

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin im Zentrum für Frauen-,
Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Professor Dr. med. K. Ullrich

Arbeitsgruppe Pädiatrische Nephrologie

Leiter: Professor Dr. med. D. E. Müller-Wiefel

**Mutationsanalyse von *EYAI* in einer unselektierten Kohorte
von 135 Kindern mit kongenitalen Anomalien der Niere und
ableitenden Harnwege (CAKUT)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg
vorgelegt von

Anne Katrin Berger
aus Bad Soden am Taunus

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 11.09.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß: der/die Vorsitzende: Prof. Dr. D.-E. Müller-Wiefel

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. T. Braulke

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Gal

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Arbeitshypothese und Fragestellung | 6 |
| 2 | Einleitung | 7 |
| 2.1 | Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege | 7 |
| 2.1.1 | Spektrum der Fehlbildungen | 7 |
| 2.1.2 | Klinik | 8 |
| 2.1.3 | Nephrogenese | 9 |
| 2.1.3.1 | Embryologie der Niere | 9 |
| 2.1.3.2 | Die Ureterknospe | 10 |
| 2.2 | CAKUT-Pathogenese | 12 |
| 2.2.1 | Obstruktive Pathomechanismen | 12 |
| 2.2.2 | Die Ureterknospe im Mittelpunkt | 12 |
| 2.2.3 | Molekulare Kenntnisse der Nephrogenese | 14 |
| 2.3 | Das Gen <i>EYAI</i> | 16 |
| 2.3.1 | Überblick | 16 |
| 2.3.2 | <i>EYAI</i> assoziierte Erkrankungen | 17 |
| 2.3.3 | <i>EYAI</i> -Struktur | 19 |
| 2.3.4 | Funktion und Expression | 21 |
| 2.4 | Aufgabenstellung | 22 |
| 3 | Material und Methoden | 23 |
| 3.1 | Material | 23 |
| 3.1.1 | Geräte | 23 |
| 3.1.2 | Chemikalien | 24 |
| 3.1.2.1 | Polymerasekettenreaktion | 24 |
| 3.1.2.2 | Agarosegel-Elektrophorese | 24 |
| 3.1.2.3 | Einzelstrangkonnformationsanalyse | 24 |
| 3.1.2.4 | Sequenzierung | 25 |
| 3.1.3 | Synthetische Oligonukleotide (Primer) | 25 |
| 3.2 | Methoden | 26 |
| 3.2.1 | Einleitung zur Methodik | 26 |
| 3.2.2 | Polymerasekettenreaktion | 27 |
| 3.2.3 | Agarosegel-Elektrophorese | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.4 Einzelstrangkonnformationsanalyse..... | 29 |
| 3.2.5 Sequenzierung..... | 31 |
| 3.3 Statistische Auswertung..... | 32 |
| 3.3.1 Berechnung der Allelfrequenzen..... | 33 |
| 3.3.2 Anwendung der Hardy-Weinberg-Regel..... | 33 |
| 3.3.3 Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit..... | 34 |
| 3.4 Patienten- und Kontrollkohorte..... | 35 |
| 3.4.1 Kontrollkohorte..... | 35 |
| 3.4.2 Patientenkollektiv..... | 36 |
| 4 Ergebnisse..... | 38 |
| 4.1 EYA1-Mutationen..... | 38 |
| 4.1.1 Exon 12: 1319 G > A; R440Q..... | 38 |
| 4.2 Polymorphismen in EYA1..... | 41 |
| 4.2.1 Exon 1: 58 C > G ; P20A..... | 42 |
| 4.2.2 Exon 7: 813 A > G; T271T..... | 44 |
| 4.2.3 Exon 12: 1278 C > T; G426G..... | 45 |
| 4.2.4 Exon 16:1755 T > C; H585H..... | 46 |
| 4.2.5 IVS 15-23; A > G..... | 48 |
| 4.2.6 IVS 15-3; C > T..... | 49 |
| 4.2.7 IVS 15-55; G > A..... | 50 |
| 5 Diskussion..... | 52 |
| 5.1 Polymorphismen in EYA1..... | 52 |
| 5.1.1 Einzelnukleotid-Polymorphismen..... | 52 |
| 5.1.2 Die Bedeutung von SNPs als genetische Marker..... | 53 |
| 5.1.3 PM P20A..... | 54 |
| 5.1.4 PM H585H und IVS 15-23; A > G..... | 54 |
| 5.1.4.1 Linkage Disequilibrium..... | 54 |
| 5.1.4.2 Statistische Auswertung..... | 55 |
| 5.1.4.3 Potentielle Konsequenzen von Haplotyp 1755 C / IVS 15-23 G..... | 56 |
| 5.1.4.4 Intronische Sequenzvariationen..... | 57 |
| 5.1.4.5 Weiterführende Überlegungen..... | 59 |
| 5.1.5 PM IVS 15-3; C > T..... | 61 |
| 5.1.6 PM T271T; PM G426G und IVS 15-55 G > A..... | 61 |
| 5.2 Mutationen in EYA1..... | 61 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2.1 | Überblick..... | 61 |
| 5.2.2 | Mutation R440Q..... | 63 |
| 5.2.2.1 | Der assoziierte klinische Phänotyp | 63 |
| 5.2.2.2 | Molekulargenetischer Hintergrund | 63 |
| 5.2.2.3 | Bedeutung der EYA-Domäne..... | 65 |
| 5.2.2.4 | Funktionelle Konsequenzen von R440Q | 66 |
| 5.3 | Bewertung und Konsequenzen der Ergebnisse | 68 |
| 6 | Zusammenfassung | 69 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 70 |
| 8 | Anhang | 78 |
| 8.1 | Abkürzungen | 78 |
| 8.2 | Abbildungen | 79 |
| 8.3 | EYA1-Referenzsequenz..... | 80 |
| 8.4 | Danksagung..... | 82 |
| 8.5 | Lebenslauf..... | 83 |
| 8.6 | Eidesstattliche Erklärung | 84 |

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Angeborene Fehlbildungen der Niere und ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidney and urinary tract*, CAKUT) bilden die Hauptursache für chronisches Nierenversagen im Kindesalter. Zu den für CAKUT charakteristischen Krankheitsbildern zählen unter anderem renale Malformationen wie Nierenagenesie, Nierenhypoplasie oder -dysplasie sowie Fehlbildungen der ableitenden Harnwege und Anomalien der Blase und der Urethra.

In der Mehrzahl der Fälle treten Manifestationen des CAKUT-Komplexes sporadisch auf, es existieren jedoch auch familiäre Formen, deren Pathogenese durch genetische Faktoren beeinflusst wird. Neben einer Vielzahl an Kandidatengenen, deren Relevanz für familiäre CAKUT-Formen derzeit in der Diskussion steht, existiert eine Anzahl bereits bekannter Gene, die mit vererbten und teilweise syndromalen Nierenentwicklungsstörungen assoziiert sind. Zu dieser Gruppe gehört *EYA1* (*eyes absent 1*), ein nukleärer Transkriptionsmodulator, der an der Regulation induktiver Signale während der frühen Nephrogenese beteiligt ist. Mutationen in *EYA1* liegen dem autosomal-dominant vererbten Branchio-Oto-Renalen (BOR)-Syndrom zugrunde, das durch die variable Kombination von Fehlbildungen der Nieren, Branchialbögen und Ohren gekennzeichnet ist. In seltenen Fällen verursachen *EYA1*-Mutationen okuläre Anomalien. Der klinische Ausprägungsgrad innerhalb einer vom BOR-Syndrom betroffenen Familie kann extrem variabel sein und von leichten morphologischen Malformationen der betroffenen Organe bis hin zum kompletten Funktionsverlust reichen. Als renale Beteiligung finden sich bei *EYA1*-Mutationsträgern häufig Nierenagenesie, -hypo oder -dysplasie sowie Nierenkelchzysten und ureteropelvine Obstruktionen.

Ob Mutation in *EYA1* neben dem BOR-Syndrom auch für non-syndromale CAKUT-Fälle verantwortlich sein können, ist bislang nicht bekannt und soll im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit untersucht werden. Zur Evaluierung der Häufigkeit von *EYA1*-Mutationen bei CAKUT wurden 135 unselektierte pädiatrische CAKUT-Patienten einem Mutationsscreening mittels PCR-SSCP-Analyse und Direktsequenzierung zugeführt. Hypothese ist, daß *EYA1*-Mutationen zu einem nicht unerheblichen Prozentsatz bei Kindern mit isolierten CAKUT-Formen an der Pathogenese beteiligt sind.

2 Einleitung

2.1 Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege

Angeborene Fehlbildungen der Niere und ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidney and urinary tract*, CAKUT) werden bei etwa drei bis sechs von eintausend Geburten beobachtet [Limwongse *et al.*, 1999] und gehören somit beim Menschen zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen. Bezogen auf die kindliche Mortalität sind sie für etwa 6% aller Todesfälle verantwortlich [ebenda]. Neben den isolierten CAKUT-Fällen können Kombinationen von renalen und urogenitalen Malformationen mit Anomalien anderer Organsysteme bei mehr als 500 bekannten syndromalen Erkrankungen gefunden werden.

2.1.1 Spektrum der Fehlbildungen

Der Begriff CAKUT subsummiert eine große Gruppe von Malformationen aus der nephrologischen und urologischen Pädiatrie, die ein breites anatomisches Spektrum aufweisen und zu einer Vielzahl von klinischen Symptomen und Krankheitsverläufen führen können.

Entwicklungsstörungen der Nieren können zu aberranten Lageverhältnissen (ektopy Niere, z.B. Beckenniere) oder Fusionsanomalien (z.B. Hufeisenniere) führen, die funktionell meist nicht bedeutsam sind und häufig als Zufallsbefunde diagnostiziert werden.

Zu den Anlagestörungen der Nieren zählen die renale Agenesie und Hypoplasie. Die renale Agenesie bleibt bei einseitigem Vorkommen (1: 450 bis 1: 1800 Geburten) durch Kompensation der kontralateralen Niere häufig asymptomatisch, bei bilateralem Auftreten ist sie jedoch nicht mit dem extrauterinen Leben vereinbar und führt zum Tod des Neugeborenen. Als hypoplastisch werden Nieren bezeichnet, die verkleinert imponieren und histologisch eine verminderte Anzahl an Glomeruli und Nephronen aufweisen. Bei beidseitigem Vorliegen kann klinisch bereits frühzeitig eine progrediente Nierenfunktionseinschränkung mit Dialysepflichtigkeit eintreten. Eine zur progredienten Niereninsuffizienz führende Sonderform der Hypoplasie ist die Oligomeganephronie, die durch ein stark erniedrigtes Nierengewicht und ausgeprägte

Verminderung der Nephronanzahl mit Hypertrophie der Restnephronen gekennzeichnet ist.

Aus diffusen oder segmental verteilten Differenzierungsstörungen des Nierengewebes entstehen renale Dysplasien, die in zystischen (multizystische Nierendysplasie als Maximalvariante) oder hypoplastischen Phänotypen resultieren. Die unilaterale multizystische Nierendysplasie zählt zu den häufigsten angeborenen Nierenfehlbildungen. Der Grad der Niereneinschränkung ist abhängig vom Ausmaß des Parenchymschadens und vom uni- oder bilateralen Befall.

Obstruktionen und Anomalien der ableitenden Harnwege, die ureteropelvin (Ureterabgangsstenose, primärer Megaureter), ureteral (Ureterstenose, Ureterektomie), oder urethral (Urethralklappen) lokalisiert sein können und auch als obstruktive Uropathien bezeichnet werden, können zur Hydronephrose führen, der häufigsten Ursache einer Nierenvolumenvergrößerung bei Neugeborenen [Brown *et al.*, 1987]. Abflußstörungen im Bereich der Ureteren und ihrer Mündungen können uni- oder bilateral auftreten, distale Störungen wie Urethralklappen manifestieren sich immer mit bilateraler Hydronephrose.

Als vesikoureteraler Reflux (VUR) wird der durch ektope Uretereinmündung verursachte retrograde Harnfluß von der Harnblase in den Ureter hinein bezeichnet. Neben rezidivierenden Harnwegsinfekten können bei starker Ausprägung auch Nierenparenchymschäden und retardiertes renales Wachstum beobachtet werden. Weitere häufige Anomalien sind Dopplungsfehlbildungen von Niere und Harnleiter, die zu einem erhöhten Auftreten von Harnwegsinfekten führen können [Kapitel 2.1.1 nach Brandis *et Zimmerhackl*, 2000; Limwongse *et al.*, 1999; Michalk, 1995; Schärer, 2002].

2.1.2 Klinik

Trotz verbesserter pränataler Diagnosemöglichkeiten und großer Fortschritte in der frühen Behandlung [Kemper *et Müller-Wiefel*, 2001] bilden CAKUT und ihre Komplikationen durch Einschränkung der Nierenfunktion, arteriellen Hypertonus, Infektion und Steinbildung die Hauptursache für chronisches kindliches Nierenversagen mit all seinen schwerwiegenden Konsequenzen [Pope *et al.*, 1999]. In einer Studie mit über 1750 nordamerikanischen chronisch niereninsuffizienten Kindern und Jugendlichen konnten in 2/3 der Fälle CAKUT-Manifestationen nachgewiesen werden [Fivush *et al.*, 1998]; bei 351 niederländischen terminal niereninsuffizienten Kindern fanden sich zu

35% kongenitale strukturelle Anomalien [Miklovicova *et al.*, 2005]. Die klinische Symptomatik der von CAKUT betroffenen Patienten ist hoch variabel und zumeist abhängig vom Schweregrad der Veränderungen. Die von pädiatrisch-nephrologischen Patienten am häufigsten präsentierten Auffälligkeiten, die zur Diagnosestellung führen, sind abnormales Miktionsverhalten (Frequenz- und Volumenänderungen, Schmerzhaftigkeit, Kontrollverlust), pathologische Urinanalyse im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen, Schmerzen (führend bei akut-inflammatorischen Prozessen) und systemische Zeichen wie Ödeme, arterieller Hypertonus und Gedeihstörung [Yared *et Barakat*, 1990].

Es ist davon auszugehen, daß die Anzahl der von Fehlentwicklungen betroffenen Personen weit höher liegt als die der diagnostizierten und erkrankten, da die Krankheitsverläufe auch subklinisch bleiben können (z.B. durch Kompensation durch eine gesunde kontralaterale Niere) oder die Auffälligkeiten der Diagnose durch Ultraschall oder andere bildgebende Verfahren nur schwer zugänglich sind und nur selten eine Biopsie zur Verifizierung erfolgt.

Die genaue Pathogenese von CAKUT und ihr molekularer Hintergrund sind noch weitgehend unbekannt und nur zu Teilen erklärt. Auffällig und bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, daß CAKUT mit familiärer Häufung und inkompletter, variabler Penetranz des klinischen Phänotyps auftreten [Squiers *et al.*, 1987]. Dementsprechend kann für einen Teil der CAKUT-Fälle ein gemeinsamer genetischer Hintergrund, der zur Entwicklung dieser Ansammlung anatomischer Anomalien führt, angenommen werden. CAKUT werden im allgemeinen als polygenetisch verursachte Erkrankung betrachtet, es existieren jedoch auch Varianten mit monogenetischer Vererbung. Innerhalb der letzten Jahre wurde eine Reihe von Genen der Nephrogenese beschrieben, deren Mutationen als (Mit-)Auslöser für CAKUT identifiziert wurden [Abdelhak *et al.*, 1997a; Sanyanusin *et al.*, 1995; Ichiki *et al.*, 1995; Kirk *et al.*, 1994; Bingham *et al.*, 2002].

2.1.3 Nephrogenese

2.1.3.1 Embryologie der Niere

Das Anlagematerial der Harnorgane entsteht aus einem als intermediäres Mesoderm bezeichneten Abschnitt des mittleren Keimblattes. Aus dem vom Mesoderm gebildeten nephrogenen Strang entwickeln sich von kranial nach kaudal nacheinander die Vorniere und die Urniere, die involutiven Veränderungen unterliegen. Als Anlage der definitiven

Niere entsteht in zunächst pelvikaler Lokalisation die Nachniere (*Metanephros*), die sich aus einem als metanephrogenes Blastem bezeichneten Anteil des intermediären Mesoderms entwickelt.

In der dorsomedialen Wand des Urnierenganges bildet sich ab der vierten Entwicklungswoche proximal der Einmündung in die Kloake die sogenannte Ureterknospe aus. Sie wächst in dorsokranialer Richtung vor und dringt in das metanephrogene Blastem ein (**Abbildung 2.1**). Die Knospe als Anlage der ableitenden Harnwege wächst bis zum fünften Monat in die Peripherie vor, bis sich die Nierenpapillen über etwa 20 Papillengänge auf ca. 65 000 Sammelrohre im Nierenmark aufgezweigt haben. Da dem verzweigenden Vorwachsen der Ureterknospe in das metanephrogene Blastem hinein in der Genese von CAKUT eine entscheidende Rolle beigemessen wird, werden Details zu diesem Abschnitt der Morphogenese im Anschluß genauer ausgeführt.

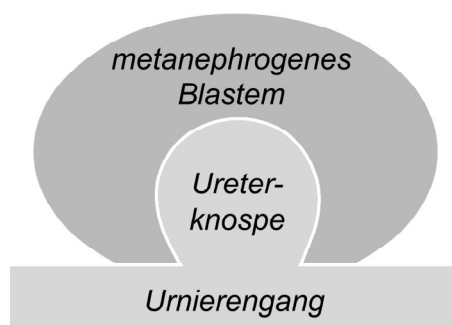


Abbildung 2.1:
Ureterknospung

Die aus dem Urnierengang entstehende Uretervorwölbung (Ureterknospe) wächst gegen das metanephrogene Blastem vor und nimmt Kontakt mit ihm auf.

2.1.3.2 Die Ureterknospe

Die Aussprossung der Knospe wird ab der fünften Embryonalwoche durch Interaktion mit dem umgebenden Blastemgewebe initiiert, durch dessen anhaltende Signalgebung das weitere Vorwachsen und Eindringen hervorgerufen wird [Saxen *et al.*, 1987]. Durch einen wechselseitigen induktiven Prozeß bedingt die vordringende Ureterknospe die Etablierung zweier Zelllinien im Mesenchym: Vorläuferzellen des Stroma und das nephrogene Mesenchym [Aufderheide *et al.*, 1987].

Aus Letzterem entwickeln sich durch von der Knospe induzierte mesenchymoepitheliale Transformation die Glomeruli, proximale und distale Tubuli

sowie die Henle-Schleife. Durch einen Prozeß von Zellkondensation mit epithelialer Differenzierung entwickeln sich S-förmige Körper, die zum Glomerulum differenzieren und Kontakt zum ableitenden System aufnehmen. Durch diese Konnektion entsteht die funktionelle Einheit der Niere: das Nephron.

Die Entwicklung und Ausbildung des harnableitenden Systems erfolgt repetitiv nach einem determinierten Muster. Zunächst erweitert sich der führende Teil der Ureterknospe an seiner Spitze zur sogenannten *Ampulla*. Diese separiert sich im folgenden dichotom, um sich nach Elongation der Tochterabschnitte an den Spitzen wiederum zu *Ampullae* zu erweitern [Potter, 1972]. Jeder so entstehende Zweig induziert die Entwicklung eines Nephrons. Nach der 15. Verzweigungsgeneration induzieren die letzten und in ihrer induktiven Kapazität gesteigerten *Ampullae* die Entwicklung von vier bis sieben in ein terminales Sammelrohr drainierenden Nephronen, die sich in Arkadenform organisieren [Saxen *et* Sariola, 1987]. Es erfolgt eine weitere Ausdifferenzierung und Spezialisierung des harnableitenden Systems nach peripherer und zentraler Lokalisation und der damit verbundenen späteren Funktion.

In den letzten Jahren sind vermehrt Erkenntnisse über die Faktoren, welche die Nierenentwicklung prägen und beeinflussen, gewonnen worden. Ein Wechselspiel aus den zellulären Ereignissen und Gegenpolen Zellwachstum und Apoptose reguliert die Entwicklung und Ausformung des embryonalen harnableitenden Systems. So finden sich in den *Ampullae* der Aufzweigungen hohe Raten von Zellproliferationsvorgängen, was in den geraden Anteilen der Ausknospungen nicht der Fall ist. In den inneren Segmenten, die zum Nierenbecken und Kelchsystem werden, ist in den späteren Stadien kein Anzeichen für Wachstum zu finden; hier herrschen apoptotische Vorgänge vor [Piscione *et* Rosenblum, 2002].

Durch genetische Studien an betroffenen Patienten und Entwicklung von Mausmodellen konnte eine Reihe von Genen für Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie von Signalmolekülen der Zelloberfläche als für die Morphogenese der intrarenalen Verzweigung wichtige Regulatoren identifiziert werden. Diese Genprodukte mediiieren durch ein komplexes Netzwerk aus gegenseitiger positiver und negativer Rückkopplung die Zell-zu-Zell-Interaktion von Ureterknospe, nephrogenem Mesenchym und Stromazellen. Für einen Teil von ihnen besteht der Nachweis einer Beteiligung an Nierenentwicklungsstörungen beim Menschen (s.u.).

2.2 CAKUT-Pathogenese

Es existieren diverse theoretische Ansätze, die zur Erklärung der Genese des CAKUT-Komplexes herangezogen werden. Innerhalb der letzten Jahre hat sich, vermutlich durch die Entwicklung verschiedener CAKUT-Mausmodelle bedingt, der Schwerpunkt der Diskussion auf genetische Defekte verlagert, die die Interaktion zwischen dem metanephrogenem Mesenchym und der Ureterknospe betreffen.

2.2.1 Obstruktive Pathomechanismen

Das Fehlen geeigneter Tiermodelle führte häufig dazu, daß die humanen CAKUT-Morphologien mit den bei jungen Tieren nach chirurgischer Ureterligation *ex utero* nachzuweisenden strukturellen Veränderungen gleichgesetzt wurden. Die Relevanz solcher Experimente bleibt unklar, da die Nephrogenese der Tiere zum Zeitpunkt der Intervention postnatal weitestgehend abgeschlossen ist, während sie bei den häufig bereits sonographisch *in utero* diagnostizierten humanen CAKUT noch durchlaufen wird. Auch stimmen die histologischen parenchymatösen Veränderungen dieser Modelle nicht mit jenen in charakteristischer Weise bei humanen CAKUT gefundenen überein. In Schafen mit experimenteller fetaler Obstruktion wurde eine Beeinflussung des renalen Wachstums und der Ausdifferenzierung des Parenchyms beobachtet [Peters *et al.*, 1992]; und auch Strikturen durch externe Kompression benachbarter Gefäße sind als CAKUT auslösende Faktoren beschrieben worden [Allen, 1970; Barnett *et al.*, 1962]. Die Rolle, die der mechanischen Obstruktion bei der Entstehung von renalen Parenchymschäden bei humanen CAKUT zukommt, wird insgesamt kritisch bewertet, da es beim Menschen keine Korrelation zwischen Schwere der Obstruktion und Ausmaß der parenchymatösen Schäden und Anomalien gibt [Stephens *et al.*, 1996].

2.2.2 Die Ureterknospe im Mittelpunkt

Die Entwicklung der Niere und des ableitenden Harntrakts erfordert die korrekte Interaktion zwischen Ureterknospe und metanephrogenem Blastem. Da diese Interaktion sowohl der Differenzierung des Nierenparenchyms wie auch der regulären Entwicklung des harnableitenden Systems zugrunde liegt, führen Störungen in diesem initialen Entwicklungsschritt zu Konsequenzen auf beiden Seiten: es folgen renalparenchymatöse Schädigung und Malformationen des Harntrakts.

Eine dieser Überlegung folgende Theorie wurde von Mackie und Stephens 1975 formuliert (*bud theory*). Sie basiert auf den Beobachtungen, daß eine morphologische Korrelation zwischen der Lokalisation der ureteralen Blaseneinmündung und der Schwere der renalen Hypoplasie oder Dysplasie sowie anderen Ureteranomalien (vesikoureteraler Reflux, primärer Megaureter) besteht. Diesen Anomalien liegt eine fehlgeleitete Aussprossung der Ureterknospe aus dem Urnierengang zugrunde. Bei regulärer Entwicklung verlagert sich die ureterale Einmündung an eine laterale und kaudale Position in das *Trigonum vesicae*, das sich durch Migration und Inkorporation des terminalen ureteralen Segmentes in den *Sinus urogenitalis* hinein entwickelt. Bei orthotop erfolgter Ureterknospung wird bei diesem Vorgang die Uretereinmündung an oben beschriebene Position verlagert, bei ektopter Aussprossung erfolgt konsekutiv eine falsche Plazierung. Je nachdem, ob die Ektopie kranial oder kaudal gelegen ist, resultieren unterschiedliche Anomalien. Bei kaudaler Aussprossung erfolgt die Inkorporation der Uretereinmündung an einer elongierten Ecke des *Trigonum*, was zur Verkürzung der Ureterstrecke im submukösen Blasentunnel führt. Der reguläre Verlauf des Ureters verhindert durch Kompression während der Miktion einen Rückstrom des Urins in den Ureter. Durch Verlust dieses funktionellen Ventilmechanismus bei kaudaler Ektopie resultiert ein vesikoureteraler Reflux. Bei Aussprossung an kranialer Lokalisation entstehen dementsprechend auch ektope Uretereinmündungen, was häufig zu obstruktiven Erscheinungen führt. Eine weitere wichtige Konsequenz des fehlerhaften Aussprossens ist der Kontakt der Ureterknospe mit nur gering differenziertem und spärlich vorhandenem Mesenchym. Dieses mangelhafte Mesenchym vermag sich nicht in erforderlichem Ausmaß zu entwickeln und bildet den Vorläufer für spätere renale Malformationen, wie z.B. Hypoplasie oder Dysplasie (**Abbildung 2.2**).

Dies bedeutet, daß die Nierenbeteiligung bei CAKUT-Patienten wahrscheinlich nicht (nur) auf mechanische Schädigungen zurückzuführen ist, sondern bereits embryologisch durch fehlerhafte Parenchymanlage determiniert werden. Diese Überlegung kann die Tatsache erklären, daß bei vielen Patienten trotz früher chirurgischer Intervention bei Obstruktion ein Progreß des Nierenschadens nicht zu verhindern ist [Piscione *et* Rosenblum, 2002].

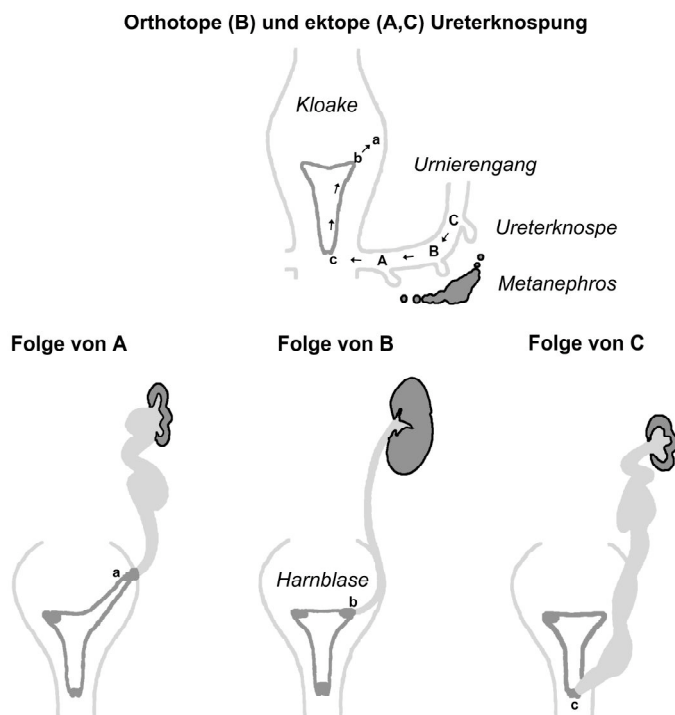


Abbildung 2.2:
Die bud theory

A: Kaudale ektope Ureterknospung: durch proximalen Kontakt der Knospe mit der sich entwickelnden Blase entsteht vesikoureteraler Reflux.

B: Orthotope Knospung.

C: Kraniale Ektopie.

In A und C kommt es zur Interaktion der Ureterknospe mit nur spärlich entwickeltem Mesenchym.

Nach Pope 1999

2.2.3 Molekulare Kenntnisse der Nephrogenese

Für diverse vom metanephrogenen Mesenchym und der Ureterknospe exprimierte Gene ist eine Beteiligung an Regulation und Kontrolle der reziproken Interaktion dieser beiden Gewebe bekannt. Viele jener Gene sind direkt oder indirekt an der Regulation eines zentralen Faktors der Nephrogenese, dem *glial-cell-line-derived neurotrophic factor* (GDNF) beteiligt. GDNF ist ein peptidischer Wachstumsfaktor und gehört zur Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF- β -Gruppe). Er wird im metanephrogenen Mesenchym exprimiert und bildet ein wichtiges Signal für die Induktion der Ureterknospe und ihr weiteres Wachstum [Sainio *et al.*, 1997]. Mäuse mit inaktivierten *Gdnf*-Allelen weisen eine bilaterale renale Agenesie und Fehlen der Ureterknospung auf [Pichel *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1996]. Lokale Applikation von GDNF in Zellkultur führt zur Ausbildung von vielen Knospungen entlang des Ureters [Sainio *et al.*, 1997]. GDNF ist zusammen mit seinem Rezeptorkomplex, bestehend aus dem Tyrosinkinase-Rezeptor RET und dem Corezeptor GFR α 1, essentiell für die Ureterknospung. Homozygote Deletionen in *Ret* und *Gfr α 1* führen im Mausmodell zum gleichen Erscheinungsbild wie das für *Gdnf* beschriebene [Cacalano *et al.*, 1998].

Pax2 (*paired domain homeobox 2*), ein Mitglied der für Homeobox-Transkriptionsfaktoren kodierenden *Pax*-Gengruppe, ist in direkter Weise an der Regulation von *Gdnf* beteiligt: in *Pax2*-homozygoten *knockout*-Mäusen findet keine Expression von GDNF im Mesenchym statt [Brophy *et al.*, 2001]; die Tiere weisen eine renale Agenesie auf [Torres *et al.*, 1995]. Da *Gdnf* in der 5'UTR eine Bindungsstelle für PAX2 aufweist [Brophy *et al.*, 2001], aktiviert PAX2 vermutlich direkt dessen Transkription. Mutationen in *PAX2* führen beim Menschen zum Reno-Kolobom-Syndrom [Sanyanusin *et al.*, 1995]. Die Vererbung dieses Syndroms, das aus einer Kombination von renalen Anomalien und *Nervus opticus* Kolobomen besteht, erfolgt autosomal-dominant. Als renale Beteiligungen sind renale Hypoplasie mit oder ohne Nierenversagen, renale unilaterale Agenesie sowie vesikoureteraler Reflux beschrieben [Eccles *et Schimmenti*, 1999].

Der Transkriptionsfaktor WT1 (*Wilms' tumor-associated gene*) wird mit Beginn der Ureterknospung im metanephrogenen Mesenchym exprimiert. Metanephrogenes Mesenchym von *Wt1-knockout*-Mäusen ist weder in der Lage, Ureterknospung zu induzieren, noch auf Signale der Knospe zu reagieren [Kreidberg *et al.*, 1993]. *Wt1*-defiziente Nieren weisen keine Ureterknospe auf, obwohl *Gdnf* weiterhin exprimiert wird. *Wt1* wird vermutlich benötigt, um die Entwicklung der mesenchymoepithelialen Transformation zu initiieren, die wiederum die Induktion der Ureterknospe bewirkt [Piscione *et Rosenblum*, 2002].

Auch der Transkriptionsfaktor SIX1 (Homolog zu *Drosophila sine oculis*) ist im Zusammenspiel mit EYA1 (*eyes absent1*), das als Co-Faktor der SIX1-Funktion benötigt wird [Li *et al.*, 2003], an der Regulation von *Gdnf* beteiligt. Bei *Six1*-homozygoten *knockout*-Mäusen findet sich eine renale Agenesie [Xu *et al.*, 2003], die auf der fehlenden Ureterknospung und dem konsekutiven apoptotischen Untergang des Mesenchyms beruht.

Ein potenter Regulator und Antagonist zu *Gdnf* findet sich im *bone morphogenetic protein 4* (BMP4), einem Wachstumsfaktor, der wie GDNF zu der Familie von TGF- β -Signal-molekülen gehört. BMP4 kommt in vielen Aspekten der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle zu [Hogan, 1996], homozygote *Bmp4-knockout*-Mäuse sterben zu einem sehr frühen embryonalen Zeitpunkt [Lawson *et al.*, 1999]. Heterozygote *Bmp4-knockout*-Mäuse zeigen ektopes Ureterwachstum und andere den menschlichen CAKUT gleichende Defekte [Miyazaki *et al.*, 2000]; *in vitro* Experimente haben gezeigt, daß

rekombinantes BMP4 die Ureterknospung in embryonalen Nierenzellkulturen verhindert und die lokalen Effekte von GDNF reguliert [ebenda]. Ektope Induktion von Ureterknospen durch GDNF wird von BMP4 inhibiert, was zur Determinierung der spezifischen Lokalisation der Knospe führt (**Abbildung 2.3**).

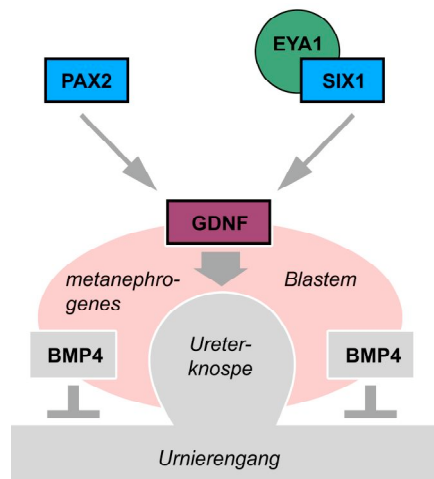


Abbildung 2.3:
Molekulare Regulatoren der Ureterknospung

PAX2 interagiert direkt mit GDNF, EYA1 und SIX1 wirken gemeinsam als Transkriptionsaktivator. BMP4 verhindert als Gegenspieler zu GDNF das Auftreten ektopter Knospenbildung entlang des Ureterganges.

Die oben aufgeführten Gene stellen nur einen Bruchteil der für die Nephrogenese bekannten und wichtigen Faktoren dar. Sie wurden exemplarisch ausgewählt und vorgestellt, da sie in erster Linie an Regulation und Ausbildung der Ureterknospe beteiligt sind, einem für die Pathogenese von CAKUT entscheidenden Entwicklungsschritt.

2.3 Das Gen *EYA1*

2.3.1 Überblick

EYA1 ist ein humanes Homolog zum *Drosophila eyes absent* Gen (*eya*) [Xu *et al.*, 1997a], einem frühen und potenten Regulator der Augenmorphogenese in *Drosophila* [Bonini *et al.*, 1993]. Es gehört zu einer Familie von bisher vier bekannten Genen (*EYA1-EYA4*), die als transkriptionale Aktivatoren an der Regulation der Organogenese bei Säugetieren beteiligt sind [Xu *et al.*, 1997a; Buller *et al.*, 2001; Borsani *et al.*, 1999]. Die Produkte dieser vier Gene besitzen eine evolutionär hochkonservierte, 271 Aminosäuren umfassende

carboxy-terminale Region, die als *eyaHR* (*eya homologous region*) oder als EYA-Domäne bezeichnet wird [Xu *et al.*, 1997a; Abdelhak *et al.*, 1997a].

Heterozygote Mutationen in *EYA1* liegen dem Branchio-Oto-Renalen (BOR)-Syndrom, einem autosomal-dominant vererbten Symptomkomplex, zugrunde (s.u.) [Abdelhak *et al.*, 1997a], und auch eine Assoziation mit okulären Fehlbildungen ist beschrieben worden [Azuma *et al.*, 2000].

2.3.2 *EYA1* assoziierte Erkrankungen

Das BOR-Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die aus der variablen Kombination von Anomalien der Nieren, Branchialbögen und Ohren besteht und von Melnick *et al.* [1976] und Fraser *et al.* [1978] charakterisiert und definiert wurde. Als klinische Befunde werden branchiale Zysten und Fisteln, strukturelle Defekte des Außen-, Mittel- und Innenohres, präaurikuläre Mulden (*pits*) oder Anhängsel (*tags*), Schwerhörigkeit sowie renale Anomalien von milder Hypoplasie bis hin zu kompletter Agenesie beschrieben. Das BOR-Syndrom tritt mit einer Häufigkeit von 1: 40 000 auf und ist für etwa 2% aller Fälle von starkem Hörverlust bei Kindern verantwortlich [Fraser *et al.*, 1980].

Das klinische Erscheinungsbild innerhalb einer betroffenen Familie kann extrem variabel sein und erstreckt sich von leichten Dismorphien bis hin zum kompletten Funktionsverlust der betroffenen Organe [König *et al.*, 1994; Pierides *et al.*, 2002]. In BOR-Familien kann es durch bilaterale renale Agenesie mit Potter-Sequenz zum gehäuften Auftreten von Fehlgeburten und erhöhter Neugeborenensterblichkeit kommen [Carmi *et al.*, 1983].

Von Chen *et al.* [1995] wurden die Häufigkeiten der phänotypischen Manifestationen des BOR-Syndroms an 45 Patienten untersucht, bei denen mindestens zwei betroffene Personen in der Familie zwei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllten: 1.) präaurikuläre Mulden, 2.) hängende Ohren (*lop-ear*), 3.) branchiale Fisteln, 4.) Hörverlust und 5.) renale Anomalien. Anomalien, die bei mehr als 20% der Patienten gefunden wurden, wurden als häufig klassifiziert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in **Tabelle 2.1** und **Tabelle 2.2** aufgelistet.

| Häufige Anomalien | % | Seltenere Anomalien | % |
|---------------------------|----|--|------|
| Hörverlust | 93 | Präaurikuläre Anhängsel | 13 |
| Präaurikuläre Mulden | 82 | Aplasie des Tränenganges | 11 |
| Renale Anomalien | 67 | Kurzer Gaumen | 7 |
| Branchiale Fisteln | 49 | Retrognathie | 4 |
| Ohrmuscheldeformitäten | 36 | Benigner Hirntumor; Gaumenspalte; | je 2 |
| Externe Gehörgangsstenose | 29 | Hüftdysplasie; euth. Struma; N. VII Parese gustatorische Lakrimation; gastroint. Nonrotation; pankreatische Zysten | |

Tabelle 2.1: Phänotypen bei BOR-Syndrom, *nach Chen 1995*

| Renale Anomalie | % |
|--|------|
| Renale Agenesie | 29 |
| Hypoplasie | 19 |
| Dysplasie | 14 |
| Ureteropelvine Obstruktion | 10 |
| Nierenkelchzysten / divertikel | 10 |
| Kalyektasie; Hydronephrose; Pelviectasie; Vesikoureteraler Reflux; | je 5 |
| Prominentes Sammelrohrsystem | |

Tabelle 2.2: Mit BOR-Syndrom assoziierte renale Anomalien; N = 21, *nach Chen 1995*

Eine genetische Diagnose des BOR-Syndroms wird durch seine bekannte Assoziation mit Mutationen in *EYAI* möglich und gelingt bei etwa 50% der betroffenen Patienten [Vervoort *et al.*, 2002]. Da ein Anteil der Mutationen in komplexen genomischen Rearrangierungen besteht, die durch herkömmliches Screening nicht erfaßt werden, könnte diese Zahl jedoch insgesamt deutlich höher liegen [ebenda]. Über 50 verschiedene Mutationen sind bislang in Assoziation mit dem BOR-Syndrom beschrieben worden [Chang *et al.*, 2004].

Durch Genotyp-Phänotyp Analyse von am BOR-Syndrom erkrankten Familien mit *EYAI*-Mutationen wurden spezifische Kriterien für die klinische Diagnosestellung des BOR-Syndroms erarbeitet und Haupt- und Nebenkriterien der Erkrankung definiert (**Tabelle 2.3**).

| Hauptkriterien | Nebenkriterien |
|----------------------|---|
| Branchiale Anomalien | Außenohranomalien |
| Taubheit | Mittelohranomalien |
| Präaurikuläre Mulden | Innenohranomalien |
| Renale Anomalien | Präaurikuläre Anhängsel |
| | Andere: Faziale Asymmetrie; Gaumenanomalien |

Tabelle 2.3: Diagnostische Kriterien des BOR-Syndroms, *nach Chang 2004*

Demnach sollen Personen die klinische Diagnose BOR-Syndrom ausschließlich dann erhalten, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: 1.) Erfüllung von mindestens drei Hauptkriterien oder 2.) Erfüllung von zwei Hauptkriterien und mindestens zwei Nebenkriterien oder 3.) Erfüllung eines Hauptkriteriums und ein Verwandter ersten Grades mit BOR-Syndrom. Bei 40% der Patienten, für die diese Diagnosekriterien zutrafen, konnten *EYAI*-Mutationen nachgewiesen werden. Davon waren 80% Sequenzmutationen, die durch SSCP-Screening detektiert wurden, die restlichen 20% komplexer genomischer Rearrangierungen wurden über ein semi-quantitatives Fluoreszenz multiplex PCR-Protokoll identifiziert [Chang *et al.*, 2004].

Die Tatsache, daß nicht bei allen Patienten mit BOR-Syndrom Mutationen in *EYAI* gefunden werden, kann durch die schwierige Detektion komplexer genomischer Strukturveränderungen erklärt werden. In einem Teil der an BOR-Syndrom erkrankten Familien koppelt der Phänotyp jedoch nicht an Chromosom 8, was genetische Heterogenität impliziert [Kumar *et al.*, 1999]. Kürzlich konnte ein weiteres Gen, das dem BOR-Syndrom zugrunde liegen kann, identifiziert werden: *SIX1* [Ruf *et al.*, 2004]. Alle bislang beschriebenen *SIX1*-Mutationen veränderten die Interaktion zwischen *SIX1* und *EYA1*. Welchen Anteil Mutationen in *SIX1* an der Gesamtheit der an BOR-Syndrom Erkrankten haben, ist noch nicht bekannt; in der untersuchten Kohorte wurden bei vier von 90 untersuchten BOR/BO-Familien drei verschiedene Mutationen in *SIX1* gefunden. Von Azuma *et al.* [2000] wurden bei 317 ophthalmologischen Patienten mit Entwicklungsfehlbildungen der Augen in drei Fällen (kongenitale Katarakt und anteriore Segmentanomalien) heterozygote Mutationen in *EYAI* nachgewiesen. Bei einem betroffenen Patienten lagen zusätzlich Merkmale des BOR-Syndroms vor. Wie häufig *EYAI*-Mutationen bei ophthalmologischen Patienten auftreten und wie häufig eine okuläre Beteiligung bei BOR-Patienten gefunden wird, ist nicht bekannt.

2.3.3 *EYA1*-Struktur

EYAI ist auf Chromosom 8q13.3 lokalisiert und besteht aus 16 Exonen mit einer genomischen Ausdehnung von über 156 Kilobasen. Die Exone 9 bis 16 kodieren für die EYA-Domäne. Es existieren vier Transkriptvarianten (*EYA1A* – *EYA1D*) des Gens, die durch alternatives Spleißen in der 5'-Region entstehen und die für drei Isoformen (a, b und c) als Genprodukt kodieren (**Tabelle 2.4**)

| Transkriptvariante | Isoform |
|--------------------|---------|
| EYA1A | a |
| EYA1B | b |
| EYA1C | b |
| EYA1D | c |

Tabelle 2.4: Transkriptionsvarianten und Isoformen von *EYA1*

Die Transkriptvarianten unterscheiden sich durch die Positionierung ihrer Startkodons, was zu divergenten Formierungen im Bereich des ersten Exons führt. Die Transkriptvarianten für Isoform b enthalten ein zusätzliches Exon (Exon 1') zwischen Exon 1 und Exon 2, das auch das alternative Start-ATG mit adäquater Kozak-Konsensus-Sequenz enthält. Exon 1 ist in diesen beiden Varianten nicht kodierend. EYA1C enthält ein zusätzliches in 5'-Richtung gelegenes nicht kodierendes Exon, das als Exon -1 bezeichnet wird und nur den 3'-Anteil von Exon 1. EYA1C ist somit die längere der beiden für Isoform b kodierenden Varianten und die längste aller vier Möglichkeiten. Die nachfolgenden Exone 2–16 und somit auch jene, die für die EYA-Domäne kodieren, sind in den Isoformen a und b identisch [Abdelhak *et al.*, 1997a]. EYA1D weist im Vergleich zu EYA1C weniger Segmente der kodierenden Region auf und führt zur kürzeren Isoform c (**Abbildung 2.4**).

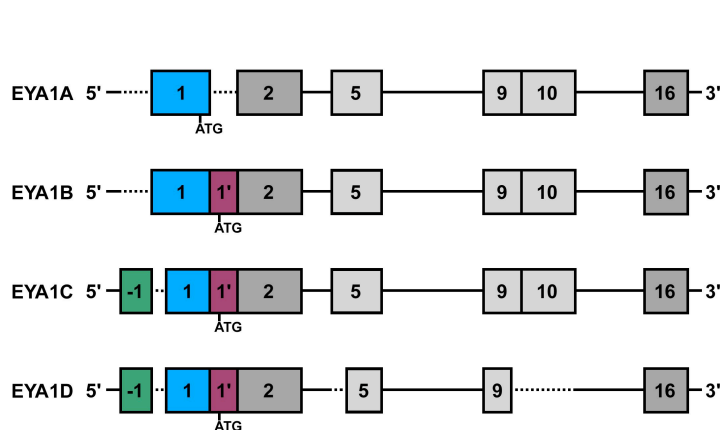


Abbildung 2.4:
Strukturvarianten von EYA1

Modifiziert nach Abdelhak 1997

Die von den vier Transkriptvarianten kodierten Proteine enthalten zwischen 559 (Isoform a) und 592 (Isoform b) Aminosäuren; im Rahmen dieser Arbeit wurde die längste Transkriptvariante EYA1C für Isoform b untersucht.

2.3.4 Funktion und Expression

Das *eyes absent* Gen ist essentiell für die Augenmorphogenese in *Drosophila*; bei Verlust der *eya*-Funktion unterliegen die Vorläuferzellen der Augenentwicklung apoptotischen Vorgängen [Bonini *et al.*, 1993].

Drosophila eyes absent interagiert *in vivo* spezifisch mit zwei weiteren Genen der Augenentwicklung, *sine oculis (so)* und *dachshund (dac)* [Chen *et al.*, 1997; Pignoni *et al.*, 1997] in einem komplexen regulatorischen Gennetzwerk mit direkter Proteininteraktion. Durch Analyse von *Eya1-knockout*-Mäusen [Xu *et al.*, 1999] konnte gezeigt werden, daß die *Six-Eya-Dach-* (das Homolog zu *Drosophila dachshund*) Interaktion auch an der Entwicklung von Niere, Ohr und Auge bei Vertebraten beteiligt ist. Die Interaktion von EYA und DACH ist indirekt und wird von CBP (CREB binding protein) mediiert [Ikeda *et al.*, 2002]. Murine *Eya*-Gene sind in der Lage, in der Augenentwicklung von *Drosophila* zu funktionieren [Bui *et al.*, 2000], was auf universelle funktionelle Regulationspfade schließen läßt. Die Proteininteraktionen finden an verschiedenen Lokalisationen innerhalb der EYA-Domäne statt. Für das *eya*-Genprodukt in *Drosophila* wurde ein Schema der Proteinstruktur mit für die spezifischen Proteininteraktionen kritischen Subdomänen innerhalb der EYA-Domäne experimentell entwickelt (**Abbildung 2.5**). Die N-terminalen Proteinabschnitte der verschiedenen Mitglieder der *Eya*-Familie sind nicht konserviert [Xu *et al.*, 1997a]. Es besteht Hinweis auf Transaktivierungsfunktion in diesen Regionen sowohl bei Mäusen als auch bei *Drosophila* [Xu *et al.*, 1997b; Silver *et al.*, 2003].

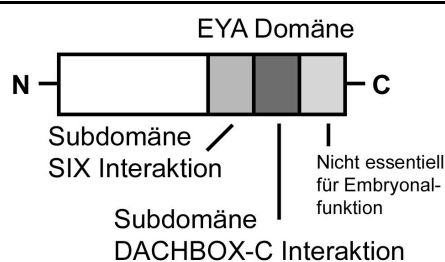


Abbildung 2.5:
Funktionelle *eya*-Subdomänen

Die Interaktion mit SIX1 erfolgt durch direkte Protein-Protein-Bindung der Transkriptionsmodulatoren. Für die Interaktion mit DACH wird ein Bindeprotein benötigt.

Nach Bui 2001

Durch Studien an embryonalen Mäusen [Xu *et al.*, 1997a; Kalatzis *et al.*, 1998] konnten Kenntnisse über das räumliche und zeitliche Expressionsmuster von *Eya1* gewonnen werden. Neben den Urogenitalanlagen wird *Eya1* während der murinen Embryogenese in den kranialen Plakoden, die die Anlagen für Linse, Nase, Ohr, anteriore Hypophyse und sensorische Ganglien bilden, stark exprimiert, was (in Kooperation mit *Eya2*) auf eine zentrale Rolle für die Induktion und Differenzierung der genannten Gewebe hindeutet. Während der okulären Entwicklung wird *Eya1* vorherrschend in den anterioren Strukturen des späteren Auges nachgewiesen (Linse, Kornea, Iris, Ziliarkörper). Auch in Progenitorzellen von Muskel- und Bindegewebe wird *Eya1* gefunden. In den vier Branchialbögen ist es ab Embryonaltag 10.5 nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch im Innenohr die Expression; im weiteren Verlauf wird *Eya1* im akustischen wie auch im vestibulären Anteil nachgewiesen. Im Metanephros ist die Expression von *Eya1* auf das kondensierende Mesenchym in Umgebung der gerade entstandenen Ureterknospe beschränkt; ab Tag 15.5 folgt das Expressionsmuster im Mesenchym den wachsenden Ureterverzweigungen in die Peripherie. Ab Tag 19.5, kurz vor Geburt der Mäuse, kann nur noch geringe Expression nachgewiesen werden. Die Kenntnis dieser Verteilung trägt zum besseren Verständnis der Symptome bei, die bei Veränderungen des Gens entstehen können.

2.4 Aufgabenstellung

Der CAKUT-Pathomechanismus ist vermutlich in fehlerhafter nephrogenetischer Regulation vor und während der Ureterausknospung zu finden (s.o.). Es stellt sich somit die Frage nach der pathogenetischen Relevanz von Mutationen in Genen, die während der Nephrogenese und speziell während des kritischen Zeitpunktes der Aussprossung und Signalinteraktion zwischen Urnierengang und Blastem exprimiert werden. *EYAI* wurde bei Vertebraten als ein solches nephrogenetisch essentielles Gen identifiziert. Mutationen in *EYAI* können im Rahmen des BOR-Syndroms zu renalen Erkrankungsbildern führen, die sich auch bei CAKUT-Patienten mit isolierten Formen finden lassen. Vor dem Hintergrund der Tatsache, daß das klinische Erscheinungsbild bei *EYAI*-Mutationsträgern hochvariabel ist, soll in dieser Arbeit bei unselektierten CAKUT-Patienten analysiert werden, ob Mutationen in *EYAI* neben dem bekannten syndromalen Krankheitsbild auch für isolierte CAKUT-Fälle verantwortlich sein können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

- Elektrophoresekammer: Agarose Gel Elektrophoresis System Mini-Sub Cell GT; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Multiphor II Electrophoresis System; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
- Geldokumentation: Gel Doc; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
- Kühlgerät: Multi Temp III; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
- Laborwaage: Kern und Sohn GmbH, Balingen
- Magnetrührer: IKA-Combimag RCO; IKA Werke, Staufen
- Mikrowelle: R 212D; Sharp
- Schüttelgeräte: Celloshake Variospeed; Biotec Fischer, Reiskirchen
Polymax 2040; Heidolph, München
- Software: Quantity One 1-D Analysis Software; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Chromas (Version 1.45); Griffith University, Southport, Australien
Primer3; Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA
- Spannungsquellen: Electrophoresis Power Supply EPS 3500; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Power Supply EPS 1001; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
- Thermocycler: My Cycler; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
- Trockengerät: Gel Dryer Model 583; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
- Vortex Mixer: Reax Top; Heidolph, München
- Zentrifuge: Mini Centrifuge; VWR International, Darmstadt
Centrifuge 5402; Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Chemikalien

3.1.2.1 Polymerasekettenreaktion

- *Aqua ad iniectabilia*; Braun, Melsungen
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
- dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 100 mM); Sigma, München
- Taq-Polymerase; Sigma, München
- 10 x PCR Puffer; Sigma, München

3.1.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

- Agarose Ultra Pure; Life Technologies, Paisley, Schottland
- Borsäure; Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
- EDTA; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Ethidiumbromid; Sigma, München
- Ficoll, Typ 400; Sigma, München
- Tris Pufferan; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Xylolencyanol; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

3.1.2.3 Einzelstrangkonnformationsanalyse

- Bromphenolblau; Schmid GmbH, Köngen
- Clean Gel 10% 52 S; ETC Elektrophorese Technik, Kirchentellinsfurt
- DNA-Disc Rehydration Buffer; ETC Elektrophorese Technik, Kirchentellinsfurt
- DNA-Disc Elektroden Buffer; ETC Elektrophorese Technik, Kirchentellinsfurt
- Ethanol absolut; Riedel-de Haen, Seelze
- Essigsäure Rotipuran 100%; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Formamid; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
- Natriumcarbonat; Riedel-de Haen, Seelze
- Salpetersäure min 65%; Riedel-de Haen, Seelze
- Silbernitrat; Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.2.4 Sequenzierung

- Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, Foster City, USA
- DYE EX 2.0 Spin Kit; Qiagen GmbH, Hilden
- QIA Quick PCR Purification Kit; Qiagen GmbH, Hilden

3.1.3 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten 16 Primerpaare wurden durch „blasten“ der CDS (*coding sequence*) der Transkriptvariante EYA1C gegen das humane Chromosom 8 mittels der NCBI-Onlinefunktion „BLAST“ erstellt (Referenzsequenzen und „BLAST“-Algorithmus aufzurufen unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Somit konnten die Exongrenzen von *EYA1* definiert und die Sequenz bestimmt werden. Die Primersequenzen wurden so gewählt, daß auch exonflankierende intronische Anteile in die Zielsequenz eingeschlossen wurden, um eine Analyse der Spleißstellen zu ermöglichen. Mit Hilfe des Primer3 Programms wurden die Primer erstellt und von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Die genauen Daten der einzelnen Primer sind in **Tabelle 3.1** aufgeführt.

| Primer | Sequenz | Nukleotid Anzahl | GC-Anteil (%) | Annealing Temp. (° C) |
|--------|--|---------------------|------------------|--------------------------|
| EX1 f | 5'-TGA TGA AGA AAC AAG GTG CAA-3' | 21 | 38 | 58 |
| EX1 r | 5'-AGC GCA TTA AAT GGT GGT GT-3' | 20 | 45 | 58 |
| EX2 f | 5'-TGC TTG GTG TTG ATG TGA AAA-3' | 21 | 38,1 | 59 |
| EX2 r | 5'-TGA TTT TCT TGT CAT TAC TCT GAA TG-3' | 26 | 30,8 | 59 |
| EX3 f | 5'-GGA ACA TGT GGG CAC AGA C-3' | 19 | 57,9 | 59 |
| EX3 r | 5'-TGTG TTT GCT TGG ATT ATT GTG C-3' | 22 | 36,4 | 59 |
| EX4 f | 5'-ATT GGC CAA AGA TTG GGT CT-3' | 20 | 45 | 58 |
| EX4 r | 5'-CCA TCT AAT GCA TGG GCCCT TT-3' | 20 | 45 | 58 |
| EX5 f | 5'-CAT GGA ACA TCA GGT TCT ACT TT-3' | 23 | 39,1 | 58 |
| EX5 r | 5'-CCA GCT TTT GAA AAT GGA CA-3' | 20 | 40 | 58 |
| EX6 f | 5'-AAG AAA ATC ATG TTG CAT TTA AAG A-3' | 25 | 24 | 58 |
| EX6 r | 5'-CCA AAT ACC AAT TCT GCC TTT T-3' | 22 | 36,4 | 58 |
| EX7 f | 5'-AAA TGC ATTT GAA ACC ATT GAA A-3' | 22 | 27,3 | 58 |
| EX7 r | 5'-TGA CAG ACA ATT CTTT GTG TGG TT-3' | 23 | 39,1 | 58 |
| EX8 f | 5'-AAC CAC TGC TGTT TTA CGT AGC-3' | 21 | 47,6 | 59 |
| EX8 r | 5'-AAG GCG AAT CTT GGC ACC AT-3' | 20 | 45 | 59 |
| EX9 f | 5'-TCC AAA GAA ATT AAA AAC TGA TGC-3' | 24 | 29,2 | 58 |
| EX9 r | 5'-AGC CAA GGC AAA GAC ACA TT-3' | 20 | 45 | 58 |
| EX10 f | 5'-TCA CCT ATT TTC AGA CAT GCA A-3' | 22 | 36,4 | 58 |
| EX10 r | 5'-CCA ATG CCT GCT TCC TCT TA-3' | 20 | 50 | 58 |
| EX11 f | 5'-AGC CGA ACA GAA AGT CCA TC-3' | 20 | 50 | 58 |
| EX11 r | 5'-TGG TTT TTC CAA AAC AAA ACA A-3' | 22 | 27,3 | 58 |
| EX12 f | 5'-AAC TGG CTG AGG TAC TGG TGG T-3' | 22 | 50 | 62 |
| EX12 r | 5'-CGG CTA ACT TTG GGC TTT TC-3' | 20 | 50 | 62 |
| EX13 f | 5'-TCC AAA ATG AAC AAG CAC GA-3' | 20 | 40 | 60 |
| EX13 r | 5'-TTA CTTT GCA AAG CCGG AAG AAA-3' | 21 | 38,1 | 60 |
| EX14 f | 5'-TCC TGA AGGG AAA AGA GCT GA-3' | 20 | 45 | 60 |
| EX14 r | 5'-CAA TGC TCG TGC TTG TTC AT-3' | 20 | 45 | 60 |
| EX15 f | 5'-TGG AAC CTG TTT AAA TGA TCC AG-3' | 23 | 39,1 | 60 |
| EX15 r | 5'-GGT TAC CCA AAC TTCC ACA TTT TC-3' | 23 | 39,1 | 60 |
| EX16 f | 5'-CTG GAT CTG TCC CTG GTC AC-3' | 20 | 60 | 62 |
| EX16 r | 5'-GTC AGC ATG GGA GTG GAT TT-3' | 20 | 50 | 62 |

Tabelle 3.1: Charakteristika der verwendeten Primer

3.2 Methoden

3.2.1 Einleitung zur Methodik

Es wurde zunächst die DNA der Patienten aus peripher-venösem EDTA-Blut extrahiert. Anschließend wurden die 16 Exone des Gens mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und die Amplifikate durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf durch Sequenzanomalien verursachtes abweichendes Laufverhalten untersucht. Bei Verdacht auf Variationen der Basenfolge erfolgten eine Direktsequenzierung des betroffenen Exons und eine weitergehende Familienuntersuchung sowie eine Korrelation des Genotypes mit dem klinischen Phänotyp. Weiterhin wurden die im Kollektiv beobachteten Polymorphismen statistisch ausgewertet und bezüglich der Frequenz ihres Auftretens mit einem Kontrollkollektiv verglichen.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) [Mullis *et al.*, 1987] ist ein molekularbiologisches Verfahren, das zur *in vitro* Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte eingesetzt wird und das in sich wiederholenden Duplikationszyklen nach dem Muster der DNA-Replikation im Zellzyklus abläuft. Endergebnis dieser artifiziellen Vervielfältigungsreaktion ist jedoch nicht die Duplikation des gesamten Genoms, sondern eine selektive Vermehrung vorbestimmter DNA-Sequenzen.

Zur Polymerisation wird eine thermostabile DNA-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) benötigt. Dieses Enzym ist im Gegensatz zu vielen anderen Enzymen in der Lage, auch bei hohen Temperaturen biologisch aktiv zu sein. Es bindet an die durch Denaturierung zur Verfügung stehende einzelsträngige DNA und synthetisiert zur vorgefundenen Sequenz komplementäre Stränge. Durch die Hitzeresistenz dieser speziellen Polymerase wird der effiziente Einsatz und Ablauf der Reaktion in automatisierter Form in Thermocyclern möglich. Diese Geräte geben präzise die für jeden einzelnen Reaktionsschritt benötigten Temperaturen vor und ermöglichen damit in kurzer Zeit eine exponentielle Zunahme der Zielsequenzen.

Zur Determination der zu amplifizierenden Abschnitte werden synthetische Oligonukleotidpaare (Primer) benötigt, die komplementär zum 3`-Ende der Zielsequenz in jeweils einem Einzelstrang sind und somit einen „Rahmen“ um den ausgewählten Genabschnitt legen. Durch diese Flankierung wird der Polymerase mit einer freien OH-Gruppe ein Anfangspunkt für ihre enzymatische Aktivität zur Verfügung gestellt und gleichzeitig der Endpunkt der Elongation bestimmt. Voraussetzung für die Synthese der Primer ist die Kenntnis der Basenfolge im gewünschten Zielabschnitt.

Die hier eingesetzten Primer wurden für eine kalkulierte *Annealing*-Temperatur von 60°C konzipiert. Sie waren zwischen 19 und 26 Nukleotide lang und hatten einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 47,7%. Die endgültigen *Annealing*-Temperaturen mußten für alle 16 Primerpaare dennoch abschließend experimentell bestimmt werden (s. Tab. 3.1), um eine Optimierung der PCR-Leistung zu erreichen. Die PCR erfolgte protokollgemäß wie in **Tabelle 3.2** aufgeführt. Für einen Reaktionsansatz wurden eingesetzt:

| | |
|----------|--|
| 1 µl | Vorwärts orientierter Primer (10 pmol/µl) |
| 1 µl | Rückwärts orientierter Primer (10 pmol/µl) |
| 2,5 µl | 10 x PCR Puffer |
| 2,5 µl | dNTPs (je 250 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| 0,25 µl | DMSO |
| 0,2 µl | Taq-Polymerase (5 U/µl) |
| 5 µl | DNA (20 ng/µl) |
| ad 25 µl | <i>Aqua ad iniectabilia</i> |

| Phase | Temperatur | Zeit |
|---------------------------|---------------|-------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 94° C | 05 Minuten |
| 2. 35 Zyklen mit je | | |
| 1. Denaturierung | 94° C | 20 Sekunden |
| 2. <i>Annealing</i> | (Tabelle 3.1) | 20 Sekunden |
| 3. Elongation | 72° C | 20 Sekunden |
| 3. Terminale Elongation | 72° C | 07 Minuten |

Tabelle 3.2: PCR-Protokoll

3.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Nach Beendigung der PCR wurden die Endprodukte stichprobenartig auf ein Agarosegel aufgetragen und ihr Laufverhalten per Elektrophorese analysiert. Die im elektrischen Feld entstandenen DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Hiermit konnte ein erfolgreicher Verlauf der PCR mit spezifischen Endprodukten gesichert und per photographischer Aufnahme (Geldokumentationssystem Gel Doc, Bio Rad Laboratories) dokumentiert werden. Um eine Kontamination des Ansatzes ausschließen zu können, wurde bei jedem PCR-Durchgang eine Negativkontrolle (ohne DNA) im Thermocycler mitgeführt und per Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert. Für das Agarosegel wurden verwendet:

| | |
|--------|-------------------------|
| 0,4 g | Agarose |
| 30 ml | 1fach TBE-Puffer (s.u.) |
| 4,0 µl | Ethidiumbromid |

Zur Elektrophorese wurden 4 µl des Amplifikats mit 2 µl Agaroselaufpuffer, bestehend aus 10% 10fach TBE-Puffer (12,11% Tris Base, 0,61% Borsäure, 0,74% EDTA, *ad* 100% *Aqua destillata*), 40% Ficoll 400, 0,1% Xylolencyanol, *ad* 100% *Aqua ad iniectabilia*, versetzt, auf das Gel aufgetragen und für 20 Minuten in einer

Elektrophoresekammer in 1fach TBE-Puffer (10% 10fach TBE-Puffer, *ad 100% Aqua ad iniectabilia*) einer Spannung von 120 Volt ausgesetzt.

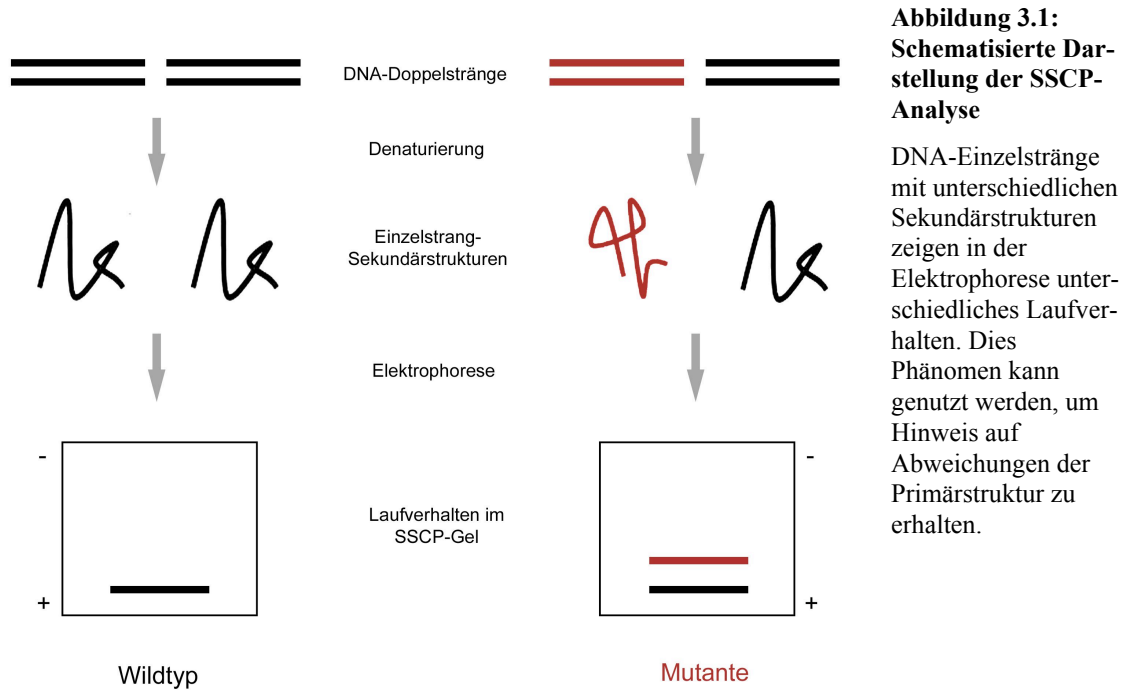
3.2.4 Einzelstrangkonnformationsanalyse

Die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP-Analyse, *single-strand conformation polymorphism analysis*, [Orita *et al.*, 1989]) ist bislang eines der in der Molekulargenetik am häufigsten eingesetzten Screening-Verfahren zur Detektion von Mutationen innerhalb des Genoms [Markoff *et al.*, 1997]. Strukturelle Veränderungen innerhalb eines DNA-Abschnittes können durch diese Methode zuverlässig identifiziert werden; die Sensitivität, mit der Punktmutationen, Deletionen und Insertionen erkannt werden, liegt im Bereich von 90-95% [Gross *et al.*, 1999]. Aufgrund der schnellen Durchführbarkeit, kombiniert mit einer sicheren Handhabung und einer hohen Detektionsrate, bietet sich hier eine Maßnahme, die sowohl für die klinische Forschung als auch für die Diagnostik genetischer Erkrankungen geeignet ist.

Die Möglichkeit, schon den Austausch einer einzigen Base im untersuchten DNA-Abschnitt aufzudecken [Orita *et al.*, 1989], resultiert dadurch, daß die Ausbildung der Sekundärstruktur eines DNA-Einzelstranges einer Sequenzspezifität unterliegt. Dies bedeutet, daß bei Abweichung der Basenfolge innerhalb des untersuchten Abschnittes (hier: ein Exon und seine angrenzenden Spleißstellen) eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Konformation der Sekundärstruktur resultiert. Aufgrund der nun veränderten räumlichen Anordnung des Stranges erfolgt ein abweichendes Laufverhalten im elektrischen Feld, welches mittels der Polyacrylamidgel-Elektrophorese und anschließender Anfärbung durch den direkten Vergleich zu simultan untersuchten Wildtypen ausfindig gemacht werden kann (**Abbildung 3.1**). Die für dieses Verfahren verwendeten Polyacrylamidgele werden eingesetzt, da sie wegen ihres Separationsoptimums bei 300 Basenpaaren eine bessere Auftrennung kurzer Fragmente wie der hier amplifizierten Exone gewährleisten und somit eine im Vergleich zu Agarosegelen hochauflösende Elektrophorese ermöglichen.

Vor Beginn der SSCP-Analyse wurden je 3,5µl des zu untersuchenden Amplifikats mit ebensoviel denaturierendem Puffer (14% Bromphenolblau, 86% Formamid) versetzt, für 10 Minuten im Thermocycler bei 95° C denaturiert und anschließend sofort in einem Eisbett gekühlt, um Rückbildung doppelsträngiger DNA zu verhindern. Die Gelelektrophorese wurde mit 10% Polyacrylamidgelen und dem DNA-Disc Buffer Kit

PH 8,4 der Firma ETC durchgeführt. Aufgetragen wurden je 4,5µl der denaturierten DNA-Proben sowie eine Negativkontrolle, bestehend aus nicht-denaturierter DNA und Pufferlösung (10% 10fach TBE, 40% Ficoll 400, 0,1% Bromphenolblau, *ad* 100% *Aqua ad iniectabilia*). Die Elektrophorese erfolgte bei 15°C für zunächst 10 Minuten bei 200 Volt, anschließend für weitere 70 Minuten bei 600 Volt.



Im Anschluß wurde eine Silberfärbung nach folgendem Protokoll durchgeführt:

| Phase | Substanz/Konzentration | Volumen | Zeit |
|-------------------|--|----------------|----------------|
| Waschen | Ethanollsg., 10% | 0,5 l | 05 min |
| Waschen | Salpetersäurelsg., 1% | 0,5 l | 02 min |
| Anfärbung | Silbernitratlsg., 0,2% | 0,5 l | 30 min |
| Waschen | <i>Aqua bidest</i> | <i>ad lib.</i> | |
| Entwicklung | Natriumhydrogencarbonatlsg., 3% + 500µl Formaldehyd | 1 l | <i>ad lib.</i> |
| Fixierung | Essigsäurelsg. 10% | 0,5 l | 10 min |
| Trocknen des Gels | | | 40 min |

Tabelle 3.3: SSCP-Gel Färbeprotokoll

Diese Silberfärbung bietet eine elegante Alternative zur oft angewendeten Ethidiumbromidfärbung, da sie eine feinere Auflösung mit länger anhaltender Dokumentation der Ergebnisse gestattet und nicht mit gesundheitsschädigenden Risiken wie bei Verwendung von Ethidiumbromid behaftet ist. Nach Visualisierung der DNA-Banden konnte die Auswertung der untersuchten Proben durch den direkten Vergleich der erhaltenen Bandenmuster untereinander erfolgen. Ergab sich ein interindividueller Unterschied im Laufverhalten, wurden die abweichenden Proben weitergehend durch Sequenzierung untersucht, um die genetischen Veränderungen eindeutig verifizieren und charakterisieren zu können.

3.2.5 Sequenzierung

Durch die von Sanger [1977] entwickelte Technik der Sequenzierung ist es möglich, die Basensequenz eines DNA-Abschnittes direkt zu bestimmen. Damit ist die Sequenzierung die genaueste Methode zur Ermittlung und Beschreibung von Mutationen im Genom, da exakt Position und Art der Abweichung bestimmt werden können.

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf dem Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) während der Synthese eines DNA-Stranges und dem damit einhergehenden Randomkettenabbruch an der Stelle des „falschen“ Substrats. Da in einem Ansatz mit üblichen Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einem Anteil ddNTPs der Einbau von letzteren nach den Gesetzen der Statistik abläuft, erhält man am Ende der Synthesereaktion ein Gemisch aus unterschiedlich langen, neu synthetisierten Strängen, die an jedem möglichen Punkt der Sequenz abbrechen. Das eingebaute ddNTP bestimmt also, mit welcher Base die neu entstandenen DNA-Fragmente enden. Durch Kenntnis des eingesetzten ddNTPs und Länge des Fragments kann die Position der Basen innerhalb der Sequenz nun aufgeschlüsselt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Fluoreszenz-markierten ddNTPs gearbeitet, wobei jedem Nukleotid ein anderer Farbstoff zugeordnet war, der von einem automatischen Sequenzierer durch Laser vermittelte Analyse detektiert wurde, so daß die Sequenzierreaktion in einem einzigen Schritt durchgeführt werden konnte. Als Grundlage der Sequenzierung wurde zunächst eine PCR wie oben beschrieben zur Amplifikation des zu sequenzierenden Exons durchgeführt. Im Anschluß erfolgte die

Aufreinigung des Amplifikats mit dem QIA Kit nach Angaben des Herstellers. Die eigentliche Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

| Phase | Temperatur | Zeit |
|---------------------------|------------|-------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95° C | 45 Sekunden |
| 2. 25 Zyklen mit je | | |
| 1. Denaturierung | 94° C | 30 Sekunden |
| 2. <i>Annealing</i> | 57° C | 15 Sekunden |
| 3. Elongation | 60° C | 04 Minuten |

Tabelle 3.4: Sequenzierprotokoll

Als Ansatz wurde eingesetzt:

- 3 µl PCR-Produkt (aufgereinigt)
- 1 µl Primer (vorwärts oder rückwärts orientiert)
- 4 µl Terminationsmix
- 1 µl DMSO
- 11 µl *Aqua* (HPLC)

Der Terminationsmix der Firma Applied Biosystems enthält ein Gemisch aus dNTPs, mit BigDye-Farbstoffen markierte ddNTPs und die AmpliTaq DNA-Polymerase. Um eine gute Darstellbarkeit der Sequenzen auch an den Enden der Exone zu erreichen, wurde der Reaktionsansatz jeweils einmal mit vorwärts und einmal mit rückwärts orientierten Primern angesetzt. Die eingesetzten Primer waren die in **Tabelle 3.1** charakterisierten Standard-Primer. Im Anschluß erfolgte wiederum eine Aufreinigung der nun synthetisierten DNA-Fragmente mit dem DYE EX Kit nach Angaben des Herstellers. Die Auftrennung und Detektion der einzelnen Positionen erfolgte in einem automatischen Sequenzierer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer; Applied Biosystems), die Auswertung der Basenfolgen wurde manuell mittels der Chromas Software durchgeführt.

3.3 Statistische Auswertung

Für verschiedene Exone des Gens *EYAI* wurde das Auftreten von Polymorphismen beobachtet. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob hinsichtlich der Verteilung der Polymorphismen Diskrepanzen zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv vorliegen, erfolgte eine statistische Auswertung der erhobenen Daten.

3.3.1 Berechnung der Allelfrequenzen

Zunächst erfolgte eine Sequenzierung von Proben, die für das untersuchte Exon und seinen Polymorphismus charakteristische SSCP-Bandenmuster aufwiesen. Um Auskunft über die zugrunde liegende Basenfolge zu erhalten, wurde für jedes auftretende Verteilungsmuster mindestens eine Sequenzierung vorgenommen. Anhand der so identifizierten möglichen Sequenzen wurden alle untersuchten Proben anhand ihrer SSCP-Bandenmuster einem Genotyp zugeordnet. Aus der beobachteten Anzahl der Genotypen können die Allelfrequenzen für das untersuchte Kollektiv berechnet werden. Hierfür muß die Anzahl der homozygoten Merkmalsträger des auszuwertenden Allels verdoppelt und zu der einfachen Anzahl der heterozygoten Anlageträger addiert werden. Wird diese absolute Allelhäufigkeit durch die Gesamtzahl aller Allele des Kollektivs dividiert, erhält man die relative Allelfrequenz des untersuchten Allels.

3.3.2 Anwendung der Hardy-Weinberg-Regel

Die Verteilung von Genotyphäufigkeiten innerhalb einer Population läßt sich durch die Hardy-Weinberg-Regel beschreiben, die 1908 vom Mathematiker G. Hardy und dem Biologen W. Weinberg formuliert wurde. Die Regel besagt, daß in einer Mendel-Population die relativen Allelhäufigkeiten p und q eines Genes in allen Generationen konstant bleiben und daß ab der ersten Nachfolgeneraion ein Gleichgewicht für die relativen Genotyphäufigkeiten vorliegt. Diese Verteilung der Genotypen entspricht dann der Normalverteilung. Sind für zwei Allele a und b ihre Frequenzen p_a und q_b in einer Population bekannt und gilt: $p_a + q_b = 1$, dann lassen sich die erwarteten Anteile der homozygoten und heterozygoten Merkmalsträger in der Population durch folgende Gleichung berechnen:

$$p_a^2 + 2p_aq_b + q_b^2 = 1$$

Gleichung 3.1:
Die Hardy-Weinberg-Regel

p_a^2 = Häufigkeit der Homozygotie für Allel a; q_b^2 = Häufigkeit der Homozygotie für Allel b
 $2p_aq_b$ = Häufigkeit für Heterozygotie ab

Zur Ermittlung der erwarteten absoluten Anzahlen der Merkmalsträger werden die berechneten Werte mit der Gesamtzahl der untersuchten Individuen multipliziert. Die

Hardy-Weinberg-Regel wurde für eine idealisierte, in der Natur nicht existente, so genannte Mendel-Population formuliert.

Kriterien einer derartigen Population sind: 1.) Die Organismen der Population sind diploid und pflanzen sich nach den Regeln der Panmixie sexuell fort. 2.) Es gelten die Mendelschen Regeln. 3.) Die Population ist groß genug (ideal: unendlich groß), um zufällige Abweichungen der Verteilung auszuschließen. 4.) Die Population existiert isoliert von anderen Populationen. 5.) Es entstehen keine Mutationen innerhalb der Allele. 6.) Die Generationen der Population sind nicht überlappend. 7.) Kein Genotyp erzeugt Selektionsvorteile.

Obwohl diese Kriterien im allgemeinen auf keine real existierende Population uneingeschränkt zutreffen, wird die Hardy-Weinberg-Regel zur Kalkulation von erwarteten Häufigkeiten für die Verteilung von Genotypen angewendet. Für das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv wurden die bei Polymorphismen beobachteten Genotyphäufigkeiten für mit den nach der Hardy-Weinberg-Regel erwarteten Zahlen verglichen und auf Abweichungen untersucht.

3.3.3 Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit

Der Chi-Quadrat (χ^2)-Test ist ein statistischer Test zur Prüfung der Unabhängigkeit zweier qualitativer Merkmale. Soll festgestellt werden, ob zwischen dem Merkmal A mit r Ausprägungen und dem Merkmal B mit s Ausprägungen ein Zusammenhang besteht, kann er bei ausreichend großen Stichproben angewendet werden. Die Daten werden in Form einer Kontingenztafel angeordnet. Für Merkmal A mit $r = 3$ und Merkmal B mit $s = 2$ ergebe sich folgende Darstellung (**Tabelle 3.5**):

| Merkmal | B 1 | B 2 | Gesamt |
|---------|------|------|--------|
| A1 | b 11 | b 12 | n 1 |
| A 2 | b 21 | b 22 | n 2 |
| A 3 | b 31 | b 32 | n 3 |
| Gesamt | b .1 | b .2 | n |

Tabelle 3.5: Kontingenztafel zur Durchführung des Chi-Quadrat-Tests

Für jedes A besteht eine Wahrscheinlichkeit p , daß Merkmal B1 oder B2 zutrifft. Nachgeprüft werden soll, ob diese Wahrscheinlichkeiten gleich sind, d.h., ob das Auftreten der Merkmale unabhängig voneinander erfolgt.

Die Nullhypothese H_0 lautet: Alle A bieten gleiche Erfolgsaussichten für B ($p_{B1} = p_{B2}$). Die Alternativhypothese H_1 lautet: Alle A haben ungleiche Erfolgsaussichten für B ($p_{B1} \neq p_{B2}$).

Für jedes Feld b_{ij} der Kontingenztafel ergeben sich unter der Annahme, daß H_0 gilt, genau $n_i b_j / n$ Einträge, bezeichnet als e_{ij} . Die Prüfgröße $V = \sum (b_{ij} - e_{ij})^2 / e_{ij}$ ist dann unter H_0 χ^2 -verteilt mit $(r-1)(s-1)$ Freiheitsgraden. Die Testentscheidung lautet: Lehne H_0 ab, falls $V > \chi^2_{(r-1)(s-1), 1-\alpha}$. Als Signifikanzniveau, d.h. als obere Grenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art, wird $\alpha = 0,05$ festgelegt. Ist die Prüfgröße nicht größer als das Quantil der χ^2 -Verteilung, kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Daten lassen dann keinen Widerspruch zur Hypothese gleicher Erfolgsaussichten zu.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der χ^2 -Test zum einen angewendet, um zu überprüfen, ob es bei den im Patientenkollektiv beobachteten Allelverteilungen einen Unterschied im Vergleich zu den nach der Hardy-Weinberg-Regel erwarteten Normalverteilungsmustern gab, und zum anderen, um zu untersuchen, ob die beobachteten Allelhäufigkeiten innerhalb der Patientengruppe von denjenigen des Kontrollkollektives signifikant abweichen oder nicht.

3.4 Patienten- und Kontrollkohorte

3.4.1 Kontrollkohorte

In das Kontrollkollektiv wurden unverwandte Personen aufgenommen, die nicht an Nieren- und Harnwegserkrankungen leiden und eine zum Patientenkollektiv vergleichbare Herkunft aufweisen. Insgesamt wurden 145 verschiedene Proben untersucht.

3.4.2 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 135 pädiatrische Patienten untersucht, die wegen kongenitaler Anomalien der Niere und der ableitenden Harnwege klinisch auffällig geworden waren. Alle Patienten bzw. ihre Erziehungsberechtigten wurden über den Inhalt und die Absicht der molekulargenetischen Untersuchung aufgeklärt und stimmten der Analyse ihres genetischen Materials hinsichtlich relevanter Gene der Nephrogenese schriftlich zu. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Heidelberg genehmigt.

Das ausgewählte Kollektiv setzt sich aus deutschen und europäischen und bis auf ein Zwillingsspaar unverwandten Kindern zusammen, die in pädiatrisch-nephrologischen Zentren rekrutiert worden waren.

67,4% der Patienten stammen aus Deutschland und Westeuropa, 32,6% kommen aus Südost- und Osteuropa. Das Alter der untersuchten Patienten betrug im arithmetischen Mittel 8^{10}_{-12} Jahre (Median = 8 Jahre) mit einer Spannweite (*range*) von 6 Monaten bis 23^4_{-12} Jahren (N = 107). 34% der Patienten sind weiblichen und 66% sind männlichen Geschlechts (N = 115). Für 128 Patienten standen exakte klinische Daten zur Verfügung (**Abbildung 3.2**).

Insgesamt ist ein großer Anteil des klinischen CAKUT-Spektrums in der Studie vertreten, wobei unter Einbeziehung sowohl der symmetrischen Beteiligung paariger Organe als auch der Beteiligung verschiedener Organsysteme pro Patient durchschnittlich zwei pathologische Manifestationen zu beobachten waren. Ein Drittel der Patienten zeigt einen vesikoureteralen Reflux, häufig in Kombination mit hypodysplastischen Nieren. Ein Drittel aller männlichen Individuen weist Urethralklappen auf.

19% der untersuchten Personen zeigen zusätzliche extrarenale Symptome, zumeist in Form neurogener Blasenstörung (26%) oder mentaler Retardierung (17%) (**Abbildung 3.3**). Der Schweregrad der renalen Erkrankungen innerhalb des Kollektivs erstreckt sich von normaler Funktionsfähigkeit der Nieren bis hin zu terminaler Niereninsuffizienz mit erforderlicher Nierenersatztherapie (N = 135) (**Tabelle 3.7**).

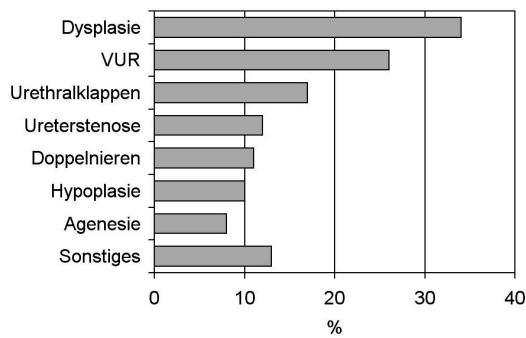


Abbildung 3.2: Renale Phänotypen der Kohorte; N = 128

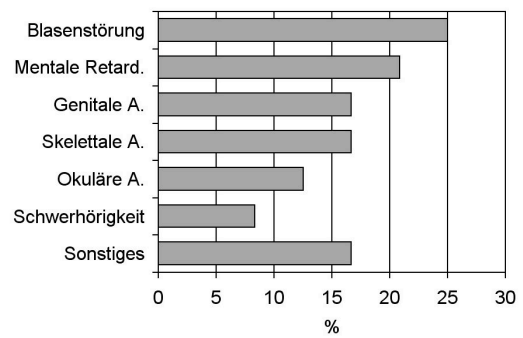


Abbildung 3.3: Extrarenale Manifestationen; N= 24

| Diagnose | Gesamt | Unilateral | Bilateral |
|--------------------------|----------|------------|-----------|
| Vesikoureteraler Reflux | 33 (26%) | 19 (15%) | 14 (11%) |
| Nierendysplasie | 43 (34%) | 25 (20%) | 18 (14%) |
| Isolierte Dysplasie | 12 (09%) | 09 (07%) | 03 (02%) |
| Zystische Dysplasie | 21 (16%) | 11 (09%) | 10 (08%) |
| Hypodysplasie | 10 (08%) | 05 (04%) | 05 (04%) |
| Nierenhypoplasie | 13 (10%) | 06 (05%) | 07 (05%) |
| Urethralklappen | 22 (17%) | - | - |
| Ureterstenose | 15 (12%) | 12 (09%) | 03 (02%) |
| Doppelniere | 14 (11%) | 10 (08%) | 04 (03%) |
| Nierenagenesie | 10 (08%) | 10 (08%) | - |
| Primärer Megaureter | 02 (02%) | 02 (02%) | - |
| Uretrektomie | 03 (02%) | 03 (02%) | - |
| Ureterozele | 02 (02%) | 02 (02%) | - |
| Extrarenale Erkrankungen | 24 (19%) | - | - |

Tabelle 3.6: Klinische Diagnosen des Patientenkollektivs; N = 128, Doppelzählungen möglich

| Nierenfunktion | Prozentualer Anteil |
|---|---------------------|
| Normale Nierenfunktion (GFR > 70 ml/min) | 37,0 |
| Chronische Niereninsuffizienz (GFR > 15 und < 70 ml/min) | 33,3 |
| Terminale Niereninsuffizienz (GFR < 15 ml/min) | 29,7 |

Tabelle 3.7: Nierenfunktion des untersuchten Kollektivs; N = 135. GFR = Glomeruläre Filtrationsrate (berechnet in ml/min pro 1,73 m² Körperoberfläche nach der Schwartz-Formel)

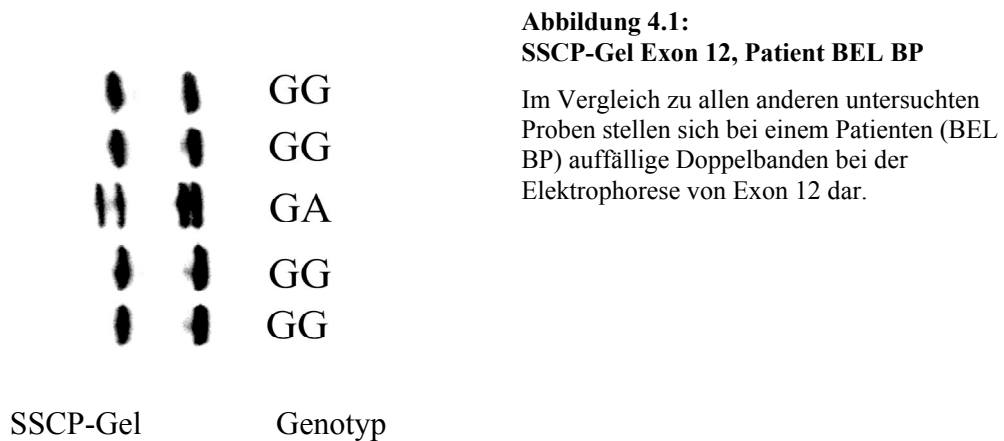
4 Ergebnisse

Durch das Mutationsscreening wurden eine Mutation und sieben Polymorphismen identifiziert. Die Nomenklatur erfolgte in Referenz zur *EYA1*-Sequenz von NM 000503 (**Kapitel 8.3**). Nukleotid 1 entspricht der ersten Position des Start-ATG.

4.1 EYA1-Mutationen

4.1.1 Exon 12: 1319 G > A; R440Q

Bei Patient BEL BP wurde während der SSCP-Analyse des zwölften Exons ein elektrophoretisch abweichendes Laufverhalten der Probe beobachtet (**Abbildung 4.1**). Die spezifischen Bandenmuster differierten von allen weiteren untersuchten Patienten.



Bei der Sequenzanomalie, die in der SSCP-Analyse bei 98 Kontrollen (d.h. 196 Allelen nierengesunder Probanden) nicht nachzuweisen war, handelt es sich um eine in einem Allel vorhandene Punktmutation an Nukleotidposition 1319, d.h. um den heterozygoten Austausch einer einzelnen Base im Vergleich zum Wildtyp, wie die in der Direktsequenzierung identifizierte Basenfolge zeigt (**Abbildung 4.2**; zum Vergleich mit Darstellung des Wildtyps).

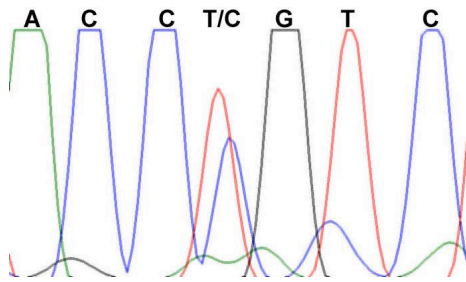


Abbildung 4.2: Sequenz Exon 12 bei Patient BEL BP; Darstellung revers und komplementär

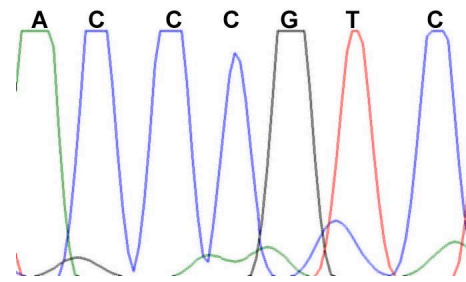


Abbildung 4.3: Vergleichssequenz des Wild-typs; Darstellung revers und komplementär

An jener Position wird im Sinne einer Transition die Purinbase Guanin durch Adenin ersetzt, was in der Konsequenz zu einer Abweichung der Aminosäureabfolge des von *EYA1* kodierten Proteins führt. Es entsteht ein die Kodierung verändernder Austausch im für die 440. Aminosäure kodierenden Basentriplett: Aus der Basenfolge Cytosin-Guanin-Guanin, die für Arginin kodiert, wird Cytosin-Adenin-Guanin und somit eine Kodierung für Glutamin. Durch diese Mutation, bezeichnet als R440Q, wird im Protein die basische Aminosäure Arginin, die eine positiv geladene Seitenkette enthält, durch das neutrale Glutamin substituiert. R440Q ist in der hochkonservierten EYA-Domäne lokalisiert. Einen Homologievergleich zwischen Proteinsequenzen verschiedener Spezies für EYA1 sowie zwischen den humanen Proteinsequenzen aller Mitglieder der EYA-Familie im Bereich von R440Q zeigen die **Tabelle 4.1** und **Tabelle 4.2**. Nur bei der Sequenz des humanen *EYA3* findet sich eine Abweichung an Position der Mutation; statt der Aminosäure Arginin wird Lysin in das Protein eingebaut, eine ebenfalls basische Aminosäure mit positiv geladener Seitenkette.

| Spezies | Proteinsequenz | Referenz |
|---------------------|----------------------------------|-----------|
| <i>Homo sapiens</i> | GGVDWMRKLAFRYRR <u>R</u> VKEIYNT | NM 000503 |
| <i>Mus musculus</i> | GGVDWMRKLAFRYRRVKEIYNT | BC 060260 |
| <i>Danio rerio</i> | GGVDWMRKLAFRYRRVKEIYTT | NM 131193 |

Tabelle 4.1: Vergleich der Proteinsequenzen EYA1 verschiedener Spezies; Unterstrich: Position der Mutation

| Gen | Proteinsequenz | Referenz |
|------|---------------------------------|-----------|
| EYA1 | GGVDWMRKLAFRYR <u>R</u> VKEIYNT | NM 000503 |
| EYA2 | GGVDWMRKLAFRYRRVKEMYN | NM 172113 |
| EYA3 | GGVDWMRKLAFRYRKVREIYDK | NM 001990 |
| EYA4 | GGVDWMRKLAFRYRRVKELYNT | NM 004100 |

Tabelle 4.2: Vergleich der humanen Proteinsequenz EYA1-EYA4; Unterstrich: Position der Mutation

Die von R440Q betroffene Patientin war zum Zeitpunkt der Untersuchung 3,5 Jahre alt. Seit Geburt bestanden rezidivierende Harnwegsinfektionen bei rechtsseitigem vesikoureteralem Reflux Grad IV. Im Alter von 2 ³/₁₂ Jahren erfolgte eine operative Sanierung. Zusätzlich besteht eine beidseitige, rechtsseitig führende renale Dysplasie mit normaler GFR und milder Proteinurie. Zur Zeit erfolgen eine suffiziente medikamentöse Therapie mit ACE-Inhibitoren sowie eine antiinfektiöse Prophylaxe bei Blasenentleerungsstörung mit Restharnbildung. Bei sorgfältiger klinischer Examination nach Detektion der Mutation konnten zusätzlich beidseits branchiale Zysten und präaurikuläre Mulden identifiziert werden (**Abbildung 4.4**). Auch bei der Mutter der Patientin, bei der im Rahmen einer Familienuntersuchung eine Mutationssuche in *EYA1* erfolgte, konnte die Mutation R440Q nachgewiesen werden. An klinischen Diagnosen sind bei ihr Taubheit sowie präaurikuläre Anhängsel bekannt. Die GFR und die renale Ultraschalluntersuchung sind unauffällig.



Abbildung 4.4:
Anomalien bei Patientin
und Mutter

Die Patientin (rechts) weist präaurikuläre Mulden auf, bei der Mutter (links) finden sich präaurikuläre Anhängsel (*tags*).

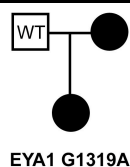


Abbildung 4.5:
Stammbaum der
Kernfamilie der BOR-
Patientin

4.2 Polymorphismen in EYA1

Insgesamt wurden in *EYA1* sieben Polymorphismen (PM) in vier verschiedenen Exonen gefunden. Zur Identifikation der den Polymorphismen zugrunde liegenden interindividuellen Sequenzunterschiede wurden in der Patienten- sowie Kontrollkohorte exemplarische Sequenzierungen von Proben mit für den PM charakteristischen Laufmustern durchgeführt und die Anzahl der existierenden Genotypen ermittelt. Nach Zuordnung der Genotypen zu den von ihnen bedingten spezifischen Bandenmustern des SSCP-Gels konnte die Auszählung der einzelnen Ausprägungen und die Berechnung der relativen Allelhäufigkeiten in den Kollektiven ausgeführt werden. Folgende Gleichung wurde für die Bestimmung der Allelfrequenzen angewendet:

$$H(a) = (2X + Y) / N$$

Gleichung 4.1:
Bestimmung der
Allelfrequenzen

H(a) = relative Häufigkeit des Allels a; **X** = Anzahl der a Homozygoten; **Y** = Anzahl der a Heterozygoten
N = Gesamtanzahl der Allele des untersuchten Kollektivs

Basierend auf den experimentell ermittelten Allelfrequenzen in den Kollektiven erfolgte eine Kalkulation der erwarteten Verteilung (Normalverteilung) der Genotypen durch Anwendung der Hardy-Weinberg-Gleichung und eine Überprüfung der Abweichungen zwischen beobachteten und erwarteten Daten mittels Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz. Des Weiteren wurden die beobachteten Allelhäufigkeiten der Patientengruppe mit denen des Kontrollkollektivs auf signifikante Unterschiede mittels Chi-Quadrat-Test verglichen, um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines bestimmten Genotyps des PM und der Entwicklung von CAKUT besteht, wie etwa im Rahmen einer *Modifier*-Funktion denkbar. Eine Übersicht über die identifizierten Polymorphismen ist in **Tabelle 4.3** zusammengestellt.

| Lokalisation | Nukleotidposition | Variante | Allelfrequenz |
|--------------|-------------------|----------|---------------|
| Exon 1 | 58 C > G | P20A | 0,0037 |
| Exon 7 | 813 A > G | T271T | 0,074 |
| Exon 12 | 1278 C > T | G426G | 0,1481 |
| Exon 16 | 1755 T > C | H585H | 0,285 |
| Intron 15 | IVS 15-3 C > T | | 0,2148 |
| Intron 15 | IVS 15-23 A > G | | 0,2852 |
| Intron 15 | IVS 15-55 G > A | | 0,2 |

Tabelle 4.3: In *EYAI* identifizierte Polymorphismen; Patientenkollektiv; N = 135

4.2.1 Exon 1: 58 C > G ; P20A

Bei diesem seltenen, bereits beschriebenen PM handelt es sich um einen Austausch von Cytosin zu Guanin an Position 58, der zu einer Substitution der Aminosäure Prolin durch Alanin führt. Ein heterozygoter Genotyp wurde bei einem Patienten (HD 130) identifiziert, alle anderen Personen der Patientengruppe wiesen den Wildtyp auf. Der P20A betroffene Patient (zum Zeitpunkt der Untersuchung 17 Jahre alt) weist als klinische Manifestation Urethralklappen sowie refluxive Megaureteren auf und ist bei terminaler Niereninsuffizienz hämodialysepflichtig.

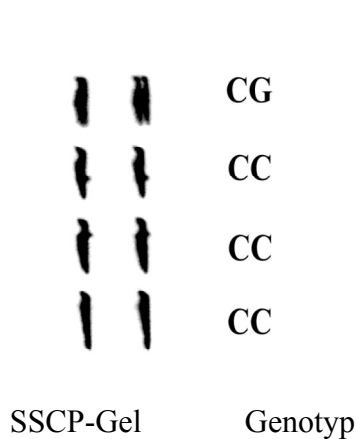


Abbildung 4.6:
SSCP-Gel Exon 1; Polymorphismus

Bei Patient HD 130 findet sich der Polymorphismus P20A

Folgende Daten wurden im Patientenkollektiv für diesen PM erhoben (**Tabelle 4.4**):

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| CC | 134 | 134 | |
| CG | 1 | 1 | C = 0,9963 |
| GG | 0 | 0 | G = 0,0037 |

Tabelle 4.4: Polymorphismus Exon 1; Patientenkollektiv; N = 135

Im Chi-Quadrat-Test berechnet sich die Prüfgröße $V = 0$. Das 0,95 Quantil der χ^2 -Verteilung mit zwei Freiheitsgraden (bezeichnet mit $\chi^2_{(2; 0,95)}$) beträgt 5,991. Da $V < \chi^2_{(2; 0,95)}$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beobachteter und erwarteter Genotypenverteilung; die Genotypenverteilung des Patientenkollektivs befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für das Kontrollkollektiv ergibt sich folgende Darstellung:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| CC | 143 | 143 | |
| CG | 1 | 1 | C = 0,997 |
| GG | 0 | 0 | G = 0,003 |

Tabelle 4.5: Polymorphismus Exon 1; Kontrollkollektiv; N = 144

Da Prüfgröße $V = 0 < \chi^2_{(2; 0,95)}$, befindet sich auch die Verteilung der Genotypen des Kontrollkollektivs im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für den Vergleich der Allelhäufigkeiten zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv berechnet sich:

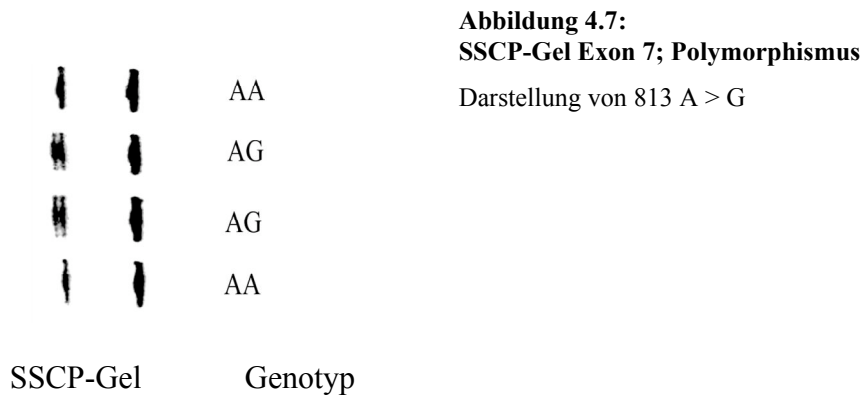
| Allel | C | G |
|--------------------------------|-----|---|
| Patienten (270 Allele) | 269 | 1 |
| Kontrollen (288 Allele) | 287 | 1 |

Tabelle 4.6: Vergleich Patienten/Kontrollen PM Exon 1

Im Chi-Quadrat-Test ergibt sich die Prüfgröße $V = 0,0021$. Das 0,95 Quantil der χ^2 -Verteilung mit einem Freiheitsgrad (bezeichnet mit $\chi^2_{(1; 0,95)}$) beträgt 3,84. Da $V < \chi^2_{(1; 0,95)}$, ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Allele zwischen Patientengruppe und Kontrollkollektiv.

4.2.2 Exon 7: 813 A > G; T271T

Durch die SSCP-Analyse von Exon 7 konnte ein stiller PM an Nukleotidposition 813 identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um eine Substitution von Adenin durch Guanin. Die Bandenmuster des SSCP-Gels sind in **Abbildung 4.7** wiedergegeben.



Für diesen PM wurden im Patientenkollektiv folgende Daten bestimmt:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| AA | 115 | 116 | |
| AG | 20 | 18 | A = 0,926 |
| GG | 0 | 1 | G = 0,074 |

Tabelle 4.7: Polymorphismus Exon 7; Patientenkollektiv; N = 135

Für das Kontrollkollektiv ergibt sich folgende Aufstellung:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| AA | 87 | 85 | |
| AG | 5 | 9 | A = 0,9521 |
| GG | 2 | 0 | G = 0,0479 |

Tabelle 4.8: Polymorphismus Exon 7; Kontrollen; N = 94

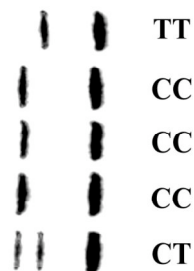
Im Chi-Quadrat-Test errechnet sich für das Patientenkollektiv die Prüfgröße $V_p = 1,1096$ und für die Kontrollgruppe $V_k = 3,1661$. Da V_p und $V_k < \chi^2_{(2; 0,95)}$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beobachteter und erwarteter Genotypenverteilung in den Kollektiven. Auch im Vergleich der Allelhäufigkeiten ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kollektiven (Prüfgröße $V = 1,283$ und somit $V < \chi^2_{(1; 0,95)}$):

| Allel | A | G |
|--------------------------------|-----|----|
| Patienten (270 Allele) | 250 | 20 |
| Kontrollen (188 Allele) | 179 | 9 |

Tabelle 4.9: Vergleich Patienten/Kontrollen PM Exon 7

4.2.3 Exon 12: 1278 C > T; G426G

An Nukleotidposition 1278 konnte ein stiller PM, der aus einer Substitution von Cytosin durch Thymin besteht, beobachtet und seine zugehörigen Genotypen bestimmt werden. Die Bandenmuster des SSCP-Gels sind in **Abbildung 4.8** wiedergegeben:



SSCP-Gel Genotyp

Abbildung 4.8:
SSCP-Gel Exon 12, Polymorphismus.
Darstellung Sequenzvariante 1278 C > T

Die in den beiden folgenden Tabellen zusammengestellten Daten wurden in Patientenkollektiv und Kontrollkohorte erhoben:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| CC | 100 | 97 | |
| CT | 29 | 35 | C = 0,8481 |
| TT | 6 | 3 | T = 0,1519 |

Tabelle 4.10: Polymorphismus Exon 12; Patientenkollektiv; N = 135

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| CC | 71 | 71 | |
| CT | 25 | 25 | C = 0,8520 |
| TT | 2 | 2 | T = 0,1480 |

Tabelle 4.11: Polymorphismus Exon 12; Kontrollen; N = 98

Im Chi-Quadrat-Test errechnen sich die Prüfgrößen $V_p = 1,6082$ für das Patientenkollektiv und $V_k = 0$ für die Kontrollgruppe. Da $V_p < \chi^2_{(2; 0,95)}$ und $V_k < \chi^2_{(2; 0,95)}$, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beobachteter und erwarteter Genotypenverteilung in beiden Kollektiven; somit besteht in beiden Gruppen ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für den Vergleich der Allelhäufigkeiten zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv berechnet sich bei einer Prüfgröße $V = 0,0135 < \chi^2_{(1; 0,95)}$ kein signifikanter Unterschied zwischen Patientengruppe und Kontrollkollektiv:

| Allel | C | T |
|--------------------------------|-----|----|
| Patienten (270 Allele) | 229 | 41 |
| Kontrollen (196 Allele) | 167 | 29 |

Tabelle 4.12: Vergleich Patienten/Kontrollen PM Exon 12

4.2.4 Exon 16:1755 T > C; H585H

Für diesen stillen PM, der einen Austausch der Pyrimidinbase Thymin zu Cytosin an Nukleotidposition 1755 beinhaltet, konnten für das Patientenkollektiv folgende Daten erhoben werden:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| TT | 78 | 69 | |
| TC | 37 | 55 | T = 0,715 |
| CC | 20 | 11 | C = 0,285 |

Tabelle 4.13: Polymorphismus Exon 16; Patienten; N = 135

Es errechnet sich eine Prüfgröße $V = 6,6857$. Da $V > \chi^2_{(2; 0,95)}$, ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der erwarteten und der beobachteten Verteilung der Genotypen. Das Patientenkollektiv befindet sich diesbezüglich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, d.h., die Verteilung der Genotypen dieses PM weicht von der erwarteten Normalverteilung ab. Für das Kontrollkollektiv ergibt sich:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| TT | 59 | 59 | |
| TC | 32 | 32 | T = 0,7895 |
| CC | 4 | 4 | C = 0,2105 |

Tabelle 4.14: Polymorphismus Exon 16; Kontrollen; N = 95

Da die Prüfgröße $V = 0 < \chi^2_{(2; 0,95)}$, befindet sich die Verteilung der Genotypen des Kontrollkollektivs im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für den Vergleich der Allelhäufigkeiten zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv berechnet sich:

| Allel | T | C |
|--------------------------------|-----|----|
| Patienten (270 Allele) | 193 | 77 |
| Kontrollen (190 Allele) | 150 | 40 |

Tabelle 4.15: Vergleich Patienten/Kontrollen PM Exon 16

Da die Prüfgröße $V = 3,278 < \chi^2_{(1; 0,95)}$, ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeit zwischen Patientengruppe und Kontrollkollektiv.

4.2.5 IVS 15-23; A > G

Bei diesem in Intron 15 befindlichen und mit H585H gekoppelten PM liegt ein Austausch der Purinbasen Adenin zu Guanin vor, der 23 Basenpaare vor Exon 16 lokalisiert ist. Eine Zusammenstellung der Daten findet sich in **Tabelle 4.16**:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| AA | 78 | 69 | |
| AG | 37 | 55 | A = 0,7148 |
| GG | 20 | 11 | G = 0,2852 |

Tabelle 4.16: Polymorphismus IVS 15-23; Patienten; N = 135

Es errechnet sich eine Prüfgröße $V = 6,6857$. Da $V > \chi^2_{(2; 0,95)}$, ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der erwarteten und der beobachteten Verteilung der Genotypen. Das Patientenkollektiv befindet sich diesbezüglich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für das Kontrollkollektiv ergibt sich:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| AA | 59 | 59 | |
| AG | 32 | 32 | T = 0,7895 |
| GG | 4 | 4 | C = 0,2105 |

Tabelle 4.17: Polymorphismus IVS 15-23; Kontrollen; N = 95

Da Prüfgröße $V = 0 < \chi^2_{(2; 0,95)}$, befindet sich die Genotypenverteilung der Kontrollen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für die Allelhäufigkeiten berechnet sich:

| Allel | A | G |
|--------------------------------|-----|----|
| Patienten (270 Allele) | 193 | 77 |
| Kontrollen (190 Allele) | 150 | 40 |

Tabelle 4.18: Vergleich Patienten/Kontrollen IVS 15-23

Da die Prüfgröße $V = 3,278 < \chi^2_{(1; 0,95)}$, ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeit zwischen Patientengruppe und Kontrollkollektiv.

4.2.6 IVS 15-3; C > T

Auch bei dieser Variante im Intron 15 handelt es sich um einen Austausch der Pyrimidinbase Cytosin zu Thymin, der drei Basenpaare vor Exon 16 lokalisiert ist. Für das Patientenkollektiv und Kontrollkohorte ergeben sich folgende Aufstellungen:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| CC | 77 | 83 | |
| CT | 58 | 46 | C = 0,7852 |
| TT | 0 | 6 | T = 0,2148 |

Tabelle 4.19: Polymorphismus IVS 15-3; Patienten; N = 135

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| CC | 50 | 55 | |
| CT | 45 | 35 | C = 0,7632 |
| TT | 0 | 5 | T = 0,2368 |

Tabelle 4.20: Polymorphismus IVS 15-3; Kontrollen; N = 95

Es errechnet sich für das Patientenkollektiv eine Prüfgröße $V_p = 7,6096$ und für das Kontrollkollektiv $V_k = 6,488$. Da V_p und $V_k > \chi^2_{(2; 0,95)}$, ergibt sich sowohl für die Gruppe der Patienten als auch für die Kontrollen ein signifikanter Unterschied zwischen der erwarteten und der beobachteten Verteilung der Genotypen. Beide Kollektive befinden sich diesbezüglich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für den Vergleich der Allelhäufigkeiten berechnet sich mit Prüfgröße $V = 0,3114 < \chi^2_{(1; 0,95)}$ kein signifikanter Unterschied der zwischen Patientengruppe und Kontrollkollektiv:

| Allel | C | T |
|--------------------------------|-----|----|
| Patienten (270 Allele) | 212 | 58 |
| Kontrollen (190 Allele) | 145 | 45 |

Tabelle 4.21: Vergleich Patienten/Kontrollen IVS 15-3

4.2.7 IVS 15-55; G > A

Dieser Polymorphismus besteht aus einem Austausch von Guanin zu Adenin, 55 Basenpaare vor Exon 16 in Intron 15. Es wurden folgende Daten erhoben:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| GG | 85 | 86 | |
| GA | 46 | 44 | G = 0,8 |
| AA | 4 | 5 | A = 0,2 |

Tabelle 4.22: Polymorphismus IVS 15-55; Patienten; N = 135

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet | Allelfrequenz |
|-----------|------------|----------|---------------|
| GG | 61 | 63 | |
| GA | 32 | 29 | G = 0,8105 |
| AA | 2 | 3 | A = 0,1895 |

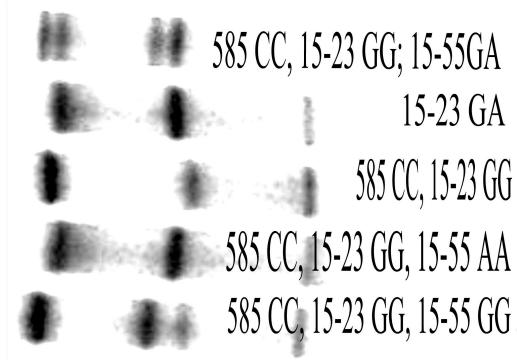
Tabelle 4.23: Polymorphismus IVS 15-55; Kontrollen; N = 95

Für das Patientenkollektiv errechnet sich eine Prüfgröße $V_p = 0,1614$, für die Kontrollgruppe $V_k = 0,3798$. Da $V_p < \chi^2_{(2; 0,95)}$ und $V_k < \chi^2_{(2; 0,95)}$, befinden sich beide Kollektive bezüglich der Verteilungsmuster der Genotypen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Im Vergleich der Allelhäufigkeiten ergibt sich mit $V = 0,0785 < \chi^2_{(1; 0,95)}$ kein signifikanter Unterschied zwischen Patientengruppe und Kontrollkollektiv.

| Allel | G | A |
|--------------------------------|-----|----|
| Patienten (270 Allele) | 216 | 54 |
| Kontrollen (190 Allele) | 154 | 36 |

Tabelle 4.24: Vergleich Patienten/Kontrollen IVS 15-55

Da die letzten vier der beschriebenen Polymorphismen simultan während der SSCP-Analyse von Exon 16 und seinen angrenzenden intronischen Strukturen identifiziert wurden, ist die Wiedergabe der aufgetretenen Bandenmuster in **Abbildung 4.9** exemplarisch zusammengefaßt.



SSCP-Gel

Genotypen

Abbildung 4.9:
SSCP-Gel Exon 16 und Intron 15
Diverse Genotypen dieser Region.

5 Diskussion

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht die Frage, ob Mutationen im Gen *EYA1* von Relevanz für die Entstehung isoliert auftretender angeborener Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege (CAKUT) sein können.

Die in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse werden nun in ihrer Bedeutung für die Krankheitsgenese näher erläutert und mit bereits bekannten Fakten zum untersuchten Gen in einen Gesamtzusammenhang gestellt. Zunächst erfolgt eine Erläuterung der Bedeutung der beschriebenen Polymorphismen, im Anschluß soll unter Bezugnahme auf bereits beschriebene Mutationen in *EYA1* und ihre pathogenetische Relevanz eine Einordnung der identifizierten Mutation vor dem Hintergrund der Fragestellung erfolgen. Abschließend ergibt sich eine Darstellung der Schlußfolgerungen und Konsequenzen, die aus den gewonnen Ergebnissen und Erkenntnissen resultieren.

5.1 Polymorphismen in EYA1

5.1.1 Einzelnukleotid-Polymorphismen

Die genomische Sequenz zweier nicht verwandter Individuen ist zu 99,9% identisch. Nur 0,1% der DNA enthält Variationen innerhalb der Sequenz, deren größter Anteil aus Unterschieden an einzelnen Basenpaaren besteht. Dieser Typ der Sequenzvariation wird als Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single-nucleotide-polymorphism*, SNP) bezeichnet und tritt mit einer Frequenz von circa einem pro tausend Basenpaaren auf [Knippers, 2001].

Die Unterscheidung zwischen Punktmutation und SNP erfolgt über definierte Häufigkeiten des Auftretens der Abweichung: Als Polymorphismus werden Variationen der Nukleotidsequenz bezeichnet, die mit einer Frequenz von 1% oder mehr in der Bevölkerung auftreten. SNPs, die keine Veränderung in der Aminosäuresequenz eines Proteins hervorrufen, werden als synonym oder still, solche mit Veränderung der Aminosäurefolge als nicht-synonym bezeichnet. Schätzungen zufolge liegen circa 50% der SNPs in nicht-kodierenden Sequenzen, und weitere 25% führen nicht zu Änderungen in der Aminosäurefolge, so daß es sich nur bei einem Viertel um nicht-synonyme SNPs handelt [Shastry, 2002]. Eine Auflistung von identifizierten SNPs des humanen Genoms findet sich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>.

5.1.2 Die Bedeutung von SNPs als genetische Marker

SNPs können durch Auftreten in kodierenden oder regulatorischen Regionen eines Genes funktionelle Konsequenzen haben. Vergleichende Studien haben gezeigt, daß die genetische Variation durch SNPs einer der Faktoren in Assoziation mit der Entstehung häufiger Erkrankungen sein und auch die Ausprägung vieler menschlicher Merkmale bestimmen kann [Shastry, 2002]. Eine Auswahl von Erkrankungen, die mit dem Auftreten definierter SNPs assoziiert sind, findet sich in **Tabelle 5.1**:

| Erkrankung | Gen(e) |
|---------------------------|---|
| Asthma | Endothelin 1; Neuronal nitricoxide synthetase 1 |
| Migräne | Insulinrezeptor |
| Syst. Lupus Erythematodes | Prolactin |
| Idiopathische Arthritis | Macrophage inhibitory factor |
| Biliäre Zirrhose | Mannose binding protein |
| Typ II Diabetes | Syntaxin 1A |

Tabelle 5.1: Auswahl von Erkrankungen in Assoziation mit SNPs, nach Shastry 2002

Wegen ihres hochfrequenten Auftretens im Genom und der Möglichkeit, die Assoziation zwischen Phänotyp und funktioneller Variante direkt untersuchen zu können, sind SNPs als Marker in der Humangenetik die Basis zur Erstellung genetischer Karten geworden, anhand derer komplexe genetische Vorgänge und Vererbungen untersucht werden [Gray *et al.*, 2000]. Assoziationsstudien werden als geeignete Möglichkeit zur Lokalisation komplexer, polygenetischer Erkrankungen betrachtet [Shastry, 2002]. Von Interesse ist hierbei, welche SNP-Muster regelmäßig mit der Vererbung einer solchen Erkrankung gekoppelt sind. Häufig werden in der Praxis eine Untersuchung und ein Vergleich der SNP-Muster in relevanten Kandidatengenomen durchgeführt. Für die humane CAKUT-Pathogenese wird beispielsweise der Einfluß eines definierten SNPs (A1332G) im *AT2R* (*Angiotensin type 2 receptor*) Gen kontrovers diskutiert. In einigen Studien konnte eine signifikante Häufung dieses SNPs in den Patientengruppen nachgewiesen werden [Yerkes *et al.*, 1997; Hohenfellner *et al.*, 1999; Rigoli *et al.*, 2004], in anderen Kollektiven wurde dies nicht bestätigt [Hiraoka *et al.*, 2001].

5.1.3 PM P20A

Der P20A-Polymorphismus in Exon 1 ist nicht-synonym. Es ist auffällig, daß der Wildtyp Cytosin im Patientenkollektiv mit einer Frequenz von 0,9963 und die Variante Guanin mit einer Frequenz von nur 0,0037 auftritt. Unter Berücksichtigung der Definition, daß ein PM dann vorliegt, wenn die Frequenz seines Auftretens größer 0,01 ist, kann der Begriff im engeren Sinne nicht für die vorliegende Variante angewendet werden.

Im Kontrollkollektiv ergibt sich eine dem Patientenkollektiv entsprechende Verteilung. Eine Person der Kontrollgruppe weist P20A in heterozygoter Form auf, was das Vorliegen einer Mutation unwahrscheinlich macht. Unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> findet sich ein für die entsprechende Position beschriebener PM. Für ein Kollektiv von nordamerikanischen Personen wird eine Frequenz von 0,7 für den Wildtyp Cytosin und 0,3 für die Variante Guanin angegeben. Für andere Populationen wird jedoch eine Frequenz von 1 für den Wildtyp beschrieben, was darauf hindeutet, daß der PM nicht stabil in verschiedenen Populationen vorhanden ist. Unter Berücksichtigung aller genannten Tatsachen scheint die Annahme berechtigt, daß es sich bei P20A um eine genetische Variante im Sinne eines SNPs handelt, die jedoch nicht in allen Populationen konstant gefunden wird.

Die funktionelle Relevanz der Substitution der hydrophoben Aminosäure Prolin durch das amphiphile Alanin im Genprodukt von *EYAI* ist nicht bekannt, und es bleibt unklar, ob P20A bei Patient HD 130 eine *Modifier*-Rolle übernimmt.

5.1.4 PM H585H und IVS 15-23; A > G

5.1.4.1 Linkage Disequilibrium

Für die Polymorphismen H585H und IVS 15-23 findet sich eine 100%ige Übereinstimmung der Genotypen in der Patienten- wie auch in der Kontrollgruppe. Bei Auftreten des Genotyps T an Position 1755 findet sich regelmäßig Genotyp A in IVS 15-23, während der Genotyp C des ersten PM immer an Genotyp G des zweiten gekoppelt ist.

Das Phänomen, daß einzelne, chromosomal benachbarte Allele in Abhängigkeit voneinander auftreten können, wird als vollständiges Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*) bezeichnet. Die beobachteten Kombinationstypen werden als

Haplotypen bezeichnet (die hier auftretenden Haplotypen sind 1755 T / IVS 15-23 A sowie 1755 C / IVS 15-23 G). Kopplungsungleichgewichte sind von großer Relevanz für die Nutzung einer Organisationsstruktur des humanen Genoms bei der Suche nach krankheitsassoziierten Haplotypen: Das humane Genom kann in genetische Blöcke unterteilt werden, in denen nur wenige evolutionäre Rekombinationsereignisse auftraten und durch Kopplungsungleichgewicht verschiedener Polymorphismen nur wenige Haplotypen beobachtet werden können (Haplotyp-Blockstruktur) [Gabriel *et al.*, 2002]. Die beobachtete Anzahl von Allelkombinationen innerhalb eines Haplotyp-Blocks ist reduziert. Ist eine Blockstruktur identifiziert, bedeutet dies einen verringerten Aufwand bei der Suche nach krankheitsassoziierten Haplotypen [Freudenberg *et al.*, 2002]. Die Besprechung der hier identifizierten gekoppelten Sequenzvarianten erfolgt im weiteren gemeinsam.

5.1.4.2 Statistische Auswertung

Auffällig ist, daß sich die Verteilung der Genotypen für beide PMs innerhalb der Patientengruppe im Gegensatz zur Kontrollkohorte nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Bezüglich der Allelfrequenzen besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten. Bei dementsprechend vergleichbaren Häufigkeiten der einzelnen Allele muß ein Unterschied in der Aufteilung der Allele auf die verschiedenen Genotypen zwischen Patienten und Kontrollen bestehen. Ein Chi-Quadrat-Test zum Vergleich der Genotypenhäufigkeiten bringt folgendes Ergebnis:

| Genotypen | Patienten (N = 135) | Kontrollen (N = 95) |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Homozygot Wildtyp (Haplotyp T/A) | 78 | 59 |
| Heterozygot Wildtyp/Variation (TC/AG) | 37 | 32 |
| Homozygot Variation (C/G) | 20 | 4 |

Tabelle 5.2: Vergleich der Genotypenhäufigkeit PM H585 und IVS 15-23 bei Patienten und Kontrollen

Als Prüfgröße errechnet sich im Chi-Quadrat-Test $V = 6,917$. Das 0,95 Quantil der χ^2 -Verteilung mit zwei Freiheitsgraden (bezeichnet mit $\chi^2_{(2; 0,95)}$) beträgt 5,991. Da $V > \chi^2_{(2; 0,95)}$, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Genotypenverteilung der Patientenkohorte und der des Kontrollkollektivs.

In der Zusammenfassung der erhobenen Daten ergibt sich, daß bei vergleichbaren Allelfrequenzen in den Kollektiven ein Unterschied in der Genotypenverteilung vorliegt.

Eine mögliche Interpretation dieser Resultate ist, daß ein spezifischer Genotyp innerhalb der Patientengruppe zu häufig auftritt, d.h., daß er mit dem Vorliegen von CAKUT gekoppelt auftritt. Zum Vergleich der erwarteten mit den beobachteten Genotypen diene **Tabelle 5.3**:

| Genotypen | Beobachtet | Erwartet |
|--------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Homozygot Wildtyp | 78 | 69 |
| Heterozygot Wildtyp/Variation | 37 | 55 |
| Homozygot Variation | 20 | 11 |

Tabelle 5.3: Vergleich erwartete/beobachtete Genotypen im Patientenkollektiv; N = 135

Es ist erkennbar, daß in der Patientenkohorte relativ zu wenig heterozygote Merkmalsträger zugunsten der homozygoten Genotypen vorhanden sind. Eine mögliche Deutung dieses Phänomens wird in **Kapitel 5.1.4.5** diskutiert. Für den Genotyp „Homozygot Variation“ findet sich ein Plus von 81% im Vergleich von beobachtetem und erwartetem Genotyp; für den Genotyp „Homozygot Wildtyp“ liegt dies bei 13%. Der homozygote Haplotyp 1755 **C** / IVS 15-23 **G** scheint überzufällig häufig bei CAKUT Patienten aufzutreten und ist eventuell von funktioneller Relevanz (s.u.).

5.1.4.3 Potentielle Konsequenzen von Haplotyp 1755 **C** / IVS 15-23 **G**

Es stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen synonyme Polymorphismen und Sequenzvariationen in intronischen Strukturen von pathogenetischer Relevanz sein können. Deshalb sei im folgenden ein kurzer Überblick zu den Charakteristika des genetischen Codes und seiner Anwendung sowie zu Abweichungen in der intronischen Sequenz gegeben:

Der genetische Code ist degeneriert, universal und konservativ. Dies bedeutet, daß alle Aminosäuren (bis auf Tryptophan und Methionin) von mindestens zwei möglichen Basentriplets (Codons) kodiert werden können (Degeneriertheit), daß der Code sowohl für Pro- wie auch für Eukaryonten gilt (Universalität) und daß es zumeist nur bei Veränderungen an zweiter Stelle des Codons zu einem Austausch zwischen den einzelnen Gruppen hydrophiler, amphiphiler und hydrophober Aminosäuren kommt

(Konservativität). Ein Basenaustausch innerhalb der genomischen Sequenz führt nicht obligat zu einer Veränderung des Genprodukts, er kann in seiner Auswirkung neutral bleiben, wenn ein Basentriplett in ein synonymes umgewandelt wird und damit die Primärstruktur des Genprodukts unverändert bleibt. Ob die verschiedenen Möglichkeiten der Kodierung und ihr unterschiedlicher Einsatz von Bedeutung sind und ob durch Austausch zweier synonymen Codons relevante Veränderungen bezüglich Funktionalität und Expressionsniveau des Proteinprodukts entstehen können, ist nicht sicher zu beurteilen. Von Grantham *et al.* [1980] wurde die These aufgestellt, daß die Wahl der dritten Base eines Codons nicht zufällig geschieht, sondern daß die Nutzung der synonymen Kodierungsmöglichkeiten für das Genom jeder Spezies verschieden ist und in Zusammenhang mit der Expression von m-RNA steht. Zusätzlich zu diesem intergenomischen Unterschied bestehen auch Hinweise auf differierende Anwendung des genetischen Codes bei Genen desselben Genoms [Gouy *et al.*, 1982; Sharp *et al.*, 1986]. Als Erklärung für diese Beobachtungen wird hoher Selektionsdruck nach gesteigerter translationaler Effizienz bei stark exprimierten Genen angenommen [Robinson *et al.*, 1984; Gouy *et al.*, 1982]. Die Effekte auf die Translationsrate entstehen hierbei durch die differierende Menge an codonspezifischen t-RNA Molekülen. Schnelle Translation von m-RNA in Genen mit hohem Expressionsniveau wird durch Kodierung für die häufig vorhandenen t-RNAs erreicht [Liljenstrom *et al.* von Heijne, 1987]. Eine Kodierungsstrategie, die als Endergebnis zu einer erhöhten Proteinsyntheserate führt, kann von der natürlichen Selektion gefördert werden und einen Selektionsvorteil darstellen [Xia, 1996].

Stumme Mutationen, die in diesen Mechanismus eingreifen, können durch Veränderung der Kodierungsstrategie zur Beeinträchtigung des Expressionsniveaus führen. Für den PM H858H besteht an dritter Stelle des Codons ein Austausch von Thymin zu Cytosin. Aus dem für Histidin kodierenden Basentriplett CAT entsteht ein synonymes Codon CAC. Als Kodierung für Histidin wird das Triplet CAT beim Menschen zu 41% und die Folge CAC zu 59% verwendet. Ob das durch 1755 C / IVS 15-23 G potentiell veränderte Expressionsniveau Auswirkungen auf die Nephrogenese hat, bleibt unklar.

5.1.4.4 Intronsische Sequenzvariationen

Ein weiterer Mechanismus, der bei Vorliegen von stummen Mutationen und bei intronischem Nukleotidaustausch betrachtet und diskutiert werden sollte, ist die Entstehung neuer potentieller Spleißstellen.

Bei IVS 15-23 entsteht aus der Basenfolge ACATG die Sequenz ACGTC. Hiermit entsteht durch die Folge GT eine neue, potentielle konventionelle 5'-Spleißstelle, Ob diese von funktioneller Relevanz ist, bleibt jedoch fraglich. Ein Nachweis könnte durch mRNA basierte cDNA-Synthese und Analyse erfolgen.

Durch PM H858H entsteht die Abfolge CAC statt CAT und damit eine neue potentielle exonische, nicht-konventionelle 3'-Spleißstelle (Basenfolge AC). Die Sequenz vor dieser Position ist reich an Pyrimidinnukleotiden. Eine Abfolge von Pyrimidinnukleotiden ist als konservierter, funktioneller Sequenzabschnitt im Bereich vor Spleißstellen bekannt und wird für geordnetes Spleißen benötigt [Knippers, 2001]. Eine Überlegung für einen pathogenetischen Mechanismus bei Homozygotie für die Variante CAC sei, daß durch die Entstehung der potentiellen 3'-Spleißstelle eine veränderte mRNA resultieren kann. Verliefe das Spleißen der prä-mRNA teilweise (nach den Gesetzen der Statistik) vom regulären 5'-Beginn in Intron 15 bis zum neuen exonischen 3'-Ende, entstünde eine mRNA, deren 16. Exon um 54 Basenpaare verkürzt wäre und nur die terminalen 21 Basenpaare des regulären Produkts enthielte. Für das Genprodukt von *EYAI* würde dies einen Verlust von 18 Aminosäuren im vom 16. Exon kodierten Abschnitt des Proteins bedeuten. Da dieser Abschnitt zur funktionell wichtigen EYA-Domäne gehört, wären funktionelle Konsequenzen für das Genprodukt möglich. Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen würde verständlich, daß Homozygotie (also zwei von der Variante betroffene Allele und damit wahrscheinlicheres „falsches“ Spleißen) häufiger zu diesem defizienten Ergebnis führen würde. Die Assoziation des Polymorphismus mit CAKUT könnte dementsprechend auf partiellem Funktionsverlust des *EYAI*-Genprodukts bei Homozygotie beruhen. Bei 20 Patienten (**Tabelle 5.4**) wurde der homozygote Haplotyp 1755 C / IVS 15-23 G identifiziert.

| Patient | Klinische Diagnose | Nierenfunktion |
|----------|--|-----------------|
| _ M 13 | Renale Hypodysplasie beidseits | TPL |
| _ H 10 | Multizystische Nierendysplasie rechts, Reflux III ^o links, arterieller Hypertonus, Adipositas | Normal |
| _ H 55 | Ureteropelvine Stenose links | Normal |
| _ H 82 | Prune-Belly-Syndrom | TPL |
| _ H 130 | Posteriore Urethralklappe | TPL |
| _ H 134 | Zystische Dysplasie beidseits | TPL |
| _ H 136 | Zystische Dysplasie beidseits | TPL |
| _ B 2 | Hypodysplastische Niere sowie Reflux III ^o links, Uterus <i>duplex bicornis</i> | CNI |
| _ B 4 | Posteriore Urethralklappe, Minderbegabung | CNI |
| _ B 10 | Posteriore Urethralklappe, renale Hypodysplasie beidseits | TPL |
| _ B 14 | Reflux IV ^o beidseits | Normal |
| _ B 23.4 | Reflux mit Refluxnephropathie beidseits | Normal |
| _ B 23.5 | Reflux mit Refluxnephropathie rechts | Normal |
| I 11 | Reflux beidseits | CNI |
| _ S 7 | Reflux V ^o beidseits | Normal |
| _ S 13 | Multizystische Dysplasie links | Normal |
| S 22 | Ureteropelvikale Stenose links, Nephrolithiasis rechts | Normal |
| _ S 23 | Posteriore Urethralklappe | TNI |
| _ S 37 | Posteriore Urethralklappe | Dialyse bei TNI |
| _ G 18 | Reflux rechts | CNI |

Tabelle 5.4: Für Haplotyp 1755 C / IVS 15-23 G homozygote Patienten, TPL = transplantiert, CNI = chron. Niereninsuffizienz, TNI = terminale Niereninsuffizienz

5.1.4.5 Weiterführende Überlegungen

Eine weitere Erklärung für das Überwiegen homozygoter Haplotypen im Kollektiv wäre Hemizygotie durch heterozygote Deletionen oder komplexe Rearrangierung im C-terminalen *EYAI*-Bereich. Interessanterweise sind derartige Mutationen bei BOR-Patienten vorbeschrieben [Vervoort *et al.*, 2002]. Im heterozygoten Status führen diese Mutationen auf dem betroffenen Allel zum Verlust der Exone dieses Bereichs. Bei der PCR kommt es ausschließlich zur Amplifikation des gesunden Allels und zu dessen

Darstellung auf dem SSCP-Gel; die Mutation entzieht sich der Detektion. Durch die Amplifikation nur eines Allels entstehen überzufällig häufig homozygote Genotypen, so daß dieses Phänomen als indirekter Hinweis auf komplexe Mutationen gesehen werden kann. Dieser Überlegung folgend, müßten sich auch die anderen C-terminal lokalisierten Polymorphismen bei den potentiell von Hemizygotie betroffenen Patienten homozygot präsentieren. Unter Einbeziehung aller C-terminalen SNPs (H585H, IVS 15-23, IVS 15-3; G426G und IVS 15-55) ergibt sich eine 15-köpfige Patientengruppe mit für diese Region homozygoten Bandenmustern (**Tabelle 5.5**). Ein Nachweis komplexer *EYAI*-Mutationen könnte bei diesen phänotypisch nicht vom BOR-Syndrom betroffenen CAKUT Patienten durch eine semi-quantitative PCR erfolgen [Chang *et al.*, 2004].

| Patient | Klinik | Nierenfunktion |
|---------|--|-----------------|
| _ M 13 | Renale Hypodysplasie beidseits | TPL |
| _ M 19 | Dystope und dysplastische Einzelniere | TPL |
| _ M 23 | Ureteropelvine Stenose | Normal |
| _ H 10 | Multizystische Nierendysplasie rechts, Reflux III ^o links, arterieller Hypertonus, Adipositas | Normal |
| _ H 51 | Zystische Dysplasie beidseits | TPL |
| _ H 55 | Ureteropelvine Stenose links | Normal |
| _ H 65 | Ureteropelvine Stenose beidseits | Normal |
| _ H 82 | Prune-Belly-Syndrom | TPL |
| _ H 130 | Posteriore Urethralklappe | TPL |
| _ H 136 | Zystische Dysplasie beidseits | TPL |
| _ B 2 | Hypodysplastische Niere sowie Reflux III ^o links, Uterus <i>duplex bicornis</i> | CNI |
| _ B 14 | Reflux IV ^o beidseits | Normal |
| _ B 15 | Refluxnephropathie links | Normal |
| _ S 37 | Posteriore Urethralklappe | Dialyse bei TNI |

Tabelle 5.5: Patientengruppe mit C-terminal homozygoten Bandenmustern. TPL = transplantiert, CNI = chron. Niereninsuffizienz, TNI = terminale Niereninsuffizienz

5.1.5 PM IVS 15-3; C > T

Bei dieser intronischen Sequenzvariante, die aus einem Austausch von Cytosin zu Thymin besteht, ist auffällig, daß sich in der Patienten- wie auch in der Kontrollgruppe der homozygote Genotyp für die Variante Thymin nicht nachweisen läßt. Beide Kollektive befinden sich folglich bezüglich der Genotypenverteilung nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. In den Allelfrequenzen bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Eine mögliche Erklärung für die von der Norm abweichende Genotypenverteilung in beiden Gruppen wäre, daß der für die Variante homozygote Genotyp in der SSCP-Analyse kein differentes Bandenmuster liefert und zufällig keine Probe mit diesem nicht visualisierbaren Genotyp zur Sequenzierung ausgewählt wurde. Diese Erklärung erscheint nicht unwahrscheinlich, da die erwartete Anzahl für Homozygotie bei einer Allelfrequenz = 0,2368 für Thymin in der Gruppe von 135 Patienten bei nur 6 läge.

5.1.6 PM T271T; PM G426G und IVS 15-55 G > A

Für diese synonymen Polymorphismen und die intronische Sequenzvariante 15-55 ergaben sich in der Auswertung keine Auffälligkeiten. Bei beiden Kohorten lag bezüglich der Genotypenverteilung in allen Fällen ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vor, und auch zwischen den Allelfrequenzen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Es ergibt sich folglich kein Hinweis für pathogenetische Relevanz dieser Sequenzvarianten.

5.2 Mutationen in EYA1

5.2.1 Überblick

Seit 1997 ist bekannt, daß Mutationen in *EYA1* mit dem BOR-Syndrom assoziiert sind [Abdelhak *et al.*, 1997a]. In der Folge wurden zahlreiche Familien und Patienten, bei denen das BOR-Syndrom klinisch diagnostiziert worden war, auf Mutationen in diesem Gen untersucht, wobei die Identifikation und Charakterisierung etlicher Mutationen gelang [Abdelhak *et al.*, 1997b; Kumar *et al.*, 1998; Rickard *et al.*, 2000; Usami *et al.*, 1999; Vervoort *et al.*, 2002]. Zur Zeit sind über 50 verschiedene dem BOR-Syndrom zugrunde liegende *Eya1*-Mutationen bekannt, die unter <http://www.medicine.uiowa.edu/pendredandbor/>

zusammengestellt sind. Das Spektrum der identifizierten Mutationstypen umfaßt Insertionen, Deletionen, Falsch-Sinn, Unsinn, Leserahmenwechsel sowie komplexe Rearrangierungen und Deletionen des kompletten *EYAI*-tragenden Chromosomabschnitts. Von Abdelhak *et al.* [1997b] wurde die These formuliert, daß alle BOR-Syndrom verursachenden Mutationen in der EYA-Domäne oder in ihrer direkten Nachbarschaft lokalisiert seien und daß Mutationen außerhalb dieses Bereiches nur zu diskreten klinischen Phänotypen führen. Zwar befindet sich ein großer Anteil der in der Literatur beschriebenen Mutationen im genannten Bereich, es konnten jedoch auch in anderen Exonen Mutationen bei BOR-Patienten identifiziert werden, ohne daß ein abgeschwächter Phänotyp assoziiert gewesen wäre [Rickard *et al.*, 2000; Vervoort *et al.*, 2002], so daß anzunehmen ist, daß Mutationen im gesamten Gen für das BOR-Syndrom verantwortlich sein können [Chang *et al.*, 2004]. Eine Betonung der hochkonservierten EYA-Domäne im Sinne eines *hotspots* für Mutationen ist jedoch wahrscheinlich [Kumar *et al.*, 1998]. Innerhalb der heterogenen Gruppe der Mutationen findet sich keine, die häufiger wäre als andere, vielmehr sind die meisten Mutationen sogenannte *private mutations*, d.h., sie sind spezifisch für die Familie, in der sie auftreten [Chang *et al.*, 2004].

Variable Expressivität ist eines der Kennzeichen des BOR-Syndroms, und selbst bei identifizierter Mutation läßt sich der Schweregrad der Erkrankung bei betroffenen Personen innerhalb einer Familie nicht voraussagen. Auch bei gleicher Mutation in zwei verschiedenen Familien können die klinischen Phänotypen sehr stark differieren. Es besteht keine bekannte Korrelation zwischen den spezifischen Mutationstypen und dem resultierenden Phänotyp des BOR-Syndroms [Kumar *et al.*, 1998]. Diese stark ausgeprägte phänotypische Variation, die vor allem auch die renale Manifestation betrifft [Rickard *et al.*, 2000], dient zur Erklärung des sogenannten BO-Syndroms (Branchio-Oto Syndrom), einer Kombination aus Anomalien der Ohren und dem Auftreten von Branchialzysten, das in einigen Familien ohne renale Anomalien beschrieben ist. Es ist bekannt, daß auch bei an BO-Syndrom erkrankten Familien Mutationen in *EYAI* zugrunde liegen, die sich nicht von jenen des BOR-Syndroms unterscheiden [Vincent *et al.*, 1997]. Eine *EYAI* assoziierte isolierte renale Fehlbildung ist bislang nicht beschrieben.

5.2.2 Mutation R440Q

5.2.2.1 Der assoziierte klinische Phänotyp

Nach den von Chang *et al.* [2004] überarbeiteten klinischen Diagnosekriterien für das BOR-Syndrom erfüllt die von R440Q betroffene Patientin drei der vier Hauptkriterien der Erkrankung (renale Anomalien, branchiale Zysten, präaurikuläre Mulden) und kann somit klinisch als BOR-Patientin identifiziert werden. Aus der mütterlichen Familie wird berichtet, daß es neben der Mutter weitere Familienmitglieder mit Anomalien der Ohren und/oder der Branchialbögen gebe, renale Erkrankungen seien bis auf einen Großvater der Mutter jedoch nicht bekannt. Es bestehen somit Hinweise auf das Vorliegen einer familiären Erkrankung, die Merkmale des BO- und BOR-Syndroms aufweist. Vor dem Hintergrund dieser klinischen Informationen wird es möglich, die neu identifizierte Mutation zu bewerten: Es handelt sich um eine familiär vorhandene, dominant vererbte Mutation in *EYAI*, die zu einem variablen innerfamiliären Erkrankungsbild führt. Die phänotypischen Merkmale scheinen zu großen Teilen dem BO-Syndrom zu entsprechen, nur bei der untersuchten Patientin (und anamnestisch bei ihrem Urgroßvater) ist bislang eine klinisch relevante Beteiligung der Nieren aufgetreten.

Als Schlußfolgerung ergibt sich, daß die einzige im Patientenkollektiv identifizierte Mutation in *EYAI* bei einer am BOR-Syndrom erkrankten Person aus einer Familie mit mehreren BO/BOR betroffenen Mitgliedern aufgetreten ist und nicht bei einem Patienten mit isolierten CAKUT. Für die betroffene Familie ist die Kenntnis der Diagnose eines autosomal-dominanten Erbleidens von großer Bedeutung, da sich für die Mutter bei erneuter Schwangerschaft ein Risiko der Mutationsvererbung von 50% für jedes weitere Kind ergibt. Das gleiche Risiko muß auch bei eventuellem späterem Kinderwunsch der Patientin berücksichtigt werden.

5.2.2.2 Molekulargenetischer Hintergrund

R440Q besteht aus einer Transition innerhalb der Basenfolge Cytosin-Guanin-Guanin an zweiter Position. Auf dem komplementären DNA-Strang befindet sich an dieser Stelle die Folge Cytosin-Cytosin-Guanin, die für die Mutagenese von Bedeutung sein könnte:

In der DNA von Wirbeltieren und Pflanzen existiert methyliertes Cytosin (5-Methylcytosin) als „fünfte Base“. Die DNA-Methylierung ist verantwortlich für eine

Reihe genetisch-regulatorischer Mechanismen, wie beispielsweise die stabile Repression eines der beiden X-Chromosome in den Zellen weiblicher Säugetiere, die genetische Inaktivierung repetitiver DNA-Elemente oder die Blockade der Genexpression durch sogenannte „CG-Inseln“, die sich vor ca. 50% aller menschlichen Gene befinden. Die genomische Methylierung der DNA findet ausschließlich an Cytosin-Bausteinen statt, die sich in CG Sequenzen befinden. Methyliertes Cytosin in CG Abfolgen kann jedoch, wie auch das reguläre Cytosin, durch spontane hydrolytische Deaminierung verändert werden: Aus 5-Methylcytosin entsteht hierbei Thymin (**Abbildung 5.1**).

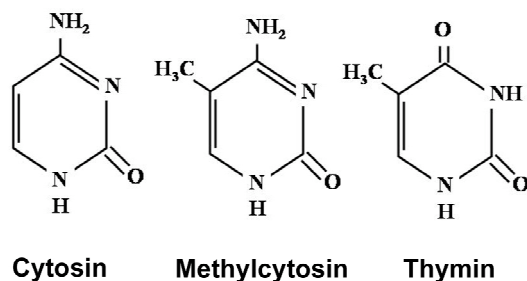
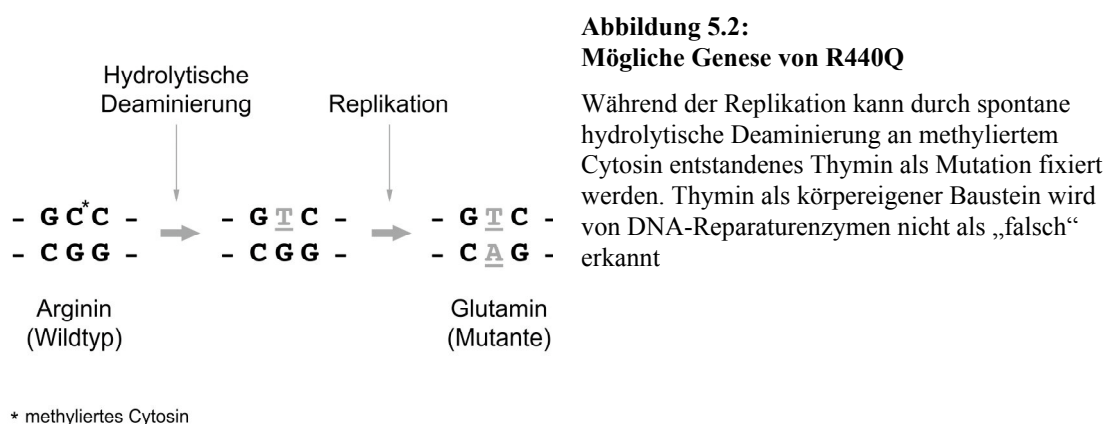


Abbildung 5.1:
Modifikationen an Cytosin und
Methylcytosin.

Aus Cytosin kann durch Methylierung und anschließende spontane hydrolytische Deaminierung Thymin entstehen

Während die Modifikation durch hydrolytische Deaminierung bei regulärem Cytosin zu einem falschen Substrat führt und durch Reparaturenzyme detektiert wird, trifft dies für die Veränderungen an 5-Methylcytosin nicht zu. Das Produkt Thymin wird als regulärer Baustein der DNA nicht von den DNA-Glykosylasen des Reparatursystems erkannt und bleibt als Ergebnis der hydrolytischen Deaminierung zurück. Bei der nächsten Replikationsrunde erfolgt die Mutationsfixierung: An Stelle des zu Cytosin komplementären Guanins erscheint Adenin in der Basenfolge des neu synthetisierten DNA-Stranges. Dies erklärt, warum CG Abfolgen als *hotspots* für Mutationen in Säugetiergenomen bekannt sind (es ereignen sich dort ein Viertel bis ein Drittel aller spontanen Nukleotidaustausche [Knippers, 2001]). Wegen des hohen Risikos der Mutagenese hat sich in Vertebratengenomen die Häufigkeit exonischer CG Dinukleotidfolgen reduziert; im Humangenom finden sich nur 10-20% der CG Abfolgen, die man aus statistischen Gründen erwarten würde. Die hydrolytische Deaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin gilt als wichtigster Mechanismus für die

spontane Entstehung von Genmutationen beim Menschen [ebenda] und kann auch bei R440Q als Ursache vermutet werden (**Abbildung 5.2**). Die Entstehung der detektierten Mutation ließe sich somit durch einen bekannten und relevanten Mechanismus der Mutagenese erklären. Die Annahme, daß die CG Abfolge, an der die Mutation lokalisiert ist, ein für Nukleotidaustausche nach beschriebenem Schema anfälliger Ort ist, läßt sich durch die Tatsache unterstützen, daß die identische Mutation R440Q bereits zuvor von Kumar *et al.* [1998] bei einem BO-Patienten beschrieben wurde (bezeichnet als R407Q in Referenz zur Transkriptvariante EYA1A).



5.2.2.3 Bedeutung der EYA-Domäne

Eya1 wird nach Aussprossung der Ureterknospe vom mesenchymalen Gewebe exprimiert, defiziente Mäuse zeigen eine renale Agenesie [Xu *et al.*, 1999]. Da im mutierten Mesenchym kein GDNF nachzuweisen ist, findet sich der nephrogenetische Defekt vermutlich in der Unterbrechung der GDNF-RET-Kaskade. EYA1 kann nicht eigenständig Transkription bewirken, sondern ist auf Interaktion mit Genen der *Six*-Familie angewiesen, um nukleäre Translokation zu erreichen [Ohto *et al.*, 1999], so daß der Effekt auf *Gdnf* vermutlich indirekt ist. Es wird angenommen, daß EYA und SIX gemeinsam als funktioneller Transkriptionsfaktor fungieren, wobei die DNA-Bindungsdomäne von SIX und die Aktivierungsdomäne von EYA zur Verfügung gestellt wird [Silver *et al.*, 2003].

Als Nachweis der funktionellen Bedeutung der C-terminalen EYA-Domäne für die Protein-Protein-Interaktion konnte gezeigt werden, daß dort lokalisierte

Punktmutationen die Interaktion zwischen EYA1 und SIX1 in Säugetierzellen zerstören [Buller *et al.*, 2001]. Die drei Subregionen der EYA-Domäne sind zwischen verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Zebrafisch, Fliege) hochkonserviert (60-70% Übereinstimmung unter Berücksichtigung aller untersuchten Spezies) und kodieren jeweils eine für die beschriebene Protein-Protein-Interaktion relevante α -Helix Struktur [ebenda].

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Mitglieder der *Eya*-Familie eine Proteinphosphataseaktivität aufweisen [Li *et al.*, 2003; Rayapureddi *et al.*, 2003] und zur Superfamilie der Haloaciddehalogenasen (HAD) zählen. Die katalytische Aktivität ist hierbei strikt auf die EYA-Domäne begrenzt. EYA-Proteine sind die ersten bekannten Transkriptionsfaktoren, die intrinsische Phosphataseaktivität aufweisen, welche möglicherweise als Feinregulationsmöglichkeit der transkriptionalen Aktivität zu bewerten ist [Tootle *et al.*, 2003]. Die genauen Zusammenhänge zwischen biologischer und katalytischer Aktivität der *Eya*-Gene sind wie die Substrate und die Regulation der Dephosphorylierungen noch unbekannt [Epstein *et Neel*, 2003]. Sicher erscheint jedoch, daß die Phosphataseaktivität von EYA die Funktion des SIX-DACH-Komplexes von Repression zu Aktivierung transformiert und dadurch transkriptionale Aktivität bewirkt [Li *et al.*, 2003].

5.2.2.4 Funktionelle Konsequenzen von R440Q

R440Q ist wie der Großteil aller bekannten *EYAI*-Mutationen innerhalb der EYA-Domäne lokalisiert (**Abbildung 5.3**). Eine funktionelle Signifikanz dieser Mutation kann aufgrund ihrer Lokalisation und der Vorbeschreibung in einer anderen betroffenen Familie angenommen werden.

Abbildung 5.3:
Lokalisation R440Q in EYA1

Von experimentelle *in vivo* und *in vitro* Versuchen ist bekannt, daß durch Mutationen innerhalb der EYA-Domäne die Funktion des fertigen Proteins gestört werden kann [Buller *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003; Ohto *et al.*, 1999; Rayapureddi *et al.*, 2003]. Durch funktionelle

in vivo Analyse humaner Missensemutationen der EYA-Domäne wurde kürzlich gezeigt, daß die molekulare Grundlage der BOR-Pathogenese vermutlich sowohl durch Beeinträchtigung der Phosphataseaktivität als auch durch Defekte der Transkriptionsfunktion von EYA1 entstehen kann [Mutsuddi *et al.*, 2005]. Welcher Art die Auswirkungen spezifischer Mutationstypen und ihre Lokalisationen auf die Proteinaktivität sind, ist noch nicht präzise bekannt, es gibt jedoch Hinweise darauf, daß es Unterschiede in der *in vivo* Funktion zwischen Mutationen gibt, die zu okulären Anomalien führen und solchen, die dem BOR-Syndrom zugrunde liegen [ebenda].

EYA1-Mutationen verhalten sich autosomal-dominant. Die Basis dieses Manifestationsmusters wird in der Haploinsuffizienz bei nur einem funktionsfähigen Gen gesehen [Zhang *et al.*, 2004]. Dies bedeutet, daß mutationsbedingt eine reduzierte Genmenge mit verminderter Expression und geringerer Proteinaktivität resultiert und somit nur eine Restfunktion von EYA1 als Transkriptionsmodulator vorhanden ist. Die Organogenese wird in den *EYA1* exprimierenden Geweben beeinträchtigt, und es folgen diverse Entwicklungsstörungen mit Betonung von Niere, Branchialbögen und Ohren. Während der Nephrogenese führt der Verlust der vollen Funktionsfähigkeit von EYA1 durch fehlerhafte Regulation von GDNF zu irregulärer Ureterausknospung. Der *bud theory* folgend, resultieren durch diese Fehlentwicklung nicht nur Malformationen des ableitenden Harntrakts, sondern durch den Kontakt der ektopen Ureterknospe mit nur gering differenziertem und spärlich vorhandenem Mesenchym auch renal-parenchymatöse Defekte.

Warum sich Mutationen im gleichen Gen und teilweise sogar gleichartige Mutationen in ihrer pathogenetischen Konsequenz so unterschiedlich und nicht vorhersehbar auswirken, ist noch nicht bekannt. In dieser Hinsicht zu bedenken wäre eine mögliche Beeinflussung des Phänotyps durch Interaktion mit anderen potentiell mutierten Genen. Koinzidentielle Mutationen mehrerer organogenetisch relevanter Gene könnten durch diesen Mechanismus zu einer Verstärkung der klinischen Symptome führen. Interessant wäre in diesem Sinne beispielsweise die Kenntnis über den *SIX1*-Genotyp bei BOR-Patienten mit *EYA1*-Mutation wie beispielsweise die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Patientin, die sich phänotypisch divergent zu anderen R440Q Trägern verhält.

5.3 Bewertung und Konsequenzen der Ergebnisse

Die Relevanz der erhobenen Assoziation der Sequenzvariationen H585H und IVS 15-23; A > G ist nicht sicher zu klären. Zur Überprüfung wäre eine erneute Untersuchung an einer weiteren CAKUT-Kohorte wünschenswert, um statistische Fehler und Verzerrungen sicher ausschließen zu können. Sollte sich das Ergebnis bestätigen, könnte eine Korrelation mit den SNPs anderer im Kontext mit der CAKUT-Genese erforschten Gene von großem Interesse sein. Auch ein Zusammenhang mit dem bereits diskutierten potentiell assoziierten SNP im *AT2R* Gen könnte untersucht werden. Ein Ausschluß des Vorliegens komplexer C-terminaler Mutationen bei der für alle C-terminalen Polymorphismen homozygoten 15-köpfigen Patientengruppe könnte durch semi-quantitative PCR-Analyse erfolgen.

Die Assoziation von Mutationen in *EYAI* mit der Genese von BOR- und BO-Syndrom ist bekannt und durch zahlreiche Untersuchungen belegt worden. Auch bei der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Sequenzanomalie R440Q handelt es sich um eine Mutation innerhalb einer an BOR/BO-Syndrom erkrankten Familie. Bei den restlichen 134 Patienten der Kohorte konnten keine weiteren Sequenzanomalien in *EYAI* entdeckt werden, die nicht durch einen Polymorphismus zu erklären waren. Dieses Ergebnis läßt keinen Hinweis darauf erkennen, daß *EYAI*-Mutationen ursächlich an der Genese von isoliert auftretenden CAKUT beteiligt sein könnten, vielmehr scheinen sie meist zu einem komplexen und in seiner Expression variablen spezifischen Fehlbildungssyndrom zu führen. Die ursprünglich formulierte Hypothese, daß *EYAI*-Mutationen zu einem nicht unerheblichen Prozentsatz bei Kindern mit isolierten CAKUT an der Pathogenese beteiligt sein könnten, muß folglich verworfen werden. Die Identifizierung der *EYAI*-Mutation hat weitergehende klinische Konsequenzen, da nun eine genauere Familienuntersuchung und eine genetische Beratung der vom autosomal-dominant vererbten Syndrom betroffenen Familie durch die behandelnden Ärzte erfolgen können.

6 Zusammenfassung

Angeborene Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidney and urinary tract*, CAKUT) sind die Hauptursache für chronisches Nierenversagen im Kindesalter und manifestieren sich hauptsächlich sporadisch. *EYA1* ist ein nephrogenetisch essentieller nukleärer Transkriptionsmodulator, von dem bekannt ist, daß Mutationen mit dem Branchio-Oto-Renalen (BOR)- und Branchio-Oto (BO)-Syndrom assoziiert sind.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Evaluation der Relevanz von *EYA1*-Mutationen für die Genese non-syndromaler CAKUT-Fälle. Vor dem Hintergrund der Arbeitshypothese, daß *EYA1*-Mutationen zu einem nicht unerheblichen Prozentsatz bei Kindern mit isolierten CAKUT an der Pathogenese beteiligt sein könnten, wurde in einem Kollektiv von 135 unselektierten pädiatrischen CAKUT-Patienten eine systematische Mutationsanalyse in *EYA1* durchgeführt. Bei einer Patientin wurde eine heterozygote Mutation (R440Q) in Exon 12 identifiziert. Diese Patientin zeigte bei sorgfältiger klinischer Reevaluation syndrom-typische extrarenale Manifestationen, die dem BOR-Syndrom entsprechen. Überträgerin von R440Q ist die vom BO-Syndrom betroffene Mutter. Die Mutation R440Q wurde bereits bei einer vom BO-Syndrom betroffenen Familie vorbeschrieben und ist in der evolutionär hochkonservierten *EYA*-Domäne lokalisiert, die organogenetisch essentiell für Proteininteraktion und Signaltransduktion ist.

Insgesamt weisen die Daten dieser Mutationsanalyse daraufhin, daß *EYA1*-Mutationen für die Pathogenese non-syndromaler CAKUT-Fälle keine wesentliche Rolle zu spielen scheinen, sondern mehrheitlich mit einem komplexen und spezifischen klinischen Fehlbildungssyndrom assoziiert sind. Eine sorgfältige Suche nach extrarenalen Symptomen sollte bei allen CAKUT-Patienten durchgeführt werden und rechtfertigt im positiven Falle eine genetische Diagnostik.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin sieben in *EYA1* auftretende Polymorphismen erfaßt und statistisch ausgewertet. Für einen gekoppelten PM ist für den Haplotyp 1755 C / IVS 15-23 G eine Assoziation mit CAKUT nicht auszuschließen. Zur Verifizierung dieses Befundes sollten weitere Untersuchungen an einer neuen CAKUT-Kohorte erfolgen.

7 Literaturverzeichnis

Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D et al. (1997a) A human homologue of the *Drosophila eyes absent* gene underlies Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family.

Nat Genet 15: 157-164

Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D et al. (1997b) Clustering of mutations responsible for Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome in the *eyes absent* homologous region (eyaHR) of *EYA1*.

Hum Mol Genet 6: 2247-2255

Allen TD (1970) Congenital ureteral strictures.

J Urol 104: 196-204

Aufderheide E, Chiquet-Ehrismann R, Ekblom P (1987) Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme.

J Cell Biol 105: 599-608

Azuma N, Hirakiyama A, Inoue T, Asaka A, Yamada M (2000) Mutations of a human homologue of the *Drosophila eyes absent* gene (*EYA1*) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies.

Hum Mol Genet 9: 363-366

Barnett JA, Stephens FD (1962) The role of the lower segmental vessel in the aetiology of hydronephrosis.

Aust NZ J Surg 31: 201-213

Bingham C, Ellard S, Cole TRP, Jones KE, Allen LIS et al. (2002) Solitary functioning kidney and diverse genital tract malformations associated with *hepatocyte nuclear factor-1beta* mutations.

Kidney Int 61: 1243-1251

Bonini NM, Leiserson WM, Benzer S (1993) The *eyes absent* gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye.

Cell 72: 379-395

Borsani G, DeGrandi A, Ballabio A, Bulfone A, Bernard L et al. (1999) *EYA4*, a novel vertebrate gene related to *Drosophila eyes absent*.

Hum Mol Genet 8: 11-23

Brandis M, Zimmerhackl LB (2000) Erkrankungen der Niere und ableitenden Harnwege.

in: Koletzko (Hrsg) von Harnack Kinderheilkunde, 11. Auflage; Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp 507-517

Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR (2001) Regulation of the ureteric bud outgrowth by *Pax2*-dependent activation of the *glial derived neurotrophic factor* gene.

Development 128: 4747-4756

- Brown T, Mandell J, Lebowitz RL (1987) Neonatal hydronephrosis in the era of sonography.
Am J Roentgenol 148: 959-963
- Bui QT, Zimmermann JE, Liu H, Bonini NM (2000) Molecular analysis of *Drosophila eyes absent* mutants reveals features of the conserved *eya* domain.
Genetics 155: 709-720
- Buller C, Xu X, Marquis V, Schwanke R, Xu PX (2001) Molecular effects of *Eya1* domain mutations causing organ defects in BOR-syndrome.
Hum Mol Genet 10: 2775-2781
- Cacalano G, Farinas I, Wang LC, Hagler K, Forgie A et al. (1998) GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney.
Neuron 21: 53-62
- Carmi R, Binshtock M, Abeliovich D, Bar-Ziv J (1983) The Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome: Report of bilateral renal agenesis in three sibs.
Am J Med Genet 14: 625-627
- Chang E, Menezes M, Meyer NC, Cucci RA, Vervoort VS et al. (2004) Branchio-Oto-Renal syndrome: The mutation spectrum in *EYA1* and its phenotypic consequences.
Hum Mutat 23: 582-589
- Chen A, Francis M, Ni L, Cremers C, Kimberling WJ et al. (1995) Phenotypic manifestations of Branchio-Oto-Renal syndrome.
Am J Med Genet 58: 365-370
- Chen R, Amoui M, Zhang Z, Mardon G (1997) Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*.
Cell 81: 893-903
- Eccles MR, Schimmenti LA (1999) Renal-coloboma syndrome: A multi-system developmental disorder caused by *PAX2* mutations.
Clin Genet 56: 1-9
- Epstein JA, Neel BG (2003) An eye on organ development.
Nature 426: 238-239
- Fivush BA, Jabs K, Neu AM, Sullivan EK, Feld L et al. (1998) Chronic renal insufficiency in children and adolescents; the 1996 annual report of NAPRTCS.
Pediatr Nephrol 12: 328-337
- Fraser FC, Ling D, Nogrady B (1978) Genetic aspects of the BOR-syndrome: Branchial fistulas, ear pits, hearing loss and renal anomalies.
Am J Med Genet 2: 241-252

Fraser FC, Sproule JR, Halal F (1980) Frequency of the BOR-syndrome in children with profound hearing loss.
Am J Med Genet 7: 341-349

Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MN, Propping P (2002) Blockstruktur des menschlichen Genoms.
Deutsches Ärzteblatt 99: 3190-3195

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J *et al.* (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome.
Science 296: 2225-2229

Gouy M, Gautier C (1982) Codon usage in bacteria: Correlation with gene expressivity.
Nucleic Acids Res 10: 7055-7074

Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pavé A (1980) Codon catalog usage and the genome hypothesis.
Nucleic Acids Res 8: 49-62

Gray IC, Campbell DA, Spurr NK (2000) Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics.
Hum Mol Genet 9: 2403-2408

Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M (1999) A comparison of *BRCA1* mutations analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC.
Hum Genet 105: 72-78

Hiraoka M, Tanigushi T, Nakai H, Kino M, Okada Y *et al.* (2001) No evidence for *AT2R* gene dearrangement in human urinary tract anomalies.
Kidney Int 59: 1244-1249

Hohenfellner K, Hunley TE, Schlömer C, Brenner W, Yerkes E *et al.* (1999) Angiotensin type 2 receptor is important in the normal development of the ureter.
Pediatr Nephrol 13: 187-191

Hogan BLM (1996) Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development.
Genes Dev 10: 1580-1594

Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y *et al.* (1995) Effects on blood pressure and exploratory behaviour in mice lacking angiotensin II type 2 receptor.
Nature 377: 748-750

Ikeda K, Watanabe Y, Ohto H, Kawakami K (2002) Molecular interaction and synergistic activation of a promotor by Six, Eya, and Dach proteins mediated through CREB binding protein.
Mol Cell Biol 22: 6759-6766

Kalatzis V, Sahly I, El-Amraoui, Petit C (1998) *Eya1* expression in the developing kidney: Towards the understanding of the pathogenesis of BOR-Syndrome.
Dev Dyn 213: 486-499

Kemper MJ, Müller-Wiefel DE (2001) Renal function in congenital anomalies of the kidney and urinary tract.
Curr Opin Uro 11: 571-575

Kirk JMW, Grant DB, Besser GM, Shalet S, Quinton R et al. (1994) Unilateral renal aplasia in x-linked kallmann's syndrome.
Clin Genet 46: 260-262

Knippers R (2001) Molekulare Genetik.
8. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart

König R, Fuchs S, Dukiet C (1994) Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome: Variable expressivity in a five-generation pedigree.
Eur J Pediatr 153: 446-450

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J et al. (1993) WT-1 is required for early kidney development.
Cell 74: 679-691

Kumar S, Deffenbacher K, Cremers C, Van Camp G, Kimberling WJ (1998) Branchio-Oto-Renal syndrome: Identifications of novel mutations, molecular characterization, mutation distribution, and prospects for genetic testing.
Genet Test 1: 243-251

Kumar S, Kimberling WJ, Marres HA, Cremers CW (1999) Genetic Heterogeneity associated with BOR-Syndrom.
Am J Med Genet 83: 207/8

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM et al. (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo.
Genes Dev 13: 424-436

Li X, Oghi KA, Zhang J, Krones A, Bush KT et al. (2003) Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis.
Nature 426: 247-265

Liljenstrom.H, Von Heijne G. (1987) Translation rate modification by preferential codon usage: Intergenic position effects.
J Theor Biol 124: 43-55

Limwongse C, Clarren SK, Cassidy SB (1999) Syndromes and malformations of the urinary tract.
In: Barrat, Avner, Harmon (Hrsg) Pediatric Nephrology, 4. Auflage; Lippincott Williams and Wilkins, pp 427-447

Mackie GG, Stephens FD (1975) Duplex kidneys: A correlation of renal dysplasia with position of the ureteral orifice.
J Urol 114: 274-280

Markoff A, Savov A, Vladimirov V, Bogdanova N, Kremensky I et al. (1997) Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol.

Clinical Chemistry 43: 30-33

Melnick M, Bixler D, Nance W, Dilk K, Yune H (1976) Familiar Branchio-Oto-Renal dysplasia: A new addition to the branchial arch syndrome.

Clin Genet 9: 25-34

Michalk D (1995) Erkrankungen des Urogenitalsystems.

In: Sitzmann (Hrsg) Pädiatrie, 1.Auflage; Hippokrates Verlag Stuttgart, pp 453-461

Miklovicova D, Cornelissen C, Cransberg K, Groothoff JW, Dedik L et al. (2005) Etiology and epidemiology of end-stage renal disease in Dutch children 1987-2001.

Pediatr Nephrol 20: 1136-1142

Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BLM, Ickikawa I (2000) Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter.

J Clin Invest 105: 863-873

Mullis SA, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction.

Methods Enzymol 155: 335-350

Mutsuddi M, Chaffee B, Cassidy J, Silver SJ, Tootle TL, Rebay I (2005) Using *Drosophila* to decipher how mutations associated with human Branchio-Oto-Renal syndrome and optical defects compromise the protein tyrosine phosphatase and transcriptional functions of eyes absent.

Genetics: published articles ahead of print, published on march 31, 2005 as 10.1534/genetics.104.039156

Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga SI, Ozaki H et al. (1999) Cooperation of Six and Eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya.

Mol Cell Biol 19: 6815-6824

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.

Proc Natl Acad Sci USA 86: 2766-2770

Peters CA, Carr MC, Lais A, Retik AB, Mandell J (1992) The response of the fetal kidney to obstruction.

J Urol 148: 503-509

Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J et al. (1996) Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF.

Nature 382: 73-76

Pierides AM, Athanasiou Y, Demetriou K, Koptides M, Deltas C (2002) A family with the Branchio-Oto-Renal syndrome: Clinical and genetic correlations.

Nephrol Dial Transplant 17: 1014-1018

Pignoni F, Hu B, Zavitz KH, Xiao J, Garrity PA et al. (1997) The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development.

Cell 91: 881-891

Piscione TD, Rosenblum ND (2002) The molecular control of renal branching morphogenesis: Current knowledge and emerging insights.

Differentiation 70: 227-246

Pope JC, Brock JW, Adams MC, Stephens FD, Ichikawa, I (1999) How they begin and how they end: Classic and new theories for the development and deterioration of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT.

J Am Soc Nephrol 10: 2018-2028

Potter (1972) Normal and abnormal development of the kidney.

Year Book Medical Publishers Inc., Chicago

Rayapureddi J, Kattamuri C, Steinmetz B, Frankfort B, Ostrin E et al. (2003) Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases.

Nature 426: 295-298

Rickard S, Boxer M, Trompeter R, Bittner-Glindzicz M (2000) Importance of clinical evaluation and molecular testing in the Branchio-Oto-Renal syndrome and overlapping phenotypes.

J Med Genet 37: 623-627

Rigoli L, Chimenz R, Di Bella C, Cavallaro E, Caruso R et al. (2004) Angiotensin-converting enzyme and angiotensin type 2 receptor gene genotype distributions in Italian children with congenital uropathies.

Pediatr Res 56: 988-993

Robinson M, Lilley R, Little S, Emtage JS, Yarranton G et al. (1984) Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia Coli*.

Nucleic Acids Res 12: 6663-6671

Ruf RG, Xu PX, Silvius D, Otto EA, Beekmann F et al. (2004) *SIX1* mutations cause Branchio-Oto-Renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes.

Proc Natl Acad Sci USA 101: 8090-8095

Sainio K, Suvanto P, Davies J, Wartinovaara J, Wartinovaara K et al. (1997) Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium.

Development 124: 4077-4087

Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA et al. (1996) Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF.

Nature 382: 70-73

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467

Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME et al. (1995) Mutation of the *PAX2* gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux.

Nat Genet 9: 358-364

Saxen L, Sariola H (1987) Early organogenesis of the kidney.

Pediatr Nephrol 1: 385-392

Schärer K (2002) Nierenhypoplasie und -dysplasie

In: Schärer, Mehls (Hrsg) Pädiatrische Nephrologie; Springer Verlag Berlin, Heidelberg

Sharp PM, Li WH (1986) An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms.

J Mol Evol. 24: 28-38

Shastry BS (2002) SNP alleles in human disease and evolution.

J Hum Genet 47:561-5

Silver SJ, Davies EL, Doyon L, Rebay I (2003) Functional dissection of eyes absent reveals new modes of regulation within the retinal determination gene network.

Mol Cell Biol 23: 5989-5999

Squiers EC, Morden RS, Bernstein J (1987) Renal multicystic dysplasia: An occasional manifestation of the hereditary renal adysplasia syndrome.

Am J Med Genet 3: 279-284

Stephens FD, Smith ED, Hutson JM (1996) Renal hypoplasia and dysplasia in infants with posterior urethral valves.

In: Stephens Fd, Smith ED, Hutson JM (Hrsg) Congenital Anomalies of the Urinary and Genital Tracts; Oxford, ISIS Medical Media; pp 341-345

Tootle T, Silver S, Davies E, Newman V, Latek R, Mills I et al. (2003) The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase.

Nature 426: 299-302

Torres M, Gomez Pardo E, Dressler G, Gruss P (1995) Pax2 controls multiple steps of urogenital development.

Development 121: 4057-4065

Usami S, Abe S, Shinkawa H, Deffenbacher K, Kumar S et al. (1999) *EYAI* nonsense mutation in a Japanese Branchio-Oto-Renal syndrome family.

J Hum Genet 44: 261-265

Vervoort VS, Smith RJH, O'Brien J, Schroeder R, Abbott A et al. (2002) Genomic rearrangements of *EYAI* account for a large fraction of families with BOR-syndrome.

Eur J Hum Genet 10: 757-766

Vincent C, Kalatzis V, Abdelhak S, Chaib H, Compain S et al. (1997) BOR- and BO-syndromes are allelic defects of *EYA1*.

Eur J Hum Genet 5: 242-246

Xia X (1996) Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias.

Genetics 144: 1309-1320

Xu PX, Woo I, Her H, Beier DR, Maas RL (1997a) Mouse *Eya* homologues of the *Drosophila eyes absent* gene require *Pax6* for expression in lens and nasal placode.

Development 124: 219-231

Xu PX, Cheng J, Epstein JA, Maas RL (1997b) Mouse *Eya* genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function.

Proc Natl Acad Sci USA 94: 11974-11979

Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S et al. (1999) *Eya1* deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia.

Nat Genet 23: 113-117

Xu PX, Zheng W, Huang L, Maire P, Laclef C et al. (2003) *Six1* is required for the early organogenesis of mammalian kidney.

Development 130: 3085-3094

Yared A, Barakat AY (1990) Clinical presentation.

In: Barakat (Hrsg) *Renal disease in children, 1. Auflage; Springer Verlag New York*

Yerkes E, Nishimura H, Hohenfellner K, Hunley TE, Yoshida H et al. (1997) Association between the *angiotensin type 2 receptor* genotype and congenital urinary tract anomalies in two independent cohorts.

J Am Soc Nephrol 8: 397A

Zhang Y, Knosp B, Maconochie M, Friedman R, Smith R (2004) A comparative study of *Eya1* and *Eya4* protein function and its implication in BOR-syndrome and DNFA10.

JARO 5: 295-30

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

| | |
|--------------|--|
| AT2R | <i>Angiotensin type 2 receptor</i> |
| BMP | <i>Bone morphogenetic protein</i> |
| BO-Syndrom | Branchio-Oto-Syndrom |
| BOR-Syndrom | Branchio-Oto-Renales-Syndrom |
| CAKUT | Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege (<i>Congenital anomalies of the kidney and urinary tract</i>) |
| DACH | <i>Dachshund</i> |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>) |
| EYA | <i>Eyes absent</i> |
| eyaHR | <i>Eya homologous region</i> |
| GDNF | <i>Glial-cell-line-derived neurotrophic factor</i> |
| GFR | Glomeruläre Filtrationsrate |
| HNF | <i>Hepatocyte nuclear factor</i> |
| IVS | Intronische variable Sequenz |
| KAL | <i>Kallman gene</i> |
| m-RNA | Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>) |
| NCBI | <i>National Centre for Biotechnology Information</i> |
| PAX | <i>Paired domain homeobox</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| PM | Polymorphismus |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>) |
| SIX | <i>Sine oculis</i> |
| SNP | Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>Single-nucleotide-polymorphism</i>) |
| SSCP-Analyse | Einzelstrangkonnformationsanalyse (<i>Single-strand conformation polymorphism analysis</i>) |
| t-RNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| VUR | Vesikoureteraler Reflux |
| WT | <i>Wilms' tumor-associated gene</i> |

8.2 Abbildungen

| | |
|--|----|
| Abbildung 2.1: Ureterknospung | 10 |
| Abbildung 2.2: Die <i>bud theory</i> | 14 |
| Abbildung 2.3: Molekulare Regulatoren der Ureterknospung..... | 16 |
| Abbildung 2.4: Strukturvarianten von EYA1.. .. | 20 |
| Abbildung 2.5: Funktionelle <i>eya</i> Subdomänen. | 21 |
| Abbildung 3.1: Schematisierte Darstellung der SSCP-Analyse..... | 30 |
| Abbildung 3.2: Renale Phänotypen der Kohorte..... | 37 |
| Abbildung 3.3: Extrarenale Manifestationen | 37 |
| Abbildung 4.1: SSCP-Gel Exon 12, Patient BEL BP..... | 38 |
| Abbildung 4.2: Sequenz Exon 12 bei Patient BEL BP..... | 39 |
| Abbildung 4.3: Vergleichssequenz des Wildtyps..... | 39 |
| Abbildung 4.4: Anomalien bei Patientin und Mutter | 40 |
| Abbildung 4.5: Stammbaum der Kernfamilie der BOR-Patientin | 40 |
| Abbildung 4.6: SSCP-Gel Exon 1; Polymorphismus | 42 |
| Abbildung 4.7: SSCP-Gel Exon7; Polymorphismus..... | 44 |
| Abbildung 4.8: SSCP-Gel Exon 12, Polymorphismus. | 45 |
| Abbildung 4.9: SSCP-Gel Exon 16 und Intron 15 | 51 |
| Abbildung 5.1: Modifikationen an Cytosin und Methylcytosin..... | 64 |
| Abbildung 5.2: Mögliche Genese von R440Q | 65 |
| Abbildung 5.3: Lokalisation R440Q in EYA1 | 66 |

8.3 EYA1-Referenzsequenz

Die Nomenklatur innerhalb dieser Arbeit erfolgte in Referenz zur EYA1 Sequenz von NM 000503 (Transkriptvariante EYA1C, Isoform b), auf die in der Online-Datenbank des *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> zugegriffen werden kann.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| M | E | M | Q | D | L | T | S | P | H | S | R | L | S | G | S | S | E | 18 |
| ATG | GAA | ATG | CAG | GAT | CTA | ACC | AGC | CCG | CAT | AGC | CGT | CTG | AGT | GGT | AGT | AGT | GAA | 54 |
| S | P | S | G | P | K | L | G | N | S | H | I | N | S | N | S | M | T | 36 |
| TCC | CCC | AGT | GGC | CCC | AAA | CTC | GGT | AAC | TCT | CAT | ATA | AAT | AGT | AAT | TCC | ATG | ACT | 108 |
| P | N | G | T | E | V | K | T | E | P | M | S | S | S | E | T | A | S | 54 |
| CCC | AAT | GGC | ACC | GAA | GTT | AAA | ACA | GAG | CCA | ATG | AGC | AGC | AGT | GAA | ACA | GCT | TCA | 162 |
| T | T | A | D | G | S | L | N | N | F | S | G | S | A | I | G | S | S | 72 |
| ACG | ACA | GCC | GAC | GGG | TCT | TTA | AAC | AAT | TTC | TCA | GGT | TCA | GCA | ATT | GGG | AGC | AGT | 216 |
| S | F | S | P | R | P | T | H | Q | F | S | P | P | Q | I | Y | P | S | 90 |
| AGT | TTC | AGC | CCA | CGA | CCA | ACT | CAC | CAG | TTC | TCT | CCA | CCA | CAG | ATT | TAC | CCT | TCC | 270 |
| N | R | P | Y | P | H | I | L | P | T | P | S | S | Q | T | M | A | A | 108 |
| AAC | AGA | CCA | TAC | CCA | CAT | ATT | CTC | CCT | ACC | CCT | TCC | TCA | CAA | ACT | ATG | GCT | GCA | 324 |
| Y | G | Q | T | Q | F | T | T | G | M | Q | Q | A | T | A | Y | A | T | 126 |
| TAT | GGG | CAA | ACA | CAG | TTT | ACC | ACA | GGA | ATG | CAA | CAA | GCT | ACA | GCC | TAT | GCC | ACG | 378 |
| Y | P | Q | P | G | Q | P | Y | G | I | S | S | Y | G | A | L | W | A | 144 |
| TAC | CCA | CAG | CCA | GGA | CAG | CCG | TAC | GGC | ATT | TCC | TCA | TAT | GGT | GCA | TTG | TGG | GCA | 432 |
| G | I | K | T | E | G | G | L | S | Q | S | Q | S | P | G | Q | T | G | 162 |
| GGC | ATC | AAG | ACT | GAA | GGT | GGA | TTG | TCA | CAG | TCT | CAG | TCA | CCT | GGA | CAG | ACA | GGA | 486 |
| F | L | S | Y | G | T | S | F | S | T | P | Q | P | G | Q | A | P | Y | 180 |
| TTT | CTC | AGC | TAT | GGC | ACA | AGC | TTC | AGT | ACC | CCT | CAA | CCT | GGA | CAG | GCA | CCA | TAC | 540 |
| S | Y | Q | M | Q | G | S | S | F | T | T | S | S | G | I | Y | T | G | 198 |
| AGC | TAC | CAG | ATG | CAA | GGT | AGC | AGT | TTT | ACA | ACA | TCA | TCA | GGA | ATA | TAT | ACA | GGA | 594 |
| N | N | S | L | T | N | S | S | G | F | N | S | S | Q | Q | D | Y | P | 216 |
| AAT | AAT | TCA | CTC | ACA | AAT | TCC | TCT | GGA | TTT | AAT | AGT | TCA | CAG | CAG | GAC | TAT | CCG | 648 |
| S | Y | P | S | F | G | Q | G | Q | Y | A | Q | Y | Y | N | S | S | P | 234 |
| TCT | TAT | CCC | AGT | TTT | GGC | CAG | GGT | CAG | TAC | GCA | CAG | TAT | TAT | AAC | AGC | TCA | CCG | 702 |
| Y | P | A | H | Y | M | T | S | S | N | T | S | P | T | T | P | S | T | 252 |
| TAT | CCA | GCA | CAT | TAT | ATG | ACC | AGC | AGC | AAC | ACC | AGC | CCA | ACG | ACA | CCA | TCC | ACC | 756 |
| N | A | T | Y | Q | L | Q | E | P | P | S | G | I | T | S | Q | A | V | 270 |
| AAT | GCC | ACT | TAC | CAG | CTT | CAA | GAA | CCG | CCA | TCT | GGC | ATC | ACC | AGC | CAA | GCA | GTT | 810 |
| T | D | P | T | A | E | Y | S | T | I | H | S | P | S | T | P | I | K | 288 |
| ACA | GAT | CCC | ACA | GCA | GAG | TAC | AGC | ACA | ATC | CAC | AGC | CCA | TCA | ACA | CCC | ATT | AAA | 864 |
| D | S | D | S | D | R | L | R | R | G | S | D | G | K | S | R | G | R | 306 |
| GAT | TCA | GAT | TCT | GAT | CGA | TTG | CGT | CGA | GGT | TCA | GAT | GGG | AAA | TCA | CGT | GGA | CGG | 918 |
| G | R | R | N | N | N | P | S | P | P | P | D | S | D | L | E | R | V | 324 |
| GGC | CGA | AGA | AAC | AAT | AAT | CCT | TCA | CCT | CCC | CCA | GAT | TCT | GAT | CTT | GAG | AGA | GTG | 972 |
| F | I | W | D | L | D | E | T | I | I | V | F | H | S | L | L | T | G | 342 |
| TTC | ATC | TGG | GAC | TTG | GAT | GAG | ACA | ATC | ATT | GTT | TTC | CAC | TCC | TTG | CTT | ACT | GGG | 1026 |
| S | Y | A | N | R | Y | G | R | D | P | P | T | S | V | S | L | G | L | 360 |
| TCC | TAC | GCC | AAC | AGA | TAT | GGG | AGG | GAT | CCA | CCC | ACT | TCA | GTT | TCC | CTT | GGA | CTG | 1080 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| R | M | E | E | M | I | F | N | L | A | D | T | H | L | F | F | N | D | 378 |
| CGA | ATG | GAA | GAA | ATG | ATT | TTC | AAC | TTG | GCA | GAC | ACA | CAT | TTA | TTT | TTT | AAT | GAC | 1134 |
| L | E | E | C | D | Q | V | H | I | D | D | V | S | S | D | D | N | G | 396 |
| TTA | GAA | GAA | TGT | GAC | CAA | GTC | CAT | ATA | GAT | GAT | GTT | TCT | TCA | GAT | GAT | AAC | GGA | 1188 |
| Q | D | L | S | T | Y | N | F | G | T | D | G | F | P | A | A | A | T | 414 |
| CAG | GAC | CTA | AGC | ACA | TAT | AAC | TTT | GGA | ACA | GAT | GGC | TTT | CCT | GCT | GCA | GCA | ACC | 1242 |
| S | A | N | L | C | L | A | T | G | V | R | G | G | V | D | W | M | R | 432 |
| AGT | GCT | AAC | TTA | TGT | TTG | GCA | ACT | GGT | GTA | CGG | GGC | GGT | GTG | GAC | TGG | ATG | AGA | 1296 |
| K | L | A | F | R | Y | R | R | V | K | E | I | Y | N | T | Y | K | N | 450 |
| AAG | TTG | GCC | TTC | CGC | TAC | AGA | CGG | GTA | AAA | GAG | ATC | TAC | AAC | ACC | TAC | AAA | AAT | 1350 |
| N | V | G | G | L | L | G | P | A | K | R | E | A | W | L | Q | L | R | 468 |
| AAT | GTT | GGA | GGT | CTG | CTT | GGT | CCA | GCT | AAG | AGG | GAA | GCC | TGG | CTG | CAG | TTG | AGG | 1404 |
| A | E | I | E | A | L | T | D | S | W | L | T | L | A | L | K | A | L | 486 |
| GCC | GAA | ATT | GAA | GCC | CTG | ACC | GAC | TCC | TGG | TTG | ACA | CTG | GCC | CTG | AAA | GCA | CTC | 1458 |
| S | L | I | H | S | R | T | N | C | V | N | I | L | V | T | T | T | Q | 504 |
| TCG | CTC | ATT | CAC | TCC | CGG | ACA | AAC | TGT | GTG | AAT | ATT | TTA | GTA | ACA | ACT | ACT | CAG | 1512 |
| L | I | P | A | L | A | K | V | L | L | Y | G | L | G | I | V | F | P | 522 |
| CTC | ATC | CCA | GCA | TTG | GCG | AAA | GTC | CTG | CTG | TAT | GGG | TTA | GGA | ATT | GTA | TTT | CCA | 1566 |
| I | E | N | I | Y | S | A | T | K | I | G | K | E | S | C | F | E | R | 540 |
| ATA | GAA | AAT | ATT | TAC | AGT | GCA | ACT | AAA | ATA | GGA | AAA | GAA | AGC | TGT | TTT | GAG | AGA | 1620 |
| I | I | Q | R | F | G | R | K | V | V | Y | V | V | I | G | D | G | V | 558 |
| ATA | ATT | CAA | AGG | TTT | GGA | AGA | AAA | GTG | GTG | TAT | GTT | GTT | ATA | GGA | GAT | GGT | GTA | 1674 |
| E | E | E | Q | G | A | K | K | H | A | M | P | F | W | R | I | S | S | 576 |
| GAA | GAA | GAA | CAA | GGA | GCA | AAA | AAG | CAC | GCG | ATG | CCC | TTC | TGG | AGG | ATC | TCC | AGC | 1728 |
| H | S | D | L | M | A | L | H | H | A | L | E | L | E | Y | L | * | 593 | |
| CAC | TCG | GAC | CTC | ATG | GCC | CTG | CAC | CAT | GCC | TTG | GAA | CTG | GAG | TAC | CTG | TAA | 1779 | |

8.4 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. D.E. Müller-Wiefel möchte ich mich herzlich für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. med. F. Schaefer danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in seinen Heidelberger Arbeitskreis.

Für die engagierte und ideenreiche Unterstützung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders meiner Betreuerin Frau Dr. med. S. Weber danken. Durch ihre Hilfe und ihre stete Bereitschaft, aufkommende Fragen sofort zu beantworten und konstruktive Anregungen sowohl in praktischen wie auch theoretischen Belangen zu geben, konnte diese Arbeit zustande kommen.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor und die vielfältigen Hilfestellungen möchte ich mich bei Tanja Knüppel, Bärbel Phillipin und Alexandra Ochs bedanken.

Nicola Isendahl danke ich für das engagierte und schnelle Korrekturlesen sowie Nadja Günther und Jan Schuster für die mathematische Hilfestellung. Bei Annika Siegmund möchte ich mich für die anregenden Gespräche und Diskussionen während unseres gemeinsamen Studiums bedanken.

Meiner Mutter Heidrun Berger möchte ich dafür danken, daß sie mein Studium ermöglicht hat und daß ich mir jederzeit ihrer Hilfe und Unterstützung bei allen Vorhaben und Plänen sicher sein kann.

Ein ganz besonderer Dank gilt Tim Weber für seine ausdauernde Hilfe im Kampf mit dem Computer und vor allem dafür, daß er immer für mich da ist. Ohne ihn hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|--------------|--------------------------------|
| Name | Anne Katrin Berger |
| Anschrift | Martinstraße 28, 20251 Hamburg |
| E-Mail | ab@capcon.de |
| Geburtsdaten | 12.09.1978 in Bad Soden a.Ts. |

Ausbildung

| | |
|------------------|---|
| 1984-1988 | Grundschule Oberhöchstadt |
| 1988-1997 | Altkönigschule Kronberg |
| Frühjahr 1997 | Abitur (Note 1,0) |
| 1997-1998 | Psychologiestudium an der Universität Frankfurt a. M. |
| 1998-2005 | Medizinstudium an der Universität Hamburg |
| Sommer 2000 | Physikum (Note 1,6) |
| seit Sommer 2000 | Stipendiatin der Friedrich-Ebert-Stiftung |
| Sommer 2001 | 1. Staatsexamen (Note 2,0) |
| 2002-2003 | Medizinstudium an der Universität Zürich |
| Frühjahr 2004 | 2. Staatsexamen (Note 2,0) |
| seit 2004 | Universität Heidelberg Molekulargenetisches Labor der pädiatrischen Nephrologie, Arbeit an der Dissertation |
| 2004-2005 | Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf |
| Herbst 2005 | 3. Staatsexamen (Note 1,0) |

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Informationsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, daß ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.