

**Diplomarbeit**

**Sind Melanozyten an der Regulierung der uvealen  
Angiogenese beteiligt?**

eingereicht von

**Olivia Carmen Schatz**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Augenheilkunde in Graz**

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr. med. univ. Anton Haas**

und

**Priv.-Doz. Dr. med. univ. Dr. scient. med. Christoph Schwab**

Graz, 31.07.2018

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 31.07.2018*

*Olivia Schatz, eh.*

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung meiner Diplomarbeit unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. univ. Dr. scient. med. Christoph Schwab, der mich während der Erstellung meiner Diplomarbeit mit viel Interesse und Geduld unterstützte und mich bestmöglich fachlich betreute.

Auch möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. univ. Anton Haas für seine fachliche Unterstützung, die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Tierärztin Dr. Petra Grinninger bedanken, die uns half, den Hund „Sammy“ zu untersuchen.

Ein besonderer Dank gilt allen Teilnehmerinnen und Teilnehmern meiner Studie, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich auch meinen Freunden, die mich in anstrengenden Lernphasen immer wieder motiviert und unterstützt haben.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung während meines Studiums, sowie für deren Suche nach Formulierungen und das Aufspüren von Rechtschreibfehlern in dieser Arbeit. Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich hier an meinen bald 87-jährigen und geistig topfiten Opa für seine Formulierungstipps und Fehlersuche richten.

# Zusammenfassung

## Einleitung

Die Aufgabe der Melanozyten in der Epidermis als Sonnenschutz ist bereits gut erforscht, über die Aufgaben der Melanozyten in der Aderhaut ist hingegen nur wenig bekannt. Durch eine umfangreiche Literaturrecherche, acht Nävus Ota Patientinnen und Patienten und einer Untersuchung eines homozygoten Australian Shepherd Merle Hundes soll die Rolle von Melanozyten in der Aderhaut beleuchtet werden.

## Methoden

Neben einer umfangreichen Literaturrecherche wurde an der Universitätsklinik für Augenheilkunde in Graz eine prospektive Studie mit acht Nävus Ota Patientinnen und Patienten durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein leuzistischer Australian Shepherd Hund untersucht.

Bei Nävus Ota Patientinnen und Patienten wurde eine Untersuchung mit der Spaltlampe und eine Untersuchung von Netzhaut und Aderhaut mittels optischer Kohärenz Tomographie (OCT) durchgeführt. Dabei wurde die Aderhautdicke des betroffenen und des nicht betroffenen Auges vermessen und miteinander verglichen. Beim Australian Shepherd Hund wurde ebenfalls eine Aderhautdickenmessung durchgeführt und eine Hautstanze entnommen.

## Ergebnisse

Es konnten signifikante Unterschiede in der Aderhautdicke in Abhängigkeit der Pigmentierung nachgewiesen werden. Die vom Nävus Ota betroffene Aderhaut war signifikant dicker als die nicht betroffene Aderhaut.

Beim homozygoten Merle Hund „Sammy“ war die Aderhaut in leuzistischen Anteilen der Aderhaut deutlich dünner als im pigmentierten Bereich.

## Diskussion

Die Ergebnisse der Literaturrecherche, die Untersuchung von Nävus Ota Patientinnen und Patienten und des Hundes deuten darauf hin, dass Melanozyten wichtig für die Angiogenese der Aderhaut sind.

Diese Hypothese wird durch Ergebnisse von verschiedenen Studien gestützt:

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Melanozyten Fibromodulin sezernieren - ein proangiogenetischer Wachstumsfaktor (1).

Eine andere Studie, bei welcher histologische Veränderungen von leuzistischen Hundeaugen untersucht wurden, zeigte, dass bei leuzistischen Augen nur vereinzelte Aderhautgefäße vorkommen und die Aderhaut stark verdünnt ist (2).

Auch die Stria vascularis des Innenohrs – eine stark gefäßführende Schicht im Innenohr mit einem ähnlich hohen Melanozytenanteil wie die Choroidea – ist bei leuzistischen Tieren verdünnt: Betroffene Tiere sind häufig taub. (3)

Bei Nävus Ota Patientinnen und Patienten liegt eine Vermehrung von Melanozyten im Versorgungsgebiet des ersten oder zweiten Trigeminasastes vor - die Aderhaut ist am betroffenen Ota Auge signifikant dicker.

Aber auch unsere Untersuchungen des partiell leuzistischen Merle Hundes stehen im Einklang mit unserer Theorie. Die Iris und Aderhaut des Hundes sind sektoriell pigmentiert. Im durchgeführten OCT erscheint die Aderhaut im pigmentierten Anteil dicker als im unpigmentierten Teil.

Wir hypothesieren, dass Melanozyten während der Embryogenese eine wichtige Rolle bei der Vascularisierung der Aderhaut haben. In dieser Thematik erscheint uns viel Forschungspotential, aus dem sich neue Erkenntnisse über die Funktion von Melanozyten ergeben könnten. Dies könnte auch zu neuen Behandlungsmöglichkeiten führen.

# Abstract

Melanocytes are pigment producing cells found in the skin, uvea, inner ear, and the choroid. They derive from pluripotent cells of the neural crest during embryogenesis. Melanoblasts are precursor cells and migrate from the neural crest along the neuronal pathway. If they found their final destination, they differentiate progressively and start producing their pigment melanin.(4)

Currently the main issue of these cells is to produce the pigment melanin as a protection against the effects of sun light. Melanin producing cells are also the reason for our skincolour. This explains the occurrence of melanocytes in the basal layer of the skin. However, melanocytes are also found in the inner ear, the uvea and the choroid. But the role of melanocytes in these areas remains unknown.

The aim for this study is to investigate further functions of these cells. We therefore conducted a literature review. Further – to underline our results we also investigated individuals with melanocytic diseases.

The first syndrome is called Nevus of Ota. Patients with congenital Nevus of Ota have an increased pigmentation around the uveal tract and episklera. Abnormally pigmentation can also occur in the palate, orbit and meninges. We investigated the choroidal thickness (OCT) regarding choroidal pigmentation. The affected part of the choroid was thicker compared with the choroid of the normal eye.

We also investigated a double merle dog called “Sammy”. He’s a leuzistic pale dog und homozygotus for merle factor. In a short anaesthesia a fundus examination (OCT) and photos from the iris and fundus were performed. The iris and choroid were sectorial pigmented, and the pigmented choroidal part was thicker than the unpigmented one. Also a biopsy of a pigmented and unpigmented skin areal were taken. No melanocytes could be found in the unpigmented skin biopsy.

Since the role of melanocytes in the choroid remains unknown, the purpose of the study is to enlighten potential further function of these cells. Based on the investigation of Nevus of Ota patients, the leuzistic dog and a study of literature we set up a hypothetical influence of melanocytes on the choroid.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	ii
Zusammenfassung .....	iii
Abstract .....	v
Inhaltsverzeichnis .....	vi
Abkürzungsverzeichnis .....	viii
Abbildungsverzeichnis .....	ix
Tabellenverzeichnis .....	x
1 Einleitung .....	1
1.1 Anatomie des Auges .....	1
1.2 Embryologie / Augenentwicklung .....	2
1.3 Durchgeführte Untersuchungen .....	3
1.3.1 Spaltlampe .....	3
1.3.2 Optische Kohärenztomographie .....	3
1.3.3 Hautbiopsie .....	4
1.4 Melanozyten .....	4
1.5 Nävus Ota .....	6
1.5.1 Klinik .....	6
1.5.2 Ätiologie .....	8
1.5.3 Epidemiologie .....	10
1.5.4 Prognose und Verlauf .....	11
1.6 Waardenburg Syndrom .....	11
1.6.1 Klinik .....	11
1.6.2 Ätiologie .....	13
1.6.3 Epidemiologie .....	13
1.6.4 Behandlung .....	13

1.7	Merle Faktor .....	14
1.7.1	Homozygoter Australian Shepherd Hund „Sammy“ .....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Literaturrecherche .....	17
2.2	Experimenteller Teil - Klinische Studie .....	17
2.2.1	Nävus Ota.....	17
2.2.2	Merle Hund .....	19
3	Ergebnisse .....	20
3.1	Literatursuche .....	20
3.2	Klinische Studie.....	20
3.2.1	Nävus Ota.....	20
3.2.2	Merle Hund .....	21
4	Diskussion.....	25
5	Anhang.....	33
6	Quellen Abbildungen .....	34
7	Literaturverzeichnis .....	36

# Abkürzungsverzeichnis

ANG1	Angiopoetin 1
ANG2	Angiopoetin 2
BAP1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
b-RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
CAM Modell	Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model
FMOD	Fibromodulin
GNA11 Gen	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha
GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha
gp100	Premelanosome protein 100
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
MEDOCS	Kommunikationsprogramm des LKH Graz
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
OCT	Optische Kohärenztomographie
OLWS	Overo lethal white Syndrom
OTA AH perip	Nävus Ota Aderhaut peripapillär
OTA AH subfov	Nävus Ota Aderhaut subfoveal
PAX2	Paired box gene 2
PAX6	Paired box protein 6
PMEL17	Premelanosome protein 17
SHH	Gen Sonic hedgehog
SILV	Gen Silber locus Gen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TIE2	Angiopoetin-2 receptor
V1	Nervus ophthalmicus
V2	Nervus maxillaris
V3	Nervus mandibularis
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor 2
VGL AH perip	Vergleichs Auge Aderhaut peripapillär
VGL AH subfov	Vergleichs Auge Aderhaut subfoveal

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Auges .....	1
Abbildung 2: Melanozyten Migration .....	5
Abbildung 3: Nävus Ota rechtes Auge .....	6
Abbildung 4: Irishyperchromie, Okuläre Melanose .....	7
Abbildung 5: Irishyperchromie, Okuläre Melanose .....	7
Abbildung 6: Okuläre Melanose im Bereich der Sklera .....	7
Abbildung 7: Okuläre Melanose im Bereich der Konjunktiva .....	7
Abbildung 8: Okuläre Melanose im Bereich der Iris und der Sklera .....	7
Abbildung 9: Augenhintergrund des Nävus Ota Auge .....	8
Abbildung 10: Augenhintergrund normal pigmentiertes Auge .....	8
Abbildung 11: Melanozytenwanderung entlang des Nervus trigeminus .....	9
Abbildung 12: Mutationsweg des Aderhautmelanoms.....	10
Abbildung 13: Irisheterochromie bei Waardenburg Syndrom .....	13
Abbildung 14: Australian Shepherd Wildtyp schwarz .....	15
Abbildung 15: Australian Shepherd Wildtyp braun .....	15
Abbildung 16: Heterozygoter schwarzer Merle-Faktor Australian Shepherd .....	15
Abbildung 17: Heterozygoter roter Merle-Faktor Australian Shepherd .....	15
Abbildung 18: Homozygoter Australian Shepherd Hund Sammy .....	16
Abbildung 19: Nävus Ota .....	20
Abbildung 20: Ergebnisse Untersuchung Merle Hund.....	21
Abbildung 21: Biopsie leuzistische Haut.....	23
Abbildung 22: Biopsie leuzistische Haut; unpigmentierte Haarwurzel.....	23
Abbildung 23: Biopsie pigmentierte Haut .....	24
Abbildung 24: Biopsie pigmentierte Haut; pigmentierte Haarwurzel.....	24
Abbildung 25: heterozygote Splashed White Scheckung (34).....	28
Abbildung 26: homozygote Splashed White Scheckung (35).....	29
Abbildung 27: Frame Overo Scheckung (37) .....	29
Abbildung 28: CAM Tag 0 .....	32
Abbildung 29: CAM Tag 2 .....	32
Abbildung 30: CAM Tag 3 .....	32

Abbildung 31: CAM Tag 6 .....	32
Abbildung 32: Genehmigung Untersuchung Merle Hund .....	33

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Ergebnisse Aderhautdicke Nävus Ota .....	21
---	----

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie des Auges

Das Auge ist das Sinnesorgan des Menschen, welches Lichtreize mit einer Wellenlänge von 400 nm bis 750 nm wahrnehmen kann. Man kann das Auge grob in einen vorderen und hinteren Augenabschnitt sowie die Augenhaut einteilen. Der vordere Abschnitt enthält die lichtbrechenden dioptrischen Einrichtungen, während der hintere Abschnitt die sensorischen und verarbeitenden Abschnitte (Retina) enthält. Die Wand des Bulbus oculi kann in 3 Schichten unterteilt werden: Innere Augenhaut (Retina), mittlere Augenhaut (Tunica vasculosa, Aderhaut) und äußere Augenhaut (Sklera und Kornea) (Abbildung 1). (5-7)

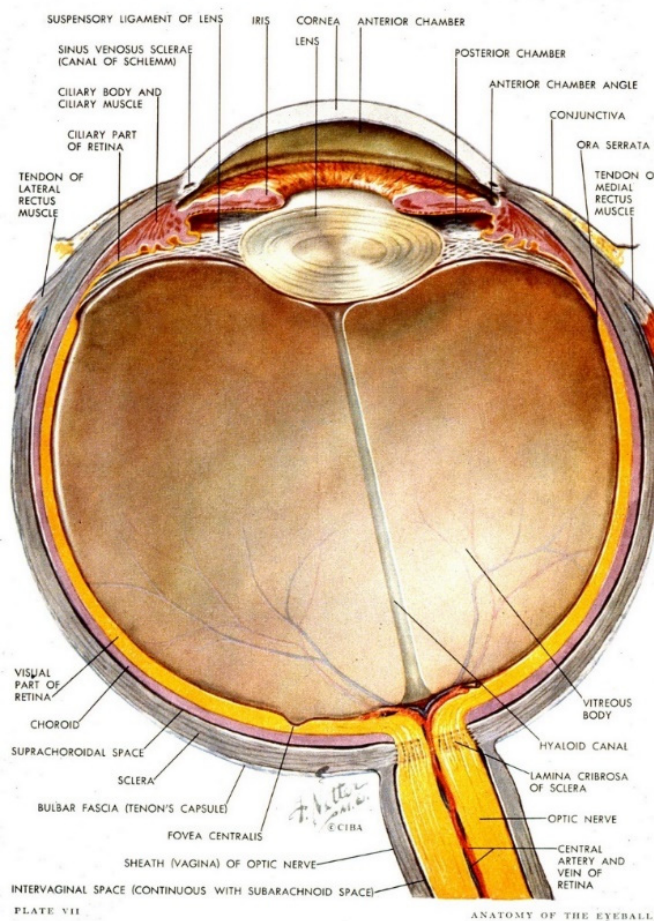


Abbildung 1: Anatomie des Auges

## 1.2 Embryologie / Augenentwicklung

Die Augenbläschen entwickeln sich in der 4. Schwangerschaftswoche. Sie entstehen aus Ausstülpungen der Gehirnbälchen (Prosencephalon) und induzieren im Oberflächenektoderm die Linsenplakode. Anschließend stülpen sich die Augenbläschen zum Augenbecher um, die Linsenplakode zum Linsenbläschen ein. Das Pigmentepithel bildet sich aus der äußeren Schicht des Augenbechers, aus der inneren Schicht entsteht die Retina.

Nach der Augenbechereinstülpung setzt sich diese nach medial unten als Augenbecherspalte in den Augenbecherstiel fort. Die Arteria hyaloidea tritt durch die Augenbecherspalte ein. Diese Arterie versorgt in der Embryonalzeit den Glaskörper und die Linse. Später wird sie zur Arteria centralis retinae und versorgt nur noch die Retina.

Stäbchen und Zapfen (Sinneszellen) sind der äußeren Schicht, dem Pigmentepithel zugewandt. Die Nervenfasern liegen auf der Innenseite der Retina. Diese korrespondieren und ziehen durch den Augenbecherstiel zum Gehirn. Aus dem Augenbecherstiel entsteht der Nervus opticus. Die Hornhaut entsteht aus drei Schichten: der Ektoderm Schicht, dem mesenchymalen Stroma und dem Mesothel. In der 7. Schwangerschaftswoche entwickeln sich die Augenlider aus zwei Hautfalten. Während der 10. Schwangerschaftswoche verkleben die Augenlider und öffnen sich erst um den 7. Schwangerschaftsmonat wieder.

Für die Augenentwicklung ist das PAX6 Gen hauptverantwortlich. Das Gen wird im unpaaren Augenfeld im Stadium der Neuralplatte exprimiert.

Das Gen Sonic hedgehog (SHH) unterteilt das Auge in zwei Augenanlagen. Im Augenbecherstiel wird das PAX2 Gen durch das SHH Gen hochreguliert, während das PAX6 dort runterreguliert wird. Die PAX6 Genexpression beschränkt sich daher nur auf Augenbecher und Linse. Später entwickeln sich Linse und Augenbecher durch die Epithel-Mesenchym-Interaktion zwischen Linsenplakode, Augenbläschen und umgebendes Mesenchym weiter. (8)

## **1.3 Durchgeführte Untersuchungen**

### **1.3.1 Spaltlampe**

Die Spaltlampe gehört zu den wichtigsten routinemäßigen Untersuchungsgeräten in der Augenheilkunde. Durch einen scharf begrenzten verstellbaren spaltförmigen Lichtstrahl kann das Auge untersucht werden. Mit einem Auflichtmikroskop, das Vergrößerungen um das 6- bis 30-fache erlaubt, kann das Auge genauestens betrachtet werden. Die verschiedenen Abschnitte des Auges können gezielt durch unterschiedliche Belichtungsmodifikationen (indirekt, seitlich, fokal) dargestellt werden. So können unter anderem Trübungen und Veränderungen ohne invasive Untersuchungen genauestens entdeckt werden. Um den Augenhintergrund darstellen zu können, müssen zusätzliche Hilfsmittel verwendet werden. (Lupe, Kontaktglas). Der Augendruck wird mit einem Tonometer gemessen, das sich an der Spaltlampe befindet. (5-7)

### **1.3.2 Optische Kohärenztomographie**

Bei der optischen Kohärenztomographie (OCT) können verschiedene Abschnitte des Auges untersucht werden. Dabei wird ein Laserstrahl verwendet, der die verschiedenen Regionen (Netzhaut, Hornhaut) abtastet. Oberflächliche Membranen wie z.B. Makuladegenerationen, intraretinale Veränderungen (Ödem, Zysten), diabetische Netzhauterkrankungen sowie auch die verschiedenen Abschnitte selbst können dargestellt und vermessen werden (Netzhaut, Aderhaut, Kornea, Fovea). Aber auch Abhebungen der Netzhaut, des Pigmentepithels oder der Untergang von Sehnervenzellen können erkannt werden.

Die optische Kohärenztomographie ist mittlerweile zur wichtigsten, nicht invasiven Untersuchungsmethode geworden. (5-7)

### **1.3.3 Hautbiopsie**

Bei einer Hautbiopsie wird Gewebe (Biopsie) aus der Haut unter lokaler oder allgemeiner Anästhesie entnommen. Diese Hautentnahme kann mit einem Skalpell oder einer Stanze durchgeführt werden. Anschließend kann eine genaue dermatopathologische Beurteilung durchgeführt werden.

## **1.4 Melanozyten**

Melanozyten haben ihren Ursprung in der Neuralleiste. Dort entstehen ihre pluripotenten Vorläuferzellen, die Melanoblasten. Ab dem neunten bis zehnten embryonalen Entwicklungstag wandern diese entlang der Nervenscheiden in ihr Zielgewebe ein (Abbildung 2) wie z.B. die Haut, Schleimhäute, Aderhaut bzw. Ziliarkörper oder die Meningen.

Die Aderhaut (Choroidea) geht im Bereich der Ora Serrata in den Ziliarkörper über und ist ein pigmentiertes Gefäßgeflecht zur Versorgung der äußeren Augenschicht. Sie weist eine sehr hohe Konzentration von Melanozyten auf, ähnlich wie die gut durchblutete Stria vascularis im Innenohr. Während die Aufgabe der Melanozyten in der Haut zum Sonnenschutz bereits bekannt ist, ist über die Aufgabe der Melanozyten im Auge erst wenig erforscht.

Melanozyten produzieren das Pigment Melanin, welches beim Menschen und auch allen anderen Säugetieren für die Färbung der Haare, Haut und Aderhaut verantwortlich ist. Melanin ist ein schwarz-brauner (Eumelanin) oder rötlicher (Phäonelanin) Farbstoff. Meistens ist Melanin an ein Protein gebunden. Ein Fehlen von Melanozyten (Leuzismus) ist mit schweren Missbildungen verbunden. Häufig sind davon die Augen in Form einer Mikrophthalmie betroffen. Darüber hinaus leiden viele Betroffene an einer Innenohrstörung.

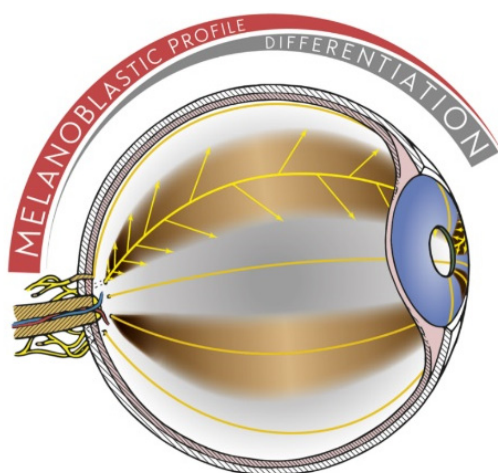
Leuzismus bedeutet, dass das Gewebe keine Melanozyten enthält, im Gegensatz zum Albinismus. Bei diesem enthalten die Zellen Melanozyten, sind aber unfähig Melanin zu produzieren.

Im Tierversuch konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass stärker pigmentierte Melanozyten eine höhere Expression der Tyrosinkinase haben als leichter pigmentierte. Dieses Enzym reguliert viele Schritte der Melanogenese. Es wird vermutet, dass dieses Enzym die Expression von Fibromodulin (FMOD) durch einen

bislang unbekanntem Mechanismus hemmt. Die erhöhte Expression der Tyrosinkinase korreliert mit einer reduzierten Expression von FMOD in der mRNA, obwohl Melanin nicht direkt die FMOD Expression reguliert.

Leicht pigmentierte Zellen haben ein „Tyrosinkinase Leck“. Dieses „Leck“ verbessert die Produktion und Sekretion von Fibromodulin von Melanozyten. Dies fördert die angiogenetische Zellantwort auf benachbarte Endothelzellen. Fibromodulin aktiviert bei Endothelzellen eine TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) Rezeptorsignalisierung und die Hochregulation der angiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF (Vascular endothelial growth factor) und ANG2 (Angiopoetin 2). Der Gefäßwachstumsstabilisator ANG1 (Angiopoetin 1) wird währenddessen unterdrückt. Auch hier ist der exakte Mechanismus nicht bekannt. VEGF und ANG2 aktivieren ihre verwandten Endothelrezeptorkinasen VEGFR-2 und TIE2, um die angiogenetische Zellantwort zu induzieren. (1, 9)

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Melanozyten auf die Aderhaut zu erforschen, um auf deren Funktion rückschließen zu können. Hierzu soll untersucht werden, ob und wie die Anzahl der Melanozyten die Aderhautdicke beeinflusst. Dahinter liegt nämlich die Annahme, dass Melanozyten wichtig für die Angiogenese der Aderhaut sind. Dazu wurden Nävus Ota Patientinnen und Patienten untersucht, die am betroffenen Auge eine vermehrte Anzahl an Melanozyten haben. Die Ergebnisse mit Waardenburg Patientinnen und Patienten und einem homozygoten Merle Hund sollen in Bezug gestellt werden. Waardenburg Patientinnen und Patienten und homozygote Merle Hunde haben durch einen partiellen Leuzismus eine stark reduzierte Melanozytenanzahl.



**Abbildung 2: Melanozyten Migration**

## 1.5 Nävus Ota

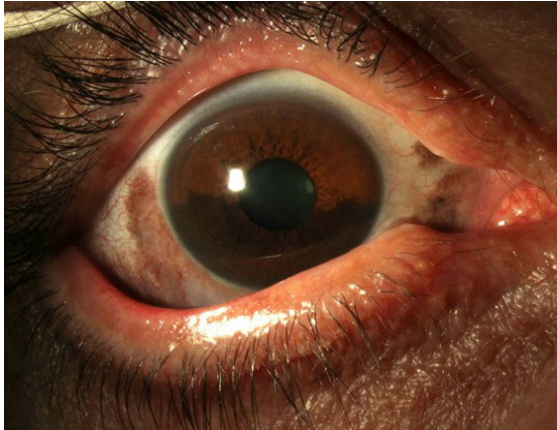
Um die Auswirkung einer erhöhten Melanozyten Anzahl auf die Aderhaut zu untersuchen, wurden acht Nävus Ota Patientinnen und Patienten hinsichtlich der Aderhautdicke untersucht.

### 1.5.1 Klinik

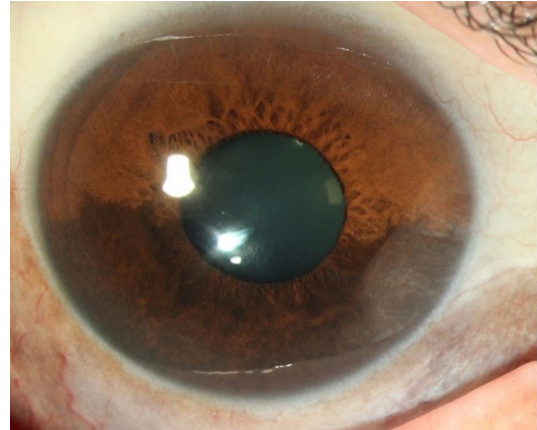
Der Nävus Ota ist eine okulodermale Melanozytose der Haut sowie des Auges und wurde 1939 erstmals von Ota und Tanino beschrieben. Es liegen dunkelblaue bis bräunliche Hyperpigmentierungen (Nävi) im Versorgungsgebiet des ersten oder zweiten Trigeminusastes vor. Davon können Stirn, Augenbereich, Wange und der Gaumen betroffen sein (Abbildung 3). Es können aber auch die Sklera, Konjunktiva (Abbildung 4, Abbildung 5) sowie das Trommelfell und der harte Gaumen mitbeteiligt sein. In 5 % der Fälle kann eine bilaterale Form vorliegen. Häufig liegen eine Hyperpigmentierung des Augenhintergrundes (Abbildung 10), eine Irishyperchromie (Abbildung 5) und Irismammillationen vor. Bei Letzteren handelt es sich um seltene, winzige, regelmäßig verteilte zottenförmige Läsionen der Iris. Der Nävus Ota ist nicht immer von Geburt an sichtbar, sondern nimmt erst in der ersten bis zweiten Lebensdekade an Intensität und Ausdehnung zu. (10-12)



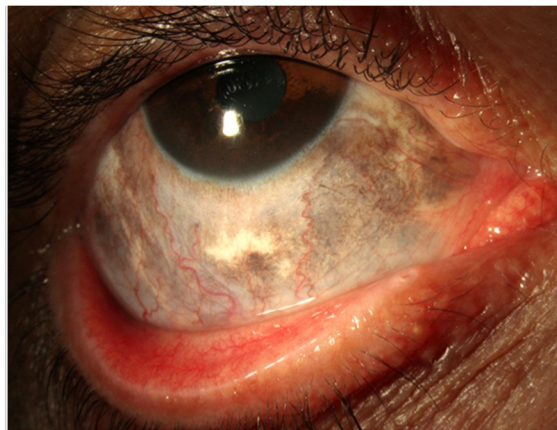
Abbildung 3: Nävus Ota rechtes Auge



**Abbildung 4: Irishyperchromie, Okuläre Melanose im Bereich der Iris und der Sklera**



**Abbildung 5: Irishyperchromie, Okuläre Melanose im Bereich der Iris und der Sklera**



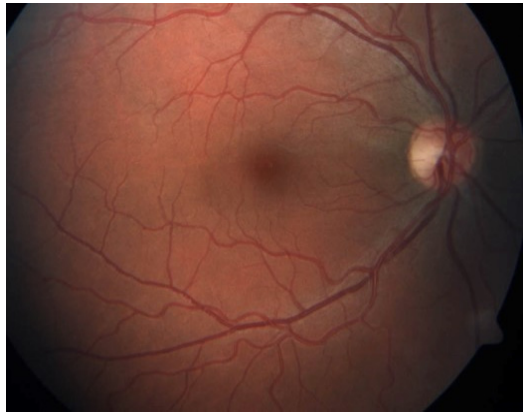
**Abbildung 6: Okuläre Melanose im Bereich der Sklera**



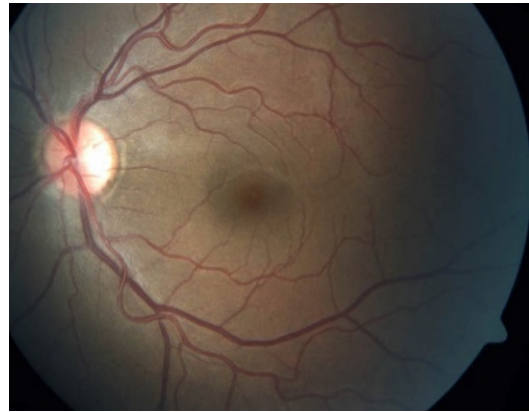
**Abbildung 7: Okuläre Melanose im Bereich der Konjunktiva**



**Abbildung 8: Okuläre Melanose im Bereich der Iris und der Sklera**



**Abbildung 9: Augenhintergrund des Nävus Ota Auge**



**Abbildung 10: Augenhintergrund normal pigmentiertes Auge**

### 1.5.2 Ätiologie

Melanoblasten wandern um den neunten embryonalen Entwicklungstag vom Neuralrohr entlang der Nervenscheide in ihr Zielgewebe ein. Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch Melanoblasten des Auges und der periokulären Region entlang der Nervenbahnen wandern. Diese teilen sich entlang der Nervenäste auf und gelangen dann an ihren Zielort (Abbildung 11) (4).

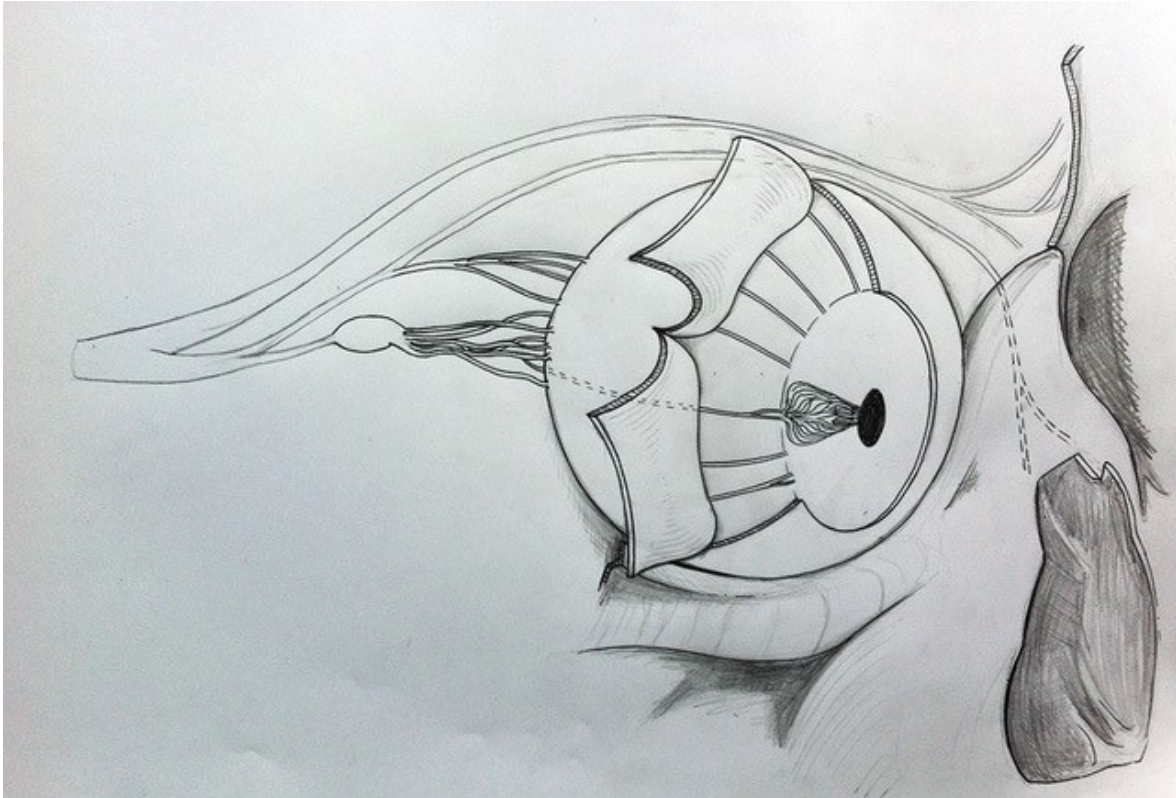
Der fünfte Gesichtsnerv - der Nervus trigeminus – besteht aus drei Hauptästen:

Nervus ophthalmicus (V1), Nervus maxillaris (V2) und Nervus mandibularis (V3).

Der Nervus ophthalmicus (V1) enthält sowohl sympathische wie auch parasympathische Fasern und innerviert die okuläre und periokuläre Region. Er teilt sich wiederum in drei Zweige auf. Einige Zweige davon, die Ziliar-Nerven, dringen in das Auge ein und innervieren die Kornea, den Ziliarkörper und die Iris. Die anderen Nervenäste sind für die Innovation der Stirn, Augenbraue, Nase, Haut der Augenlider und die Bindehaut zuständig.

Beim Nävus Ota kommt es vermutlich während der Embryogenese zu einer gesteigerten Melanozytenproliferation, noch bevor diese ihre Zielregion erreichen.

Abhängig von Ort und Zeit der melanozytären Proliferation entstehen im Bereich der Innervationsgebiete des Nervus maxillaris Nävi unterschiedlicher Größe. (Abbildung 11) (4, 11).



**Abbildung 11: Melanozytenwanderung entlang des Nervus trigeminus**

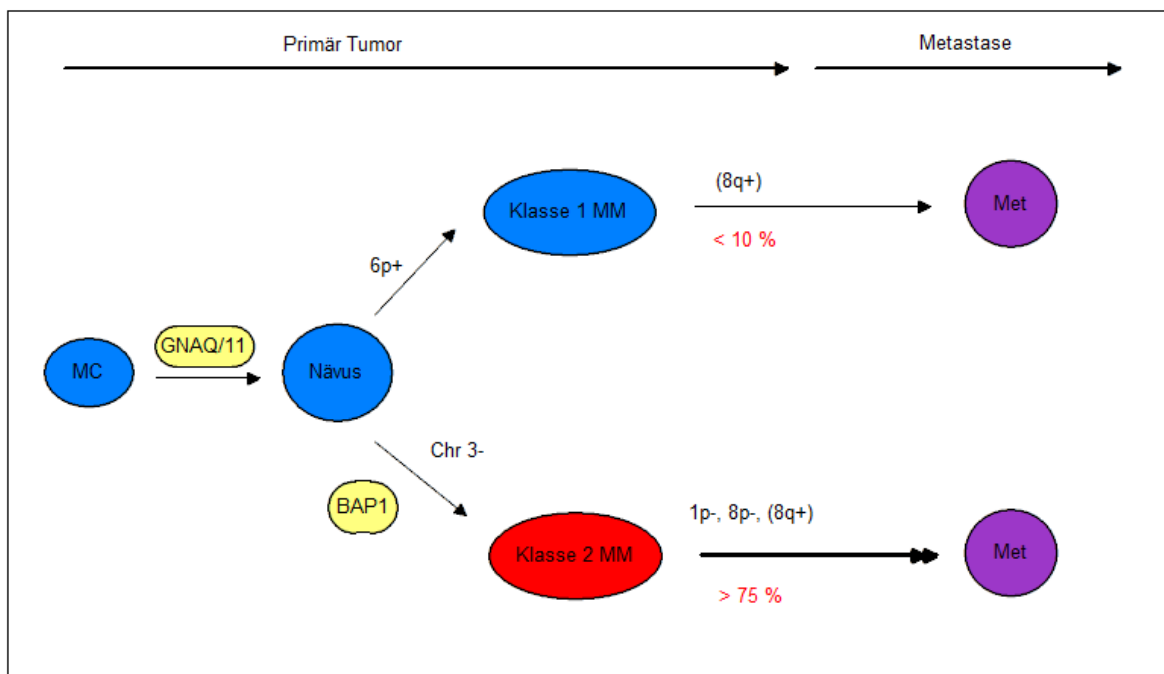
Man geht davon aus, dass die Proliferation der Melanozyten beim Nävus Ota durch eine Mutation im GNAQ oder GNA11 Gen ausgelöst wird. Diese Gene spielen beim MAPK Pfad eine wichtige Rolle und sind dort für das Wachstum verantwortlich - auch kleine Aderhaut Nävi weisen diese Mutation auf.

Diese Mutationen gelten als „Vorläufermutationen“ in Richtung Aderhautmelanom. Das Aderhautmelanom ist mit 15 bis 20 Todesfällen pro Jahr der häufigste Tumor, der direkt das Auge betrifft. Die Prävalenz von Aderhautnävi liegt bei 4-8 %, die Inzidenz eines Melanoms bei 4 bis 6 Fällen pro einer Million Einwohner pro Jahr. Das Entartungsrisiko steigt mit höherem Lebensalter an und das höchste Risiko liegt zwischen 60 bis 70 Jahren. (13)

Im Gegensatz zum kutanen Melanom scheinen die Sonnenlichtexposition und eine Mutation im b-RAF Gen keine Rolle zu spielen. (14) Die Metastasierungs- und Überlebensrate ist seit der ersten Beschreibung von Fuchs im Jahr 1917 beinahe unverändert. Die Überlebensrate liegt bei ca. 50 % über 15 Jahre und ist abhängig von der gewählten Therapie (Strahlentherapie – Eukleation) (15). In 1 von 5.000 bis 8.000 Nävi pro Jahr transformiert dieser Nävus in ein Aderhautmelanom (13).

In 10 % der Fälle entwickelt sich ein Klasse 1 Melanom, das nur selten Metastasen bildet. Es entsteht ein zusätzlicher kurzer Arm des Chromosoms 6 oder des langen Arms von Chromosom 8.

In über 75 % der Fälle entwickelt sich ein Klasse 2 Melanom, das häufiger Metastasen bildet. Dabei kommt es zu einem Verlust von Chromosom 3 (Monosomie) und des kurzen Arms der Chromosomen 1 und 8. Des Weiteren entsteht ein zusätzlicher langer Arm des Chromosoms 8. Auf Chromosom 3 liegt das Gen BAP1. Derzeit geht man davon aus, dass der bi-allelische Verlust dieses Gens eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Metastasen spielt. (16)



**Abbildung 12: Mutationsweg des Aderhautmelanoms**

### 1.5.3 Epidemiologie

Der Nävus Ota kommt vermehrt in der asiatischen und dunkelhäutigen Bevölkerung vor, prinzipiell können aber alle Rassen betroffen sein. In der kaukasischen amerikanischen Bevölkerung wird eine okuläre Melanozytose mit 0,04 % beschrieben. In Japan liegt eine Inzidenz von 1:1000 bis 2:1000 vor. Frauen sind 3- bis 5-mal häufiger betroffen als Männer. (12, 17)

### **1.5.4 Prognose und Verlauf**

Menschen weißer Hautfarbe haben im Vergleich zur asiatischen und afro-amerikanischen Bevölkerung eine niedrigere Prävalenz für einen Nävus Ota. Jedoch haben Nävus Ota Patientinnen und Patienten mit weißer Hautfarbe ein signifikant höheres Risiko, im Laufe ihres Lebens an einem uvealen Melanom zu erkranken. Den Patientinnen und Patienten wird deshalb empfohlen, sich jährlich einer ophthalmologischen Untersuchung zu unterziehen.

Beim Verdacht auf ein mögliches Orbitamelanom wird zusätzlich ein MRT der Orbita durchgeführt. Das Risiko für ein Glaukom ist ebenfalls erhöht. Man vermutet, dass durch die vermehrte Pigmentierung (und Anzahl der Melanozyten) der Kammerwasserabfluss des Trabekelwerks behindert wird.

Dies kann zu einer Steigerung des Augeninnendrucks und einem sogenannten Offenwinkelglaukom führen. (11)

## **1.6 Waardenburg Syndrom**

Als Beispiel für ein partielles Fehlen von Aderhautmelanozyten werden Waardenburg Syndrom Patientinnen und Patienten miteinbezogen.

### **1.6.1 Klinik**

Das Waardenburg Syndrom ist eine angeborene, autosomal dominant vererbte Erkrankung, die nach dem niederländischen Ophthalmologen Petrus Johannes Waardenburg benannt ist. Ein genetischer Defekt führt zu Pigmentstörungen der Augen, Haare und Haut. Des Weiteren sind Innenohrschwerhörigkeiten, eine kongenitale Fehlbildung des Gesichts (Dystopia canthorum) sowie eine partielle bzw. totale Iris- und Choroideahypopigmentierung und typische weiße Haarlocke möglich (Abbildung 13). Das Waardenburg Syndrom kann man in vier verschiedene Typen einteilen. (18-20)

### **Type I (Waardenburg) (18-22)**

- Angeborene Innenohrschwerhörigkeit
- Albinismus partialis
- Dystopia canthorum
- Pigmentanomalien der Iris (komplette oder partiell segmentale Heterochromie, Irishypoplasie)
- Hypoplasie der Alae nasi: Breite Nasenwurzel und breiter Nasenrücken
- Breite mediale Augenbrauen bis zur Synophrys

### **Type II (Waardenburg) (18-22)**

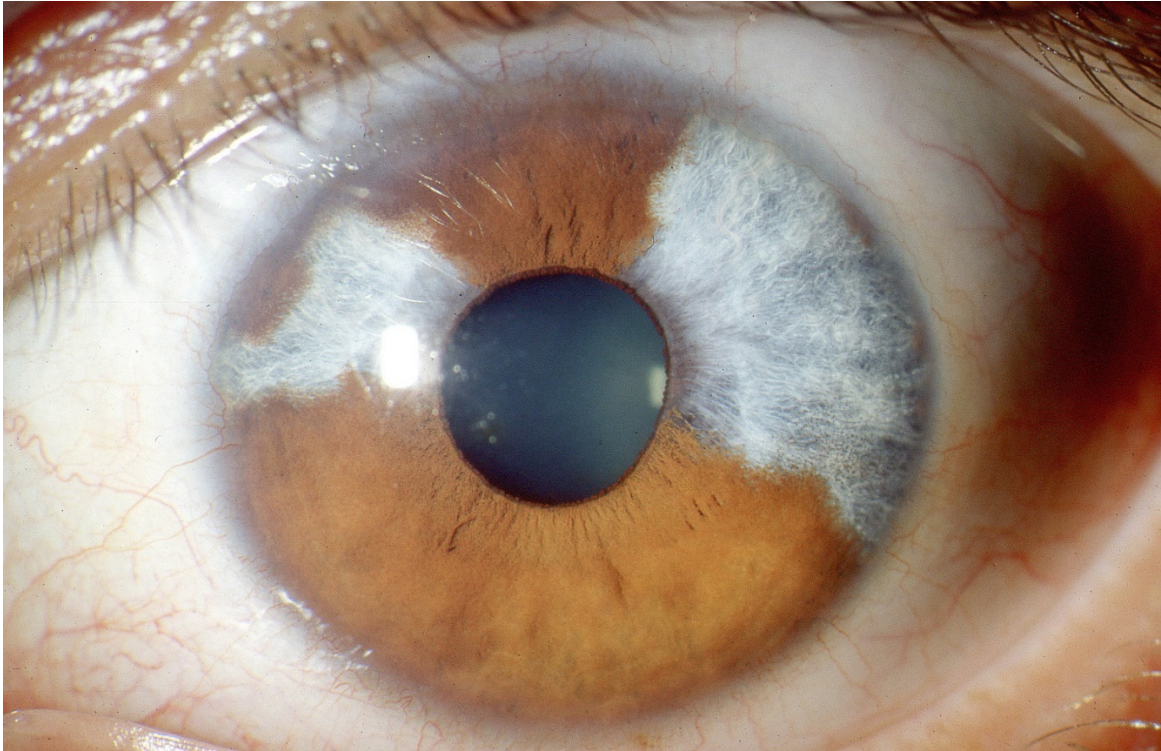
- Angeborene Innenohrschwerhörigkeit
- Pigmentanomalien der Iris (komplette oder partiell segmentale Heterochromie, Irishypoplasie)

### **Type III (Klein–Waardenburg) (18-22)**

- Angeborene Innenohrschwerhörigkeit
- Albinismus partialis
- Dystopia canthorum
- Pigmentanomalien der Iris (komplette oder partiell segmentale Heterochromie, Irishypoplasie)
- Hypoplasie der Alae nasi: Breite Nasenwurzel und breiter Nasenrücken
- Breite mediale Augenbrauen bis zur Synophrys
- Muskuloskelettale Anomalitäten

### **Type IV (Shah–Waardenburg) (18-22)**

- Angeborene Innenohrschwerhörigkeit
- Albinismus partialis
- Pigmentanomalien der Iris (komplette oder partiell segmentale Heterochromie, Irishypoplasie)
- Enterische Neurone mitbetroffen
- zusätzlich Morbus Hirschsprung (angeborenes Megakolon)



**Abbildung 13: Irisheterochromie bei Waardenburg Syndrom**

### **1.6.2 Ätiologie**

Das Waardenburg Syndrom ist ein genetischer Defekt im sogenannten Mikrophthalmus assoziierten Transkriptionsfaktor (MITF).

Es ist ein Protein, das für die Melanozytenreifung mitverantwortlich ist. Der Defekt führt zu einem partiellen Leuzismus mit Pigmentstörungen der Augen, Haare und Haut. (18, 20, 21)

### **1.6.3 Epidemiologie**

Die Inzidenz des Waardenburg Syndroms wird mit 1:42000 angegeben, wobei der Typ I und der Typ II am häufigsten vorkommen. (21)

### **1.6.4 Behandlung**

Für das Waardenburg Syndrom gibt es keine Therapie, die zu einer Heilung führt. Man kann lediglich Symptome therapieren und die Patientinnen und Patienten z.B. durch ein Hörgerät unterstützen. (22)

## 1.7 Merle Faktor

Der sogenannte Merle Faktor ist eine Insertion im SILV Gen (Silver locus Gen, auch bekannt als PMEL17; gp100) und führt bei Tieren zu verschiedenen aufhellenden Farbvariationen des Fells. Das Gen kodiert ein melanozytenspezifisches Transmembran Glykoprotein von Melanosomen (PMEL). Diese produzieren Melanin in den Melanozyten und spielen eine wichtige Rolle in der Prämelanosomenstruktur (23).

Homozygote Australian Shepherd Hunde mit dem Wildtyp sind im Gegensatz zu heterozygoten Tieren (Abbildung 16 ) gleichmäßig schwarz (Abbildung 14) oder rot (Abbildung 15) pigmentiert. Heterozygote Hunde haben auf ihrem Fell stellenweise weiße oder graue Flecken. Die Iris dieser Hunde ist meistens sektoriell pigmentiert. Bei den weißen bzw. grauen Flecken und bei der blau wirkenden Iris sind keine Melanozyten (partieller Leuzismus) vorhanden. Werden zwei heterozygote Hunde miteinander verpaart, kann mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % ein homozygoter Merle entstehen. Man nennt diese Form auch „Double Merle“. Ein Untergang von melanozytären Zellen während der Embryogenese ist beim homozygoten Merle (eine Mutation im SILV locus) zusammen mit einer Innenohrschwerhörigkeit und einer Mikrophthalmie anzutreffen.

Melanozyten sind scheinbar wichtig für eine normale Entwicklung der Stria vascularis, eine gut durchblutete Gefäßschicht des Innenohrs. Die Stria vascularis versorgt die Cochlea. Fehlen Melanozyten, kommt es zum Untergang von sensorischen Haarzellen und somit zur Taubheit. Oftmals verenden die betroffenen Tiere bereits intrauterin.

Es stellt sich daher die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Auges (vor allem der Aderhaut und des Zilliarkörpers) und Melanozyten gibt. Die Hunde haben ein nahezu gänzlich weißes Fell und leiden unter einem fast vollständigen Pigmentverlust. Durch diesen haben Double Merles oft rosarote Lidränder, Lefzen und Nasen. Die Augen sind meist komplett blau oder nur sektoriell blau/braun pigmentiert.

Aber nicht nur Hunde wie Australian Shepherds können von Leuzismen betroffen sein, auch Mäuse oder Pferde können diesen Phänotyp aufweisen - häufig in Verbindung mit Taubheit und Augenfehlbildungen.

Wie schon Clark et al. beschrieben haben, gibt es einige Gemeinsamkeiten beim Waardenburg Syndrom und homozygoten Merle. Ein partieller Leuzismus beim Menschen führt zu Pigmentstörungen (Leuzismus) und zur Innenohrschwerhörigkeit. (1, 3, 4, 9, 23-26)



**Abbildung 14: Australian Shepherd Wildtyp schwarz**



**Abbildung 15: Australian Shepherd Wildtyp braun**



**Abbildung 16: Heterozygoter schwarzer Merle-Faktor Australian Shepherd**



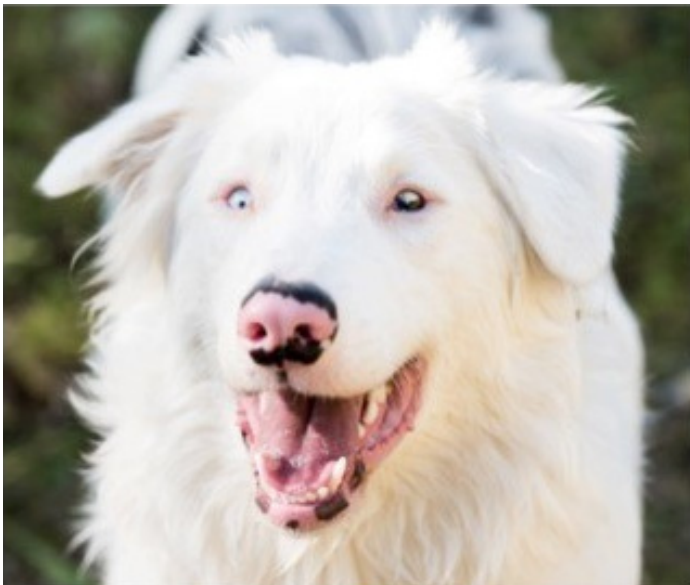
**Abbildung 17: Heterozygoter roter Merle-Faktor Australian Shepherd**

### **1.7.1 Homozygoter Australian Shepherd Hund „Sammy“**

Als Beispiel für ein partielles Fehlen von Aderhautmelanozyten wurde der homozygote Merle Hund namens „Sammy“ untersucht.

„Sammy“ ist ein im Jahr 2017 in Österreich geborener Australian Shepherd Hund (Abbildung 18). Beide Elternteile sind Träger des Merle Faktors und haben ihm diesen Merle Faktor vererbt. „Sammy“ ist daher ein Double Merle, sein Fell ist bis auf ein paar dunkle Flecken weiß und die Haut rosa.

Seit seiner Geburt ist er auf beiden Ohren taub. Die Iris ist am linken Auge nicht pigmentiert und am rechten Auge sektoriell pigmentiert. Sein Sehvermögen ist am unpigmentierten Auge deutlich herabgesetzt, er orientiert sich mit dem teilweise pigmentierten Auge. Wird das unpigmentierte Auge abgedeckt, wird das von ihm gut toleriert. Er zeigt jedoch eine starke Abwehr, wenn man das pigmentierte Auge abdeckt.



**Abbildung 18: Homozygoter Australian Shepherd Hund Sammy**

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Literaturrecherche**

Zu Beginn der Arbeit wurde eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt. Im Portal PubMed wurde dazu nach Literatur gesucht. Dabei wurden folgende Suchbegriffe verwendet: Nävus of Ota, Waardenburg Syndrome, Melanozytes, Merle Faktor, Melanozyten and Angiogenesis, Leuzismus, Fibromodulin, Splashed-White-Overo, Overo-Lethal-White-Gen. Die letzte PubMed Abfrage wurde am 10.06.2018 durchgeführt.

### **2.2 Experimenteller Teil - Klinische Studie**

#### **2.2.1 Nävus Ota**

Am Universitätsklinikum für Augenheilkunde in Graz wurde ein Ethikantrag für eine prospektive Studie gestellt. Die Studie wurde entsprechend der Declaration of Helsinki von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

Im Zeitraum von April 2016 bis Oktober 2016 wurden acht Patientinnen und Patienten mit Nävus Ota untersucht.

Mittels Spaltlampe wurde eine genaue augenärztliche Untersuchung des vorderen und hinteren Augenabschnitts durchgeführt.

Um die Aderhautdicke vermessen zu können, wurde eine OCT Untersuchung beider Augen mit dem Modus EDI, welches eine bessere Darstellung der Aderhaut erlaubt, durchgeführt. Anschließend wurde das betroffene Nävus Ota Auge mit dem nicht betroffenen Auge verglichen.

Die gewonnenen Daten wurden anonymisiert und statistisch ausgewertet. Bei Normalverteilung der Daten wurde ein t-Test für abhängige Stichproben verwendet.

### **2.2.1.1 Auswahl der Patientinnen und Patienten**

Es wurden Nävus Ota Patientinnen und Patienten ausgewählt, die im Zeitraum April 2016 bis Oktober 2016 an der Tumorambulanz der Univ. Klinik für Augenheilkunde vorstellig waren.

Die Patientinnen und Patienten wurden gefragt, ob sie an der Studie teilnehmen wollen. Sie wurden ausführlich über die Untersuchung und den wissenschaftlichen Aspekt aufgeklärt und willigten den Untersuchungen mittels Unterschrift ein. Eine Kopie der schriftlichen Einverständniserklärung wurde den Patientinnen und Patienten mitgegeben.

### **2.2.1.2 Einschlusskriterien**

Als Einschlusskriterium galt die Diagnose Nävus Ota mit Beteiligung eines Ota Auges. Die Diagnose wurde bereits vorher im Rahmen einer augenärztlichen Untersuchung gestellt. Die Patientinnen und Patienten mussten volljährig und einwilligungsfähig sein. Waren die Patientinnen und Patienten minderjährig, mussten die Erziehungsberechtigten einwilligen.

### **2.2.1.3 Ausschlusskriterien**

Patientinnen und Patienten, die nicht an der Studie teilnehmen wollten, und nicht einwilligungsfähige Patientinnen und Patienten, wurden nicht miteinbezogen.

### **2.2.1.4 Widerruf**

Die Patientinnen und Patienten nahmen freiwillig an der Studie teil und konnten zu jedem Zeitpunkt ohne Angabe von Gründen wieder aus der Studie aussteigen. Dies wurde Ihnen sowohl schriftlich als auch mündlich zugesichert.

Die erhobenen Daten wurden anonymisiert und ausschließlich für diese Studie verwendet.

## 2.2.2 Merle Hund

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es zwischen dem Waardenburg Syndrom und den homozygoten Merle Hunden einige Parallelen.

Eine MEDOCS Auswertung vor der Studie ergab 57 mögliche Patientinnen und Patienten. Leider war es uns nicht möglich, Waardenburg Patientinnen und Patienten ausfindig zu machen. Die 57 erhobenen Patienten wurden größtenteils falsch unter „Leuzismus“ kodiert. Bis auf eine Person waren alle Patientinnen und Patienten von einem Albinismus betroffen. Unser einziger Patient war aber aufgrund einer mentalen Retardierung nicht zu untersuchen. Deshalb haben wir uns entschieden, den Hund „Sammy“ in die Arbeit miteinzubeziehen.

„Sammy“ ist ein junger Double Merle (homozygoter) Australian Shepherd Rüde. Bedingt durch seine genetische Erkrankung hat er ein erhöhtes Risiko für einen Katarakt und ein Glaukom. Deswegen musste eine genaue Untersuchung beider Augen in einer Kurznarkose durchgeführt werden.

Diese Situation wurde genutzt, um zusätzlich an beiden Augen eine OCT Untersuchung sowie eine Hautbiopsie von einer Stelle mit weißen und einer Stelle mit dunklen Haaren zu entnehmen. Ein entsprechender Tierversuchsantrag wurde vorab beim Land Steiermark gestellt und genehmigt (Abbildung 32).

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Literatursuche**

Es wurden insgesamt 44 Publikationen gefunden. Davon mussten acht ausgeschlossen werden.

### **3.2 Klinische Studie**

#### **3.2.1 Nävus Ota**



**Abbildung 19: Nävus Ota**

Im Zeitraum April 2016 bis Oktober 2016 wurden insgesamt acht Personen in das Univ.-Klinikum für Augenheilkunde bestellt: Sechs weibliche und zwei männliche Personen im Alter von 8 bis 86 Jahren.

In der Studie wurde die Aderhautdicke beider Augen mittels OCT vermessen und anschließend miteinander verglichen. Da eine Normalverteilung der Daten vorlag, wurde ein t-Test für verbundene Stichproben verwendet. Im t-Test zeigte sich, dass die Aderhaut am betroffenen Auge signifikant dicker war als am anderen, gesunden Auge. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

### Deskriptive Statistik

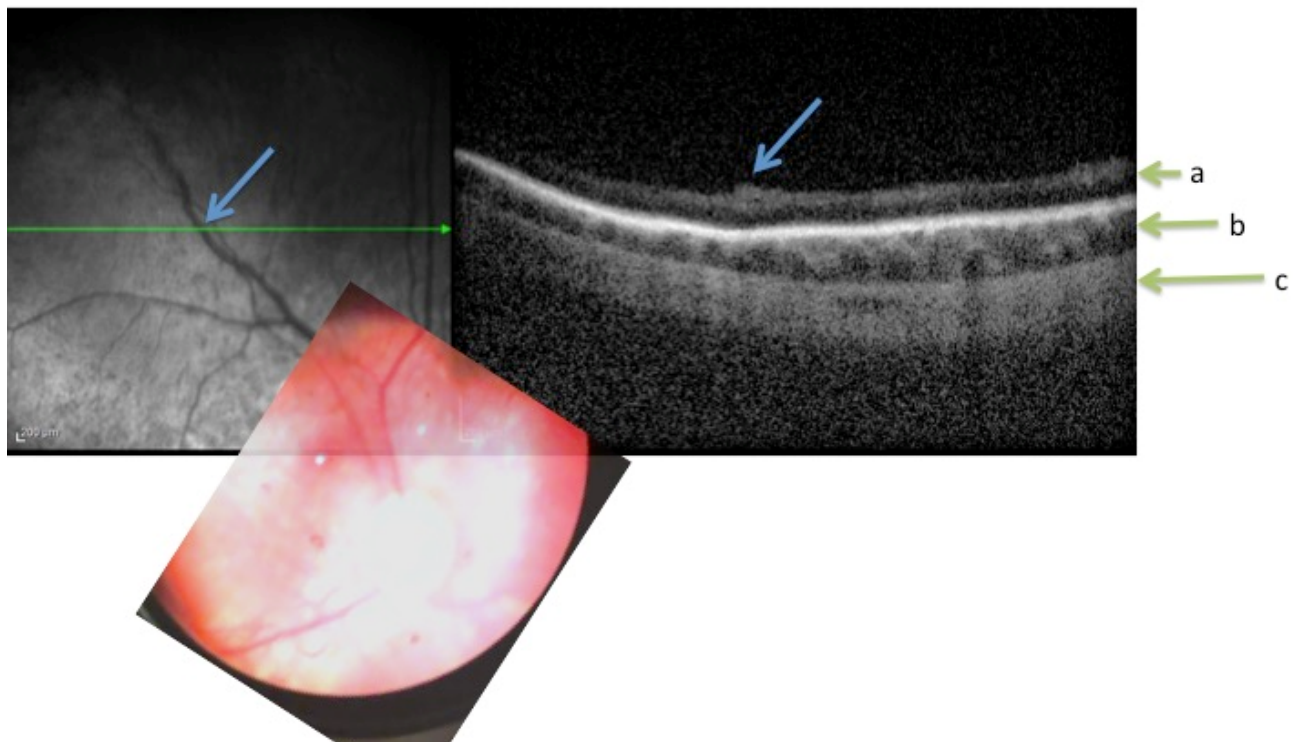
	N	Minimum in $\mu\text{m}$	Maximum in $\mu\text{m}$	Mittelwert in $\mu\text{m}$	Standardabweichung in $\mu\text{m}$
OTA AH perip	8	157,00	399,00	255,25	76,33
VGL AH perip	7	107,00	355,00	226,14	75,01
OTA AH subfov	7	153,00	533,00	370,00	140,67
VGL AH subfov	7	198,00	456,00	376,43	89,43

OTA AH perip = Nävus Ota Aderhaut peripapillär; VGL AH perip = Vergleichs Auge Aderhaut peripapillär;

OTA AH subfov = Nävus Ota Aderhaut subfoveal; VGL AH subfov = Vergleichs Auge Aderhaut subfoveal

**Tabelle 1: Ergebnisse Aderhautdicke Nävus Ota**

### 3.2.2 Merle Hund



**Abbildung 20: Ergebnisse Untersuchung Merle Hund**

Im September 2017 wurden die Augen des Hundes „Sammy“ in einer Kurznarkose untersucht. Dabei wurden eine OCT Untersuchung des Fundus und Fotos der Netzhaut gemacht.

## **Zu Abbildung 20:**

### **Im Bild links oben:**

Am Infrarotfoto vom Augenhintergrund markiert der grüne Pfeil die Position des Querschnitts beim OCT. Der blaue Pfeil im Bild links oben markiert dasselbe Gefäß wie im Bild rechts oben.

Rechts vom Gefäß / Pfeil kann man erkennen, dass die Aderhaut deutlich dunkler pigmentiert ist als links davon.

### **Im Bild rechts oben:**

Dieses OCT-Bild zeigt den Querschnitt durch:

- a) die Retina
- b) Choroidea / Aderhaut
- c) Sklera

Der blaue Pfeil (Im Bild rechts oben) markiert dasselbe Gefäß wie im Bild links oben. Die Aderhaut ist auf der rechten Seite des Gefäßes signifikant dicker, dies entspricht auch der deutlich dunkler pigmentierten Stelle im Infrarotbild (Im Bild links oben).

### **Im Bild unten:**

Fundus Bild zur besseren Orientierung

### 3.2.2.1 Hautbiopsie

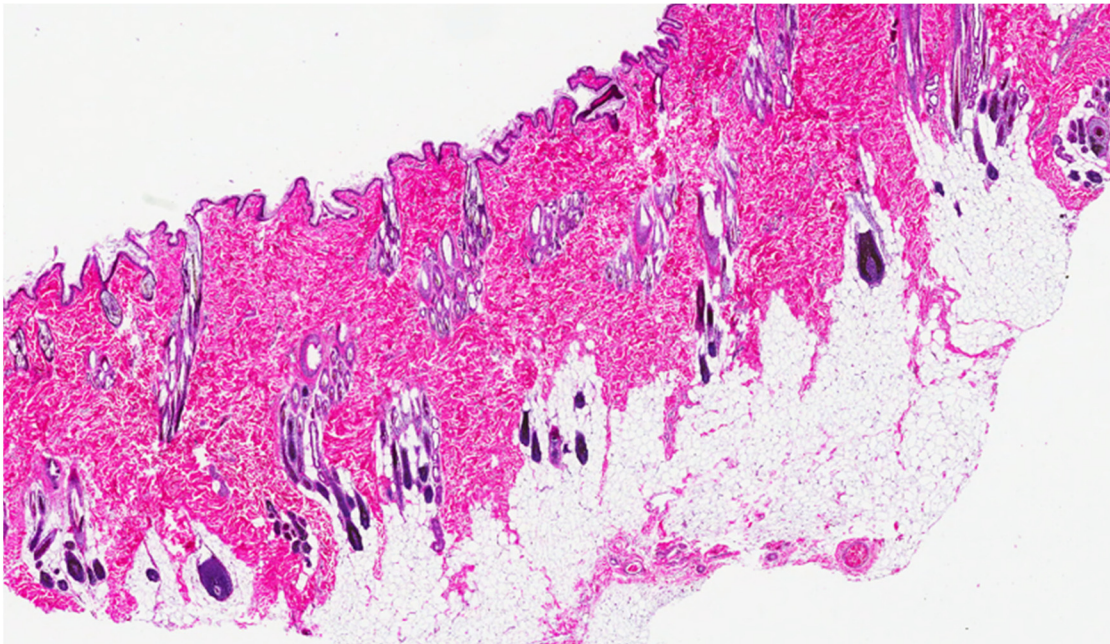


Abbildung 21: Biopsie leuzistische Haut

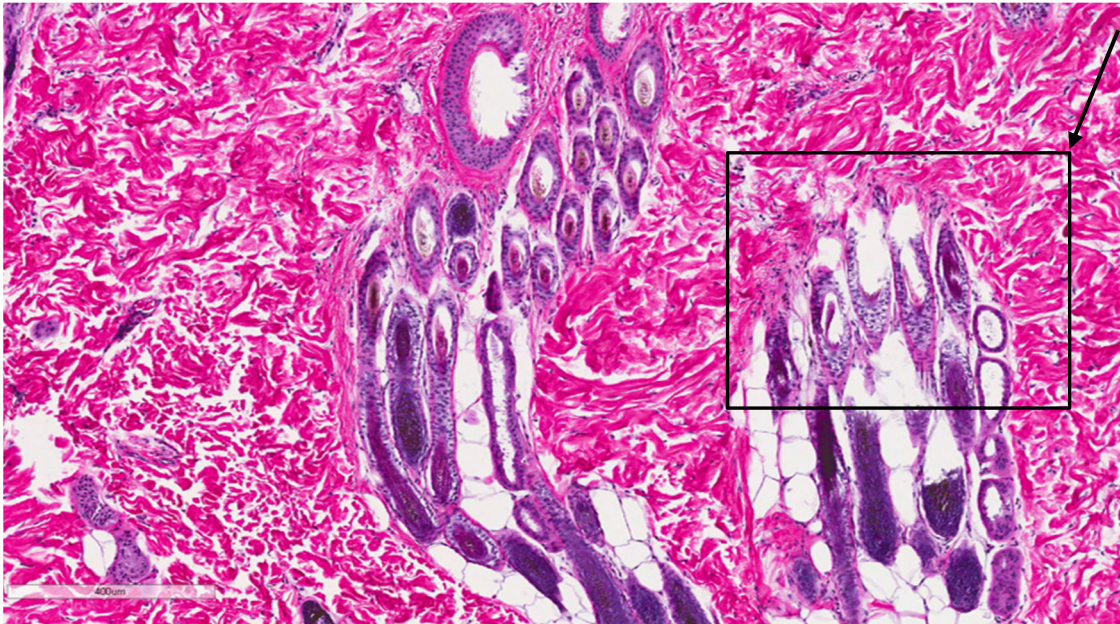
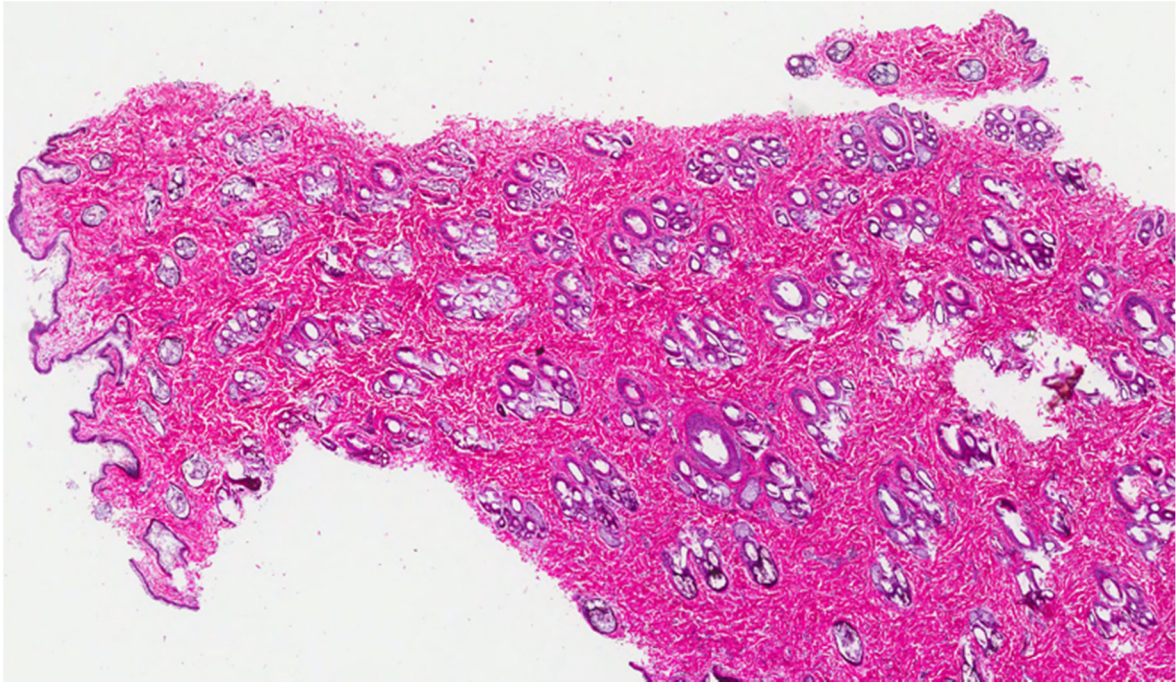
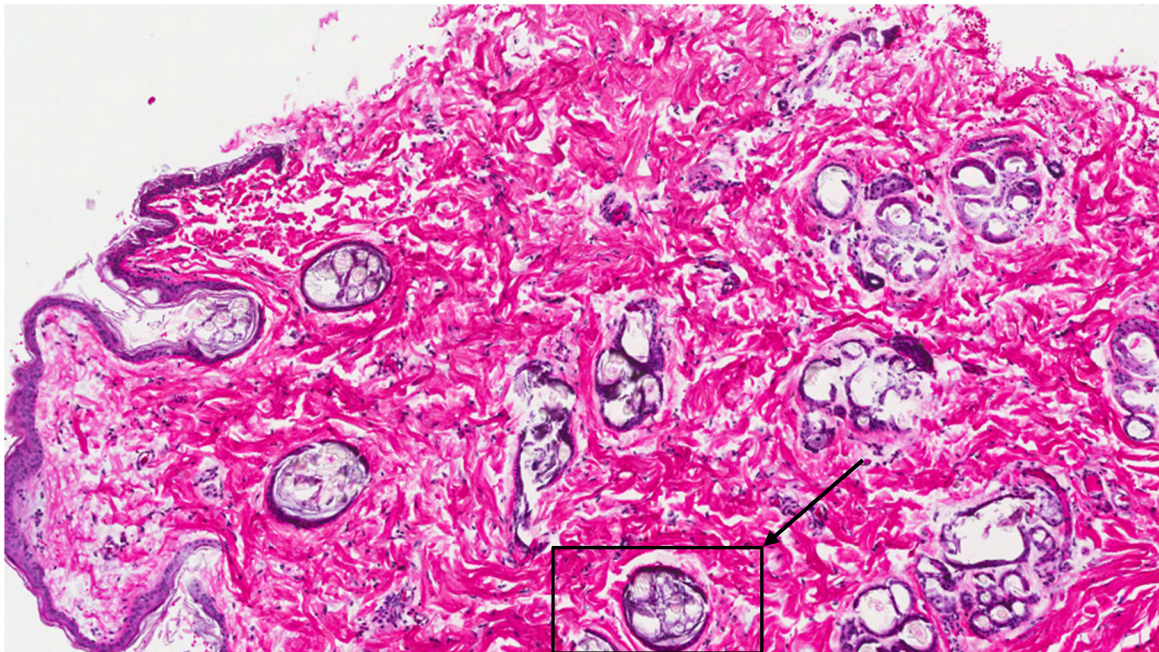


Abbildung 22: Biopsie leuzistische Haut; der Ausschnitt zeigt eine unpigmentierte Haarwurzel im Längs- und Querschnitt.



**Abbildung 23: Biopsie pigmentierte Haut**



**Abbildung 24: Biopsie pigmentierte Haut; der Ausschnitt zeigt eine pigmentierte Haarwurzel im Querschnitt.**

Auf den Bildern ist zu erkennen, dass in den pigmentierten Bereichen Melanozyten vorhanden sind, während diese in den leuzistischen Hautbiopsien fehlen.

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse unserer Literaturrecherche und Untersuchungen deuten darauf hin, dass Melanozyten eine wichtige Rolle bei der Angiogenese der Aderhaut spielen. Wir untersuchten die Aderhautdicke mittels OCT (Heidelberg Spectralis -EDI) bei acht Nävus Ota Patientinnen und Patienten und einem homozygoten Australian Shepherd Hund. Dabei wurden unterschiedlich pigmentierte Areale der Aderhaut miteinander verglichen.

Die Untersuchung der Aderhaut von Nävus Ota Patientinnen und Patienten ergab, dass die Aderhaut am betroffenen Ota Auge signifikant dicker war als am anderen, normal pigmentierten Auge. Zentral war es nur schwer möglich, die Aderhautdicke zu bestimmen, da die Melanozyten einen starken Schatten warfen. Peripapillär konnten die Messungen valider durchgeführt werden. Da eine Normalverteilung der Daten vorlag, wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Dieser zeigt, dass die Aderhaut am beteiligten Auge durchschnittlich 255,25  $\mu\text{m}$  dick war (Standardabweichung 76,33  $\mu\text{m}$ ), während die Aderhautdicke am unbeteiligten Auge durchschnittlich 226,14  $\mu\text{m}$  betrug (Standardabweichung 75,01  $\mu\text{m}$ ).

Die Theorie, dass Melanozyten die uveale Angiogenese beeinflussen, wird aber auch durch die Untersuchung des homozygoten Merle Hundes „Sammy“ bekräftigt. Dafür wurden in einer Kurznarkose Hautbiopsien durchgeführt sowie Fotos der Iris und des Fundus angefertigt. Außerdem wurde mittels OCT (Heidelberg Spectralis – EDI) der Augenhintergrund untersucht und die Aderhaut vermessen. Anschließend wurden die Daten analysiert und leuzistische Teile der Aderhaut mit normal pigmentierten Anteilen verglichen.

Die Hautbiopsien ergaben, dass an Stellen mit dunklem Fell Melanozyten vorhanden waren, an Stellen mit weißen Haaren diese jedoch fehlten.

Es zeigte sich auch, dass die Iris und Aderhaut des Hundes sektoriell pigmentiert sind. Pigmentierte Anteile der Aderhaut erschienen im Vergleich zu leuzistischen Anteilen am sektoriell pigmentierten Auge dicker.

Unsere Hypothese befindet sich auch im Einklang mit anderen Studien. So beschreiben bereits Pellegrini et al., dass Patientinnen und Patienten mit einem Nävus Ota eine signifikant dickere Aderhaut am betroffenen Auge aufweisen. Bei einer retrospektiven Studie am Wills Eye Hospital in Philadelphia wurden die Augen von 15 Patientinnen und Patienten mit einem Nävus Ota untersucht. Dort wurde festgestellt, dass die subfoveale Aderhautdicke am betroffenen Auge um 23 % dicker war als am normalen Auge. Am beteiligten Auge war die Aderhaut durchschnittlich 326,4 µm dick (Median 326 µm; Spannweite 120 bis 459 µm), während die Aderhaut am unbeteiligten Auge durchschnittlich 254,4 µm dick war (Median 260 µm; Spannweite 94 bis 462 µm) (27).

Das Waardenburg Syndrom hat viele Gemeinsamkeiten mit dem homozygoten Merle Hund. Genetische Alterationen führen zu einer Pigmentierungsstörung der Haare bzw. des Fells sowie der Augen und zu einer Innenohrschwerhörigkeit. Durch eine Mutation im kodierenden DNA Abschnitt im Mikrophthalmus assoziierten Transkriptionsfaktor (MITF) kommt es zu einem partiellen Leuzismus.

Dieser Transkriptionsfaktor ist für die Regulation der Melanozytenreifung von Bedeutung. Aber auch Fehlbildungen des Gehörs sind sowohl bei Waardenburg Patientinnen und Patienten als auch beim homozygoten Merle Hund vorhanden. So sind einige Double Merle Hunde und Waardenburg Patientinnen und Patienten taub.

Taubheit bei Fehlen von Melanozyten im Innenohr ist auch bei anderen Tieren bereits bekannt und gut dokumentiert.

So konnten bereits Steel et al. zeigen, dass bei Mäusen die Präsenz von Melanozyten in der Stria vascularis wichtig für eine normale Funktion des Innenohrs ist – diese besiedeln die Stria vascularis. Die Stria vascularis ist eine stark gefäßführende Struktur, weiters versorgt diese die Chochlea im Innenohr. Fehlen Melanozyten, erscheint die Stria vascularis stark verdünnt – es liegt eine ausgeprägte Innenohrschwerhörigkeit vor. (3)

Dass Melanozyten wichtig für die Angiogenese der Aderhaut sind, konnten auch Klinckmann et al. zeigen. In ihrer Studie mit homozygoten Merle Hunden fanden sie heraus, dass bei homozygoten Merle Dachshunden die Choroidea außergewöhnlich dünn war und nur wenige große Gefäße enthielt (2).

Shields et al. konnte bei Untersuchungen der subfovealen Aderhaut bei Waardenburg Patienten zeigen, dass leuzistische Aderhautregionen dünner waren als pigmentierte. Bei vier Patienten wurde das hypopigmentierte Auge mit dem normal pigmentierten Auge verglichen. Dabei zeigte sich, dass die subfoveale Aderhaut am hypopigmentierten Auge um 19 % dünner war als am normalen Auge. Die durchschnittliche subfoveale Aderhautdicke lag beim hypopigmentierten Auge bei 197  $\mu\text{m}$ , beim normalen Auge bei 243  $\mu\text{m}$  (20). Diese Ergebnisse lassen auch einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Auges – insbesondere der Aderhaut - und Melanozyten vermuten.

Diese Resultate unterstützen ebenfalls unsere Hypothese, dass die Anzahl der Melanozyten Einfluss auf die Dicke der Aderhaut hat.

Dass Melanozyten die Angiogenese beeinflussen, wurde auch in einem anderen Mausmodell gezeigt. Adini et al. konnte im Tierversuch bei Mäusen zeigen, dass Melanozyten Fibromodulin (FMOD) produzieren, und dass dies eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt. So konnten sie nachweisen, dass Fibromodulin die angiogenetische Zellantwort auf benachbarte Endothelzellen aktiviert. So werden durch TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) die angiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF (Vascular endothelial growth factor) und ANG2 (Angiopoetin 2) ausgeschüttet. Währenddessen wird der Gefäßwachstumsstabilisator ANG1 (Angiopoetin 1) unterdrückt. Der genaue Mechanismus ist allerdings unbekannt. VEGF und ANG2 bewirken eine Aktivierung der Endothelrezeptorkinasen VEGFR-2 und TIE2. Diese induzieren die angiogenetische Zellantwort. (1, 9)

In der Pferdezucht gibt es verschiedene Farbvariationen des Fells, die auf einem Leuzismus beruhen. Diese Pferde werden "Schecke" oder auch "Scheck" genannt. Die Körperbehaarung dieser Pferde weist neben der Grundfarbe klar umgrenzte, weiße Bereiche auf. Die Tiere werden nach Scheckungstyp in Tigerschecken und Plattenschecken (Abbildung 25, Abbildung 27) eingeteilt. Bei den Plattenschecken gibt es drei verschiedene Typen: Splashed White Overo, Frame Overo und Tobiano. (28, 29)

Der Leuzismus kann unterschiedlich ausgeprägt sein. Sind keine Melanozyten vorhanden, ist die Haut rosa, die Haare erscheinen weiß. Ist der Melanozytenanteil

gering, zeigt sich ein zufälliges Muster von farbigen und weißen Haaren – diese werden Stichelhaare genannt. (29-31)

Die Splashed-White Scheckung wird auch nordische Scheckung genannt. Farbiger und weißes Fell kommen dabei abwechselnd vor. Die Pferde haben weiße Beine und weiße Bauchflecken. Es wirkt so, als würde die weiße Zeichnung des Fells von unten nach oben zunehmen. Der Kopf hat häufig ein weißes Abzeichen und die Pferde haben blaue Augen. (32) Man kann zwischen der heterozygoten und homozygoten Form unterscheiden. Die heterozygote Form ist teilweise nur schwer zu erkennen, da die Tiere meist keine Scheckzeichnung zeigen. Blaue Augen oder dezente Abzeichen am Kopf können allerdings ein Hinweis auf die genetische Anlage sein (Abbildung 25). Nur homozygote Tiere zeigen eine typische Splashed-White Zeichnung (Abbildung 26). (28)

Einige dieser Pferde sind von Geburt an taub. Vermutet wird, dass auch hier die Stria vascularis durch den Leuzismus verändert ist. (33)



**Abbildung 25: heterozygote Splashed White Scheckung (34)**



**Abbildung 26: homozygote Splashed White Scheckung (35)**

Bei der Frame-Overo-Scheckung kommt es - bedingt durch das Overo-Lethal-White-Gen - zur Scheckung an der ventralen und lateralen Seite von Hals und Rumpf, wobei die dunklen Stellen wie "eingerahmt" wirken. Die Rückenlinie wird von den weißen Flecken nicht gekreuzt, lediglich manchmal der Mähnenkamm von den weißen Flecken. Meist ist zumindest eines der Beine - wenn nicht sogar Alle - dunkel gefärbt. (Abbildung 27). (28, 36)



**Abbildung 27: Frame Overo Scheckung (37)**

Das Overo-Lethal-White Gen wird unvollständig dominant vererbt und führt durch eine Mutation im Endothelin-Rezeptor-B-Locus zu einem Leuzismus. Heterozygote Pferde zeigen die Frame-Overo-Scheckung und sind gesund. Werden zwei heterozygote Tiere miteinander verpaart, kommt es in 25 % zu einer homozygoten Form

des Overo lethal white Gens, und führt zum so genannten OLWS (Overo-Lethal-White-Syndrom). (28, 38)

Die Fohlen kommen komplett weiß zur Welt. Bereits kurz nach der Geburt kommt es zu kolikartigen Symptomen und der Mekoniumabgang bleibt aus. Dem Magendarmtrakt fehlen durch eine gestörte Auswanderung von pluripotenten Zellen aus dem Neuralrohr die Nervenzellen. Dies führt in den ersten Lebenstagen zu einem Darmverschluss, der in weiterer Folge zu einem Megacolon führt. Die Fohlen müssen daraufhin euthanasiert werden. (36) Um das verhindern zu können, ist es wichtig, Rassen in denen Frame Overos vorkommen, vorzeitig testen zu lassen, ob sie das Overo-Lethal-White Gen tragen. Das Gen wird in über 90 % der Frame-Overos nachgewiesen. (36)

Das Lethal-White-Foal-Syndrom zeigte einige Parallelen zum Waardenburg Syndrom. Bei der Form IV des Waardenburg Syndroms kann ein Morbus Hirschsprung vorliegen. Dabei handelt es sich um ein kongenitales Fehlen der Ganglionzellen des Plexus Myentericus (Aganggliose). Dies führt zu einer spastischen Verengung des betroffenen Darmabschnitts. In weiterer Folge kommt es zur Dilatation der prästenotischen Dickdarmareale und zu einem Megacolon. Auch hier liegt wie beim Overo-Lethal-White-Foal Syndrom eine gestörte Migration der Nervenzellen und eine Mutation im Endothelin-B-Rezeptor vor. (21, 28, 39, 40)

Zusammenfassend scheint es wahrscheinlich, dass die Aufgaben der Melanozyten nicht nur in der Pigmentproduktion liegen. Wir vermuten, dass diese auch eine wichtige Rolle in der Angiogenese der Aderhaut spielen.

Obwohl die aktuelle Forschung die Ergebnisse im Detail nicht erklären kann, scheint es, dass ein Fehlen von Melanozyten einen signifikanten Einfluss auf die Organogenese hat und vaskularisierte Strukturen sowie beispielsweise die Choroidea und Stria vascularis des Innenohres beeinflusst.

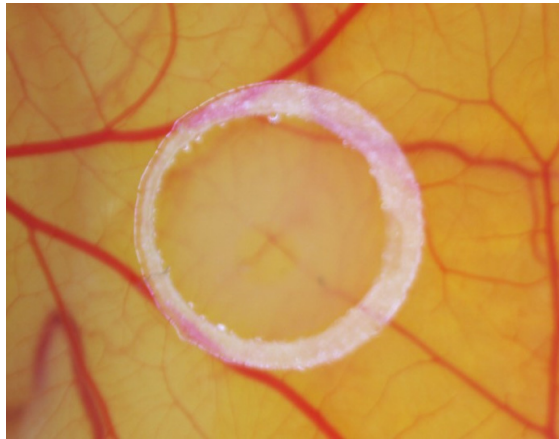
Mit dieser Hypothese möchten wir weitere Erkenntnisse in der Funktion der Melanozyten im Innenohr und der Choroidea fördern. Wir glauben, dass zu diesem Thema noch viel Forschungspotential vorhanden ist und in Zukunft noch weitere neue Erkenntnisse möglich sind. Dadurch erhoffen wir uns neue Behandlungsmöglichkeiten:

Einerseits könnten durch die Suppression der melanozyteninduzierten Angiogenese neue therapeutische Möglichkeiten für die feuchte Makuladegeneration entstehen, andererseits könnte eine Stimulation genutzt werden, um Mikrophthalmi oder gefäßbedingte Innenohrschwerhörigkeiten wie beim Waardenburg Syndrom zu behandeln.

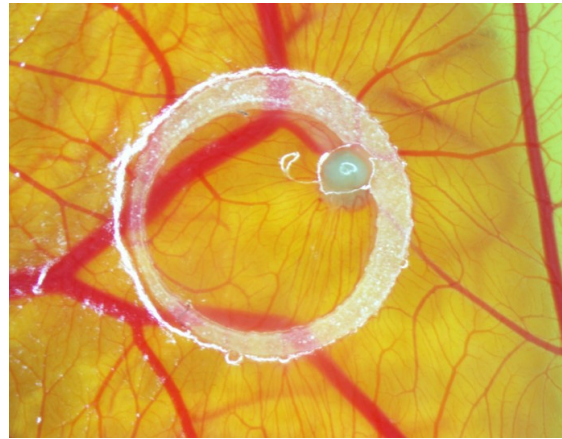
Aufgrund dieser potentiellen therapeutischen Möglichkeiten haben wir ein weiteres Projekt geplant:

Dazu soll die angiogenetische Potenz von Zellen mit Hilfe des CAM Modells (Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model) untersucht werden. Dabei werden Melanozyten aus unterschiedlichem Gewebe (juvenile Vorhaut, Aderhaut und adulte cutane Haut) isoliert, charakterisiert und auf die Chorionallantois Membran von Hühnereiern aufgetragen (Abbildung 28-31). Die Membran ist ein extraembryonales Gebilde unter der Eischale des sich entwickelnden Hühnerembryos. Diese ist für den Gasaustausch verantwortlich und deshalb stark vaskularisiert. In diesem System können Faktoren, die für die Angiogenese stimulierend oder inhibierend wirken, sehr gut studiert werden, da diese direkt beobachtet werden können.

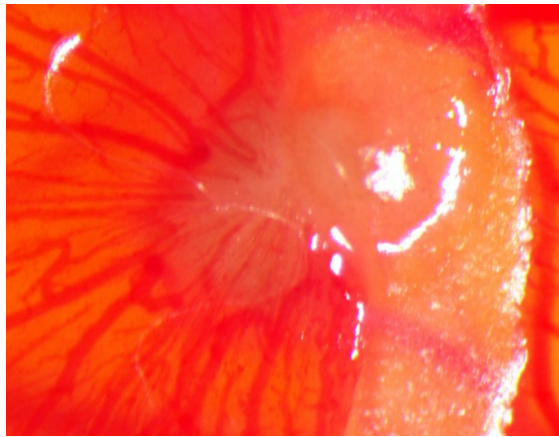
MCP-1 ist ein Monozyten-chemotaktisches Protein-1 und ist auch als Chemokin (C-C-Motiv) - Ligand 2 bekannt. Dieses Protein soll bestimmt werden, um die Biologie von Melanozyten in unterschiedlichen Entnahmeorten besser darstellen zu können. Der Transport von Monozyten zu Entzündungszellen wird von MCP-1 reguliert. Außerdem regelt das Protein die VEGF Expression und regt die Migration und Proliferation von Endothelzellen an. (41, 42)



**Abbildung 28: CAM Tag 0**



**Abbildung 29: CAM Tag 2**



**Abbildung 30: CAM Tag 3**



**Abbildung 31: CAM Tag 6**

## 5 Anhang

AMT DER STEIERMÄRKISCHEN LANDESREGIERUNG

Abteilung 8 Gesundheit, Pflege und Wissenschaft

Dr. Christoph Schwab  
Universitäts-Augenklinik  
Auenbruggerplatz 4  
8036 Graz

GZ: ABT08GP-116220/2017-2

Ggst.: Angiographie- und Optische Kohärenz Tomographie, Anfrage,  
Christoph Schwab, Untersuchung eines Hundes

Sehr geehrter Herr Dr. Schwab!

Das Amt der Steiermärkischen Landesregierung, Fachabteilung Gesundheit und Pflegemanagement, teilt zu Ihrer Anfrage vom 21. August 2017 betreffend die bei Ihrem Hund geplante Angiographie und Optische Kohärenz Tomographie zur Untersuchung der Netzhaut und ihrer einzelnen Schichten mit, dass es sich dabei aus ha. Sicht nicht um einen Tierversuch gemäß § 2 des Bundesgesetzes über Versuche an lebenden Tieren (Tierversuchsgesetz 2012, BGBl I Nr. 114/2012) handelt. Die Untersuchung entspricht einer prophylaktischen, diagnostischen und therapeutischen Maßnahme, die primär bzw. überwiegend der Behandlung eines einzelnen Hundes und nicht vorrangig dem Erkenntnisgewinn dient und ist somit als nichtexperimentelle veterinärmedizinische klinische Praktik zu werten.

Da es wissenschaftliche Berichte gibt, welche die gute Verträglichkeit dieser Untersuchungsmethode - auch beim Hund – bestätigen und die Untersuchung unter Narkose erfolgt, sind keine unnötigen Schmerzen, Leiden und Schäden für das Tier zu erwarten.

Mit freundlichen Grüßen  
Für den Landeshauptmann  
Der Fachabteilungsleiter i.V.

Dr. Peter Wagner  
(elektronisch gefertigt)

8010 Graz Friedrichgasse 9  
DVR 0087122 • UID ATU37001007 • Landes-Hypothekenbank Steiermark: IBAN AT375600020141005201 • BIC  
HYSTAT2G

EB\_1 V1.1



Das Land  
Steiermark

→ Fachabteilung Gesundheit  
und Pflegemanagement

Referat Veterinärdirektion/  
öffentliches Veterinärwesen

Bearb.: Mag. Karoline Schlögl  
Tel.: +43 (316) 877-4844  
Fax: +43 (316) 877-3373  
E-Mail: veterinaerwesen@stmk.gv.at

Bei Antwortschreiben bitte  
Geschäftszeichen (GZ) anführen

Graz, am 23.08.2017

Das elektronische Original dieses Dokumentes wurde erteilt.  
Hinweise zur Fälschung finden Sie unter <https://as.stmk.gv.at>

Abbildung 32: Genehmigung Untersuchung Merle Hund

## 6 Quellen Abbildungen

Abbildung 1: Archiv Augenlinik Graz .....	1
Abbildung 2: Privatgrafik .....	5
Abbildung 3: Privataufnahme .....	6
Abbildung 4: Privataufnahme .....	7
Abbildung 5: Privataufnahme .....	7
Abbildung 6: Privataufnahme .....	7
Abbildung 7: Privataufnahme .....	7
Abbildung 8: Privataufnahme .....	7
Abbildung 9: Privataufnahme .....	8
Abbildung 10: Privataufnahme .....	8
Abbildung 11: Privataufnahme .....	9
Abbildung 12: Privataufnahme .....	10
Abbildung 13: Archiv Augenlinik Graz .....	13
Abbildung 14: Privataufnahme .....	15
Abbildung 15: Privataufnahme .....	15
Abbildung 16: Privataufnahme .....	15
Abbildung 17: Privataufnahme .....	15
Abbildung 18: Privataufnahme .....	16
Abbildung 19: Privataufnahme .....	20
Abbildung 20: Privataufnahme .....	21
Abbildung 21: Privataufnahme .....	23
Abbildung 22: Privataufnahme .....	23
Abbildung 23: Privataufnahme .....	24
Abbildung 24: Privataufnahme .....	24
Abbildung 25: Wikipedia. Poulain yeux bleus. <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Poulain_yeux_bleus_1.jpg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Poulain_yeux_bleus_1.jpg</a> : [Zugriff am 10.06.2018] .....	28
Abbildung 26: Wikipedia. Splashwhitemare. <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Splashwhitemare2.jpg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Splashwhitemare2.jpg</a> : [Zugriff am 10.06.2018] .....	29

Abbildung 27: Wikipedia. Overo2. <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Overo2.jpg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Overo2.jpg</a> : [Zugriff am 10.06.2018]. .....	29
Abbildung 28: Privataufnahme .....	32
Abbildung 29: Privataufnahme .....	32
Abbildung 30: Privataufnahme .....	32
Abbildung 31: Privataufnahme .....	32
Abbildung 32: Privatdokument.....	33

## 7 Literaturverzeichnis

1. Adini I, Ghosh K, Adini A, Chi ZL, Yoshimura T, Benny O, et al. Melanocyte-secreted fibromodulin promotes an angiogenic microenvironment. *J Clin Invest.* 2014;124(1):425-36.
2. Klinckmann G, Koniszewski G, Wegner W. Light-Microscopic Investigations on the Retinae of Dogs Carrying the Merle Factor. *Journal of Veterinary Medicine Series A.* 1986;33(1-10):674-88.
3. Steel KP. Inherited hearing defects in mice. *Annu Rev Genet.* 1995;29:675-701.
4. Schwab C, Wackernagel W, Grinninger P, Mayer C, Schwab K, Langmann G, et al. A Unifying Concept of Uveal Pigment Cell Distribution and Dissemination Based on an Animal Model: Insights into Ocular Melanogenesis. *Cells Tissues Organs.* 2016;201(3):232-8.
5. Grehn F. *Augenheilkunde: Springer Berlin Heidelberg; 2011.*
6. Bowling B, Burk R, Tönjes S. *Kanski's Klinische Ophthalmologie: Ein systematischer Ansatz: Elsevier Health Sciences; 2017.*
7. Lang GK, Lang GE. *Augenheilkunde essentials: Thieme; 2015.*
8. Sadler TW, Langman J. *Medizinische Embryologie: die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen: Thieme; 2003.*
9. Kontos CD. More than skin deep: connecting melanocyte pigmentation and angiogenic diseases. *J Clin Invest.* 2014;124(1):76-9.
10. bowling b. *Kanski's Clinical Ophthalmology 2011.*
11. Cronemberger S, Calixto N, Freitas HL. Nevus of Ota: clinical-ophthalmological findings. *Revista Brasileira de Oftalmologia.* 2011;70:278-83.
12. Terheyden P, Rickert S, Kämpgen E, Münnich S, Hofmann UB, Bröcker E-B, et al. Nävus Ota und Aderhautmelanom. *Der Hautarzt.* 2001;52(9):803-6.
13. Singh AD, Kalyani P, Topham A. Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology.* 2005;112(10):1784-9.
14. Singh AD, Bergman L, Seregard S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol Clin North Am.* 2005;18(1):75-84, viii.

15. Zimmerman LE, McLean IW, Foster WD. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumour cells. *Br J Ophthalmol.* 1978;62(6):420-5.
16. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science.* 2010;330(6009):1410-3.
17. Tateishi C, Ozawa T, Shirakawa M, Tsuruta D, Ishii M, Harada T. Bilateral nevus of Ota: a rare manifestation congenital type in a boy. *Osaka City Med J.* 2011;57(1):45-8.
18. Nork TM, Shihab ZM, Young RS, Price J. Pigment distribution in Waardenburg's syndrome: a new hypothesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1986;224(6):487-92.
19. Milunsky JM. Waardenburg Syndrome Type I. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews(R).* Seattle (WA)1993.
20. Shields CL, Nickerson SJ, Al-Dahmash S, Shields JA. Waardenburg syndrome: iris and choroidal hypopigmentation: findings on anterior and posterior segment imaging. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(9):1167-73.
21. Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. *J Med Genet.* 1997;34(8):656-65.
22. Dourmishev AL, Dourmishev LA, Schwartz RA, Janniger CK. Waardenburg syndrome. *Int J Dermatol.* 1999;38(9):656-63.
23. Clark LA, Wahl JM, Rees CA, Murphy KE. Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1376-81.
24. Schwab C, Zalaudek I, Mayer C, Riedl R, Wackernagel W, Juch H, et al. New insights into oculodermal nevogenesis and proposal for a new iris nevus classification. *Br J Ophthalmol.* 2015;99(5):644-9.
25. Cattanach B. The 'dalmatian dilemma': white coat colour and deafness. *J Small Anim Pract.* 1999;40(4):193-4, 6, 8-200.
26. Strain GM. Aetiology, prevalence and diagnosis of deafness in dogs and cats. *Br Vet J.* 1996;152(1):17-36.

27. Pellegrini M, Shields CL, Arepalli S, Shields JA. Choroidal melanocytosis evaluation with enhanced depth imaging optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2014;121(1):257-61.
28. Metallinos DL, Bowling AT, Rine J. A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung disease. *Mamm Genome*. 1998;9(6):426-31.
29. Pruvost M, Bellone R, Benecke N, Sandoval-Castellanos E, Cieslak M, Kuznetsova T, et al. Genotypes of predomestic horses match phenotypes painted in Paleolithic works of cave art. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(46):18626-30.
30. Terry RB, Bailey E, Lear T, Cothran EG. Rejection of MITF and MGF as the genes responsible for appaloosa coat colour patterns in horses. *Anim Genet*. 2002;33(1):82-4.
31. Sandmeyer LS, Breaux CB, Archer S, Grahn BH. Clinical and electroretinographic characteristics of congenital stationary night blindness in the Appaloosa and the association with the leopard complex. *Vet Ophthalmol*. 2007;10(6):368-75.
32. Hauswirth R, Haase B, Blatter M, Brooks SA, Burger D, Drogemuller C, et al. Mutations in MITF and PAX3 cause "splashed white" and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS Genet*. 2012;8(4):e1002653.
33. Harland MM, Stewart AJ, Marshall AE, Belknap EB. Diagnosis of deafness in a horse by brainstem auditory evoked potential. *Can Vet J*. 2006;47(2):151-4.
34. Wikipedia. Poulain yeux bleus. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Poulain\\_yeux\\_bleus\\_1.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Poulain_yeux_bleus_1.jpg): [Zugriff am 10.06.2018].
35. Wikipedia. Splashwhitemare. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Splashwhitemare2.jpg>: [Zugriff am 10.06.2018].
36. Lightbody T. Foal with Overo lethal white syndrome born to a registered quarter horse mare. *Can Vet J*. 2002;43(9):715-7.
37. Wikipedia. Overo2. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Overo2.jpg>: [Zugriff am 10.06.2018].

38. Kashima T, Akiyama H, Kishi S. Asymmetric severity of diabetic retinopathy in Waardenburg syndrome. *Clin Ophthalmol*. 2011;5:1717-20.
39. Yang GC, Croaker D, Zhang AL, Manglick P, Cartmill T, Cass D. A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS); a horse variant of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*. 1998;7(6):1047-52.
40. Linda M, D. GL, Andrew K, Marge C, Bruce BJ, B. MER. Overo lethal white foal syndrome: Equine model of aganglionic megacolon (Hirschsprung disease). *American Journal of Medical Genetics*. 1990;36(3):336-40.
41. Godwin LS, Castle JT, Kohli JS, Goff PS, Cairney CJ, Keith WN, et al. Isolation, culture, and transfection of melanocytes. *Curr Protoc Cell Biol*. 2014;63:1 8 1-20.
42. Adini I, Adini A, Bazinet L, Watnick RS, Bielenberg DR, D'Amato RJ. Melanocyte pigmentation inversely correlates with MCP-1 production and angiogenesis-inducing potential. *FASEB J*. 2015;29(2):662-70.