

Gilbert-Meulengracht-, Arias- oder ein noch unbekanntes Syndrom - chronischer Ikterus bei einem Norwegischen Fjordpferd

Malte Harland¹, Stefanie Mömke², Steffen Fink², Albrecht Harland (†)³ und Ottmar Distl²

Tierärztliche Klinik für Pferde Mühlen, Mühlen¹, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, Hannover² und DRK Krankenhaus Mölln-Ratzeburg, Mölln³

Zusammenfassung

Ein 21-jähriges Fjordpferd wurde mit chronischem Ikterus zur weiteren Diagnostik überwiesen. Klinische und serumbiochemische Parameter waren abgesehen vom Ikterus und dem erhöhten unkonjugierten Bilirubinwert normal. Die Bilirubinkonzentration konnte durch die orale Gabe von Phenobarbital gesenkt werden. Ein beim Menschen vergleichbares Krankheitsbild mit chronischem Ikterus sind sowohl das Gilbert-Meulengracht- als auch das Arias-Syndrom, die durch einen identischen Enzymdefekt hervorgerufen werden. Das hier untersuchte Pferd zeigte entsprechend dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom eine unkonjugierte Hyperbilirubinämie und ansonsten normale Leberparameter. Für das Kandidatengen UGT1A1 wurden auf genomischer DNA des erkrankten Fjordpferdes und eines Vergleichspferdes sämtliche Exons mit Exon-Intron Übergängen und untranslatierten Bereichen sequenziert. Polymorphismen wurden identifiziert. Einer erscheint rasse-spezifisch. Die Kausalität des anderen für das Krankheitsbild konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen durch RNA-konservierende Gewebeproben für cDNA Analysen sind daher notwendig, um die genetischen Ursachen des chronischen Ikterus zu klären.

Schlüsselwörter: Ikterus, Gelbsucht, Gilbert-Meulengracht-Syndrom, Crigler-Najjar-Syndrom, Arias-Syndrom, Gen, Mutation

Gilbert's-, Arias'- or a still unknown syndrome - chronic icterus in a Norwegian Fjord Horse

A 21-year-old Norwegian Fjord Horse was presented due to chronic icterus. A complete clinical examination and serum biochemical evaluation was performed. Only icterus with unconjugated hyperbilirubinemia was present. The serum concentration of bilirubin could be decreased by oral induction therapy with phenobarbital. In human, a similar clinical picture is caused by Gilbert-Meulengracht- and Arias-syndroms, which both originate from the same enzyme deficiency. The presented horse showed an unconjugated hyperbilirubinemia and otherwise normal parameters of hepatic function, according to the Gilbert-Meulengracht-syndroms, where the enzyme deficiency is only partial. All exons, exon-intron boundaries and untranslated regions of the candidate gene UGT1A1 were sequenced on genomic DNA of the affected horse and an unaffected control horse. One of the identified polymorphisms seems to be specific to the breed. The causality of another identified polymorphism for the presented disease could not be proven for sure. Therefore, further cDNA analyses with RNA preserving tissue samples are necessary to completely understand the genetic cause of chronic jaundice in horses.

Keywords: jaundice, icterus, Gilbert's syndrome, Crigler-Najjar syndrome, Arias' syndrome, gene, mutation

Einleitung

Der Ikterus ist ein bei verschiedenen Erkrankungen auftretendes Symptom. Als chronisches Geschehen beim Pferd wurde der Ikterus von *Divers* (1983) und *Schusser et al.* (2007) beschrieben. Die zunächst offensichtlichen Verfärbungen der Schleimhäute werden durch eine erhöhte Konzentration von Bilirubin verursacht, einem Abbauprodukt des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin.

Die Lebenszeit der zirkulierenden Erythrozyten beträgt etwa 150 Tage (*Sellon* 2004). Danach werden sie in der Milz abgebaut. Aus dem Hämoglobin, welches beim Abbau anfällt, wird über Zwischenstufen Bilirubin, eine gelbliche Substanz, gebildet. Dieses ist als unkonjugiertes Bilirubin (indirektes Bilirubin) gut in Fett (lipophil), aber sehr schlecht in Wasser löslich. Zum Transport im Blut muss es deshalb an Albumin gebunden sein. Unkonjugiertes Bilirubin wird danach in der Leber durch das Enzym UDP-Glucuronosyltransferase an Glucuronsäure gekoppelt (konjugiert). In dieser wasserlöslichen Form wird es als „direktes Bilirubin“

bezeichnet, da es nicht mehr an Albumin gekoppelt und direkt ohne Lösungsvermittler in wässrigem Medium löslich ist. Es kann mit der Galle in den Darm ausgeschieden werden. Im Darm wird Bilirubin über Urobilinogen (Mesobilirubinogen und Stercobilinogen, lat. stercus = Stuhl) zu Urobilin und Stercobilin überführt. Etwa 10% des in den Darm abgegebenen Bilirubins werden im Ileum reabsorbiert und unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf (*Barton* 2005). Der Hauptanteil wird mit dem Kot ausgeschieden und nur ein geringer Teil wird als Urobilinogen über die Harnwege eliminiert. Bei Leberfunktionsstörungen werden diese Produkte vermehrt über den Urin ausgeschieden.

Der Normalwert des Gesamtbilirubins im Serum liegt beim Pferd unter 2,8 mg/dl (47,9 µmol/l, Bilirubin direkt < 0,6 mg/dl, Synlab. Vet, Augsburg). Bei einer Hyperbilirubinämie kommt es zum Ikterus, wobei sich ab einem doppelten Normalwert zuerst die Skleren und später die Haut gelb verfärben. Bei ausgeprägter Hyperbilirubinämie verfärben sich durch die massive Einlagerung ins Gewebe nahezu alle

Organe gelb. Der Ikterus kann sowohl hepatischen als auch prä- oder posthepatischen Ursprungs sein. Beim hepatischen Ikterus können folgende drei Stoffwechselabläufe gestört sein: 1) Die Bilirubinaufnahme in die Leberzelle, 2) die Bilirubin-konjugation, Auslöser sind hier häufig Gendefekte der beteiligten Enzyme, vor allem der UDP-Glucuronosyltransferase (Crigler-Najjar-Syndrom Typ II = Arias-Syndrom, Gilbert-Meulengracht-Syndrom), 3) der Transport von konjugiertem Bilirubin aus der Leberzelle.

Die humanen Syndrome Gilbert-Meulengracht sowie Crigler-Najjar Typ I und Typ II werden durch verschiedene Mutationen innerhalb der UDP-Glucuronosyltransferase Genfamilie (UGT1A) verursacht (Kadokol et al. 2000). Diese Enzyme sind Bestandteile des Glucuronidierungsstoffwechsels, durch den kleine lipophile Moleküle wie Bilirubin in wasserlösliche, ausscheidbare Metaboliten transformiert werden. UGT1A ist eine komplexe Genfamilie, die verschiedene UDP-Glucuronosyltransferasen kodiert. Die zugehörigen Gene bestehen aus jeweils fünf Exons, wobei 13 unterschiedliche erste Exons jeweils alternativ mit den gemeinsamen Exons 2-5 verbunden werden (UGT1A1 - UGT1A13) und somit unterschiedliche Enzyme produzieren. Von diesen 13 Varianten sind neun aktiv. Jedes der aktiven ersten Exons wird von einem eigenen Promotor reguliert. Mutationen, die jeweils zum Crigler-Najjar-Syndrom führen, wurden in allen Exons von UGT1A1 beschrieben. Als Auslöser für das Gilbert-Meulengracht-Syndrom sind bisher nur expressionsverändernde Promotormutationen bekannt. Beim Pferd wurde das UGT1A1 Gen noch nicht näher beschrieben. Ein zu diesem Gen syntäner Sequenzbereich wurde auf Pferdechromosom 6 annotiert (LOC100065342, EquCab2.0). Neben den Syndromen, die auf Mutationen des UGT1A1 Gens beruhen, gibt es zwei weitere, sehr seltene und rezessiv vererbte humane Erbkrankheiten, die eine konjugierte Hyperbilirubinämie auslösen können: das Rotor-Syndrom und das Dubin-Johnson-Syndrom. Letzteres wird durch Mutationen innerhalb des Canalicular multispecific organic anion transporter Gens (cMOAT) hervorgerufen (Wada et al. 1998). Das Rotor Syndrom konnte genetisch noch nicht aufgeklärt werden.

Fallbericht

Anamnese und Indikationsstellung

Der in der Klinik vorgestellte 21-jährige Fjordpferd-Wallach wurde vom Haustierarzt überwiesen. Vorberichtlich hatte der Wallach seit einigen Wochen auffallend gelbe Konjunktiven, eine wechselnde Kotfarbe und zeigte sich vom Allgemeinbefinden geringgradig matt. Die angefertigte Serumbiochemie ergab einen erhöhten Bilirubin-Gesamt-Wert (9,24 mg/dl),

bei ansonsten auch in der Hämatologie unveränderten Parametern. Der Patient wurde in der Klinik einige Tage beobachtet. Bei scheinbar ungestörtem Allgemeinbefinden blieben die Schleimhäute ikterisch.

Diagnostik

Bei rassespezifischer Fütterung mit viel Rau- und wenig Kraftfutter sowie Offenstallhaltung wurden 3 Tage nach stationärer Aufnahme die Werte für Bilirubin gesamt (7,50 mg/dl) und Bilirubin indirekt/direkt (6,56/0,94 mg/dl) erneut bestimmt. Zwei Tage später erfolgte eine Null-Probe mit anschließender oraler Gabe von 1,5 g Phenobarbital. In der Folge wurden über einen Zeitraum von 45 Stunden Blutproben entnommen und ausgewertet (Tabelle 1).

Vier Wochen nach der Entlassung wurde im heimischen Laufstall eine EDTA-Blutprobe entnommen und an das Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur weiteren Analytik geschickt. Gleichzeitig wurden die Bilirubinwerte bestimmt (Bilirubin gesamt 9,18 mg/dl, Bilirubin indirekt/direkt 8,01/1,17 mg/dl), die weitere Futteraufnahme durch einen Maulkorb unterbunden und 24 Stunden später eine erneute Probe entnommen (Bilirubin gesamt 8,83 mg/dl, Bilirubin indirekt/direkt 7,89/0,94 mg/dl). Weitere 9 Monate später ergab die Blutuntersuchung folgende Werte: Bilirubin gesamt 8,96 mg/dl und Bilirubin indirekt/direkt 8,08/0,88 mg/dl bei unverändert gutem Allgemeinbefinden.

Molekulargenetische Untersuchung

Material und Methoden

Der Pedigree des erkrankten Norwegischen Fjordpferdes lag bis in die siebte Generation vor. Für die genetischen Analysen wurde genomische DNA aus EDTA-Blutproben des erkrankten Pferdes sowie eines gesunden Kontrollpferdes derselben Rasse unter Verwendung des NucleoSpin Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) isoliert. Durch eine BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Analyse wurden die humanen Exons 1-5 von UGT1A1 innerhalb des auf Chromosom 6 lokalisierten LOC100065342 in der öffentlichen Genomsequenz des Pferdes (EquCab2.0) identifiziert (Abbildung 1). In den umliegenden Genomregionen wurden Primersequenzen mit Hilfe der Software PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) für die Sequenzierung aller Exons, der Exon-Intron-Übergänge und der untranslatierten Bereiche erstellt (Tabelle 2). Mit diesen wurden über Polymerasekettenreaktionen (PCRs) alle identifizierten, kodierenden Regionen für jeweils das erkrankte Tier und das Kontrolltier auf TProfessional Basic

Tab. 1 Bilirubinkonzentration (gesamt, indirekt und direkt) im Serum über einen Zeitraum von 45 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 1,5 g Phenobarbital. / *Bilirubin concentration (total, indirect and direct) in the serum over a period of 45 hours after a non-recurring oral application of 1.5 g phenobarbital.*

Probe	0	1	2	3	4	5	6	7
Uhrzeit	13:00	18:00	23:00	4:00	9:00	14:00	19:00	10:00
Bilirubin gesamt mg/dl	7,63	7,90	7,92	7,94	7,60	7,69	5,76	7,52
Bilirubin indirekt mg/dl	6,65	6,91	6,96	6,99	6,67	6,71	4,77	6,36
Bilirubin direkt mg/dl	0,98	0,99	0,96	0,95	0,93	0,98	0,99	1,16

Tab. 2 Primersequenzen für die Amplifizierung der kodierenden Bereiche von UGT1A1 auf genomischer DNA. *Primer sequences for amplification of the UGT1A1 coding regions based on genomic DNA.*

Region	Vorwärtsprimer (5'>3')	Rückwärtsprimer (5'>3')	AT	P
Promotor, Exon 1	GGCAAACCTCTGGCTAGT	GCCAAAGTATTCACAAGATAAGC	60	942
Exon 2	CAGCTTAATGTATGCAGTCACCA	TGAGACCTCCAAGGGAAGTG	60	408
Exon 3-4	ACCCCTGCCAAGATTAGGTT	TGAATGCAATGGCCAAAATA	60	757
Exon 5	GCGAGCATAGAGAGGGGATA	GATATTGGAAGAAGCAGAAAGCA	60	553

AT: Annealingtemperatur (°C) für die Amplifizierung, P: Produktgröße (Basenpaare, bp)

Thermocycler Geräten (Biometra, Göttingen, Germany) amplifiziert. Um die Basenabfolge bei beiden Tieren in den entsprechenden Genomregionen zu ermitteln, wurden vergleichende Sequenzierungen auf einem MegaBACE 1000 Kapillarsequenzierer (GE Healthcare, Freiburg, Germany) durchgeführt. Für die Analyse der Sequenzdaten kam die Sequencher 4.7 Software (GeneCodes, Ann Arbor, USA) zum Einsatz. Anschließend erfolgten Mutationsanalysen zwischen Fall- und Kontrolltier sowie zu der von einer Englischen Vollblutstute stammenden Referenzsequenz (EquCab2.0).

beiden Fjordpferden im Vergleich zur Referenzsequenz (Tabelle 3). Der offene Leserahmen (ORF) des UGT1A1 Gens wurde für das Pferd anhand der Genmodelle für den Menschen und andere Säugetiere sowie der Spleiß-Erkennungsstellen innerhalb der in dieser Studie sequenzierten genomischen Bereiche abgeleitet und auf eine Größe von 1.602 Basenpaaren bestimmt, bestehend aus dem kodierenden Bereich von Exon 1 (864 bp), Exon 2 (132 bp), Exon 3 (88 bp), Exon 4 (220 bp) und dem kodierenden Bereich von Exon 5 (298 bp).

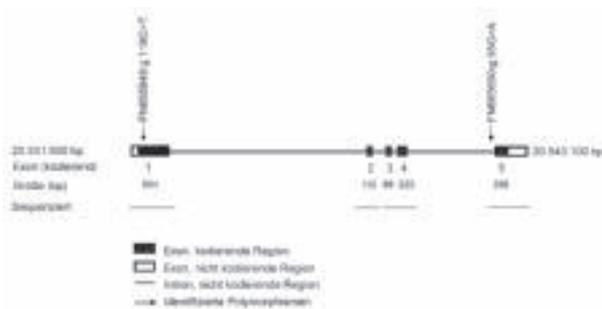


Abb. 1 Genmodell für das UGT1A1 Gen auf Pferdchromosom 6, Position von 20.531.900 bis 20.543.100 bp. *Gene model of the UGT1A1 gene located on equine chromosome 6, positioned between 20,531,900 and 20,543,100 bp.*

Ergebnisse

Der Pedigree des erkrankten Pferdes belegt eine mehrfache Inzucht auf eine gemeinsame Vaterlinie, die mütterlicherseits siebenmal und väterlicherseits zweimal vorkommt. Da der Einsatz dieses Vorfahren jedoch mehrere Generationen zurückliegt, beträgt der Inzuchtkoeffizient des erkrankten Pferdes nur 0,3%.

In der kodierenden Sequenz des erkrankten Pferdes konnte eine heterozygote Mutation identifiziert werden (Abbildung 2). Dieser Polymorphismus war innerhalb des ersten Exons von UGT1A1 lokalisiert und führt zu einem synonymen Austausch der in der Referenzsequenz vorliegenden Base Cytosin durch Thymin (C/C > C/T). Diese Mutation verändert somit die Aminosäuresequenz nicht (Basentriplett GCC > GCT). Beide Triplets kodieren die Aminosäure Alanin. Das Triplett GCT kam in den vorliegenden Analysen nur bei dem erkrankten Pferd vor, nicht bei dem Kontrollpferd oder in der Referenzsequenz (Tabelle 3).

Ein zweiter Polymorphismus wurde in der nicht kodierenden Sequenz des vierten Introns von UGT1A1 identifiziert (Abbildung 2). Bei dieser Mutation erfolgt ein homozygoter Basenaustausch von Guanodin nach Adenin (G/G > A/A) bei

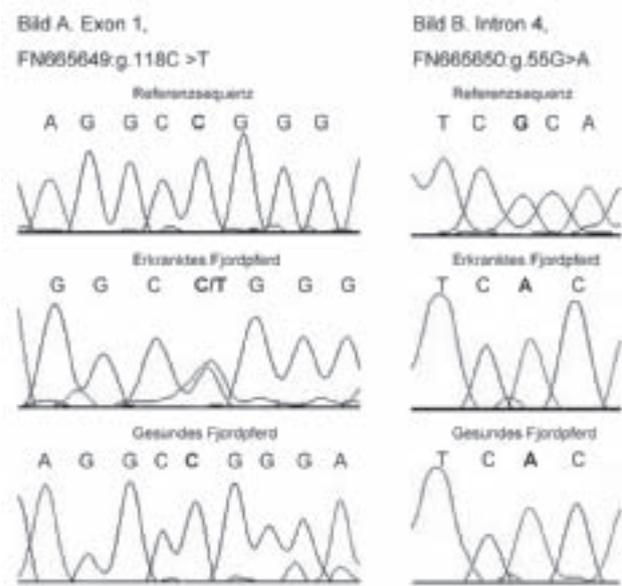


Abb. 2 Sequenzchromatogramme der Polymorphismen für die Referenzsequenz, das erkrankte Pferd und das Kontrollpferd gleicher Rasse (Norwegisches Fjordpferd). Die Referenzsequenz ist die öffentlich verfügbare Sequenz der Englischen Vollblutstute „Twilight“ (EquCab2.0). Bild A zeigt den Sequenzbereich des nur beim erkrankten Pferd vorhandenen Basenaustauschs in Exon 1. Bild B zeigt den Bereich des Polymorphismus in Intron 4. Introns eines Gens tragen nicht zur Proteinsynthese bei und werden daher als nicht-kodierend bezeichnet. Da dieser intronische Polymorphismus außerdem sowohl beim erkrankten Pferd als auch beim gesunden Kontrollpferd vorkommt, ist von einer rassetypischen Mutation auszugehen, die in keinem Zusammenhang mit der Krankheit steht. *Sequence chromatograms of the polymorphisms for the reference sequence, the affected horse and the unaffected control horse of the same breed (Norwegian Fjord Horse). The reference sequence presents the openly available genetic sequence of the Thoroughbred mare “Twilight” (Equ-Cab2.0). Image A shows a sequence section including the base exchange within exon 1 of UGT1A1. This polymorphism was only found in the affected horse. Image B shows a sequence section including the base exchange within intron 4. Introns of genes do not contribute to the protein sequence and therefore are regarded as non-coding. In addition, this polymorphism was present in the affected and the unaffected Norwegian Fjord Horse as well, indicating a breed specific mutation rather than a disease specific one.*

Tab. 3 Identifizierte Mutationen im UGT1A1 Gen. Die Region innerhalb des UGT1A1 Gens, die offizielle Polymorphismennomenklatur, die Auswirkungen auf Proteinebene und die Genotypen der Polymorphismen für das erkrankte Pferd, das gesunde Kontrollpferd gleicher Rasse und die öffentliche Referenzsequenz sind dargestellt. Da intronische Sequenzen im Körper nicht zur Proteinsynthese genutzt werden, sondern allenfalls regulatorische Elemente enthalten verändert der Polymorphismus in Intron 4 von UGT1A1 das zugehörige Protein nicht. Da außerdem sowohl der gesunde als auch der erkrankte Norweger dasselbe Allel zeigen und damit von der Referenzsequenz (Englisches Vollblut) abweichen, ist davon auszugehen, dass es sich lediglich um einen rassetypischen Polymorphismus handelt, der keine Relevanz für das Auftreten der Erkrankung hat. *Mutations identified within the UGT1A1 gene. The regions within UGT1A1, the official polymorphism nomenclature, and the impact on the amino acid sequence are given, as well as the polymorphism genotypes for the affected horse, the unaffected control horse of the same breed and the reference sequence. Intrinsic sequences are not used for protein synthesis, but may contain regulatory elements. The polymorphism within intron 4 of UGT1A1 therefore does not change the protein structure. Furthermore, the affected as well as the unaffected Norwegian Fjord Horse show the same alleles at this position, but differ from the reference sequence (Thoroughbred). Therefore it can be assumed that this polymorphism is a breed specific one without any relevance for the examined disease.*

Region	Polymorphismus	Protein	Erkranktes Pferd (N)	Kontrollpferd (N)	Referenzsequenz (EV)
Exon 1	FN665649:g.118C>T	Ala -> Ala	C/T	C/C	C/C
Intron 4	FN665650:g.55G>A	-	A/A	A/A	G/G

N: Norweger, EV: Englisches Vollblut

Diskussion

Innerhalb des Kandidatengens UGT1A1 wurden zwei Polymorphismen identifiziert, wovon ein intronischer Polymorphismus rassespezifisch zu sein scheint, da er sowohl bei dem erkrankten Pferd als auch bei dem gesunden Kontrolltier gleicher Rasse homozygot vorkommt. Es ist somit davon auszugehen, dass dieser Basenaustausch keinen Einfluss auf die Erkrankung hat. Der zweite Polymorphismus ist in der kodierenden Sequenz des ersten Exons von UGT1A1 lokalisiert und nur beim erkrankten Pferd vorhanden. Obwohl dieser Basenaustausch synonym ist und beide Basen den Einbau der Aminosäure Alanin in das von UGT1A1 kodierte Protein bewirken, könnte er dennoch einen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen haben. Dies wäre der Fall, wenn durch den Basenaustausch „Codon usage biases“, also eine translationelle Instabilität hervorgerufen würde. Des Weiteren wären Defekte beim Spleißvorgang oder bei der Transkriptionskontrolle möglich (Chao et al. 2001, Kimchi-Sarfaty et al. 2007, Montera et al. 2001).

Neuere Forschungsergebnisse belegen sogar, dass synonyme Mutationen durchaus Effekte auf Proteinstruktur und Proteinaktivität haben können (Komar 2007). Um dies für die vorliegende Erkrankung nachzuweisen, würde jedoch ein umfangreicheres Probenmaterial aus verschiedenen Pferdefamilien mit Merkmalsträgern benötigt. Da das Pferd zum Zeitpunkt der Erkrankung bereits 21 Jahre alt war, ist jedoch davon auszugehen, dass der größte Teil der Vorfahren bereits verstorben ist. Weitere erkrankte Tiere in der Familie sind nicht bekannt. Allerdings handelt es sich auch bei dem in der Veröffentlichung von Schusser et al. (2007) erwähnten Pferd mit chronischem Ikterus um ein Norwegisches Fjordpferd, das ebenfalls eine Inzucht auf dieselbe Vaterlinie aufweist (väterlicherseits zweifach, mütterlicherseits mindestens zweifach). Der Einsatz des gemeinsamen Vorfahren liegt weit zurück und es besteht keine direkte Verwandtschaft zwischen beiden Tieren. Da in den Pedigrees beider Pferde jedoch derselbe Vorfahre sowohl auf mütterlicher als auch auf väterlicher Seite mehrfach vorkommt, ist eine rezessive Vererbung der vorliegenden Krankheit möglich. Ebenfalls könnte es sich jedoch um eine dominante Neu- oder Keimbahnmutation in der DNA des erkrankten Pferdes handeln. Diese würde im Gegensatz zur rezessiven Mutation auch im heterozygoten Zustand zur Erkrankung führen. Im Falle einer Kausalität des bei dem erkrankten Pferd in Exon 1 von UGT1A1 gefundenen Basenaustauschs wäre somit

nur eine dominante Vererbung und damit eine Neumutation möglich. Die genetische Analyse konnte lediglich auf genomischer DNA durchgeführt werden, da keine RNA-konservierenden Gewebeproben für cDNA Analysen zur Verfügung standen. Es ist somit nicht auszuschließen, dass weitere Mutationen innerhalb der nicht kodierenden Sequenz vorliegen, die regulatorische Elemente betreffen und zu einem Verlust eines oder mehrerer Exons, zu Expressionsunterschieden oder fehlerhafter Prozessierung führen.

Obwohl das UGT1A1 Gen sowohl beim Gilbert-Meulengracht-Syndrom als auch bei den Crigler-Najjar-Syndromen Typ I und Typ II des Menschen betroffen ist, gibt es Unterschiede in der Vererbung dieser Erkrankungen. Das Gilbert-Meulengracht-Syndrom wird generell als eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung angesehen (Chowdhury et al. 2001). Aber auch Fälle von heterozygoten und zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern und dominante Erbgänge wurden beschrieben (Fouk et al. 1959, Powell et al. 1967, Sleisenger et al. 1967). Mutationen, die als Auslöser für das Gilbert-Meulengracht-Syndrom beschrieben wurden, betreffen in der Regel die sogenannte „TATA Box“ (Bosma et al. 1995), eine regulative Sequenz innerhalb des Promotors von UGT1A1 und verändern somit die Expressionshöhe der mRNA. Beim Pferd konnten in dieser Studie keinerlei Polymorphismen innerhalb der berechneten Promotorregion gefunden werden, und die Struktur der „TATA Box“ als solche kommt bei Pferden im UGT1A1-Promotor nicht vor. Allerdings können auch Mutationen außerhalb des Promotors eines Gens Auswirkungen auf die Expressionshöhe haben. Für das Crigler-Najjar-Syndrom des Menschen sind vor allem rezessive Vererbungsmuster bekannt (Chowdhury et al. 2001), aber auch dominante Erbgänge (Powell et al. 1967) und rezessive Erbgänge mit Pseudodominanz (Guldutuna et al. 1995). Mutationen, die beide Typen dieses Syndroms auslösen können, wurden in allen Exons von UGT1A1 beschrieben. Das Dubin-Johnson-Syndrom wird durch Deletionen und Missense Mutationen innerhalb des cMOAT Gens hervorgerufen (Wada et al. 1998). Für das Rotor-Syndrom ist bisher keine ursächliche Mutation bekannt. Allerdings können sowohl das Dubin-Johnson- als auch das Rotor-Syndrom ausgeschlossen werden, da das direkte Bilirubin beim Patienten nicht erhöht war. Gegen das Vorkommen des Crigler-Najjar-Syndrom Typ I spricht das Ansprechen auf den Phenobarbitaltest sowie das nicht mehr juvenile Alter des Tieres. Letzteres spricht auch gegen den Typ II, bei welchem die Induktions-

therapie mit Phenobarbital zu einer weniger starken Reduktion der Bilirubinkonzentration führt als beim Gilbert-Meulengracht-Syndrom. Da die Diagnose des Gilbert-Meulengracht-Syndroms in der Humanmedizin meistens als Ausschlussverfahren gestellt wird, kommen hier die Dünnschichtchromatographie (TLC), die intravenöse Injektion von Nikotinsäure sowie das Fasten, welches zu einer zwei- bis dreifachen Zunahme des unkonjugierten Bilirubins im Blut innerhalb von 48 Stunden führt, eben so selten zum Einsatz wie der neuerdings beschriebene Rifampicin Test (Hallal et al. 2006). Beim diskutierte Patienten führte das Fasten nach 24 Stunden zu nahezu keiner Zunahme des unkonjugierten Bilirubins im Blut. Möglicherweise ist der Zeitraum des Fastens und der Probenentnahme bei dem Patienten zu kurz gewählt, um einen Anstieg des unkonjugierten Bilirubins zu beobachten. Trotz des positiven Phenobarbital Induktionstests mit einer signifikanten Reduktion des indirekten Bilirubin nach 30 Stunden (Tab. 1, Probe 6) und der durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen, welche zur Identifizierung zweier Polymorphismen innerhalb des Kandidatengens UGT1A führten, kann das Vorkommen des Gilbert-Meulengracht-Syndroms als hereditäre Krankheit weder eindeutig bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Drei Jahre nach der letzten Kontrolluntersuchung verstarb der Patient, ohne dass eine Entnahme der Leber möglich war. Weiterführende genetische Untersuchungen sind durch RNA-konservierende Gewebebiopsien, möglichst aus der Leber, und durch zusätzliches Probenmaterial weiterer erkrankter Pferde und deren Familien mit Merkmalsträgern notwendig.

Literatur

- Barton M. H. (2005) Disorders of the liver. In: Reed S. M., Bayly W. M. und Sellon D. C. (eds). *Equine Internal Medicine*. 2 edn. St. Louis. Saunders, pp 951-994
- Bosma P. J., Chowdhury J. R., Bakker C., Gantla S., de Boer A., Oostra B. A., Lindhout D., Tytgat G. N. J., Jansen P. L. M., Oude Elferink R. P. J. und Chowdhury N. R. (1995) The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *New Eng. J. Med.* 333, 1171-1175
- Chao H. K., Hsiao K. J. und Su T. S. (2001) A silent mutation induces exon skipping in the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria. *Hum. Genet.* 108, 14-19
- Chowdhury J. R., Wolkoff A. W., Chowdhury N. R. und Arias I. M. (2001) Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S. und Valle D. (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York. McGraw-Hill, pp 3063-3101

- Divers T. J. (1983) Liver disease and liver failure in horses. *Proceedings of the twenty-ninth annual convention of the American Association of Equine Practitioners*. Las Vegas, 213
- Foullk W. T., Butt H. R., Owen C. A., Whitcomb F. F. und Mason H. L. (1959) Constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease): its natural history and related syndromes. *Medicine* 38, 25-46
- Gulduutuna S., Langenbeck U., Bock K. W., Sieg A. und Leuschner U. (1995) Crigler-Najjar syndrome type II: new observation of possible autosomal recessive inheritance. *Digest. Dis. Sci.* 40, 28-32
- Hallal H., Egea J. M., Mas P., Garcia M. D., Perez-Cuadrado E. und Carballo F. (2006) A shortened, 2-hour rifampin test: a useful tool in Gilbert's syndrome. *Gastroenterol. Hepatol.* 29, 63-65
- Kadokol A., Ghosh S. S., Sappal B. S., Sharma G., Chowdhury J. R. und Chowdhury N. R. (2000) Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum. Mutat.* 16, 297-306
- Kimchi-Sarfaty C., Oh J. M., Kim I. W., Sauna Z. E., Calcagno A. M., Ambudkar S. V. und Gottesman M. M. (2007) A „silent“ polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 315, 525-528
- Komar A. A. (2007) SNPs, silent but not invisible. *Science* 315, 466-467
- Montera M., Puiaggio F., Marchese C., Gismondi V., Stella A., Resta N., Varesco L., Guanti G. und Mareni C. (2001) A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J. Med. Genet.* 38, 863-867
- Powell L. W., Hemingway E., Billing B. H. und Sherlock S. (1967): Idiopathic unconjugated hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome): a study of 42 families. *New Eng. J. Med.* 277, 1108-1112
- Schusser G. F., May M., Meister A., Ohnmar Kyaw W., Lobeck T. und Uhlig A. (2007) Kontinuierlich unkonjugierte Hyperbilirubinämie beim Pferd - Ähnlichkeit mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom. *Tierärztl. Prax.* 35 (G), 75-80
- Sellon D. C. (2004) Disorders of the hematopoietic system. In: Reed S. M., Bayly W. M. und Sellon D. C. (eds). *Equine Internal Medicine*. 2 Edn. St. Louis. Saunders, pp 721-768
- Sleisenger M. H., Kahn I., Barniville H., Rubin W., Ben-Ezzer J. und Arias I. M. (1967) Nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with hepatic glucuronyl transferase deficiency: a genetic study in four generations. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 80, 259-266
- Wada M., Toh S., Taniguchi K., Nakamura T., Uchiyama T., Kohno K., Yoshida I., Kimura A., Sakisaka S., Adachi Y. und Kuwano M. (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 7, 203-207

Dr. Malte Harland
Tierärztliche Klinik für Pferde Mühlen
Münsterlandstraße 42
49439 Mühlen
harland@pferdeklunik-muehlen.de