 45, 1875-1878.
9. Mura C., Raguene O., Ferec C.. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999;93:2502-5.
10. Miller S.A., Dykes D.D., and Polesky H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
11. Bacon B.R., Powell L.W., Adams P.C., Kresina T.F., Hoofnagle J.H. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology* 1999;116:193-207.
12. Camaschella C., Piperno A. Hereditary Hemochromatosis: recent advances in molecular genetics and clinical management. *Haematologica* 1997;82:77-84.
13. Jouanolle A.M., Gandon G., Jezeque P., Blayau M., Campion M.L., Yaouanq Y., Mosser J., Fergelot P., Chauvel B., Bouric P., Carn G., Andrieux N., Gicquel I., Le Gall J.Y., David V. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996;14:251-2.
14. Beutler E., Gelbert T., West C., Lee P., Adams M., Blackston R., Pockros P., Kosty M., Venditti C.P., Phatak P.D., Seese N.K., Chorney K.A., Ten Elshof A.E., Gerhard G.S., Chorney M. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 1996;22:187-94.
15. Pietrangelo A., Camaschella C. Molecular genetics and control of iron metabolism in Hemochromatosis. *Haematologica* 1998;83:456-61.
16. Beutler E. Genetic iron beyond haemochromatosis: clinical effects of HLA-H mutations. *Lancet* 1997;349:296-7.
17. Beutler E. The significance of 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 1997;61:762-4.
18. Carella M., D'Ambrosio L., Totaro A., Grifa A., Valentino M.A., Piperno A., Girelli D., Roetto A., Franco B., Gasparini P., Camaschella C. Mutation analysis of HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997;60:828-32.
19. Piperno A., Sampietro M., Pietrangelo A., Arosio C., Lupica L., Montosi G., Vergani A., Fraquelli M., Girelli D., Pasquero P., Roetto A., Gasparini P., Fargion S., Conte D., Camaschella C. Heterogeneity of hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 1998;114:996-1002.
20. Camaschella C., Fargion S., Sampietro M., Roetto A., Bosio S., Garozzo G., Arosio C., Piperno A. Inherited HFE-unrelated hemochromatosis in Italian families. *Hepatology* 1999;29:1563-4.
21. 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. *New Engl J Med* 1999;341:725-32.
22. Wallace D.F., Dooley J.S., Walker A.P. A novel mutation of HFE explains the classical phenotype of genetic hemochromatosis in a C282Y heterozygote. *Gastroenterology* 1999;116:1409-12.
23. Barton J.C., Sawada-Hirai R., Rothenberg B.E., Acton R.T. Two novel missense mutations of the HFE gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25:146-54.
24. Scheuer P.J., Williams R., Muir A.R. Hepatic pathology in relatives of patients with hemochromatosis. *J. Pathol Bacteriol* 1962;84:53-64.
25. Piperno A., Arosio C., Fargion S., Roetto A., Nicoli C., Girelli D., Sbaiz L., Gasparini P., Boari G., Sampietro M., Camaschella C.. The ancestral hemochromatosis haplotype is associated with a severe phenotype expression in Italian patients. *Hepatology* 1996;24:43-6.
26. Camaschella C., Roetto A., Ciciliano M., Pasquero P., Bosio S., Gubetta L., Di Vito F., Girelli D., Totaro A., Carella M., Grifa A., Gasparini P. Juvenile and adult hemochromatosis are distinct genetic disorders. *Eur J Hum Genet* 1997;5:371-5.
27. Zhou X.Y., Tomatsu S., Fleming R.E., Parkkila S., Waheed A., Jiang J., Fei Y., Brunt E.M., Ruddy D.A., Prass C.E., Schatzman R.C., O'Neill R., Britton R.S., Bacon B.R., Sly W.S. HFE gene

Knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2492-7.

28. Levy J.E., Montross L.K., Cohen D.E., Fleming M.D., Andrews N.C.. The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* 1999;94:9-11.

29. Pratiwi R., Fletcher L.M., Pyper W.R., Do K.A., Crawford D., Powell L.W., Jazwinska E.C. Linkage disequilibrium analysis in Australian haemochromatosis patients indicates bipartite association with clinical expression. *Journal of Hepatology* 1999;31:39-46.

30. Chehab F.F., and Wall J. (1992). Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridization: a technology for carrier screening. *Hum. Genet.* 89, 163-168.

31. Douabin V., Moirand R., Jouanolle A.M., Brissot P., Le Gall J.Y., Deugnier Y., and David V. (1999). Polymorphisms in the HFE gene. *Hum. Hered.* 49, 21-26.

32. Jeffrey G.P., Chakrabarti S., Hegele R.A., and Adams P.C. (1999). Polymorphism in intron 4 of HFE may cause overestimation of C282Y homozygote prevalence in haemochromatosis. *Nature Genet.* 22, 325-326.

33. Maggio A., Giambona A., Cai S.P., Wall J., Kan Y.W., and Chehab F.F. (1993). Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean (-thalassemia) mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood* 81, 239-242.

34. Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson C.H., and Erlich H.A. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6230-6234.

35. Stuyver L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborght B., Heuverswyn H.V., and Maertens G. (1993). Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.*

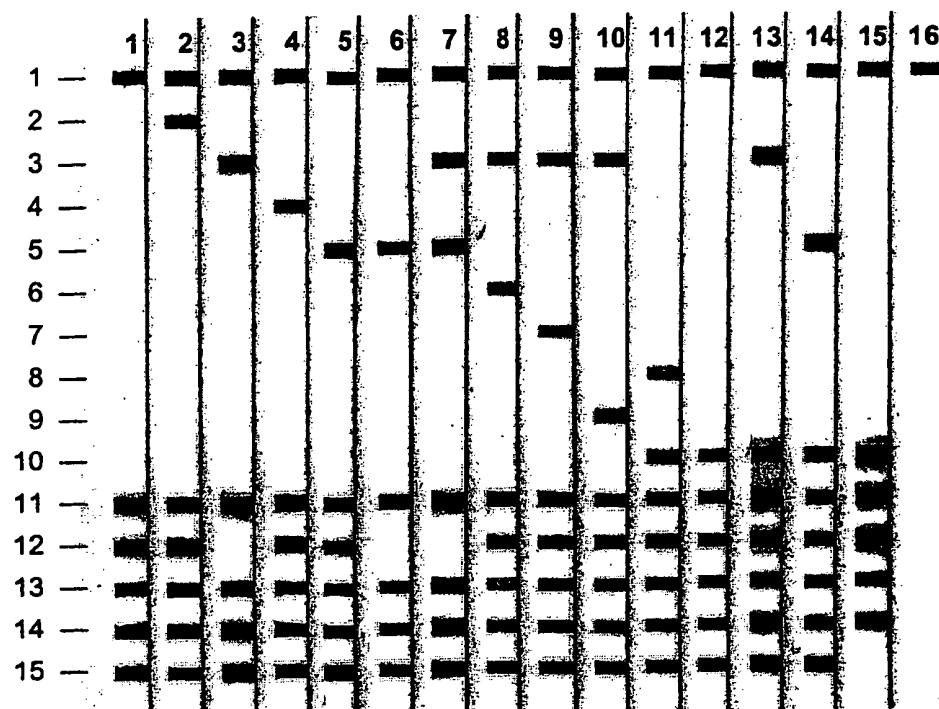
PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Diagnose von Hämochromatose, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine biologische Probe auf Vorliegen einer G → A Mutation am Nukleotid 506 und/oder einer G → T Mutation am Nukleotid 502 des HFE-Gens untersucht wird.
2. Verfahren zur Diagnose von Hämochromatose, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine biologische Probe auf Vorliegen einer G → C Mutation am Nukleotid 502 des HFE-Gens untersucht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die biologische Probe auch auf Vorliegen eine C282Y Mutation und/oder eine H63D Mutation untersucht wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die biologische Probe auch auf Vorliegen von Nukleinsäuren untersucht wird, deren HFE-Gen die genannten Mutationen nicht aufweist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Untersuchung in an sich bekannter Weise durch Sequenzierung der aus der biologischen Probe erhaltenen Nukleinsäure durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die biologische Probe mit mindestens einer Sonde, die fähig ist, mit dem HFE-Gen im Bereich des Nukleotids 506 bei Vorliegen der G → A Mutation und/oder im Bereich des Nukleotids 502 bei Vorliegen der G → T Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren, in Kontakt gebracht wird und dass überprüft wird, ob entsprechende Hybridisierungsprodukte vorliegen.
7. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die biologische Probe mit mindestens einer Sonde, die fähig ist, mit dem HFE-Gen im Bereich des Nukleotids 502 bei Vorliegen der G → C Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren, in Kontakt gebracht wird und dass überprüft wird, ob entsprechende Hybridisierungsprodukte vorliegen.
8. Verfahren nach Anspruch 3 und 6 und/oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die biologi-

sche Probe mit mindestens einer weiteren Sonde in Kontakt gebracht wird, die fähig ist, mit dem Bereich bzw. den Bereichen des HFE-Gens zu hybridisieren, der bzw. die die C282Y Mutation und/oder die H63D Mutation trägt, oder fähig ist, mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren, und dass überprüft wird, ob entsprechende Hybridisierungsprodukte vorliegen.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die biologische Probe mit mindestens einer weiteren Sonde in Kontakt gebracht wird, die fähig ist, mit einem der gleichen Bereiche zu hybridisieren, wenn keine Mutation vorliegt.
10. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die biologische Probe mittels Antikörper auf Vorliegen eines verkürzten HFE Proteins untersucht wird, wobei dieses verkürzte Protein durch Abbruch der Translation durch das Stopcodon entsprechend der G → A Mutation am Nukleotid 506 und/oder der G → T Mutation am Nukleotid 502 des HFE-Gens gebildet wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die biologische Probe weiters mittels Antikörper auf Vorliegen eines HFE Proteins herkömmlicher Länge untersucht wird.
12. Sonde zur Diagnose von Hämochromatose, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Sonde fähig ist, mit dem HFE-Gen im Bereich des Nukleotids 506 bei Vorliegen einer G → A Mutation und/oder im Bereich des Nukleotids 502 bei Vorliegen einer G → T Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren.
13. Sonde zur Diagnose von Hämochromatose, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Sonde fähig ist mit dem HFE-Gen im Bereich des Nukleotids 502 bei Vorliegen der G → C Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren.

HIEZU 1 BLATT ZEICHNUNGEN



FIGUR 1