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 *PAX-2* 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

Tim Frederik Weber
aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 13.08.2007
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg
Prüfungsausschuß: der Vorsitzende: Prof. Dr. med D.E. Müller-Wiefel
Prüfungsausschuß: 2.Gutachter: Prof. Dr. med. F. Thaiss
Prüfungsausschuß:3.Gutachter: PD Dr. med. C. Hübner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 3

1 Arbeitshypothese 6

2 Einleitung 7

2.1 Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege 7

2.2 Nephrogenese 9

2.2.1 Formale Embryologie der Niere und ableitenden Harnwege 9

2.3 Pathogenese von CAKUT 11

2.3.1 Ektopie der Ureterknospe 12

2.4 Kontrolle der Nierenentwicklung 14

2.4.1 Expression und Regulation von GDNF 14

2.5 Der Transkriptionsfaktor PAX-2 16

2.5.1 Die *PAX*-Genfamilie 16

2.5.2 Struktur des humanen PAX-2-Gens 17

2.5.3 Expression und Regulation von PAX-2 19

2.5.4 Biologische Funktionen von PAX-2 20

2.5.5 Klinische Bedeutung von PAX-2 21

2.6 Papillo-renales Syndrom 22

2.6.1 Urogenitale Anomalien 23

2.6.2 Okuläre Anomalien 24

2.6.3 Anomalien anderer Organe 25

3 Methoden und Material 26

3.1 Patienten- und Kontrollkollektive 26

3.1.1 Patientenkollektiv 26

3.1.2 Kontrollkollektiv 28

3.2 Polymerase-Kettenreaktion 28

3.2.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion 28

3.2.2 Konstruktion der Primer 29

3.2.3 Optimierung der PCR-Bedingungen 30

3.2.4 PCR-Protokoll 30

3.3 Agarosegel-Elektophorese 31

3.4 Einzelstrang-Konformationsanalyse 32

3.4.1 Prinzip der SSCP-Analyse 32

3.4.2 Einflussfaktoren auf die SSCP-Analyse 33

3.4.3 SSCP-Protokoll 34

3.5 Sequenzanalyse 35

3.5.1 Prinzip der Sequenzierung 35

3.5.2 Sequenzierungsprotokoll 36

3.6 Statistische Methoden 37

3.6.1 Berechung der Allelhäufigkeiten 37

3.6.2 Das HARDY-WEINBERG-Modell 38

3.6.3 Chi-Quadrat-Test 39

3.7 Chemikalien 40

3.7.1 Polymerase-Kettenreaktion 40

3.7.2 Agarosegel-Elektrophorese 40

3.7.3 Einzelstrangkonformationsanalyse 41

3.7.4 Sequenzierung 42

4 Ergebnisse 43

4.1 Mutationen 43

4.1.1 Mutation Patient M2 (764del20ins2 in-frame) 43

4.1.2 Mutation Patient V8 (954-2A>G splice-site) 44

4.1.3 Mutation Patient S26 (996G>A neutral) 45

4.2 Polymorphismen 46

4.2.1 Polymorphismus 1410C>T (Exon 8) 47

4.2.2 Polymorphismus 1521A>C (Exon 8) 48

4.2.3 Polymorphismus 1941+34C>T (3'-UTR) 50

5 Diskussion 51

5.1 Bekannte Mutationen in *PAX-2* 51

5.2 764del20ins2 in-frame (Exon 3) 55

5.2.1 Koinzidente DACH-1-Mutation 56

5.2.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation 56

5.3 954-2A>G splice-site (Intron 3) 58

5.3.1 Allgemeine Effekte von Spleißmutationen 59

5.3.2 Mögliche Folgen von 954-2A>G 60

5.3.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation 62

5.4 996G>A neutral (Exon 4) 63

5.4.1 Mögliche Folgen von 996G>A 63

5.4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation 66

5.5 Konklusion und Ausblick 67

6 Literaturverzeichnis 69

7 Zusammenfassung 76

8 Anhang 77

8.1 PAX-2E-Referenzsequenz 77

8.2 Abbildungsverzeichnis 78

8.3 Abkürzungsverzeichnis 79

8.4 Danksagung 80

8.5 Lebenslauf 81

8.6 Eidesstattliche Erklärung 82

Arbeitshypothese

Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidney and urinary tract,* CAKUT) bilden die Hauptursache für die chronische Niereninsuffizienz im Kindes- und Jugendalter. CAKUT vereinen anatomische Fehlbildungen der oberen und unteren Harnwege und schließen vor allem Nierenhypoplasie und -dysplasie sowie Störungen im Verlauf der Harnleiter ein.

In der Mehrzahl der Fälle treten diese angeborenen Fehlbildungen sporadisch auf. Zahlreiche Berichte über fämiliäre Manifestationen weisen jedoch auf die pathogenetische Bedeutung genetischer Faktoren hin. Neben einer Vielzahl an Kandidatengenen, deren Relevanz für die Entstehung von CAKUT derzeit in der Diskussion steht, ist bereits eine Reihe von Genen identifiziert worden, die mit hereditären, vor allem syndromhaften Nierenentwicklungsstörungen assoziiert sind. Zu dieser Gruppe gehört der Transkriptionsfaktor PAX-2, der bezüglich der embryonalen Regulation der Nephrogenese eine bedeutende Rolle einnimmt. Mutationen in *PAX-2* verursachen das autosomal-dominant vererbte papillo-renale Syndrom (PRS), das gekennzeichnet ist durch kolobomatöse Augendefekte und Harnwegsanomalien. Der klinische Ausprägungsgrad innerhalb einer Familie kann extrem variabel sein; häufig werden einzelne betroffene Familienmitglieder ausschließlich mit einer renalen Manifestation auffällig, während andere Mitglieder der gleichen Familie das Vollbild der Erkrankung zeigen.

Es existieren erste Hinweise aus einer kleinen Untersuchung, daß *PAX-2*-Mutationen gelegentlich auch isolierte Nierenfehlbildungen verursachen. In der vorliegenden Dissertationsarbeit soll nun in einem großen Kollektiv geprüft werden, ob Störungen des Transkriptionsfaktors für CAKUT-Manifestationen unabhängig vom PRS verantwortlich sein können. Zur Evaluierung der Häufigkeit von *PAX-2*-Mutationen bei CAKUT wurden 135 unselektierte pädiatrische CAKUT-Patienten einem Mutationsscreening mittels PCR-SSCP-Analyse und Direktsequenzierung zugeführt. Hypothese ist, daß *PAX-2*-Mutationen zu einem nicht unerheblichen Prozentsatz an der Pathogenese bei Kindern mit CAKUT ohne PRS beteiligt sind.

Einleitung

Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidney and urinary tract*, CAKUT) sind häufige Störungen beim Menschen. Bei etwa einer von 200 Ultraschalluntersuchungen im Säuglingsalter können Fehlbildungen des Harntraktes beobachtet werden [1]. Trotz aller diagnostischen und therapeutischen Fortschritte in der Betreuung kindlicher Nierenerkrankungen sind angeborene Nieren- und Harnwegsanomalien die Hauptursache des chronischen Nierenversagens im Kindesalter [2]. Bis zu zwei Drittel der jungen Patienten mit einer chronischen Einschränkung der Nierenfunktion zeigen strukturelle Anomalien der Harnwege [3]. Bei terminal niereninsuffizienten Patienten, die eine Nierenersatztherapie erhalten, beträgt der Anteil von CAKUT an den zugrunde liegenden Diagnosen etwa ein Drittel [4].

Komplikationen wie arterieller Hypertonus, Infektion und Steinbildung können eine vorbestehende Nierenfunktionseinschränkung zusätzlich aggravieren. Symptome angeborener Nephropathien sind neben renalen Zeichen wie Polyurie und -dipsie, Proteinurie und Hämaturie vor allem metabolische und endokrine Störungen mit Urämie, Anämie und Wachstumsretardierung [5].

Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege

Die anatomische und funktionelle Komplexität der Harnwege lässt erwarten, daß sich eine ganze Reihe von Anomalien manifestieren kann, wenn die normale Organogenese des Harntrakts beeinträchtigt wird. Unter CAKUT versteht man deswegen eine Familie von Erkrankungen, zu denen sowohl Fehlbildungen der oberen Harnwege (Nieren, Nierenbecken) als auch der unteren Harnwege (Ureter, Harnblase, Urethra) gehören (Tabelle 0.1). Unilaterale Manifestationen bleiben klinisch häufig stumm, nicht selten findet sich jedoch eine bilaterale Manifestation mit Einschränkung der globalen Nierenfunktion, und oft treten mehrere Anomalien gleichzeitig auf. Darüber hinaus findet sich bei einer Vielzahl von syndromalen Erkrankungen eine Beteiligung des Harntrakts.

Störungen der Nierenentwicklung manifestieren sich als Nierenagenesie, Nierenhypoplasie oder Nierendysplasie. Die bilaterale Agenesie verläuft ohne unmittelbar postnatal einsetzende Nierenersatztherapie stets letal. Dysplastische Nieren enthalten undifferenziertes Gewebe und sind in vielen Fällen mit anderen Anomalien

des Urogenitaltraktes assoziiert. Am häufigsten ist die Kombination mit zystischen Veränderungen wie bei der multizystischen Nierendysplasie. Hypoplastische Nieren sind lediglich in ihrer Größe reduziert. Die Anzahl der Nephrone ist vermindert, deren Struktur aber primär nicht verändert. Eine Sonderform der Hypoplasie ist die Oligomeganephronie, bei der die Reduktion der Nephronanzahl von einer Hypertrophie der verbliebenen Nephrone begleitet wird. Nierenhypoplasie und -dysplasie kommen häufig kombiniert vor (Tabelle 0.2) [6].

Tabelle 0.1 Inzidenz häufiger Harnwegsanomalien

Anomalie	Inzidenz
Doppelfehlbildungen	1/20-125
Vesikoureteraler Reflux	1/10-100
Nierenhypoplasie	1/500
Harnwegsobstruktion	1/500-1000
Nierenagenesie unilateral	1/1000
Nierenagenesie bilateral	1/2500-5000

Modifiziert nach Tsuchiya et al. (2003) [1].

Tabelle 0.2 Nierenhypoplasie und -dysplasie

	Unterform
Nierenhypoplasie	einfache Hypoplasie (ohne Nephronhypertrophie)
	Oligomeganephronie (mit Nephronhypertrophie)
	gemischte Hypodysplasie
Nierendysplasie	einfache, nichtzystische Dysplasie
	zystische/multizystische Dysplasie

Modifiziert nach Schärer (2002) [6].

Beim primären vesikoureteralen Reflux (VUR) kommt es aufgrund einer funktionellen Insuffizienz des Ventilmechanismus im Bereich des distalen Ureters und des Blasenostiums zu einem retrograden Fluß von Urin evtl. bis in das Nierenparenchym. Liegen weitere Störungen distal des Ureters vor spricht man von sekundärem VUR [7]. Der primäre Megaureter ist durch eine Unterbrechung der Ureterperistaltik im prävesikalen Harnleiter gekennzeichnet und unterscheidet sich vom erweiterten Ureter bei VUR (refluxiver Megaureter) durch die permanente Dilatation des betroffenen Ureters. Als Ureterozele bezeichnet man eine zystische Dilatation eines terminalen Harnleitersegments. Ureterozelen können in Kombination mit Doppelfehlbildungen des

Harntrakts auftreten, bei denen dichotome Nierenbecken in zwei Ureteren drainieren. Diese münden schließlich wiederum zum Teil ektop in die Harnblase oder vereinigen sich im Verlauf zum Ureter fissus. Neben diesen funktionellen Obstruktionen der Harnwege existieren anatomische, die auf Engen im ureteropelvinen Übergang (Ureterabgangsstenose) oder bei männlichen Individuen auf posterioren Urethralklappen beruhen [8].

Die Mehrzahl der Fälle von CAKUT manifestiert sich sporadisch. Auffallend ist jedoch, daß bei einer familiären Häufung die Ausprägung der Anomalien interindividuell sehr verschieden ist. Selbst beim Nachweis einer Genmutation in einem Stammbaum zeigt sich eine erhebliche phänotypische Variabilität. Dies läßt vermuten, daß weitere modifizierende, u.a. genetische Einflüsse für den individuellen Phänotyp von Bedeutung sind. Verschiedene Defekte in einer Reihe von Nierenentwicklungsgenen, die im Mausmodell identifiziert wurden, verursachen ebenfalls humane Harnwegsanomalien. Bei keinem der bislang untersuchten Gene wurde jedoch eine Mutationsprävalenz gefunden, die die Häufigkeit von CAKUT erklären könnte.

Neben genetischen Ursachen werden exogene Faktoren für die Entwicklung von CAKUT verantwortlich gemacht. Einige therapeutische Substanzen, die z.B. in das Renin-Angiotensin-System eingreifen, wie Inhibitoren des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE) oder Antagonisten am Angiotensin-II Rezeptor, besitzen ein fetotoxisches Potential, das zu Entwicklungsdefekten der Harnwege führen kann [9 10].

Nephrogenese

In der dritten Woche der humanen Embryonalentwicklung bildet sich zwischen dem äußeren und inneren Keimblatt (Ekto- und Entoderm) durch Auswanderung von ektodermalen Zellen der Primitivrinne ein drittes, mittleres Keimblatt, das intraembryonale Mesoderm bestehend aus paraxialem Mesoderm, Seitenplatten und intermediärem Mesoderm. Letzteres enthält das Anlagematerial für die Harnorgane [11].

1.1.1 Formale Embryologie der Niere und ableitenden Harnwege

Drei aufeinanderfolgende Nierenanlagen werden aus dem intermediären Mesoderm gebildet. Zervikal entsteht die Vorniere (Pronephros), in thorakalen und lumbalen

Abschnitten die Urniere (Mesonephros). Die definitive Niere (Metanephros) entwickelt sich aus dem als nephrogenen Strang bezeichneten kaudalen Anteilen des intermediären Mesoderms. Allen Nierenanlagen gemeinsam ist das Prinzip der Umwandlung von mesenchymalen Mesoderm in epithelial differenziertes Gewebe [11].

Harnblase und Urethra sind entodermalen Ursprungs und entstehen aus dem vorderen Anteil der primitiven Kloake, dem Sinus urogenitalis. Im Trigonum vesicae verschmelzen die mesodermalen Ureteren mit dem Anlagematerial der Harnblase [11].

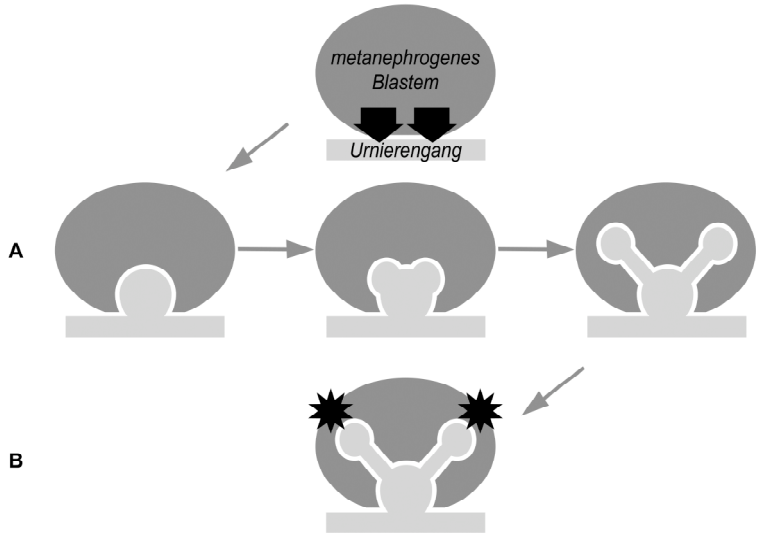
Vor- und Urnierensystem spielen beim Menschen funktionell keine Rolle. Von Bedeutung ist allerdings ein von der Vorniere gebildeter Sammelgang, der sich parallel zum nephrogenen Strang verlaufend in der Urniere fortsetzt und dort als Urnieren- oder Wolffscher Gang bezeichnet wird [11].

Als definitives Ausscheidungsorgan bildet sich ab der fünften Entwicklungswoche die Nachniere. Ihre Nephrone als funktionelle, exkretorische Einheiten gehen aus intermediärem Mesoderm hervor, das im Bereich des Beckens kaudal im nephrogenen Strang liegt und als metanephrogenes Blastem bezeichnet wird. Das harnableitende System entsteht aus der Ureterknospe, die aus dem erwähnten Urnierengang aussprosst und Ureter, Nierenbecken und -kelche, Papillengänge, Sammelrohre sowie Verbindungsstücke beisteuert [11].

Die Entwicklung der Niere ist das Resultat einer reziproken Interaktion zwischen dem metanephrogenem Gewebe und dem Urnierengang und erfordert deren gegenseitige induktive Beeinflussung [12]. Das initiale Signal zur Einleitung der Entwicklung der adulten Niere kommt dabei aus dem metanephrogenem Blastem und bewirkt im Urnierengang Proliferationsvorgänge, die zur Bildung, Invasion und repetitiven, dichotomen Aufzweigung der primären Ureterknospe in das metanephrogene Blastem führen [13] (Abbildung 0.1).

Das Eindringen des ureteralen Gewebes führt im dadurch induktiv aktivierten Blastem zur epithelialen Transformation von Mesenchym und zur Ausbildung der Nephrone. Ureterknospenspitzen und Mesenchym bilden so gemeinsam morphogenetische Einheiten, die durch gegenseitige Promotion und Inhibtion von Wachstum die Nierenarchitektur erzeugen [14]. Eine Subpopulation von induziertem Mesenchym differenziert sich non-epithelial zu Stromazellen [13].

Abbildung 0.1 Wechselseitige Induktion von Urnierengang und Blastem



A *Das metanephrogene Blastem induziert die Knospung des Ureters aus dem Wolffschen Gang und die repititive dichotome Verästelung der Ureterderivate.* ***B*** *An den erweiterten Endstücken der elongierten Äste kommt es reziprok zur Nephroninduktion.*

Pathogenese von CAKUT

Lange Zeit dienten als Modell für CAKUT tierexperimentelle Untersuchungen, in denen Ureteren operativ ligiert und die Auswirkungen des erzeugten Harnstaus auf das Nierenparenchym beobachtet wurden [15]. So zeigen Schafe mit experimenteller, fetaler Obstruktion der Harnleiter eine Reihe verschiedener Nierenanomalien, vor allem Hypodysplasien unterschiedlicher Schweregrade [16]. Es wurde davon ausgegangen, daß Nierenentwicklungsstörungen und assoziierte Defekte auch beim Menschen durch eine solche primäre, intraembryonale Obstruktion der ableitenden Harnwege verursacht werden. Ätiologisch kämen hier etwa eine Obliteration der Urnierengänge [17], muskuläre Hypoperistaltik der Ureteren [18] sowie eine Kompression der Harnleiter zum Beispiel durch Blutgefäße [19] in Frage.

Genetische Untersuchungen jedoch unterstützen erste Vermutungen von Mackie und Stephens [20], daß im Mittelpunkt der Pathogenese von Nierenfehlbildungen nicht eine primäre Obstruktion der Harnwege steht, sondern die fehlerhafte Morphogenese der embryonalen Nierenanlagen [21]. CAKUT-Manifestationen von obstruktivem Charakter wie posteriore Urethralklappen und Ureterstenosen führen schließlich erst sekundär über verschiedene Mechanismen zur Schädigung von Nierengewebe und zur Funktionseinschränkung des Organs [22].

1.1.2 Ektopie der Ureterknospe

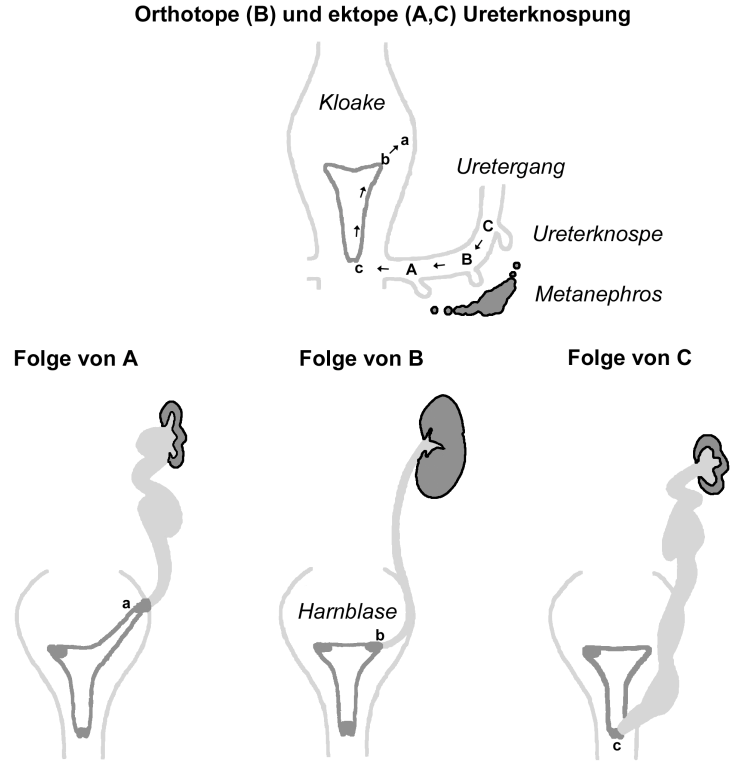
Von herausragender Bedeutung für die normale Nierenentwicklung ist die wechselseitige Beeinflussung von ureteralem Gewebe und Nierenblastem mit dem nephrogenetischen Schlüsselereignis der Knospung des Ureters aus dem Wolffschen Gang (s.o.). Die sog. *bud theory* postuliert die defizitäre, ektope Ureterknospung als gemeinsame Grundstörung angeborener Harnwegsanomalien und stützt sich auf die morphologische Korrelation zwischen dem Ort der vesikalen Uretermündung und dem Ausmaß renaler Hypodysplasie sowie dem Ort der vesikalen Uretermündung und zusätzlichen Anomalien des Ureters [20] (Abbildung 0.2).

Die primitive Uretermündung verlagert sich im Laufe der Embryonalentwicklung von ihrer ursprünglichen Position am Wolffschen Gang in die Blase hinein. Dort verschmilzt sie mit der Blasenwand und bildet das Trigonum vesicae. Wenn die Ureterknospe ektop weiter kaudal aus dem Wolffschen Gang entspringt, so kommt es später zu einer lateralen Fehlposition der intravesikalen Uretermündung. Aufgrund der ektopen Lokalisation der Öffnung ist die submuköse Verlaufsstrecke des distalen Ureters verkürzt mit der Folge eines nur mangelhaften Ventilmechanismus (Abbildung 0.2**A**). Direkte Konsequenz dessen ist ein vesikoureteraler Reflux. Darüber hinaus kann die Ektopie zu einer übermäßigen Größenzunahme des distalen Ureters führen und als Megaureter imponieren.

Die Differenzierung des metanephrogenen Blastems leidet ebenfalls unter einer ektopen Ureterknospung. Ein zu weit distal oder auch proximal vom Wolff-Gang abgehender Ureter projiziert sich entsprechend ektop in nur unzureichend induzierbares Mesoderm, welches die eigentliche Nachnierenanlage umgibt (Abbildung 0.2**A/C**). Hypodysplastische Nieren sind die Folge.

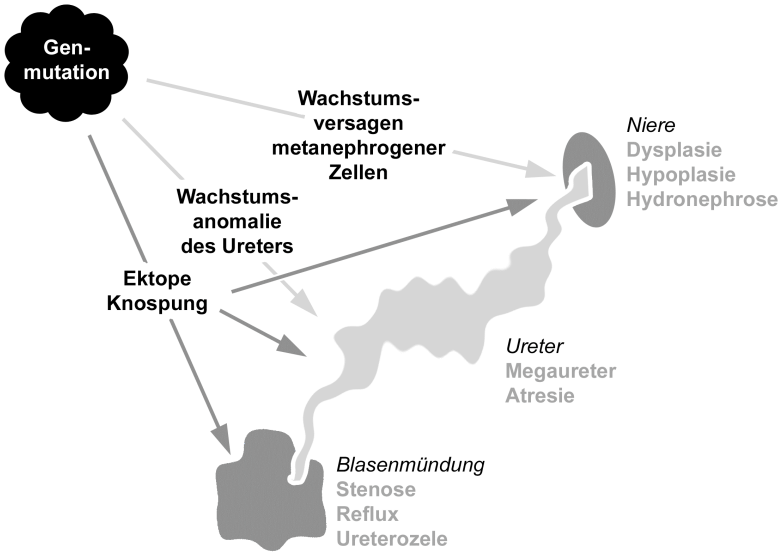
Mit Hilfe der *bud theory* und der Multipotenz einer initial ektopen Ureterknospung gelingt es, das Auftreten von Anomalien im ureteralen, renalen und ureterovesikalen Übergangsbereich auf ein gemeinsames embryologisches Ereignis zurückzuführen. Entsprechend ließe sich das breite Spektrum humaner CAKUT-Phänotypen durch Defekte in einzelnen Nierenentwicklungsgenen erklären, die neben unmittelbarer Störung von Zellfunktionen die Spezifikation der initialen *budding site* als ersten Schritt der Nephrogenese beeinträchtigen (Abbildung 0.3) [23].

Abbildung 0.2 Konsequenzen ektoper Ureterknospung



A-C *Relative Position der initialen Ureterknospe zum metanephrogenem Blastem.*
a-c *Vesikale Uretermündung in Abhängigkeit von der jeweiligen* budding site.
Modifiziert nach Pope et al. *(1999)* [21].

Abbildung 0.3 Mutationen in Nierenentwicklungsgenen und CAKUT



Einzelne Genmutationen erzeugen das gesamte Spektrum von Harnwegsanomalien unter Beteiligung der Niere, des Harnleiters und des ureterovesikalen Übergangs. Dies beruht sowohl auf den vielfältigen biologischen Funktionen eines Gens in allen Ausgangsgeweben als auch auf der Bedeutung der initialen Ureterknospung für die Differenzierung assoziierter Zellen. Modifiziert nach Kuwayama et al. *(2002)* [23].

Kontrolle der Nierenentwicklung

Eine Reihe von Untersuchungen zeigt, daß vor allem der Wachstumsfaktor *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) und von diesem abhängige Signalwege eine zentrale Rolle bezüglich der Regulation der primären Ureterknospung als vorentscheidender Schritt der Nierenentwicklung einnehmen [24]. GDNF ist ein Wachstumsfaktor aus der *transforming growth factor-β*-Superfamilie, der nicht nur im embryonalen Urogenitaltrakt sondern auch im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert wird [25]. Die Notwendigkeit von GDNF für das Überleben dopaminerger Neurone in der Substantia nigra impliziert ein therapeutisches Potenzial in der Behandlung des Parkinsom-Syndroms [26]. Mäuse ohne GDNF zeigen allerdings keinen zentralnervösen Phänotyp, sondern lediglich Defizite in der autonomen Innervation des Verdauungsstraktes und vor allem eine bilaterale Nierenagenesie [27].

1.1.3 Expression und Regulation von GDNF

GDNF wird bereits vor der Entstehung der Ureterknospe zu einem frühen Zeitpunkt der Nephrogenese im metanephrogenem Blastem exprimiert. Über einen im ureteralen Gewebe gebildeten Rezeptorkomplex bestehend aus der Tyrosinkinase RET und dem Co-Rezeptor GFR-α1 werden die biologischen Effekte von GDNF vermittelt [28]. Diese bestehen aus einer Aktivierung der Proliferation im Wolffschen Gang mit Knospung des Ureters in das metanephrogene Blastem hinein und einer Attraktion der wachsenden Ureterknospe in Richtung des GDNF-Syntheseortes [29]. Mäuse mit homozygoten Defekten in den Genen für RET und GFR-α1 entwickeln ähnliche Morphologien wie *gdnf*-Nullmutanten [30].

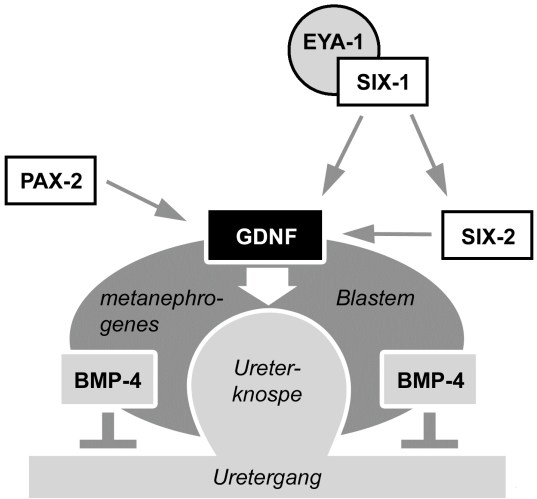
Die Wirkung von GDNF auf den Urnierengang wird durch das *bone morphogenetic protein 4* (BMP-4) supprimiert [31]. BMP-4 wird im Urnierengang produziert und inhibiert spezifisch die GDNF-vermittelte Signalgebung zum Ureterepithel ohne das Expressionsmuster von *gdnf* direkt zu beeinflussen. Nur in Bereichen mangelnder BMP-4 Expression kann sich die Ureterknospe ausbilden (Abbildung 0.4). Die regional unterschiedlich ausgeprägte Synthese von BMP-4 und die dadurch ortsabhängige Antagonisierung von GDNF determiniert den Ort und den Zeitpunkt der initialen, orthotopen Ureterknospung [32].

Verschiedene Gene sind in Mausmodellen identifiziert worden, die an der Regulation der GDNF-Transkription beteiligt sind. Für diese Gene wurden beim Menschen homologe Sequenzen nachgewiesen. In einem Netzwerk von Signalwegen wirken diese direkt oder indirekt auf die Synthese von GDNF ein. An dieser Stelle können lediglich einige dieser Faktoren besprochen werden, einen umfassenderen Überblick nicht nur über GDNF-assoziierte Nierenentwicklungsgene liefern Piscione und Rosenblum (2002) [12].

In Kooperation mit Mitgliedern der SIX-Proteinfamilie reguliert der Transkriptionsmodulator *eyes absent 1* (EYA-1) die Expression von GDNF. EYA-1 wird gemeinsam mit *sine oculis 1* (SIX-1) nukleär transloziert [33]. Als Komplex promovieren sie die Transkription mehrerer Zielgene. Neben *gdnf* ist dies *six-2* [34], ein homologer Verwandter von *six-1*, der wiederum seinerseits synergistisch mit EYA-1/SIX-1 die Expression von GDNF positiv beeinflusst [35] (Abbildung 0.4).

Direkte Auswirkungen auf die Expression von GDNF hat hingegen der Transkriptionsfaktor *paired domain homeobox 2* (PAX-2). PAX-2 ist in der Lage, spezifisch den Promotor von *GDNF* zu binden und dessen Expression zu steigern [31] (Abbildung 0.4).

Abbildung 0.4 GDNF-Regulation und Ureterknospung



Antagonisiert durch BMP-4 induziert GDNF die Ureterknospe. Die Expression von GDNF wird durch ein Netzwerk von Faktoren reguliert.

Das PAX/EYA/SIX-Netzwerk fungiert als genetische Determinante der Nephrogenese und bildet somit die Basis für die physiologische Entwicklung des Urogenitaltrakts [36].

Defekte in PAX-2, EYA-1 und den SIX-Genen führen im Mausmodell zu einer Störung der Nierenentwicklung. Darüber hinaus sind beim Menschen Syndrome identifiziert worden, die auf Mutationen in diesen Genen zurückzuführen sind. SIX-1 und vor allem EYA-1-Mutationen verursachen das Branchio-oto-renale Syndrom. Durch PAX-2 Mutationen entsteht das Papillo-renales Syndrom.

Der Transkriptionsfaktor PAX-2

PAX-2 gehört zu einer Gruppe von neun homologen Genen im humanem und murinem Genom. Der Transkriptionsfaktor nimmt über die direkte Beeinflussung von *GDNF* eine Schlüsselrolle in der Embryogenese der Nieren und ableitenden Harnwege ein. Homozygote *pax-2*-Defizienz führt im Mausmodell zu einem Fehlen von Nieren, Ureteren und Genitalorganen. Diese Defekte werden einer Dysgenesie von epithelialen Komponenten des Urogenitalsystems zugeschrieben.

1.1.4 Die *PAX*-Genfamilie

Die *PAX*-Genfamilie kodiert bei der Maus und beim Menschen eine Gruppe von neun Transkriptionsfaktoren, denen in der frühen Entwicklung von Organismen eine wesentliche Bedeutung zukommt. *PAX*-Gene wurden in einer Reihe von Spezies identifiziert, u.a. bei Quallen [37] und dem Zebrafisch [38], bei Drosophila [39], dem Huhn [40] sowie mehreren Säugetierspezies [41]. Mutationen in Genen der *PAX*-Familie verursachen schwere Entwicklungsdefekte in verschiedenen Geweben [42]. Mutationen in vier der *PAX*-Gene - *PAX-2*, *PAX-3*, *PAX-6* und *PAX-8* - sind für angeborene Fehlbildungssyndrome beim Menschen verantwortlich. Basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten in Abhängigkeit von Sequenzhomologien und der Präsenz von Proteindomänen werden die *PAX*-Gene in 4 Klassen gruppiert [43] (Tabelle 0.3).

PAX-Gene erhielten ihren Namen aufgrund eines konservierten DNA-Motivs, der *paired domain* (PD), einer aus 128 Aminosäuren bestehenden Domäne im aminoterminalen Anteil des Proteins [44]. Jede PD besteht aus zwei strukturell unabhängigen Homöobox-Subdomänen, die über ein kurzes Verbindungsstück (*linker*) miteinander verknüpft sind [45] [46]. Homöobox-Domänen sind häufige DNA-Bindungsstrukuren in einer großen Zahl von Transkriptionsfaktoren. Sekundärstrukturell setzen sie sich aus drei α-Helices zusammen, die in einer sog. *helix-*

turn-helix Konfiguration angeordnet sind. Jeweils die dritte Helix stellt die Erkennungssequenz dar. Diese legt sich im Bereich der Promotorregion des Zielgens in die große Rinne der DNA, wo definierte Aminosäure-Seitengruppen spezifische Bindungen mit DNA-Basen und dem Phosphodiester-Rückgrat eingehen [47].

Tabelle 0.3 *PAX*-Genfamile

	Gen	Subdomäne					Locus	Gewebe	Erkrankung
		PD	OP	HD1	HD2	TD			
1	PAX-1	•	•			•	20p11	Thymus	
	PAX-9	•	•			•	14q12-q13	Skelett, Zähne	Oligodentie
2	PAX-2	•	•	•		•	10q25	ZNS, Niere	Papillo-renales Syndrom
	PAX-5	•	•	•		•	9p13	B-Lymphoz.	Großzelliges Lymphom
	PAX-8	•	•	•		•	2q12-q14	Schilddrüse	Kongen. Hypothyreose
3	PAX-4	•		•	•	•	7q	Pankreas	
	PAX-6	•		•	•	•	11p13	Auge	Aniridie, Katarakt
4	PAX-3	•	•	•	•	•	2q35	Skelettmuskel	Waardenburg-Syndrom
	PAX-7	•	•	•	•	•	1p36.2	Skelettmuskel	Rhabdomyosarkom

Modifiziert nach Chi und Epstein (2002) [42].

Je nach Protein-Subtyp oder Isoform können weitere konservierte Sequenzen in PAX-Proteinen gefunden werden (Tabelle 0.3). Neben einer zusätzlichen, teilweise inkompletten Homöobox (HD1 bzw. HD2) sind dies ein zwischen PD und HD gelegenes Oktapeptid-Motiv (OP) sowie Transaktivierungsdomänen (TD) im carboxyterminalen Bereich [42]. TD dienen der Aktivierung der funktionellen Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren und binden sogenannte allgemeine Transkriptionsfaktoren. Über das OP wird eine Repression der Transaktivation durch die TD von PAX-Proteinen vermittelt [48]. *PAX-2* gehört mit den Genen *PAX-5* und *PAX-8* zur Gruppe 2 der *PAX*-Genfamilie, da diese Gene über eine ähnliche Sequenz verfügen und neben der PD ein OP und eine partielle HD besitzen.

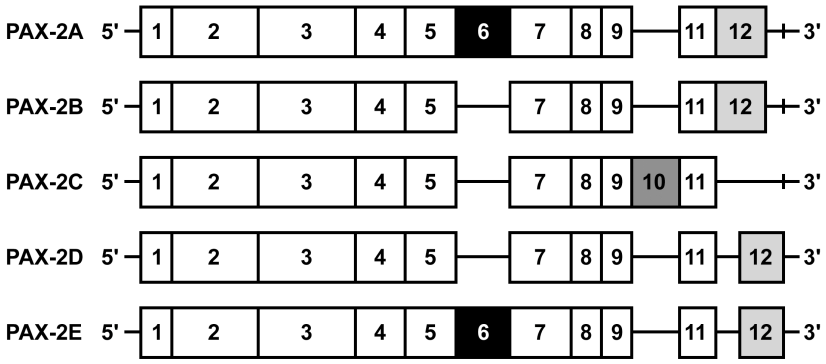
1.1.5 Struktur des humanen PAX-2-Gens

Das menschliche *PAX-2* ist auf Chromosom 10q25 lokalisiert [49] und umspannt dort mit 12 Exonen etwa 70 kb [50]. Bislang konnten fünf durch alternatives Spleißen erzeugte Transkriptvarianten (PAX-2A bis PAX-2E) identifiziert werden (Abbildung 0.5). Diese unterscheiden sich durch die Insertion, bzw. Deletion der Exone 6 und 10, wodurch es

zum Teil zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens kommt, und durch die Verwendung einer alternativen Spleißstelle in Exon 12. Die exakte Funktion der alternativ gespleißten Exone ist nicht bekannt. Keine der beschriebenen Isoformen beinhaltet die komplette genomische Information von *PAX-2*.

Um eine praktikable Vergleichbarkeit der hier analysierten Sequenzen mit der Literatur zu gewährleisten, wird entgegen neuerer nomenklatorischer Übereinkünfte die von Sanyanusin *et al.* zur Charakterisierung von *PAX-2* eingeführte Numerierung der Nukleotidpositionen verwendet [50]. Hierbei wird dem Start-ATG nicht die Nukleotidposition 1 sondern korrespierend auch zu jüngst publizierten Arbeiten die 544 zugeordnet.

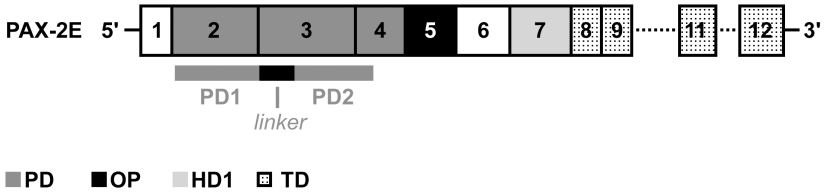
Abbildung 0.5 PAX-2 Transkriptvarianten



Markiert sind die alternativ gespleißten Exone 6, 10 und 12. PAX-2A und PAX-2E, bzw. PAX-2B und PAX-2D unterscheiden sich durch ein alternativ gespleißtes Exon 12. Die Verwendung der stromabwärts gelegenen Spleißstelle verschiebt den Leserahmen und führt zu einer späteren Termination der Proteinsynthese. Die Insertion von Exon 10 in PAX-2C erzeugt am Ende von Exon 11 ein vorzeitiges Stopcodon.

Die DNA-bindende PD von PAX-2, bestehend aus der N-terminalen Subdomäne PD1, der *linker*-Region und der C-terminalen PD2, erstreckt sich über die Exone 2 bis 4 beginnend an Nukleotiposition 589. Die Information für das OP ist in Exon 5 enthalten (Position 1096 bis 1119). PAX-2 beinhaltet in Exon 7 eine zusätzliche, vermutlich funktionslose partielle Homöobox (HD1) [51]. Die transaktivierenden Regionen (TD) des Transkriptionsfaktors sind über den Carboxyterminus verteilt. Die in dieser Arbeit verwendete Numerierung der Nukleotide und die Zuweisung der Nukleotidpositionen der Domänen folgt der Erstbeschreibung der genomischen Struktur durch Sanyanusin *et al.* (1996) [50].

Abbildung 0.6 Lokalisation konservierter Domänen von PAX-2



Die paired domain *verteilt sich wie abgebildet mit ihren Subdomänen über die Exone 2 bis 4. Transkaktivierende Domänen erstrecken sich über das 3'-Ende des Gens.*

1.1.6 Expression und Regulation von PAX-2

Das *PAX-2*-Gen wird während der Embryonalentwicklung im Auge, Ohr, Zentralnervensystem und Urogenitaltrakt exprimiert [52 53]. Eine kritische Rolle für *PAX-2* in der Genese dieser Organe wurde durch die Analyse von Mausmodellen mit gestörter Expression von PAX-2 beschrieben. Die Nierenentwicklung betreffend erscheint PAX-2 mit dem Beginn der mesenchymo-epithelialen Transformation im Urnierengang und dessen Abkömmlingen, im metanephrogenem Blastem sowie in den frühen epithelialen Derivaten des Blastems. PAX-2 wird demgemäß in allen Geweben exprimiert, die an der Entstehung der adulten Niere beteiligt sind. Mit fortschreitender Reifung der tubulären Strukturen in der Niere sistiert die Expression in den genannten Geweben. In der gesunden reifen Niere ist eine Expression von PAX-2 nicht mehr nachweisbar [53].

Die transiente Expression von PAX-2 in der sich entwickelnden Niere wird reguliert durch Wechselwirkungen mit dem Transkriptionsfaktor *Wilms` tumor suppressor gene 1* (WT-1). Wie PAX-2 wird WT-1 in den verschiedenen Gewebekomponenten der Nachniere exprimiert, zeitlich jedoch etwas versetzt. PAX-2 ist in der Lage, den Promotor von *WT-1* zu aktivieren und die Synthese dieses Transkriptionsfaktors zu steigern [54]. Im Gegenzug reprimiert WT-1 im Sinne einer negativen Rückkopplung gegen Ende der epithelialen Ausreifung der Nephrone die Expression von PAX-2 [55].

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ebenfalls an der Regulation von PAX-2 beteiligt. Angiotensin II als Effektor des RAS vermag die Expression von PAX-2 über den AT_1-Rezeptor zu steigern. Im Tiermodell führt der Defekt dieses Rezeptors zu einem Phänotyp, der den humanen CAKUT sehr ähnlich ist [56].

1.1.7 Biologische Funktionen von PAX-2

Unter den etablierten Mausmodellen mit Beeinträchtigung der Funktion von PAX-2 finden sich Tiere mit einer transgen induzierten Deletion des *pax-2* tragenden murinen Chromosoms (*krd*) [57], einer Insertionsmutation in der PD (*pax-2*^{1Neu}) [58] sowie homo- und heterozygote *knock out* Mäuse (*pax-2*$^{-/-}$ und *pax-2*$^{+/-}$) [59]. Alle betroffenen Tiere haben die Manifestation von Anomalien sowohl des Urogenitaltraktes als auch der Augen gemeinsam.

pax-2$^{-/-}$-Tieren fehlen sämtliche epithelialen Urogenitalorgane, die sich aus dem intermediären Mesoderm ableiten. Neben den Nieren und den Harnleitern sind dies die genitalen Derivate von Wolffschen und Müllerschen Gängen. Den weiblichen Tieren fehlen Eileiter, Uterus und Vagina und den männlichen Ductuli efferentes, Nebenhoden, Ductus deferentes und Samenbläschen. Die Entwicklung von Keimzellgewebe als Resultat non-epithelialer Differenzierung des intermediären Mesoderms ist hingegen nicht beeinträchtigt. Heterozygoten *pax-2*-Mutanten (*pax-2*$^{+/-}$) weisen einen milderen, vornehmlich aus hypoplastischen Nieren bestehenden Phänotyp auf. Die Genitalorgane sind bei diesen Tieren normal. Urethra, Harnblase und Prostata als Urogenitalorgane entodermalen Ursprungs sind sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygoten Mäusen nicht gestört [59].

Diese Organdefekte beruhen auf Störungen sämtlicher morphogenetischer Schritte bei PAX-2-Mutanten. So bleibt bei *pax-2*$^{-/-}$-Mäusen das Auswachsen der primären Ureterknospe aus dem zunächst regelhaft entwickelten Wolffschen Gang aus [59]. Untersuchungen weisen darauf hin, daß dies auf einer vermehrten Apoptose in den PAX-2-abhängigen Geweben mutierter Tiere beruht [60 61 62].

Zudem zeigen Versuche an explantiertem Gewebe, daß PAX-2-defizientes metanephrogenes Blastem trotz Stimulation nicht epithelial transformiert und somit die notwendige Induktionsfähigkeit verloren hat [63].

Die genauen molekularen Zusammenhänge von PAX-2-Effekten und -Interaktionen mit anderen Nierenentwicklungsgenen sind nach wie vor zum großen Teil unbekannt. Wie bereits erwähnt stellt der Wachstumsfaktor GDNF ein bedeutsames Zielgen von PAX-2 dar. *pax-2*$^{-/-}$-Mäuse zeigen eine signifikante Abnahme der GDNF-Expression [31]. Die PAX-2-abhängige Aktivierung von GDNF wird vermittelt über eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor im Bereich der 5'-UTR des Wachstumsfaktorgens (PBS2).

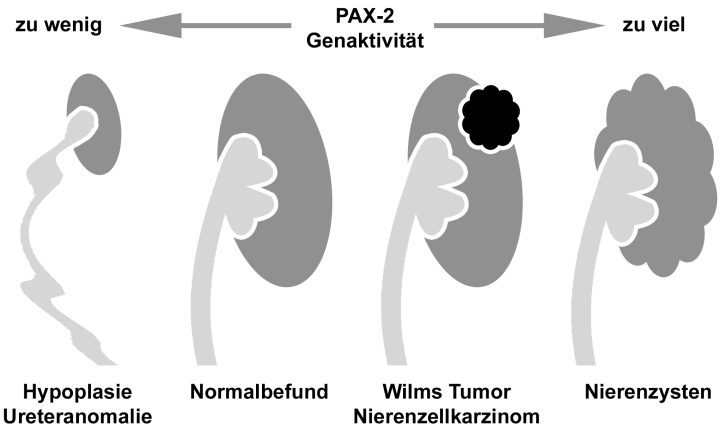
Experimentelle Deletion dieser Sequenz führt zu einer Abnahme der transaktivierenden Kapazität von PAX-2 [31].

PAX-2 ist demnach an der Entwicklung und Differenzierung beider nephrogener Ausgangsgewebe entscheidend beteiligt. Es gewährleistet über einen Schutz abhängiger Gewebe vor programmiertem Zelltod und über Beeinflussung der GDNF-Expression die regelhafte Bildung und Arborisation der Ureterknospe und ist im folgenden essentiell für die Differenzierung exkretorischer Einheiten im metanephrogenem Blastem.

1.1.8 Klinische Bedeutung von PAX-2

Da homo- und heterozygote Mutanten Phänotypen unterschiedlichen Schweregrads aufweisen, liegt die Vermutung nahe, daß Haploinsuffizienz von PAX-2 der entscheidende Mechanismus in der Pathogenese der beobachteten Organanomalien ist [14]. Haploinsuffizienz führt über eine Beeinträchtigung der normalen Proliferationsmuster in der morphogenetischen Einheit der Niere (s.o.) mit apoptischer Degeneration von Progenitorzellen zur Retardierung des Ureterknospenwachstums [14]. Die mangelnde Aufzweigung der Knospe verursacht eine unzureichende Differenzierung des metanephrogenen Blastems und vermindert die Anzahl funktionsfähiger Nephrone [64]. Nierenhypoplasien und -dysplasien sind die Folge (Abbildung 0.7).

Abbildung 0.7 PAX-2 Genaktivität bei verschiedenen Störungen



Eine herabgesetzte Expression von PAX-2 führt zu renalen Entwicklungsdefekten. Bei hyperproliferativen wie tumorösen und zystischen Erkrankungen der Nieren wird bisweilen eine erhöhte Genaktivität von PAX-2 beobachtet. Modifiziert nach Woolf (2000) [65].

Andere PAX-2 exprimierende Organsysteme wie Augen und Ohren sind bei Mutanten ebenfalls von Entwicklungsstörungen betroffen. Das Papillo-renale Syndrom besteht aus der fixen Kombination von renalen und okulären Fehlbildungen und ähnelt damit dem Phänotyp PAX-2-defizienter Mausmodelle [66]. In einer kleinen Kohorte gelang erstmalig der Nachweis eines *PAX-2*-Defekts bei einem Patienten mit isolierter Nierenhypoplasie [67].

Jedoch nicht nur der Mangel sondern auch die abnorme Überexpression des Transkriptionsfaktors besitzt ein pathogenes Potential (Abbildung 0.7). Hyperproliferative Gewebe wie Wilms Tumorgewebe und Nierenkarzinomzellen zeigen zum Teil eine Deregulation der PAX-2-Expression passend zu einer Aufhebung der PAX-2-assoziierten antiapoptotischen Effekte [68] [69]. Die onkogene Kapazität von PAX-2 beruht in erster Linie auf einer Inhibition des Tumorsuppressorgens *p53* [70]. Außerdem erzeugt die murine, transgene Überexpression von PAX-2 dysfunktionales Nierengewebe [71], und die Hemmung der PAX-2-Synthese im Mausmodell der polyzystischen Nierenerkrankung führt zu einer Verlangsamung des Krankheitsprogresses [72].

Das papillo-renale Syndrom

Das papillo-renale Syndrom (PRS, auch: Reno-Kolobom-Syndrom) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die durch die Kombination von okulären Anomalien mit renalen Entwicklungsstörungen gekennzeichnet ist [73] [74]. Weitere, bei den Betroffenen

anzutreffende Merkmale sind häufig sensorineurale Hörminderung und seltener zentralnervöse Defizite [74] [75] (Tabelle 0.4).

Die Kongruenz zwischen klinischen Merkmalen des PRS, dem embryonalem Expressionsmuster von *PAX-2* und der ähnliche Phänotyp von *PAX-2*-Mausmutanten impliziert eine ursächliche Bedeutung des Transkriptionsfaktors bei der Entstehung der Krankheit. 1995 konnten in einer Familie mit mehreren Fällen von Optikuskolobomen und Nierenhypodysplasie erstmals Falschsinn-Mutationen in *PAX-2* identifiziert werden [66]. Inzwischen wurden Gendefekte in einer ganzen Reihe von familiären und sporadischen Fällen von PRS nachgewiesen. Die interindividuelle Variabilität der klinischen Ausprägung ist jedoch sogar innerhalb von Familienmitgliedern mit der gleichen Mutation beträchtlich und lässt keine eindeutige Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp zu - weder bezüglich des klinischen Verlaufs der Erkrankung noch bezüglich der anatomischen Lokalisation und Verteilung der Anomalien. Das Spektrum reicht von blanden, klinisch unauffälligen Veränderungen bis zu multiplen Fehlbildungen hohen Schweregrads mit frühkindlicher Krankheitsmanifestation [75]. Aufgrund der phänotypischen Heterogenität der PRS-Patienten und des erfolgten Nachweises einer PAX-2-Mutation bei Patienten mit isolierter Nierenhypoplasie stellt sich die Frage, inwieweit PAX-2-Mutationen in einem großen, unselektierten Kollektiv von Patienten mit variablen CAKUT-Manifestationen anzutreffen sind und vor allen Dingen für Pathologien unabhängg vom PRS verantwortlich sein können.

Tabelle 0.4 Phänotypverteilung bei 19 Patienten mit *PAX-2*-Mutationen

Anomalie	% Patienten mit PAX-2-Mutation (n=19)
Niereninsuffizienz	100
Okuläre Anomalien	100
Nierenhypoplasie	68
Vesikoureteraler Reflux	26
Innenohrschädigung	16

Modifiziert nach Eccles und Schimmenti (1999) [76].

1.1.9 Urogenitale Anomalien

Häufigste renale Veränderung bei Patienten mit PRS ist die ein- oder beidseitige Nierenhypoplasie mit Reduktion sowohl von Nierengröße als auch von Nephronanzahl. Die Erkrankung der Nieren verläuft in der Regel fortschreitend und erfordert im Falle

bilateraler Affektion oft eine Nierenersatztherapie. Bioptisch zeigen die betroffenen Organe eine mesangiale Fibrose und Glomerulosklerose sowie eine Abnahme der Gesamtzahl an Nierenkörperchen [76]. Jüngst wurde eine multizystsche Nierendysplasie im Rahmen eines PRS dokumentiert [77]. Gelegentlich manifestiert sich die Nephropathie als Oligomeganephronie, einer Sonderform der Nierenhypoplasie [78] (vgl. Kapitel 0).

Eine Vielzahl der Patienten mit PRS präsentiert einen vesikoureteralen Reflux. Dieser tritt isoliert oder in Kombination mit hypodysplastischen Nieren oder anderen renalen Anomalien auf. Bei einem Teil der Patienten bessert sich der Reflux im Laufe der Zeit, ein anderer Teil entwickelt trotz isoliertem VUR ein chronisches Nierenversagen als Folge einer Refluxnephropathie oder als Komplikation rezidivierender Pyelonephritiden. Genitale Anomalien werden nicht regelhaft beim PRS beobachtet. Bei einem Betroffenen wurde ein bilateraler Kryptorchismus dokumentiert [76].

1.1.10 Okuläre Anomalien

Das primitive Auge ist durch den Augenbecherstiel mit dem Gehirn verbunden. Entlang des Augenbecherstiels erstreckt sich als Fortsetzung des invaginierten Augenbechers die Augenbecherfurche, die sich nach Aufnahme der Vasa hyaloidea schließt. Der Augenbecherstiel entwickelt sich zum Nervus opticus [11]. Unzulängliche Verschmelzung im Bereich des Augenbechers bzw. Augenbecherstiels resultiert in einer Reihe von Fehlbildungen, die unter kolobomatösen Augendefekten subsummiert werden [79]. Mutationen in *PAX-2* führen zu derartigen Fusionsdefekten im Bereich des hinteren Augenpols [76].

Okuläre Anomalien beim PRS beinhalten neben Läsionen des Sehnervs (inklusive Dysplasie und Aplasie), der Retina (inklusive Atrophie und Makulopathie) und der Choroidea auch Orbitalzysten und Mikrophthalmus. Klinisch zeigen die Patienten eine angeborene Blindheit oder einen progressiven Visusverlust. Nicht selten bleiben ophthalmologisch nachweisbare Veränderungen jedoch klinisch asymptomatisch und werden erst bei der Fahndung nach extrarenalen Anomalien bei nierenkranken Kindern entdeckt [76 78 80].

1.1.11 Anomalien anderer Organe

Ein Teil der Erkrankten leidet an einer Schwerhörigkeit für hohe Frequenzen, die vermutlich auf einem Entwicklungsdefekt neuraler Anteile des Innenohrs beruht [52 75]. In einigen Fällen werden Störungen des Zentralnervensystems beobachtet wie Krampfleiden oder mentale Retardierung, obwohl PRS Patienten im allgemeinen eine durchschnittliche bis überdurchschnittliche Intelligenz aufweisen. Eine Chiari I Malformation (Herniation inferiorer Kleinhirnanteile in das Foramen magnum) als Defekt der (PAX-2 exprimierenden) Mittelhirn-Nachhirn-Grenze konnte in einem Fall diagnostiziert werden [81].

Methoden und Material

Die genetische Untersuchung von Patienten und Kontrollpersonen erfolgte mittels kombinierter PCR-SSCP-Analyse. Nach Amplifikation der für den Transkriptionsfaktor PAX-2 kodierenden Genabschnitte mit dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde die Technik der Einzelstrang-Konformationsanalyse (*single strand conformation polymorphism analysis*, SSCP-Analyse) verwendet. Proben, die ein auffälliges Elektrophorese-Verhalten zeigten, wurden zur exakten Identifikation von Mutationen und Polymorphismen sequenziert.

Patienten- und Kontrollkollektive

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 135 Patienten auf Sequenzanomalien im Gen *PAX-2* untersucht. Bei Nachweis einer genetischen Abweichung stand zum Ausschluss bzw. zur Quantifizerung von Polymorphismen ein Kontrollkollektiv von 145 Personen zur Verfügung. Alle Teilnehmer wurden über den Zweck der molekulargenetischen Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihres genetischen Materials.

1.1.12 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzte sich aus bis auf ein Zwillingspaar unverwandten Individuen aus verschiedenen pädiatrisch-nephrologischen Zentren Europas zusammen. 67% der Patienten stammen aus Deutschland, Mittel- und Westeuropa sowie 33% aus Ost- und Südosteuropa.

Das Durchschnittsalter betrug zum Zeitpunkt der Untersuchung 8 10/12 Jahre (im Median 8 Jahre) mit einer Spannbreite von 1 bis 23 Jahren (n=107). 65% der Patienten sind männlichen Geschlechts (n=115). Alle eingeschlossenen Personen leiden unter angeborenen Fehlbildungen der Harnwege. Von 128 Patienten liegen exakte klinische Angaben vor, die das gesamte Spektrum von CAKUT repräsentieren. Die Krankengeschichten der übrigen sieben Patienten lagen nur lückenhaft vor, so dass zur Vermeidung von unscharfen Ergebnissen auf deren Einarbeitung verzichtet worden ist.

Etwa die Hälfte der Patienten zeigt hypo- oder dysplastische Nieren. Dies häufig in Kombination mit einem vesikoureteralen Reflux, der insgesamt bei einem Drittel der

Kinder nachgewiesen wurde. Eine Übersicht über die diagnostizierten Veränderungen im Patientenkollektiv zeigen Tabelle 0.1 und Abbildung 0.1**A**. Im Durchschnitt sind bei jedem Individuum zwei Entitäten von pathologischen Veränderungen betroffen. Hierzu zählen sowohl die symmetrische Beteiligung paariger Organe als auch die koinzidente Beteiligung verschiedener Organe.

Tabelle 0.1 Harnwegsanomalien im Patientenkollektiv

Diagnose	gesamt (%)	unilateral (%)	bilateral (%)
Nierenhypoplasie *	23 (18)	11 (9)	12 (9)
einfache Hypoplasie	13 (10)	6 (5)	7 (5)
gemischte Hypodysplasie	10 (8)	5 (4)	5 (4)
Nierendysplasie *	33 (26)	20 (16)	13 (10)
einfache Dysplasie	12 (9)	9 (7)	3 (2)
zystische Dysplasie	21 (16)	11 (9)	10 (8)
prim. vesikoureteraler Reflux	33 (26)	19 (15)	14 (11)
Ureterabgangsstenose	15 (12)	12 (9)	3 (2)
Doppelfehlbildung	14 (11)	10 (8)	4 (3)
Nierenagenesie	10 (8)	10 (8)	-
Ureterektopie	3 (2)	3 (2)	-
Ureterozele	2 (2)	2 (2)	-
prim. Megaureter	2 (2)	2 (2)	-
post. Urethralklappe	22 (17)*	22 (17)*	-

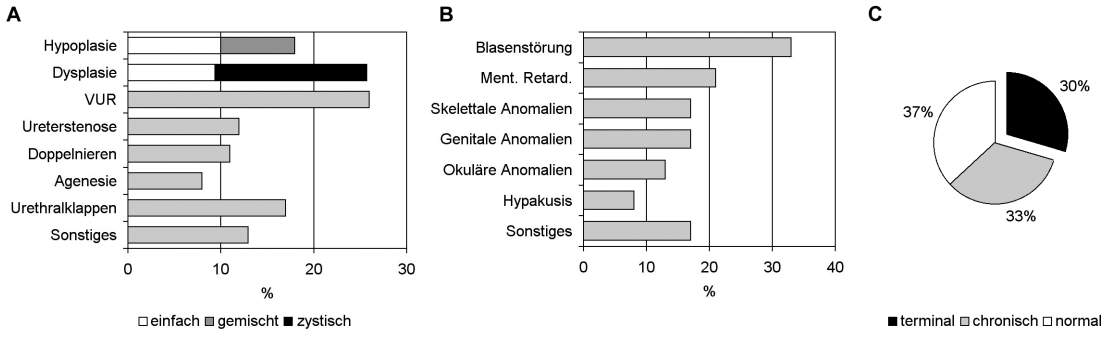
N=128. Doppelnennungen möglich. zur Nomenklatur vgl. Tabelle 0.2. ** entspricht 30% der männlichen Individuen.*

19% der untersuchten Personen zeigen zusätzliche extrarenale Symptome, zumeist in Form neurogener Blasenstörung (33%) oder mentaler Retardierung (21%) (Abbildung 0.1**B**). Alle Patienten mit psychomotorischen Defiziten sind chronisch niereninsuffizient (GFR<70ml/min/1,73m^2 KO).

Die Einschränkung der Nierenfunktion variiert im Patientenkollektiv von gar keiner bis hochgradig. Anhand der vorliegenden Messungen der glomerulären Filtrationsrate (GFR, berechnet nach der Schwartz-Formel) als Parameter für die Nierenfunktion wurden die Patienten in drei Gruppen von normaler Funktionsfähigkeit bis hin zu terminaler Niereninsuffizienz eingeteilt. Normale Nierenfunktion wurde konstatiert bei einer GFR von über 70ml/min/1,73m^{2}KO. Bei einer GFR von unter 70 und über 15ml/min/1,73m^{2}KO erfolgte eine Einteilung in die Gruppe der chronisch niereninsuffizienten Kinder. Betrug die GFR weniger als 15ml/min/1,73m^{2}KO bestand

eine terminale Niereninsuffizienz. Patienten, die eine Nierentransplantation erhalten haben wurden als terminal niereninsuffizient klassifiziert (Abbildung 0.1**C**).

Abbildung 0.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs



A *Beobachtete Harnwegsanomalien (N=128).* ***B*** *Beobachtete extrarenale Anomalien (N=24).*
C *Ausprägungsgrad der Niereninsuffizienz nach Verminderung der GFR nach Schwartz (N=135, chronisch=GFR<70ml/min/1,73m^{2}KO, terminal=GFR<15ml/min/1,73m^{2}KO).*

1.1.13 Kontrollkollektiv

In das Kontrollkollektiv wurden unverwandte Personen vergleichbarer Herkunft aufgenommen, die nicht an den Nieren und/oder Harnwegen erkrankt sind. Insgesamt wurden 145 verschiedene Proben untersucht.

Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR lassen sich definierte DNA-Abschnitte enzymatisch selektiv vervielfältigen. Diese Technik erlaubt es, aus einer kleinen Menge DNA (sog. Matrize oder *Template*-DNA) mit einer großen Zahl irrelevanter Sequenzen eine spezifische Sequenz auszuwählen und zu amplifizieren [84].

1.1.14 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR besteht aus einer Abfolge von Polymerisationszyklen, die sich jeweils aus drei temperaturabhängigen Schritten zusammensetzen: DNA-Denaturierung, *Primer-Template*-Bindung und DNA-Polymerisation. Je Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der Kopien der zu interessierenden Zielsequenz.

Da die *in-vitro*-Amplifikation der DNA-Replikation im Zellzyklus entsprechend mit DNA-Polymerasen erfolgt, müssen je Zielsequenz zwei synthetisch hergestellte

Oligonukleotide (*Primer*) dem Ansatz hinzugefügt werden, die die für die Elongation initial notwendigen 3'-OH-Enden bereitstellen. Jeweils ein *Primer* ist komplementär zum 3'-Ende eines der beiden DNA-Einzelstränge der zu vermehrenden Sequenz. Man unterscheidet zwischen sogenannten Vorwärts (F) - und Rückwärts (R)-*Primern*. Die Elongation der Zielsequenz wird durch die thermostabile DNA-Polymerase von *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) katalysiert. Die Thermostabilität verhindert ein Zerstören des Enzyms während der zyklischen Denaturierungsschritte.

1.1.15 Konstruktion der Primer

In dieser Arbeit wurde das *PAX-2*-Gen basierend auf der für die längste Protein-Isoform kodierenden Transkriptvariante PAX-2E exonweise amplifiziert. Zur *Primer*-Konstruktion wurden die Sequenzen der 11 Exone von PAX-2E durch einen Abgleich der genomischen *coding sequence* von PAX-2E (Zugangsnummer *NM_003990* unter [82]) mit dem humanen Chromosom 10 (Zugangsnummer *NT_030059.11* unter [82]) durch die Onlinefunktion *BLAST*[83] ermittelt. Die Referenzsequenz von PAX-2E ist im Anhang auf Seite 77 abgedruckt. Um Spleißstellen beurteilen zu können, wurden *Primer* gewählt, die auch exonnahe Intronabschnitte amplifizierten (Tabelle 0.2).

Tabelle 0.2 Primer-Spezifikationen

Primer	Sequenz	Amplifikat (bp)	T_m (°C)	T_a (°C)
1F	5'-CCCTCCCTTTTCTCCTCAAG-3'	196	62	60
1R	5'-TGGGACTGGACAGGGTTG-3'		58	
2F	5'-TGTGTGGGGTGTTGTGTTTT-3'	250	58	61
2R	5'-GAAGTAGGCAAGGCGTCTCC-3'		64	
3F	5'-CAGGAGAGTGGCTCAGCAG-3'	324	62	63
3R	5'-GAGTCCAGCCCTGAAAACC-3'		60	
4F	5'-GCTGAGGAACTTGGGAGAGA-3'	222	62	58
4R	5'-GATCTGGTTTCCTCCCCTTC-3'		62	
5F	5'-TTGGCCTACGATCACAACTG-3'	236	60	58
5R	5'-TCCAAGGACAAAGCATGTGA-3'		58	
6F	5'-CTTCTGCCTGCCTGTCTTTC-3'	221	62	58
6R	5'-GCCCTTAGGAACCCACTCTC-3'		64	
7F	5'-ACTGTTCCTGTGCCTCTGCT-3'	280	62	58
7R	5'-GCCGGCTCCTTTCTACTTCT-3'		62	
8F	5'-TGCGTGCATCAATAGAGAGC-3'	223	60	58
8R	5'-GAGGCACCCTCCACTGAAC-3'		62	
9F	5'-TTTCCTCTCCGTGCAGTACC-3'	276	62	60
9R	5'-CCCCAGCCTCAGACTACAGA-3'		64	
11F	5'-CTTGCAGGCGTCTGATCC-3'	220	58	64
11R	5'-CGGGTCCCCAGAGGTC-3'		56	
12F	5'-CAGCCCATTCTTCTCCTGTG-3'	250	62	62
12R	5'-GTCGTGGGATGGGGTGA-3'		56	

Primerdesign Software Primer3, *Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA*

1.1.16 Optimierung der PCR-Bedingungen

Durch die Sequenz der Oligonukleotide - und damit durch deren Länge und Basenzusammensetzung - werden ihre Bindungseigenschaften entscheidend beeinflusst. Mit dem Ziel, eine möglichst große Reinheit und Ausbeute zu erzielen, ist es unerlässlich, vor allen Dingen die optimale Bindungstemperatur (*Annealing*-Temperatur T_a) für jedes *Primer*paar separat experimentell in Vorversuchen zu ermitteln. Zur Orientierung dient die oligonukleotid-spezifische Schmelztemperatur T_m die im allgemeinen etwa 3 bis 5 °C oberhalb der T_a liegt und sich aus der Basenzusammensetzung des Primers errechnen lässt (Formel 1).

[1] $T_m = (4\ (G + C)) + (2\ (A + T))$

Die Buchstaben G, C, A und T bezeichnen die Anzahl der jeweiligen Nukleotide in der *Primer*sequenz.

Bei suboptimalen *Annealing*-Temperaturen entstehen unspezifische Produkte, bei supraoptimalen Temperaturen nimmt die Bindungsfähigkeit der Oligonukleotide deutlich ab; in beiden Fällen leidet der Ertrag.

1.1.17 PCR-Protokoll

Ein PCR-Standardansatz enthielt je untersuchte Probe folgende Komponenten:

- 2,5µL 10fach PCR-Puffer
- 2,5µL dNTPs
- 1µL Vorwärts-*Primer* (10pmol/µL)
- 1µL Rückwärts-*Primer* (10pmol/µL)
- 0,25µL DMSO
- 0,20µL *Taq*-Polymerase
- 5µL *Template*-DNA (20ng/µL)
- ad 25µL *aqua ad injectabilia*

Wenn mehrere DNA-Proben gleichzeitig mit denselben *Primern* amplifiziert werden, empfiehlt sich die Herstellung eines so genannten *Mastermix*. Hierfür werden alle Komponenten außer den jeweiligen DNA-*Templates* für die gesamte Anzahl Proben inklusive einer „Reserve-Probe“ zusammen in ein Reaktionsgefäß gemischt und anschließend auf die mit *Template* zu bestückenden Reaktionsgefäße verteilt.

Die PCR wurde in einem Thermozykler von Bio Rad Laboratories, Hercules, USA (*MyCycler thermal cycler*) durchgeführt. Dieser generierte je Zyklusphase die gewünschten Temperatur-Bedingungen. Das Standardprotokoll ist in Tabelle 0.3 aufgeführt.

Tabelle 0.3 PCR Standardprotokoll

Phase		Zeit (s)	Temperatur (°C)
a) Initiale Denaturierung		300	94
b) 35 Zyklen	1. DNA-Denaturierung	20	94
	2. Primer-Template-Bindung	20	s. Tabelle 0.2
	3. DNA-Polymerisation	20	72
c) Finale Elongation		300	72

Agarosegel-Elektophorese

Um den Erfolg und die Qualität jeder PCR zu beurteilen, wurden exemplarisch je einige PCR-Produkte in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt (*Agarose Gel Elektrophoresis System Mini-Sub Cell GT*, Bio Rad Laboratories, Hercules, USA), mit Ethidiumbromid markiert und unter UV-Licht sichtbar gemacht (*Gel Doc*, Bio Rad Laboratories, Hercules, USA). Zur Dokumention wurde das Ergebnis fotografiert und elektronisch gespeichert (Software *Quantity One*, Bio Rad Laboratories, Hercules, USA).

In Agarosegelen lassen sich Fragmente mit Größen von etwa 2 bis 20kb voneinander trennen, wobei die Agarosekonzentration den jeweiligen Trennbereich bestimmt. Je kleiner die zu trennenden Fragmente sind, umso höher muss die Agarosekonzentration des Gels sein. In diesem Fall wurde zur rein qualitativen Erfolgskontrolle der DNA-Amplifikation ein 1,2%iges Agarosegel unter Verwendung folgender Chemikalien angefertigt.

- 0,4g Agarose
- 30mL TBE-Puffer (1fach)
- 4μL Ethidiumbromid

Die pulverförmige Agarose wird in Gegenwart des Puffers geschmolzen und im flüssigen Zustand in den Gelträger gegossen. Ein in das Gel eingeführter Gelkamm erzeugt in der nach dem Erkalten erstarrten Gelmatrix Geltaschen, in welche die Proben - 4μL DNA gepuffert mit 2μL Agarose-Laufpuffer - aufgetragen werden. Zuvor wird dem flüssigen Agarosegel noch vor dem Erstarren Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser

Farbstoff interkaliert in die DNA-Doppelhelix und ermöglicht die Darstellung von Nukleinsäuren im Gel nach Abschluss der Elektrophorese unter Beleuchtung mit ultraviolettem Licht. Mit Ethidiumbromid können Mengen ab etwa 5ng DNA pro Bande nachgewiesen werden.

Ethidiumbromid ist mutagen und erfordert einen vorsichtigen Umgang bestehend aus der Verwendung von Einmalhandschuhen, Einrichtung eines gesonderten Arbeitsplatzes und Berücksichtigung besonderer Maßnahmen bei der Entsorgung von Ethidiumbromid-haltigen Lösungen und Stoffen.

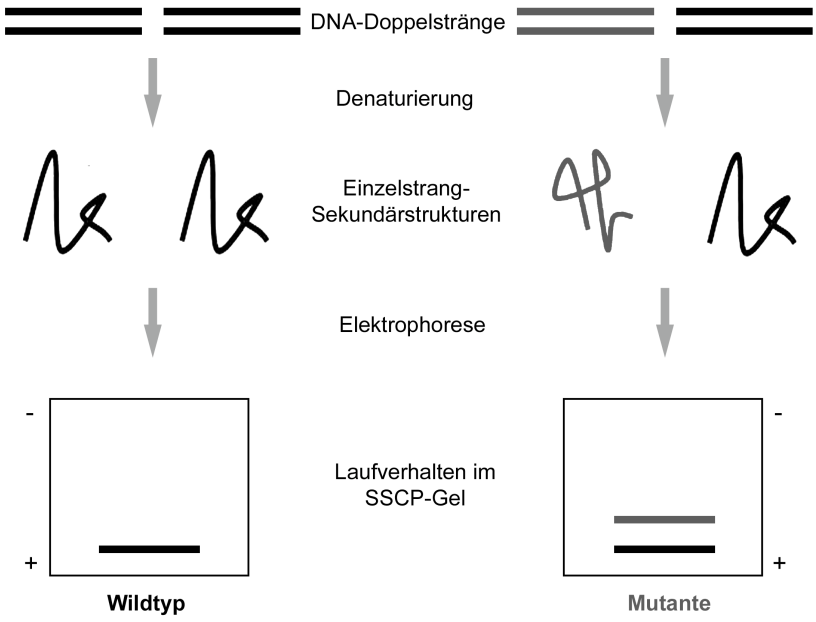
Einzelstrang-Konformationsanalyse

Da die PCR-Produkte eine Länge von weniger als 1kb haben, reicht die Auflösung von Agarosegelen zur dezidierten Analyse dieser DNA-Fragmente nicht aus. Zur analytischen Elektrophorese dieser Moleküle werden aufgrund ihres geeigneteren Separationsoptimums Polyacrylamidgele verwendet. Eine Form der nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist die Einzelstrang-Konformationsanalyse (*single strand conformation polymorphism analysis*, SSCP), welche ein etabliertes Verfahren zur kostengünstigen und sensitiven Identifikation von bereits minimalsten Sequenzveränderungen in DNA-Fragmenten darstellt [85] [86].

1.1.18 Prinzip der SSCP-Analyse

Die SSCP-Analyse beruht auf dem Verhalten einzelsträngiger DNA-Fragmente unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgrund intramolekularer Wechselwirkungen eine sequenz-spezifische Sekundärstruktur einzunehmen. Moleküle, die sich nur in einer einzigen Base unterscheiden bilden abweichende Konformationen und zeigen wegen veränderter physikalischer Eigenschaften ein anderes elektrophoretisches Wanderungsverhalten [85]. Aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit eignet sich diese Methode, um eine große Anzahl von DNA-Proben auf Mutationen und Polymorphismen hin zu screenen.

Abbildung 0.2 Prinzip SSCP-Analyse



Nach Denaturierung von DNA bilden Einzelstränge mit Basensubstitutionen andere Sekundärstrukturen aus und zeigen ein vom Wildtyp abweichendes Elektrophoreseverhalten im Polyacrylamid-Gel.

1.1.19 Einflussfaktoren auf die SSCP-Analyse

Bezüglich der Erstellung einer optimalen SSCP-Strategie müssen eine Reihe von Variablen bedacht werden, die die Empfindlichkeit der Mutationsanalyse beeinflussen. Unter geeigneten Bedingungen beträgt die Sensitivität der SSCP-Analyse für die Detektion von Veränderungen in genomischen Sequenzen etwa 95%.

Eine bedeutende Rolle spielt die Länge der zu untersuchenden Fragmente. Diese sollte zwischen 150 und 300 Nukleotiden liegen, da jenseits dieses Bereiches Konformationsänderungen aufgrund einzelner Nukleotidaustausche nicht zu erwarten sind.

Zur Denaturierung der DNA wird eine Kombination aus physikalischen und chemischen Verfahren angewendet. Im unmittelbaren Anschluss an die Hitzedenaturierung werden die Proben zur Verhinderung einer Reassoziation der Einzelstränge eisgekühlt.

Um den Einfluss der schwankenden Raumtemperatur auf die SSCP-Analyse möglichst gering zu halten ist es notwendig, die Elektrophorese unter konstanten Bedingungen mit Temperaturen unterhalb Raumtemperatur durchzuführen. Durch Variation der

angelegten Elektrophorese-Spannung und der Laufzeit lässt sich die Empfindlichkeit der Untersuchung erhöhen.

Neben der Acrylamid-Konzentration im Gel beeinflusst der zur Gelherstellung verwendete Puffer die Mobilität der DNA-Fragmente.

1.1.20 SSCP-Protokoll

Aufgrund der großen Zahl an zu untersuchenden Amplifikaten mit unterschiedlichen Eigenschaften mussten Analysebedingungen gewählt werden, die eine möglichst vollständige Identifikation von Sequenzabweichungen in allen Proben erwarten liessen.

Zur Denaturierung wurde je 3,5μL der PCR-Produkte mit SSCP-Laufpuffer im Verhältnis 1:1 dilutiert und für 10 Minuten auf 94°C erhitzt. Anschließend wurden je 4,5μL der denaturierten Proben auf ein 10%iges Polyacrylamidgel (*Clean Gel 10% 52S*, Fa. ETC Elektrophorese-Technik, Kirchentellinsfurt) aufgetragen. Um die Nachhaltigkeit der Denaturierung zu kontrollieren, wurde je Gel eine mit Negativ-Puffer verdünnte nicht-denaturierte Probe aufgetragen. Das Gel wurde zuvor gemäß Handbuch des Herstellers für 90 Minuten in Pufferlösung mit pH 8,4 (*DNA Disc Buffer*, Fa. ETC Elektrophorese-Technik, Kirchentellinsfurt) rehydriert.

In der Elektrophorese-Kammer (*Multiphor II*, Fa. Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) wurde über eine Wasserkühlung (*Multitemp III*, Fa. Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) eine Temperatur von konstant 15°C gehalten. Das Elektrophorese-Programm bestand aus zwei Phasen unterschiedlicher Spannungsbedingungen (Tabelle 0.4).

Tabelle 0.4 Standardbedingungen SSCP-Elektrophorese

Phase	Spannung (V)	Stromstärke (A)	Leistung (W)	Zeit (min)
a) 1. Phase	200	0,4	100	10
b) 2. Phase	600	0,4	100	60

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die im Gel deponierten Nukleinsäuren durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Silberfärbung lassen sich im Gegensatz zur Färbung mit Ethidiumbromid bereits sehr geringe Mengen an DNA nachweisen. Tabelle 0.5 zeigt das verwendete Färbeprotokoll. Das fixierte Gel wurde für 40 Minuten bei 80°C in einem Geltrockner (*Gel Dryer Model 583*, Fa. Bio Rad

Laboratories, Hercules, USA) getrocknet. Die Bandenmuster der einzelnen Proben wurden im Vergleich zu dem Laufverhalten der anderen, mit aufgetragenen Proben beurteilt.

Tabelle 0.5 SSCP Färbeprotokoll

Phase	Lösung	Volumen (L)	Zeit (min)
a) Waschen	Ethanollösung 10%	0,5	5
b) Waschen	Salpetersäurelösung 1%	0,5	2
c) Versilberung	Silbernitratlösung 0,2%	0,5	30
d) Waschen	*aqua destillata*	*ad libidum*	2
e) Entwicklung	Natriumcarbonatlösung 3%	1	*ad libidum*
f) Fixierung	Essigsäurelösung 10%	0,5	15

Sequenzanalyse

In der Beurteilung der elektrophoretischen Bandenmuster auffällige Proben wurden zwecks exakter Analyse der Sequenzabweichungen sequenziert. Die Sequenzierung ist die Methode mit der höchsten Detektionsrate für Mutationen, aufgrund der Kosten- und Zeitintensivität jedoch ungeeignet, um eine große Zahl an Patienten routinemäßig in einem ganzen Gen zu untersuchen. Die Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren durchgeführt.

1.1.21 Prinzip der Sequenzierung

Das Kettenabbruchverfahren basiert auf einem ähnlichen Prinzip wie die PCR. Nach Denaturierung der DNA und Hybridisierung der Einzelstränge mit *Primern* erfolgt eine Elongation durch DNA-Polymerasen. Den Sequenzierungsansätzen werden neben normalen dNTPs Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) hinzugefügt. ddNTPs fehlt die freie 3'-OH-Gruppe, so daß nach deren Anknüpfen die Elongation terminiert wird. Der Kettenabbruch erfolgt basenspezifisch, statistisch jedoch an jeder beliebigen Position, die die Base enthält. Nach elektrophoretischer Auftrennung des fertigen Ansatzes ergibt sich im Gel ein Gemisch verschieden langer Bruchstücke, aus dem wegen der spezifischen Farbstoff-Markierung des jeweils terminalen Didesoxynukleotids die Basensequenz des untersuchten DNA-Abschnitts abgelesen werden kann [87].

1.1.22 Sequenzierungsprotokoll

Voraussetzung zur Sequenzierung ist das Vorhandensein des zu interessierenden DNA-Abschnitts in ausreichender Menge. Da die Amplifikation von DNA mit dem Verfahren der PCR aber nicht in jedem Fall fehlerfrei abläuft, und es zum Einbau falscher Nukleotide in die polymerisierten Stränge kommen kann, wurde zunächst ein neues Amplifikat von der auffälligen Patienten-DNA gemäß des oben genannten PCR-Protokolls hergestellt.

Anschliessend wurde das PCR-Produkt in mehreren Arbeitsschritten aufgereinigt (*QIAquick PCR Purification Kit*, Fa. Qiagen, Hilden) und jede gewaschene Probe auf zwei Sequenzieransätze verteilt. Jedem der beiden Sequenzieransätze je Probe wurde einer der beiden *Primer* des untersuchten Exons hinzugefügt. Da *Primer*sequenzen nicht mitsequenziert werden, wird durch die Kombination von Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzierung ein insgesamt vollständiges Bild inklusive *Primer*-bindender, intronischer Sequenzen produziert. Die Sequenzieransätze wurden schließlich mit einem als Terminationsmix bezeichneten Gemisch aus dNTPs, Farbstoff-markierten ddNTPs und DNA-Polymerase (*Big Dye Terminator Kit,* Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA) bestückt. Ein Sequenzieransatz setzte sich folgendermaßen zusammen.

- 11μL HPLC-Wasser
- 1μL DMSO
- 1μL Vorwärts-, bzw. Rückwärts-*Primer*
- 4μL Terminationsmix
- 3μL *Template*-DNA

Die Sequenzierungsreaktion wurde im Thermozykler (*MyCycler thermal cycler*, Fa. Bio Rad Laboratories, Hercules, USA) nach dem in Tabelle 0.6 dargestellten Protokoll durchgeführt. Diesem Verfahren schloss sich ein erneutes Waschen der nun sequenzierten Proben an (*DyeEx Spin Kit*, Fa. Qiagen, Hilden). Die elektrophoretische Auftrennung des gereinigten Materials erfolgte in einem Sequenzierautomaten (*ABI Prism 310*, Fa. Perkin Elmer). Mit der Software *Chromas v1.45* (Griffith University, Southport, Australien) wurden die elektronisch gespeicherten Ergebnisse visuell dargestellt und manuell ausgewertet.

Tabelle 0.6 Standardprotokoll Sequenzierung

Phase		Zeit (s)	Temperatur (°C)
a) Initiale Denaturierung		45	95
b) 25 Zyklen	1. DNA-Denaturierung	30	94
	2. Primer-Template-Bindung	15	57
	3. DNA-Polymerisation	240	60

Statistische Methoden

Zur Analyse von Verteilung und etwaiger pathogenetischer Relevanz der bei der genetischen Untersuchung beobachteten genomischer Polymorphismen erfolgte eine statistische Auswertung der erhobenen Daten. Hierzu wurde das Patientenkollektiv mit einem Kontrollkollektiv bezüglich der genetischen Merkmale mit mathematischen Methoden verglichen.

1.1.23 Berechung der Allelhäufigkeiten

Durch die Sequenzierung elektrophoretisch auffälliger DNA wurden die den Abweichungen zugrunde liegenden Genotypen bestimmt. Anhand dessen konnte jede Probe mit ihrem charakterischen Elektrophorese-Verhalten einer genetischen Merkmalskombination zugeordnet werden. Zur Berechnung der Häufigkeiten der Allele A und a wurden zunächst die homozygoten und heterozygoten Merkmälsträger n_{AA}, n_{Aa} und n_{aa} ausgezählt und daraus die absoluten Häufigkeiten $f_{abs}(A)$ und $f_{abs}(a)$ abgeleitet (Formeln 2 und 3). Die relativen Allelhäufigkeiten p und q ergeben sich aus dem Quotienten aus absoluter Allelhäufigkeit f_{abs} und der Anzahl der untersuchten Allele n_{ges} (Formeln 4 und 5).

(2) $f_{abs}(A) = 2\ n_{AA} + n_{Aa}$

(3) $f_{abs}(a) = 2\ n_{aa} + n_{Aa}$

(4) $p = f_{abs}(A) / n_{ges}$

(5) $q = f_{abs}(a) / n_{ges}$

Anhand der beobachteten relativen Allelhäufigkeiten p und q wurde geprüft, ob die beobachteten Häufigkeiten der Genotypen AA, Aa und aa einer nach dem HARDY-WEINBERG-Modell erwarteten Normalverteilung entsprechen.

1.1.24 Das HARDY-WEINBERG-Modell

Nach dem HARDY-WEINBERG-Modell bleiben die relativen Allelhäufigkeiten p und q eines Merkmals in einer Population über Generationen hinweg konstant, und die Verteilung der Genotypen AA, Aa und aa befindet sich im Gleichgewicht. D.h., die tatsächliche Häufigkeit der einzelnen Genotypen verhält sich so wie es durch Anwendung der Formel 6 (HARDY-WEINBERG-Gleichung) auf die beobachteten Allelhäufigkeiten p und q erwartet wird (unter der Annahme, daß $p + q = 1$).

(6) $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

p^2 = erwartete Häufigkeit des Genotyps AA

q^2 = erwartete Häufigkeit des Genotyps aa

$2pq$ = erwartete Häufigkeit des Genotyps Aa

Das Modell gilt nur für idealisierte, MENDEL-Populationen, die eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen.

- Die Population ist sehr groß.
- Die Population ist isoliert von anderen Populationen.
- Innerhalb der Populationen herrscht Panmixie.
- Es gibt keine Mutationen.
- Es gibt keine Selektionsvorteile einzelner Genotypen.
- Die Vererbung erfolgt nach den Mendelschen Regeln.
- Es gibt keine überlappenden Generationen.

Mit der HARDY-WEINBERG-Gleichung können also anhand der beobachteten relativen Allelhäufigkeiten die zu erwartenden relativen Genotyphäufigkeiten in einer Population berechnet werden. Zur Analyse der Verteilung der Genotypen in den untersuchten Patienten- und Kontrollkollektiven und zur Prüfung, ob die Kohorten sich im HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht befinden, wurden die jeweils beobachteten Genotyphäufigkeiten mit den jeweils erwarteten Genotyphäufigkeiten im Chi-Quadrat-Test verglichen. Darüber hinaus wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet, um die Unterschiede in den Allelhäufigkeiten zwischen Patienten- und Kontrollkollektiven auf Signifikanz zu untersuchen.

1.1.25 Chi-Quadrat-Test

Der Chi-Quadrat-Test ist ein statistischer Test, mit dem qualitative Merkmale auf Unabhängigkeit geprüft werden können. In diesem Fall wird untersucht, ob zwischen dem Merkmal X mit r Ausprägungen (hier: Genotypen AA, Aa und aa) und dem Merkmal Y mit s Ausprägungen (hier: beobachtete und erwartete Häufigkeiten) ein Zusammenhang besteht. Zur Verdeutlichung werden die erhobenen Daten in einer Kontingenztafel angeordnet (Tabelle 0.7).

Tabelle 0.7 Kontingenztafel Chi-Quadrat-Test

	Y_{s1}	Y_{s2}	$\sum$
X_{r1}	y_{r1s1}	y_{r1s2}	n_{r1}
X_{r2}	y_{r2s1}	y_{r2s2}	n_{r2}
X_{r3}	y_{r3s1}	y_{r3s2}	n_{r3}
	n_{s1}	n_{s2}	N

Für jede Ausprägung von X besteht eine Wahrscheinlichkeit p, daß eine Ausprägung von Y zutrifft. Im Chi-Quadrat-Test wird geprüft, ob diese Wahrscheinlichkeiten übereinstimmen. Die statistische Testentscheidung, d.h. ob die sogenannte Nullhypothese H_0 - also die Hypothese, daß es keinen Unterschied zwischen den Wahrscheinlichkeiten für die Ausprägung des Merkmals Y gibt - zutrifft oder zugunsten der Alternativhypothese H_1 verworfen werden muss, wird anhand der Größe der aus dem Test resultierenden Prüfgröße V gefällt. Ist die Prüfgröße V kleiner als das Quantil der Chi-Quadrat-Verteilung, kann nichts gegen H_0 eingewendet werden. Das Quantil der Chi-Quadrat-Verteilung charakterisiert die Verteilung Chi-Quadrat-verteilter Zufallsgrößen unter einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit α (hier: $\alpha = 0{,}05$) und ist abhängig von den Freiheitsgraden k des Tests. k ergibt sich aus der Anzahl der Merkmalausprägungen von X und Y (Formel 7).

$$(7) \quad k = (r - 1)(s - 1)$$

Die Berechnung der Prüfgröße V erfolgt nach Formel 8 und bedient sich der in der Kontigenztafel in den entsprechenden Feldern enthaltenen Werten.

$$(8) \quad V = \sum (y_{rs} - (n_r\ n_s\ /\ N))^2\ /\ (n_r\ n_s\ /\ N)$$

Da im Chi-Quadrat-Test absolute Werte miteinander verglichen werden, müssen die relativen Genotyphäufigkeiten p^2, 2pq und q^2 zunächt durch Multiplikation mit der Anzahl der Individuen in dem betrachteten Kollektiv in absolute Häufigkeiten umgerechnet werden.

Darüber hinaus wird der Chi-Quadrat-Test einmalig angewandt, um die Frequenzen eines Codons zwischen Wildtyp-Gen und Mutanten-Gen zu vergleichen und so einen möglicherweise signifikanten Unterschied zwischen diesen zu erfassen (vgl. [88]).

Chemikalien

1.1.26 Polymerase-Kettenreaktion

1. Enzyme
    - *Taq*-Polymerase Nr. 6677 (Fa. Sigma, München)
2. PCR-Puffer
    - 10fach PCR-Puffer Nr. P-2192 (Fa. Sigma, München)
3. Nukleotide
    - *Primer* 10pmol/µL

        10µL *Primer*-Stammlösung 100pmol/µL (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg)

        ad 100µL *aqua ad iniectabilia* (Fa. Braun, Melsungen)
    - dNTP-Lösung 1mmol/L

        2,5µL dATP 100mmol/L Nr. T-9656 (Fa. Sigma, München)

        2,5µL dTTP 100mmol/L Nr. T-9656 (Fa. Sigma, München)

        2,5µL dCTP 100mmol/L Nr. T-9656 (Fa. Sigma, München)

        2,5µL dGTP 100mmol/L Nr. T-9656 (Fa. Sigma, München)

        ad 1000µL *aqua ad iniectabilia* (Fa. Braun, Melsungen)
4. Lösungen
    - Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland)

1.1.27 Agarosegel-Elektrophorese

1. Agarose-Puffer
    - TBE-Puffer (10fach)

        12,11% Tris Base (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

        0,61% Borsäure (Fa. Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande)

0,74% EDTA Titriplex III (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

ad 100% *aqua destillata*

- Agarose-Laufpuffer

  10% TBE-Puffer (10fach)

  40% Ficoll (Fa. Sigma, München)

  10% Xylolencyanol 1% (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg)

  ad 100 % *aqua ad iniectabilia* (Fa. Braun, Melsungen)

2. Agarose-Gel
   - Agarose Ultra Pure (Fa. Life Technologies, Paisley, Schottland)
   - TBE-Puffer (1fach)

     10% TBE-Puffer (10fach)

     ad 100% *aqua destillata*
   - Ethidiumbromid 0,7μg/μL (Fa. Sigma, München)
3. Nukleotide
   - 100bp Ladder

     50μL 100bp Ladder (Fa. Invitrogen, Karlsuhe)

     200μL Agarose-Laufpuffer

     450μL *aqua ad iniectabilia* (Fa. Braun, Melsungen)

1.1.28 Einzelstrangkonformationsanalyse

1. SSCP-Puffer
   - SSCP-Laufpuffer

     86% Formamid (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg)

     14% Bromphenolblau (Fa. Schmid, Köngen)
   - Negativ-Puffer

     10% 10fach TBE-Puffer

     40% Ficoll (Fa. Sigma, München)

     10% Bromphenolblau 1% (Fa. Schmid, Köngen)

     ad 100% *aqua ad iniectabilia* (Fa. Braun, Melsungen)
2. Silberfärbung
   - Ethanollösung 10%

     10% V/V Ethanol 100% (Fa. Sigma, München)

     ad 100% V/V *aqua destillata*

- Salpetersäurelösung 1%

  1,54% Salpetersäure 65% (Fa. Sigma, München)

  ad 100% *aqua destillata*

- Silbernitratlösung 0,2%

  0,2% Silbernitrat (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

  ad 100% *aqua destillata*

- Natriumcarbonatlösung 3%

  3% Natriumcarbonat (Fa. Sigma, München)

  0,05% Formaldehyd (Fa. Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederl.)

  ad 100% *aqua destillata*

- Essigsäurelösung 10%

  10% Essigsäure 100% (Fa. Sigma, München)

  ad 100% *aqua destillata*

1.1.29 Sequenzierung

1. PCR-Produktreinigung
   - QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
2. Terminationsmix
   - Big Dye Terminator Kit (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA)
3. Sequenzierungsaufreinigung
   - DyeEx Spin Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
4. Lösungen
   - HPLC-Wasser
   - Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland)

Ergebnisse

Mutationen

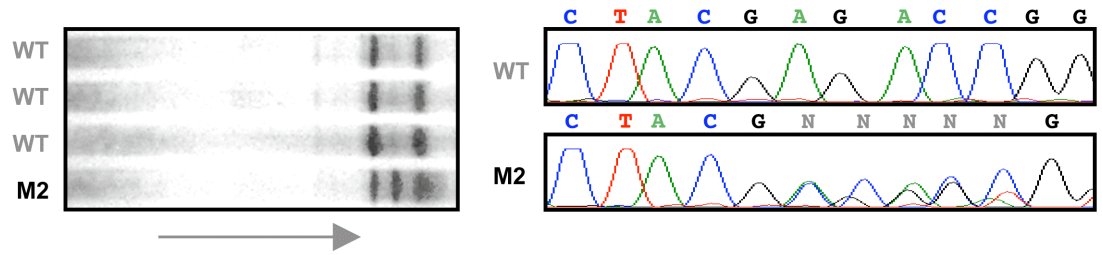
Bei der PCR-SSCP-Analyse der 135 Patienten konnten drei verschiedene Mutationen in *PAX-2* identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine Kombination von Insertion und Deletion, einen intronischen Nukleotidaustausch in einer 3'-Spleißstelle und einen exonischen, aminosäuren-neutralen Nukleotidaustausch. Durch Analyse von mindestens 100 Kontrollallelen wurden Polymorphismen ausgeschlossen.

1.1.30 Mutation Patient M2 (764del20ins2 in-frame)

Die PCR-SSCP-Analyse von Exon 3 des Patienten *M2* präsentiert ein auffälliges Bandenmuster gemäß Abbildung 0.1.

Sequenzierungen ergeben das Bild einer heterozygoten, kombinierten Deletion und Insertion. Ab Nukleotidposition 764 fehlt eine Sequenz von 20 Basen. Anstelle dieser Folge befindet sich dort irregulär die Insertion eines Cytosin-Dinukleotids. Es resultiert eine Netto-Deletion von 18 Nukleotiden.

Abbildung 0.1 SSCP-Analyse und Sequenzierung von M2

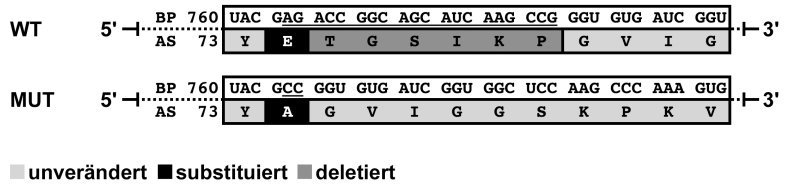


Zusätzliche Bande in der Elektrophorese des Amplifikats von Exon 3 bei Patient M2. Beginn der Insertion/Deletion an Nukleotidposition 764.

Das Nukleotid mit der Position 764 befindet sich auf mRNA-Ebene der untersuchten Transkriptvariante PAX-2E an zweiter Stelle des Codons 74. Die Mutation führt also letztendlich zu einer Substitution der zweiten und dritten Stelle des erwähnten Codons durch die zwei Cytosin-Nukleotide sowie zu einem Verlust der nachfolgenden sechs Codons (Codons 75 bis 80). Codon 74 des Wildtyps (`5'-GAG-3'`) kodiert für die Aminosäure Glutamat, in der Mutante (`5'-GCC-3'`) trägt das Codon die Information für Alanin (Abbildung 0.2).

Ein genetisches Screening der erstgradigen Verwandtschaft ergibt weder bei den Eltern noch bei der dizygoten Zwillingsschwester eine Sequenzanomalie in *PAX-2*. In einem ergänzendem Gespräch versichert die Mutter die biologische Paternität des mutmaßlichen Vaters.

Abbildung 0.2 Auswirkung der Deletion/Insertion auf mRNA- und Aminosäurenbene



Deletion von 20 Nukleotiden ab Position 764 (Exon 3) und ebendort Insertion eines Cytosin-Dinukleotids (unterstrichen). Entsprechend markiert sind die mutmaßlichen Auswirkungen der Kontraktion auf Aminosäurenebene (Ein-Buchstaben-Code).

Phänotypisch zeigte sich bei dem Patienten in der Neugeborenenperiode bei laborchemisch kompensierter Niereninsuffizienz sonographisch eine bilaterale Nierenhypoplasie. In der Miktionszystourographie kam ein bilateraler vesikoureteraler Reflux zum Ausdruck. Die Progression der Niereninsuffizienz erforderte den Beginn einer Nierenersatztherapie mit Peritonealdialyse am Ende des zweiten Lebensjahres. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte eine Nierentransplantation. Eine ophthalmologische Untersuchung ergab die Diagnose bilateraler Optikuskolobome.

Zusätzlich zu den genannten okulären und renalen Anomalien findet sich bei dem Patienten eine angeborene, mittelgradige valvuläre Pulmonalstenose mit rechtsventrikulärer Hypertrophie. Die Eltern und die Schwester des Patienten sind phänotypisch unauffällig.

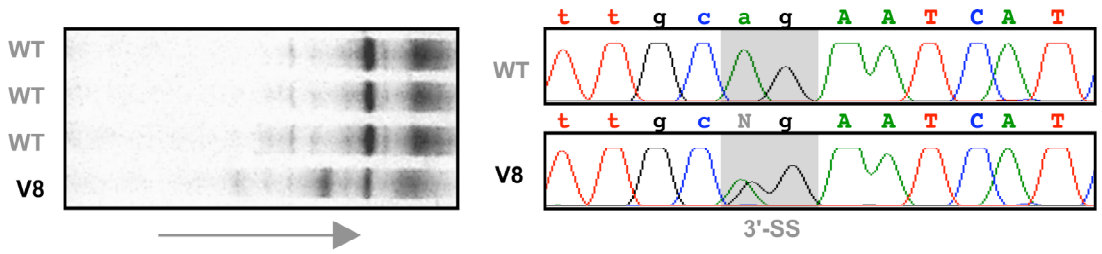
1.1.31 Mutation Patient V8 (954-2A>G splice-site)

Patient *V8* zeigt in der PCR-SSCP-Analyse von Exon 4 ein differentes Elektrophorese-Ergebnis. Durch Sequenzierung dieses Abschnitts konnte ein Nukleotidaustausch in der 3'-Spleißstelle von Intron 3 nachgewiesen werden. An Position 954-2 findet sich anstelle von Adenin heterozygot ein Guanin (Abbildung 0.3).

Die genetische Familienanalyse bringt eine identische Mutation beim Vater des Patienten zu Tage. Die Mutter ist diesbezüglich genetisch unauffällig. Ebenso die Eltern

des Vaters. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei dieser *splice site* Mutation also um eine *de novo* Mutation beim Vater des Patienten.

Abbildung 0.3 SSCP-Analyse und Sequenzierung von V8



Abweichendes Laufverhalten des Amplifikats von Exon 4 von Patient V8. Intronischer Nukleotidaustausch an Position 954-2 an der Akzeptor-Spleißstelle von Intron 3. Intronische Sequenzen in Kleinbuchstaben.

Die Oberbauchsonographie des männlichen Patienten ergibt eine linksseitige Nierenagenesie/-aplasie. Die rechte Niere ist morphologisch unauffällig. Dennoch besteht laborchemisch eine deutliche Niereninsuffizienz mit einer Kreatinin-Clearance von 10,7 ml/min. In der Fundoskopie zeigt sich links eine kolobomatöse Anomalie der Choroidea oberhalb des Discus nervi optici. Weitere pathologische Befunde können nicht erhoben werden.

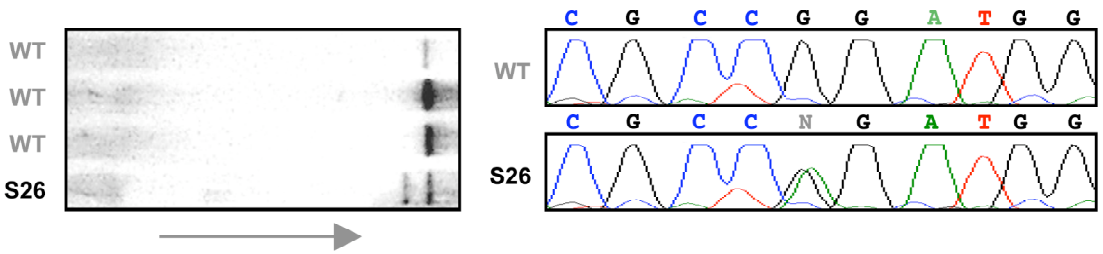
In der Untersuchung der Eltern des Patienten zeigt die Mutter keine Auffälligkeiten. Der Vater weist stark erhöhte Serum-Kreatininwerte (Sonographie nicht verfügbar) und fundoskopisch ebenfalls ein unilaterales choroidales Kolobom auf. Die Sehkraft sowohl des Patienten als auch des Vaters ist gering vermindert. Der Vater präsentiert darüber hinaus eine Schwerhörigkeit.

1.1.32 Mutation Patient S26 (996G>A neutral)

Die Sequenzierung des elektrophoretisch abweichenden Exon 4 von Patient *S26* offenbart einen Nukleotidaustausch an Position 996. Dort zeigt die Analyse die heterozygote Präsenz eines Adenin-Nukleotids anstelle eines Guanin-Nukleotids (Abbildung 0.4). Diese Position befindet sich an dritter Stelle von Codon 151. Die Sequenzabweichung an diesem Ort verhält sich bezüglich der daraus resultierenden Aminosäuresequenz des Genproduktes stumm.

Die Genanalyse der erstgradigen Verwandtshaft zeigt einen identischen, heterozygoten Nukleotidaustausch bei der Mutter des Patienten. Vater und Bruder besitzen homozygot die Wildtyp-Allele.

Abbildung 0.4 SSCP-Analyse und Sequenzierung von S26



Abweichendes Laufverhalten des Amplifikats von Exon 4 von Patient S26 und Nachweis des Austauschs von Guanin durch Adenin.

S26 ist ein zum Zeitpunkt dieser Untersuchung zehnjähriger Junge, der eine linksseitige Doppelniere aufweist. Die obere Kelchgruppe drainiert in einen akzessorischen vollständigen Ureter, welcher ektop in die Harnblase mündet. Die Nierenfunktion ist normal. Eine durchgeführte augenärztliche Untersuchung erbrachte keinen pathologischen Befund. Andere Anomalien sind ebenfalls nicht bekannt. Alle oben genannten Familienmitglieder inklusive Vater, Mutter und des Bruders zeigen einen linksseitigen Ureter fissus.

Polymorphismen

Bei dem genetischen Screening wurden drei Polymorphismen in *PAX-2* identifiziert. Mit den oben genannten Methoden wurden erwartete Allelfrequenzen und Genotypverteilungen bestimmt und auf Unterschiede mit den tatsächlich beobachteten Werten untersucht. Die Daten des Patientenkollektivs wurden schließlich mit denen des Kontrollkollektivs verglichen, um festzustellen, ob dezidierte Sequenzvarianten mit der Manifestation von CAKUT assoziiert sind. Die hier beobachteten Polymorphismen in Exon 8 sind in der Literatur bereits beschrieben und zeigten dort keine von der statistischen Erwartung abweichende Kosegregation [89].

1.1.33 Polymorphismus 1410C>T (Exon 8)

Die SSCP-Analyse von Exon 8 zeigt eine Vielzahl differierender Bandenmuster, die in Abbildung 0.5 gemeinsam dargestellt werden. 8 von 135 der untersuchten Patienten zeigen ein Elektrophoreseverhalten wie in Abbildung 0.5**D**. Im Kontrollkollektiv kann ein entsprechendes Muster bei 3 von 51 Proben beobachtet werden. Durch Sequenzierung läßt sich dort an Nukleotidposition 1410 heterozygot die Substitution von Cytosin zu Thymin identifizieren. Homozygote Individuen ließen sich trotz ausgedehnter Sequenzierung in keiner Gruppe nachweisen. Bezüglich der Aminosäuresequenz verhält sich diese Variante synonym zum Wildtyp, da das Nukleotid im entsprechenden Codon 306 an dritter Position liegt.

Zur statistischen Analyse der Genotypverteilung in Patienten- und Kontrollkollektiv erfolgt nach Bestimmung der jeweils beobachteten Allelfrequenzen (Formeln 2 bis 5) eine Kalkulation der demzufolge innerhalb einer Gruppe zu erwartenden Genotypverteilung (Formel 6). Beobachtete und erwartete Genotypverteilung werden mittels Chi-Quadrat-Test miteinander verglichen (Formel 8). Tabelle 0.1 stellt die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 0.1 Genotypverteilung Nukleotidposition 1410

	Patienten		Kontrollen	
Genotyp	beobachtet	erwartet	beobachtet	erwartet
CC	127	127,119	48	48,044
CT	8	7,763	3	2,912
TT	0	0,119	0	0,044
Prüfgröße v	0,122		0,045	
Quantil$_{(k=2;\ \alpha=0,05)}$	5,991		5,991	

In beiden Fällen muss die Testentscheidung zu Gunsten der Nullhypothese H_0 gefällt werden, da die Prüfgröße jeweils kleiner ist als das Quantil der Chi-Quadrat-Verteilung. Das heißt, es gibt keinen Unterschied zwischen beobachteter und erwarteter Genotypverteilung in beiden Kollektiven; die Genotypverteilung in den Gruppen befindet sich jeweils im HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht. Zum Vergleich zwischen Erkrankten und Gesunden können die Allelfrequenzen herangezogen werden (Tabelle 0.2).

Tabelle 0.2 Allelfrequenzvergleich Nukleotidposition 1410

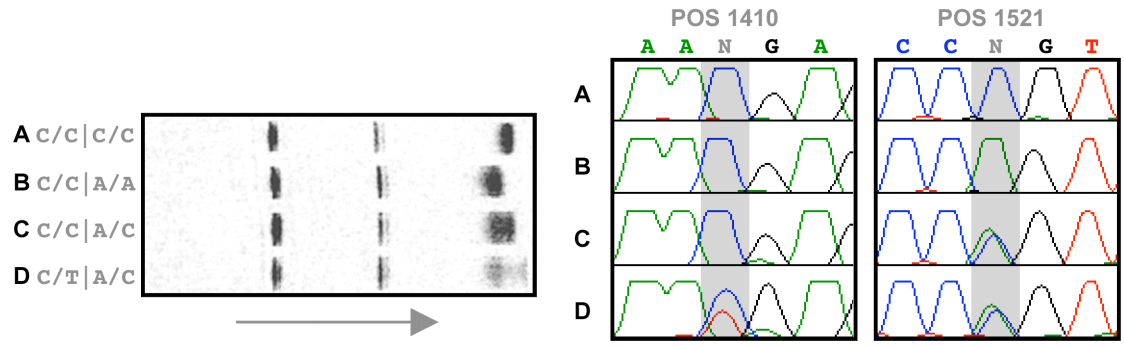
Allel	Patienten	Kontrollen
C	262	99
T	8	3
Prüfgröße v	0,000	
Quantil$_{(k=1;\ \alpha=0,05)}$	3,841	

Die Analyse zeigt, daß die Prüfgröße v kleiner ist als das zugehörige Quantil. Bezüglich der Allelfrequenzen besteht zwischen den beiden Gruppen folglich kein Unterschied. Dies entspricht dem Ergebnis früherer Untersuchungen zu diesem Polymorphismus [89].

1.1.34 Polymorphismus 1521A>C (Exon 8)

Neben oben genanntem genetischer Polymorphismus kann in Exon 8 ein weiterer beobachtet werden. Dieser besteht an Position 1521 (Codon 326, 3. Stelle) aus einem Austausch von Adenin durch Cytosin und bleibt für die Aminosäuresequenz ebenfalls folgenlos. Diese Variante kommt in hetero- und homozygoter Form vor; der heterozygote Genotyp ist in Kombination mit dem erstgenannten Polymorphismus an Position 1410 anzutreffen (Abbildung 0.5). Die Sequenzvariante an Position 1410 ist bei den untersuchten Personen stets mit Heterozygotie an Position 1521 vergesellschaftet.

Abbildung 0.5 SSCP-Analyse und Sequenzierungen von Exon 8



Vier verschiedene Genotypen in Exon 8 als Folge der Kombination zweier Polymorphismen.

Die statistische Auswertung ergibt ein HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht beider Kollektive bezüglich der Genotypverteilung (Tabelle 0.3). Im direkten Vergleich der Allelfrequenzen beider Gruppen stellt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen heraus (Tabelle 0.4).

Um zu überprüfen ob insgesamt ein Unterschied in der Verteilung von Kombinationen der verschiedenen Genotypen vorliegt, können abschließend die ausgezählten Genotypen von Patienten- und Kontrollkollektiv miteinander im Chi-Quadrat-Test verglichen werden (Tabelle 0.5). Das Ergebnis läßt die Schlußfolgerung zu, daß keine Genotypkombination im Patientenkollektiv häufiger ist als bei den Kontrollen. Die statistischen Erhebung entsprechen auch in diesem Fall der genannten früheren Untersuchung [89].

Tabelle 0.3 Genotypverteilung Nukleotidposition 1521

	Patienten		Kontrollen	
Genotyp	beobachtet	erwartet	beobachtet	erwartet
AA	67	68,267	30	30,593
AC	58	55,467	19	17,814
CC	10	11,267	2	2,593
Prüfgröße v	0,144		0,121	
Quantil$_{(k=2;\ \alpha=0,05)}$	5,991		5,991	

Tabelle 0.4 Allelfrequenzvergleich Nukleotidposition 1521

Allel	Patienten	Kontrollen
A	192	79
C	78	23
Prüfgröße v	1,504	
Quantil$_{(k=1;\ \alpha=0,05)}$	3,841	

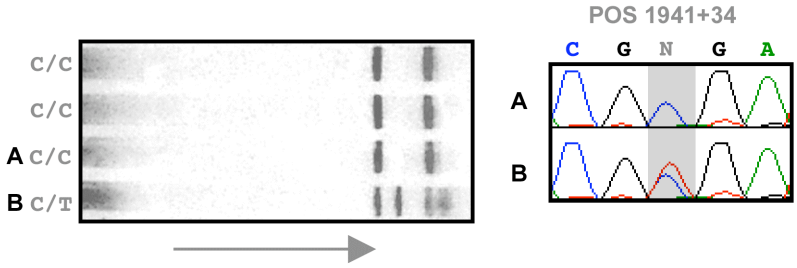
Tabelle 0.5 Vergleich Genotypkombination Exon 8

Genotyp	Patienten	Kontrollen
CC/AA	67	30
CC/AC	50	16
CC/CC	10	2
CT/AC	8	3
Prüfgröße v	1,632	
Quantil$_{(k=3;\ \alpha=0,05)}$	7,815	

1.1.35 Polymorphismus 1941+34C>T (3'-UTR)

6 von 135 Patienten fielen bei der Untersuchung von Amplikon 12 durch eine Laufmusterabweichung im SSCP-Gel auf (Abbildung 0.6). Die Sequenzierung ergab in diesen Fällen einen heterozygoten Nukleotidaustausch in der 3'-Nichtkodierungssequenz (3'-UTR). 34 Nukleotide hinter dem Stopcodon findet sich an Stelle eines Cytosin ein Thymin. Von 94 Kontrollpersonen zeigt eine einen entspechenden Genotyp. Individuen mit einem homozygoten Thymin-Nukleotid an dieser Position wurden nicht beobachtet.

Abbildung 0.6 SSCP-Analyse und Sequenzierung Exon 12



Laufmusterabweichung in der elektrophoretischen Auftrennung des Amplifikates von Exon 12.

Beide Kollektive befinden sich im HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht (Tabelle 0.6). Darüberhinaus findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Allelfrequenzen (Tabelle 0.7).

Tabelle 0.6 Genotypvergleich Nukleotidposition 1941+34

	Patienten		Kontrollen	
Genotyp	beobachtet	erwartet	beobachtet	erwartet
CC	129	129,067	93	93,003
CT	6	5,867	1	0,995
TT	0	0,067	0	0,003
Prüfgröße v	0,068		0,003	
Quantil$_{(k=2;\ \alpha=0,05)}$	5,991		5,991	

Tabelle 0.7 Allelfrequenzvergleich Nukleotidposition 1941+34

Allel	Patienten	Kontrollen
C	264	187
T	6	1
Prüfgröße v	2,104	
Quantil$_{(k=1;\ \alpha=0,05)}$	3,841	

Diskussion

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Mutationen in *PAX-2* und der Entwicklung non-syndromaler kongenitaler Anomalien der Niere und der ableitenden Harnwege (CAKUT). PAX-2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Embryonalzeit in verschiedenen Gewebskomponenten des sich entwickelnden Harntrakts synthetisiert wird und bezüglich der Regulation der Nephrogenese eine kritische Rolle einnimmt. Mutationen in diesem Gen sind ursächlich für die Erkrankung am Papillo-renalen Syndrom (PRS) - ein Fehlbildungssyndrom mit Manifestation an Harnwegen, Augen und Zentralnervensystem.

In einem Kollektiv von 135 Patienten, betroffen von einem weiten Spektrum renaler und extrarenaler Fehlbildungen, sollte geprüft werden, ob Sequenzabweichungen in *PAX-2* abgesehen vom spezifischen PRS ebenfalls sporadische CAKUT-Syndrome verursachen können. An die Darstellung der experimentellen Befunde schließt sich nun die Einordnung der Resultate in ein Gesamtkonzept an, welches die Bedeutung der Ergebnisse für das Verständnis von Ätiologie und Pathogenese angeborener Nieren- und Harnwegsfehlbildungen aufzeigen möge.

In den durchgeführten Untersuchungen konnten drei Mutationen und drei Polymorphismen in *PAX-2* identifiziert werden. Zwei der Mutationen führen zu Veränderungen auf Protein-Ebene, bei der dritten handelt es sich um eine aminosäureneutrale Mutation. Die Kinder mit den augenscheinlich funktionell wirksamen Mutationen leiden an einer Kombination morphologischer Organanomalien, welche typisch für das PRS ist. Die stumme Mutation betrifft einen Patienten mit isoliert renaler Manifestation.

Die Analyse der Polymorphismen und deren Verteilung in Patienten- und Kontrollkollektiv offenbarte in keinem Fall einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Bekannte Mutationen in *PAX-2*

Seit der initialen Entdeckung von Mutationen in *PAX-2* in einer Familie mit mehreren am PRS erkrankten Personen wurden eine Reihe von weiteren Sequenzanomalien bei PRS-Patienten nachgewiesen. Eine der identifizierten Mutationen betrifft einen Patienten mit nonsyndromalem Verlauf bei isolierter renaler Hypoplasie [67].

Bis zum Zeitpunkt dieser Untersuchung wurden 18 verschiedene Mutationen in *PAX-2* publiziert. Hierunter fallen 17 Genmutationen und eine Translokation nach Chromosom 13 (Tabelle 0.1).

Tabelle 0.1 PAX-2 Mutationen

Nr.	Exon	Domäne	Nukleotid	Mutation	Erstbeschreibung
1	2	PD	602	Deletion 1-bp, frame shift	Chung *et al.* (2001) [90]
2	2	PD	611	Deletion 1-bp, frame shift	Cunliffe *et al.* (1998) [79]
3	2	PD	619	Deletion 1-bp, frame shift	Schimmenti *et al.* (1999) [81]
4	2	PD	619	Insertion 1-bp, frame shift	Sanyanusin *et al.* (1995a) [91]
5	2	PD	619	Insertion 2-bp, frame shift	Amiel *et al.* (2000) [92]
6	2	PD	658	Deletion 6-bp, in-frame	Salomon *et al.* (2001) [78]
7	2	PD	673	Deletion 22-bp, frame shift	Schimmenti *et al.* (1997) [75]
8	2	PD	682	Deletion 10-bp, frame shift	Fletcher et al. (2005) [77]
9	2	PD	755	G>C, Falschsinn	Higashide *et al.* (2005) [93]
10	3	PD	769	G>A, Falschsinn	Devriendt *et al.* (1998) [80]
11	3	PD	768	Insertion 6-bp, in-frame	Devriendt *et al.* (1998) [80]
12	3	PD	832	Deletion 1-bp, frame shift	Amiel *et al.* (2000) [92]
13	3	PD	886	C>T, Unsinn	Schimmenti *et al.* (2003) [94]
14	5	OP	1104	Deletion 1-bp, frame shift	Sanyanusin *et al.* (1995b) [66]
15	7	HD	1297	C>T, Unsinn	Porteous *et al.* (2000) [60]
16	7	HD	1318	C>T, Unsinn	Nishimoto *et al.* (2001) [67]
17	9	TD	1566	C>A, Unsinn	Nishimoto *et al.* (2001) [67]
18	Translokation t(10;13)				Narahara *et al.* (1997) [95]

In 72% der Fälle (13 von 18) betreffen Mutationen die kodierende Sequenz der *paired domain* DNA-Bindungsdomäne (PD). Auffallend häufig ist Exon 2 betroffen. Insbesondere innerhalb einer an Nukleotidposition 613 beginnenden Folge von sieben Guaninen wurden immer wieder Mutationen in verschiedenen Familien dokumentiert. In diesem Homoguanintrakt konnten sowohl expandierende Insertionen als auch kontrahierende Deletionen von einem oder mehreren Guanin-Nukleotiden nachgewiesen werden (Nr. 3, 4 und 5 in Tabelle 0.1).

Expansions- und Kontraktionsmutationen verursachen eine Verschiebung des translationalen Leserasters, wenn nicht eine Anzahl Basen inseriert oder deletiert wird, die ein Vielfaches von drei darstellt, und sind innerhalb von Homonukleotidsequenzen wie dieser hier beschriebenen ein nicht selten beobachtetes Phänomen. Leseraster-Mutationen (*frame shifts*) entstehen meist in der Nähe von Sequenzwiederholungen, da es in diesen Regionen während der Replikation, bei der Rekombination oder bei Reparaturprozessen zu Lücken im DNA-Strang kommen kann. Diese Regionen können

schließlich replikativ als Deletionen fixiert werden oder im Rahmen reparativer Vorgänge durch übermäßiges Wiederauffüllen zu Insertionen expandieren [47].

Mutationen Nr. 10 bis 13 in Tabelle 0.1 sind in Exon 3 lokalisiert, das ebenfalls Informationen für die PD trägt. Hierunter fallen je eine Falschsinn- , Unsinn-, Insertions- und Deletionsmutation.

Die PD stellt das charakteristische, gemeinsame Merkmal von PAX-Proteinen dar und dient den Transkriptionsfaktoren zur Erkennung und Bindung der Promotorregionen der Zielgene. PD bestehen aus zwei funktionell unabhängigen Subdomänen, die durch ein Verbindungsstück (*linker*) miteinander verbunden sind. DNA-Kontakte wurden für jedes dieser Proteinabschnitte nachgewiesen [45 46]. Die PD von PAX-2 erstreckt sich von Aminosäure 16 bis 143 (Nukleotidposition 589 bis 972) über die Exone 2 bis 4 [45].

Abbildung 0.1 Aminosäure- und Nukleotidsequenz der PAX-2 PD

```
 16  G   H   G   G   V   N   Q   L   G   G   V   F   V   N   G   R   P   L
589  GGG CAC GGG GGT GTG AAC CAG CTC GGG GGG GTG TTT GTG AAC GGC CGG CCC CTA

 34  P   D   V   V   R   Q   Q   I   V   E   L   A   H   Q   G   V   R   P
643  CCC GAC GTG GTG AGG CAG CGC ATC GTG GAG CTG GCC CAC CAG GGT GTG CGG CCC

 52  C   D   I   S   R   Q   L   R   V   S   H   G   C   V   S   K   I   L
697  TGT GAC ATC TCC CGG CAG CTG CGG GTC AGC CAC GGC TGT GTC AGC AAA ATC CTG

 70  G   R   Y   Y   E   T   G   S   I   K   P   G   V   I   G   G   S   K
751  GGC AGG TAC TAC GAG ACC GGC AGC ATC AAG CCG GGT GTG ATC GGT GGC TCC AAG

 88  P   K   V   A   T   P   K   V   V   D   K   I   A   E   Y   K   R   Q
805  CCC AAA GTG GCG ACG CCC AAA GTG GTG GAC AAG ATT GCT GAA TAC AAA CGA CAG

106  N   P   T   M   F   A   W   E   I   R   D   R   L   L   A   E   G   I
859  AAC CCG ACT ATG TTC GCC TGG GAG ATT CGA GAC CGG CTC CTG GCC GAG GGC ATC

124  C   D   N   D   T   V   P   S   V   S   S   I   N   R   I   I   R   T
913  TGT GAC AAT GAC ACA GTG CCC AGC GTC TCT TCC ATC AAC AGA ATC ATC CGG ACC

142  K   V
967  AAA GTT
```

In unterschiedlichen Grautönen hinterlegt sind die Sequenzen der einzelnen für die PD kodierenden Exone 2, 3 und 4. Die angegebene Numerierung bezieht sich zum einen auf die Position innerhalb des Gens, bzw. Proteins (rechts).

Identische Mutationen im Bereich der PAX-2-PD beim Menschen und bei der Maus führen jeweils zu einer Kombination kongenitaler Anomalien der Nieren und Augen (Mutation 619ins1, Nr. 4 in Tabelle 0.1, [58 91]). *Frame shifts* innerhalb der für die PD kodierenden Region resultieren häufig über die Generierung vorzeitiger Stopcodons in einem verkürzten offenen Leserahmen und führen zu unvollständigen Genprodukten. Falschsinn-Mutationen in diesem Abschnitt äußern sich aufgrund einer veränderten

Aminosäuresequenz am ehesten in einer reduzierten DNA-Bindungskapazität der Domäne.

Die anderen bereits beschriebenen Mutationen verteilen sich auf die übrigen konservierten Domänen von *PAX-2*. Die Deletion eines Nukleotids wurde innerhalb des Oktapeptid-Motivs (OP, Exon 5) beschrieben (Nr. 14 in Tabelle 0.1). Sequenzanomalien im murinen OP führen über eine Veränderung der modulierenden Eigenschaften dieser Domäne zu einem Anstieg der Transaktivation von PAX-2 [48]. In Exon 7 wurden zwei Unsinn-Mutation identifiziert (Nr. 15 und 16 in Tabelle 0.1). Dieser Bereich kodiert die partielle Homöobox (HD) von PAX-2, eine unvollständige DNA-Bindungsdomäne ohne funktionelle Kapazität. Die Termination der Translation an dieser Stelle führt jedoch zu einem Genprodukt, dem der carboxy-terminale Bereich inklusive der Transaktivierungsdomäne (TD) fehlt. Die Erzeugung eines vorzeitigen Stopcodons in Exon 9 (Nr. 17 in Tabelle 0.1) führt ebenfalls zu einem verkürzten Protein mit mutmäßlich eingeschränkter Transaktivierungskapazität. Die letztgenannte Mutation ist die am weitesten in 3'-Richtung gelegene und die einzige, die bei Individuen mit einem isolierten renalen Phänotyp identifiziert wurde [67]. Diese Tatsache kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass Mutationen, die deutlich stromabwärts der Promotor-bindenden Sequenzen liegen, eventuell zu milderen, weniger komplexen Phänotypen führen können. Die Organmanifestationen der übrigen Mutationen unterscheiden sich jedoch nicht derart, dass im allgemeinen Rückschlüsse vom Phänotyp auf die genetische Position der zugrunde liegenden Sequenzabweichung gezogen werden können.

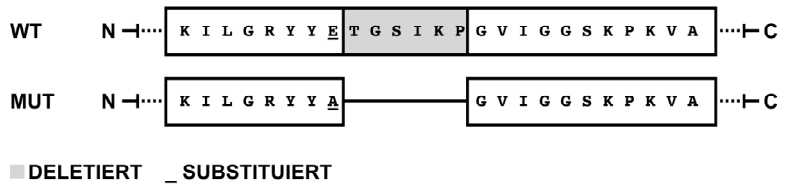
Darüber hinaus fällt in der Zusammenschau der bekannten Mutationen auf, daß stromabwärts der PD keine Falschsinn-Mutationen identifiziert wurden. Möglicherweise führt lediglich eine erhebliche Verkürzung des Proteins im carboxyterminalen Anteil durch Unsinn- oder Stopcodon-erzeugende Leserastermutationen zu einer relevanten Einschränkung der Funktionalität des Transkriptionsfaktors und somit zur Entwicklung eines klinisch faßbaren Phänotyps. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure bei einer Falschsinn-Mutation hat mutmaßlich ebendort hingegen keine pathogenetische Relevanz.

764del20ins2 in-frame (Exon 3)

Die Kombination einer Deletion von 20 Nukleotiden mit einer Insertion von 2 Cytosin-Nukleotiden in Exon 3 von Patient *M2* führt zu einer Netto-Kontraktion dieser Region um 18 Nukleotide. Die Mutation befindet sich an Nukleotidposition 764, beginnend an zweiter Stelle von Codon 74. Auf mRNA-Ebene resultiert infolgedessen eine Modifikation der Basenfolge von Codon 74 von `5'-GAG-3'` nach `5'-GCC-3'` und eine aberrierende Aminosäure im Genprodukt. Das saure Glutamat mit hydrophiler Seitenkette wird duch neutrales und hydrophobes Alanin ersetzt. Die nachfolgenden sechs Basentripletts werden vollständig deletiert (Abbildung 0.2, Seite 44). Im Anschluß an die Deletion (ab Nukleotidposition 784) verbleibt die Sequenz unverändert. Diese Kontraktionsmutation verursacht keinen *frame shift* und generiert kein vorzeitiges Stopcodon.

Durch die hier beschriebene Deletion wird Aminosäure 59 der PD ausgetauscht und gehen die Aminosäuren 60 bis 65 verloren (Abbildung 0.2). Der betroffene Abschnitt ist unter den verschiedenen humanen Genen der PAX-Gruppe hoch konserviert [45]; darüber hinaus wurden für Teile der entsprechenden Sequenz von PAX-6 und des homologen *prd*-Drosophilagens DNA-Kontakte nachgewiesen [45] [46] (Abbildung 0.3). Aus diesem Grunde ist davon auszugehen, daß das die Mutation tragende Gen ein PAX-2-Protein mit defizitärer PD kodiert, das nur über eine eingeschränkte DNA-Bindungskapazität und Funktionalität verfügt.

Abbildung 0.2 Auswirkungen von 764del20ins2 auf Aminosäurenebene



Deletion zentraler Sequenzen der PD inklusive Teilen von PD1 und Verbindungsstück.

Die hier beschriebene Mutation ist bislang bei keinem Patienten dokumentiert worden. Zwei verschiedene, bereits bekannte Sequenzanomalien (Nr. 10 und 11 aus Tabelle 0.1) betreffen allerdings den gleichen Sequenzabschnitt innerhalb der PD. Nr. 10 stellt eine Falschsinn-Mutation in Codon 76 dar; d.h. ein Nukleotidaustausch - hier an erster Stelle des Basentripletts - bedingt eine Substitution der kodierten Aminosäure; in diesem Fall von Glycin nach Serin. Die Duplikation der Nukleotide 763 bis 768 in Nr. 11 führt zu

einer unmittelbaren Wiederholung der Codons 74 und 75. Die offensichtliche Häufung von Mutationen in einem Abschnitt von nicht mehr als neun Nukleotiden Länge spricht für das Vorliegen eines mutagenen *hot spots* in dieser Region, jedoch ohne daß augenscheinliche Sequenz-Merkmale von *hot spots* wie GC-Reichtum oder Homonukleotid-Wiederholungen (siehe oben) hier vorlägen.

Abbildung 0.3 Aminosäuren 59 bis 65 der PD der verschiedenen humanen *PAX*-Gene

PAX-1	E	T	G	S	I	L	P
PAX-2	E	T	G	S	I	K	P
PAX-3	E	T	G	S	I	R	P
PAX-4	R	T	G	V	L	E	P
PAX-5	E	T	G	S	I	K	P
PAX-6	E	T	G	S	I	R	P*
PAX-7	E	T	G	S	I	R	P
PAX-8	E	T	G	S	I	R	P
PAX-9	E	T	G	S	I	L	P
Übereinstimmung mit PAX-2	8/9	9/9	9/9	8/9	8/9	2/9	9/9

Der bei M2 *mutierte Sequenzabschnitt zeigt mit den übrigen humanen PAX-Genen einen erheblichen Grad an Übereinstimmung. Mit einem Stern markiert ist die Position, für die nach XU* et al. *(1999)* [46] *DNA-Kontakte dokumentiert wurden.*

1.1.36 Koinzidente DACH-1-Mutation

Neben der hier dokumentierten Mutation in *PAX-2* konnte im Rahmen einer anderen Arbeit bei dem gleichen Patienten eine Sequenzanomalie in einem weiteren Entwicklungsgen, *dachshund 1 (DACH-1)* identifiziert werden. DACH-1 ist ein Transkriptionskofaktor, der mit dem PAX/EYA/SIX-Netzwerk interagiert und an der embryonalen Reifung diverser Organsysteme beteiligt ist [36]. Über Protein-Protein-Wechselwirkungen reguliert DACH-1 EYA-1 [96] und zeigt in diesem Sinne synergistische Effekte mit PAX-2 in Bezug auf die Aktivierung gemeinsamer Zielgene. DACH-1 wird beim Menschen hauptsächlich in der Niere und interessanterweise im Herzen exprimiert [97]. Im Mausmodell zeigen DACH-1-Mutanten jedoch keinerlei makro- und mikroskopische Auffälligkeiten der inneren Organe inklusive der genannten [98]. Die humanpathogenetische Bedeutung von *DACH-1* Mutationen - insbesondere bezüglich der Entstehung renaler Malformationen - ist zur Zeit unklar.

1.1.37 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

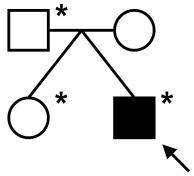
Patient *M2* präsentiert klinisch eine Kombination von angeborenen Fehlbildungen, die typisch für das PRS ist. Neben einer bilateralen Nierenhypoplasie mit vesikoureteralem Reflux und terminalem Versagen der Nierenfunktion finden sich Optikuskolobome

beidseitig. Als für das PRS uncharakteristische Anomalie muss die kongenitale Pulmonalstenose des Patienten angesehen werden.

In Zusammenschau mit dem Ergebnis der genetischen Analyse wird die sich klinisch aufdrängende Verdachtsdiagnose eines PRS bestätigt. Der spezifische syndromale Charakter der Erkrankung verblieb in diesem Fall jedoch bislang unerkannt, und die Identifikation der beschriebenen Mutation sowie die nachfolgende Analyse der erstgradigen Verwandtschaft ermöglicht nun eine dezidierte humangenetische Beratung der betroffenen Familie.

Das PRS ist eine Erbkrankheit, die autosomal-dominant auf die Folgegenerationen übertragen wird. Das Risiko, daß etwaige Nachkommen des Patienten *M2* ebenfalls am PRS erkranken ist demzufolge mit 50% anzugeben. Eltern und Schwester des untersuchten Patienten besitzen homozygot das Wildtyp-Allel und sind klinisch gesund. Dennoch ist das Wiederholungsrisiko einer identischen Mutation bei weiteren Nachkommen der Eltern nicht verläßlich zu bestimmen. Im Falle einer embryonalen *de novo* Mutation bei *M2* ist die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Manifestation der Erkrankung bei einem weiteren Kind nicht höher als in der Normalbevölkerung. Die extrem unwahrscheinliche Möglichkeit einer Keimzellmutation bei Vater oder Mutter lässt sich jedoch nicht vollständig ausschließen, so daß insgesamt ein minimales Restrisiko für die Wiederholung der Störung resultiert. Eine Arbeitsgruppe konnte bereits einmal ein paternales Keimzellmosaik in einer Familie mit mehreren an PRS erkrankten Geschwistern von klinische gesunden Eltern nachweisen [92].

Abbildung 0.4 Stammbaum der Familie von M2



Der Indexpatient mit klinischer Manifestation und Mutationen in PAX-2 *und* DACH-1. *Vater und Zwillingsschwester sind klinisch gesund, besitzen aber die Mutation in* DACH-1 *(*).*

Während sich die *PAX-2*-Mutation in dieser Familie ausschließlich bei dem primär untersuchten Patienten zeigt, läßt sich die Mutation in *DACH-1* ebenfalls beim Vater und bei der Schwester des Patienten nachweisen. Beide Personen sind jedoch phänotypisch unauffällig (Abbildung 0.4). Dies läßt vermuten, daß trotz der Beteiligung

des Faktors an der Nierenentwicklung die beschriebene Mutation in *DACH-1* keine die Nephrogenese irritierenden Effekte hat. Es ist jedoch auch möglich, daß sich die kongenitalen Malformationen erst durch das Zusammentreffen beider Sequenzabweichungen manifestieren, bzw. daß sich der Phänotyp des durch die Störung in *PAX-2* ausgelösten PRS aufgrund der koinzidentellen *DACH-1*-Mutation aggraviert, z. B. auch im Sinne einer Erweiterung des Spektrums betroffener - DACH-1 exprimierender - Organsysteme wie des Herzens (s.o.). Hierfür spricht in diesem Fall der ausgeprägte Phänotyp des Patienten mit bilateraler okulärer und renaler Manifestation inklusive PRS-untypischem Herzvitium. Über PAX-2-Mutationen begleitende Gendefekte bei PRS-Patienten gibt es zur Zeit keine weiteren Untersuchungen. Die bekannte interindividuelle Diversivität in der klinischen Ausprägung ließe sich jedoch durch einen den Phänotyp modulierenden Einfluß unabhängig vererbter, zusätzlicher Gendefekte erklären.

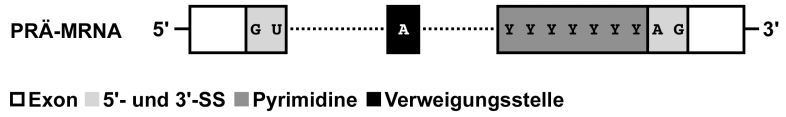
954-2A>G splice-site (Intron 3)

Die Sequenzierung des Amplifikats von Exon 4 des Patienten *V8* ergab die heterozygote Transition von Adenin zu Guanin in der intronischen Sequenz zwei Nukleotide vor dem Exon-Anfang. Der Nukleotidaustausch fällt in die Sequenz der 3'-Spleißstelle von Intron 3. Aus Tabelle 0.1 ist ersichtlich, daß diese Mutation ebenfalls noch nicht beschrieben wurde.

Bleim Spleißen werden die intronischen Sequenzen aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die kodierenden exonischen Sequenzen aneinandergereiht. Dieser Prozeß erfordert eine enorme Präzision und muß auf das Nukleotid genau erfolgen, sonst würde die Folge der Codons gestört und das Leseraster der mRNA außer Takt geraten. Aus diesem Grunde stellen die Übergangsbereiche zwischen Introns und Exons evolutionär hoch konservierte Regionen dar. Intronische 5'-Enden (Donor-Spleißstellen) und 3'-Enden (Akzeptor-Spleißstellen) werden jeweils durch Dinukleotide markiert, deren Sequenzen in fast allen Introns Spezies-übergreifend identisch sind und als Angriffspunkte für den Spleißapparat dienen. Donor-Spleißstellen bestehen meistens aus dem Dinukleotid `5'-GT-3'` (bzw. `5'-GU-3'` in der prä-mRNA) und Akzeptor-Spleißstellen aus `5'-AG-3'` (GT-AG-Regel). Nur sehr wenige Introns weichen von dieser Regel ab und beginnen mit einem `5'-AT-3'` (bzw. `5'-AU-3'`) und enden mit `5'-AC-3'`. Vor der Akzeptor-Spleißstelle sowohl konventioneller als auch alternativer

Introns befindet sich typischerweise unmittelbar eine Folge von Pyrimidin-Nukleotiden von variabler Länge sowie 20 bis 40 Nukleotide stromaufwärts ein Adenin-Baustein als sogenannte Verzweigungsstelle [47] (Abbildung 0.5).

Abbildung 0.5 Sequenzmerkmale an Intron-Exon-Grenzen



Akzeptor-Spleißstellen mit vorausgehender Folge von Pyrimidinen und einen 20 bis 40 Nukleotide stromaufwärts gelegenen Adenin-Baustein als Verzweigungsstelle. Modifiziert nach Knippers (2001) [47].

1.1.38 Allgemeine Effekte von Spleißmutationen

Mutationen, die Spleißerkennungssequenzen betreffen, können sich auf unterschiedliche Art und Weise auf die Reifung der mRNA auswirken, je nach dem ob es in der Folge zu einem kompletten Versagen des Spleißens oder zu einer Aktivierung alternativer kryptischer oder regulärer Spleißstellen kommt.

Kryptische, bzw. illegitime Spleißstellen sind Sequenzen, die der Spleißstellen-Konsensussequenz gleichen, aber normalerweise nicht vom Spleißapparat genutzt werden. Die Verwendung intronischer kryptischer Spleißstellen führt in diesem Fall zusätzliche Nukleotide in die reife mRNA ein, während exonische in einer Deletion von kodierenden Sequenzen resultieren [99].

Wird anstelle der mutierten Spleißstelle alternativ die nächste reguläre Spleißstelle verwendet, kommt es zum *exon skipping*, dem vollständigen Verlust eines Exons. Eine Mutation in einer Donor-Spleißstelle mündet in einem Verlust des vorangehenden, stromaufwärts gelegenen Exons. Bei einer Mutation in einer Akzeptor-Spleißstelle wird das folgende, stromabwärts gelegene Exon deletiert [99].

Fehlen in der näheren Umgebung der mutierten Spleißstelle alternative illegitime oder reguläre Spleißstellen, kann dies dort zu einem vollständigen Unterbleiben des Spleißens führen. Die gesamte intronische Sequenz wird dann in die reife mRNA integriert (*read through*). Dadurch werden zusätzliche Aminosäuren in das Genprodukt eingeführt und Leserasterverschiebungen erzeugt [99].

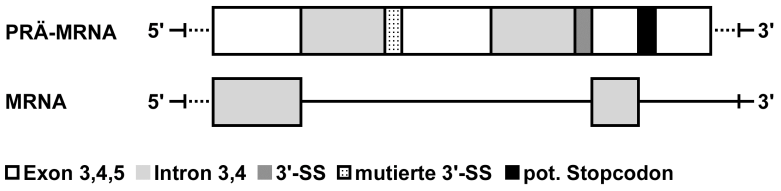
1.1.39 Mögliche Folgen von 954-2A>G

Intron 3 des Wildtyps von *PAX-2* zeigt konventionelle Spleißstellen entsprechend der GT-AG-Regel. Die Analyse der wildtypischen Spleißstelle bezüglich der Wahrscheinlichkeit einer enthaltenen Akzeptor-Spleißstelle mittels der online verfügbaren Software *SpliceView* ergibt einen Vorhersagewert (*Score*) von 80 (möglicher Maximalwert 100) [100]. Das mutierte Allel des untersuchten Patienten besitzt in der regulären Akzeptor-Spleißstelle von Intron 3 aufgrund des Nukleotidaustauschs eine abweichende Sequenz, und der oben genannte Algorithmus erkennt in der mutierten Sequenz keine Akzeptor-Spleißstelle. Von einer Inaktivierung der Erkennungssequenz und von einer konsekutiv abnormen Reifung der prä-mRNA ist auszugehen.

Dabei muß es zur Realisierung von mindestens einer der oben genannten Konsequenzen von Spleißmutationen kommen. Ein *read through* aufgrund eines Ausbleibens des Spleißvorgangs an diesem Intron-Exon-Übergang würde zu einer vollständigen Integration von Intron 3 in die reife RNA führen.

Würde der Spleißapparat die nächste reguläre Akzeptorspleißstelle (am Ende von Intron 4) nutzen, käme es zur direkten Verknüpfung von Exon 3 mit Exon 5. Exon 4 würde inklusive beider angrenzenden Introns aus der RNA herausgespleißt werden (*exon skipping*). Die folgende Leserahmenverschiebung um ein Nukleotid würde ein vorzeitiges Stopcodon an Nukleotidposition 1080 innerhalb von Exon 5 erzeugen (Abbildung 0.6).

Abbildung 0.6 Skipping von Exon 4

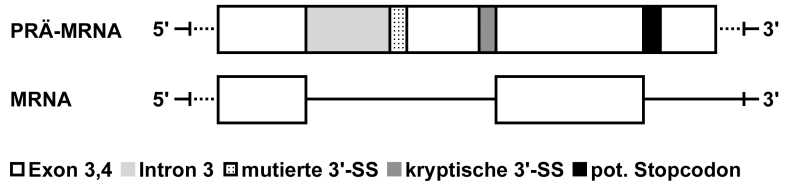


Kompletter Verlust von Exon 4 durch exon skipping *und Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stopcodon in Exon 5.*

Die Auswirkungen der Aktivierung einer illegitimen Spleißstelle sollen am Beispiel eines exonischen kryptischen Spleißakzeptors exemplarisch verdeutlicht werden. Als kryptische Spleißstelle kommen theoretisch alle stromabwärts in Exon 4 gelegenen AG-Dinukleotide in Frage, denen eine pyrimidinreiche Sequenz vorangestellt ist und somit

der Konsensus-Sequenz entsprechen. In Exon 4 erfüllt lediglich eine Adenin-Guanin-Folge an Position 974 diese Grundvoraussetzungen. Dieser Sequenz 20 Basen stromabwärts des regulären Exon-Beginns gehen drei Pyrimidine unmittelbar voraus. Das Spleißen an dieser Position würde das regulär liberierte Exon 3 mit Nukleotidposition 976 innerhalb von Exon 4 verknüpfen. Dies hätte weitreichende Auswirkungen auf das Genprodukt. Die ersten 22 Basen von Exon 4 würden gemeinsam mit den nicht-kodierenden Sequenzen von Intron 3 aus der prä-mRNA entfernt werden. Neben der Deletion der Codons 138 bis 144 käme es zu einer Verschiebung des Leserasters mit konsekutiver Alteration der kodierten Aminosäuresequenz. Der *frame shift* gipfelt in der Generierung eines vorzeitigen Stopcodons (`5'-UGA-3'`) an Nukleotidposition 1016 (Abbildung 0.7).

Abbildung 0.7 Exonisches Spleißen von Exon 4



Partieller Verlust von Exon 4 und Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stopcodon in Exon 4.

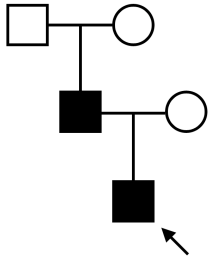
Ein von einer derartig gespleißten mRNA translatiertes Protein wäre höchstgradig verkürzt und strukturell verändert. Die Deletion und Leserasterverschiebung beträfe in diesem Fall den carboxy-terminalen Anteil der PD, deren Promotor-Bindungskapazität eingeschränkt würde. Durch die vorzeitige Termination der Proteinbiosynthese innerhalb von Exon 4 fehlten wie beim Beispiel des *skippings* von Exon 4 neben dem DNA-bindenden OP sämtliche transaktivierenden Domänen des carboxy-Terminus. Wie bereits erwähnt führen vergleichbare Unsinn-Mutationen in den konservierten Sequenzen dieser Regionen zu biologischen Defekten aufgrund alterierter Proteinfunktion und Haploinsuffizienz.

Da die Software *SpliceView* die Sequenz an Position 974 nicht als potentielle Akzeptor-Spleißstelle erkennt, ist deren Realisierung *in vivo* unwahrscheinlich. Welche der übrigen genannten Möglichkeiten des alternativen Spleißens bei V8 tatsächlich verwirklicht wird, ist ohne ergänzende molekularbiologische Untersuchungen nicht zu bestimmen.

1.1.40 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Der Patient und der Vater des Patienten leiden an einem PRS-typischen Symptomenkomplex. Neben renaler Manifestation mit Einschränkung der Nierenfunktion zeigen sich bei beiden Personen charakteristische kolobomatöse Augenfehlbildungen. Der Vater präsentiert darüber hinaus eine Schwerhörigkeit. Die genetische Analyse ergibt identische Mutationen. Mutter und Eltern des Vaters sind klinisch und genetisch ohne pathologischen Befund (Abbildung 0.8).

Abbildung 0.8 Stammbaum der Familie von V8



Indexpatient und Vater mit klinischer Manifestation und PAX-2-*Mutation.*

Die bei den Betroffenen bereits deutlich fortgeschrittene Niereninsuffizienz spricht für einen insgesamt schweren Verlauf der Erkrankung trotz sonographisch unilateraler Manifestation beim Kind. Die extrarenale Symptomatik rückt in den Hintergrund, da deren Ausprägung bei Vater und Sohn lediglich als geringgradig dokumentiert ist.

Die hier erhobenen Daten zeigen nach wie vor weiterhin keinen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der genomischen Position einer *PAX-2* Mutation und der nachfolgenden morphologischen Anomalie. Obwohl sowohl die erstgenannte Insertion/Deletion als auch diese Spleißstellen-Mutation die PD von PAX-2 betreffen und somit vermutlich ähnliche funktionelle Konsequenzen haben, unterscheiden sich die konsekutiven morphologischen Abweichungen nicht unerheblich voneinander. Den okulär und renal beidseitig entwickelten Fehlbildungen bei *M2* stehen die unilateralen Anomalien in der Familie von *V8* gegenüber. Dies muß bedeuten, daß entweder die embryonal *PAX-2* exprimierenden Organe sehr empfindlich auf geringste Unterschiede in der PAX-2-Produktion und -Funktionalität reagieren oder weitere individuelle, eventuell genetische Prädispositionen neben *PAX-2* Mutationen bestehen.

996G>A neutral (Exon 4)

Die Transition von Guanin nach Adenin an Nukleotidposition 996, bzw. an dritter Stelle von Codon 151 in einem *PAX-2*-Allel von *S26* verhält sich bezüglich der Primärstruktur des translatierten Proteins zunächst stumm. Sowohl der Wildtyp `5'-CCG-3'` als auch die Sequenzvariante `5'-CCA-3'` kodieren für die Aminosäure Prolin. Da der Basenaustausch in 102 Kontrollallelen nicht registriert werden konnte, handelt es sich formal um eine Mutation.

Im Rahmen der Degeneriertheit des genetischen Codes ist die dritte Base eines Tripletts von untergeordneter Bedeutung für die Selektion einer Aminosäure. Bis auf Methionin und Tryptophan werden alle proteinogenen Aminosäuren von mindestens zwei verschiedenen, sogenannten synonymen Codons kodiert, die sich meist nur an der dritten Stelle voneinander unterscheiden. Sich hier ereignende Mutationen haben in der Regel keinerlei Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des synthetisierten Proteins. Lediglich im Falle einer Transversion oder einer Erzeugung eines Stopcodons kann sich ein Basenaustausch an dritter Codonstelle auf die Translation fortsetzen.

Daneben besitzen aminosäureneutrale Mutationen das Potential, die RNS-Reifung über eine Beeinflussung des Spleißvorgangs zu modulieren. Dies kann zum Beispiel durch eine Erzeugung einer neuen Spleißstelle oder durch eine Veränderung exonischer und für das korrekte Spleißen relevanter Sequenzmotive geschehen.

1.1.41 Mögliche Folgen von 996G>A

Synonyme Codons werden nicht in einander entsprechender Frequenz verwendet, sondern werden in charakteristisch unterschiedlicher Häufigkeitsverteilung vorgefunden (sog. *codon usage bias*). Verschiedene Genome, aber auch verschiedene Gene eines Genoms enthalten synonyme Codons in unterschiedlichem Ausmaß [101]. Die Auswahl bestimmter Synonyma geschieht dabei nicht zufällig, sondern besitzt in Bezug auf Genexpressionsmuster eine Bedeutung, so dass die differentielle Verwendung synonymer Codons die Proteinbiosynthese sowohl auf Transkriptions- als auch auf Tranlationsrate beeinflusst und sich darüber hinaus auf die dreidimensionale Faltung von mRNA und translatiertem Protein auswirkt [102] [103] [104] [105] [106].

Tabelle 0.2 zeigt, daß die Codonfrequenzen im mutierten Allel nicht signifikant vom Wildtyp-Allel abweichen und Auswirkungen der Mutation durch eine Veränderung des *codon usage bias* als insgesamt unwahrscheinlich zu erachten sind.

Tabelle 0.2 Codonfrequenzen von Tausend in PAX-2E und Vergleich im Chi-Quadrat-Test

Codon	Mutante S26	Wildtyp
CCG	1,62 % (7)	1,86 % (8)
CCA	1,40 % (6)	1,16 % (5)
Prüfgröße v	0,366	
Quantil$_{(k=1;\ \alpha=0,05)}$	3,841	

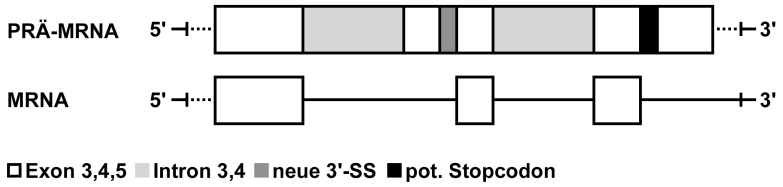
Der Chi-Quadrat-Test zeigt, daß die abweichenden Codonfrequenzen im mutierten Allel sich nicht signifikant vom Wildtyp unterscheiden (Prüfgröße kleiner als das zugehörige Quantil). In Klammern angegeben die absoluten Codonhäufigkeiten in dem 432 Codons umfassenden PAX-2E.

Da Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren allerdings schon durch minimale Sequenzänderungen alteriert werden können (vgl. Prinzip der SSCP-Analyse), ist es jedoch möglich, daß eine einzige stumme Mutation die Effizienz und die Quantität der Proteinbiosynthese auf dieser Ebene beeinträchtigen kann. In Anbetracht der oben diskutierten Koinzidenz von Sequenzabweichungen in *PAX-2* und in anderen Nierenentwicklungsgenen, ist nicht auszuschließen, daß eine gegebenfalls auch nur geringfügig herabgesetzte Produktion von PAX-2 infolge einer primärstrukturell stummen Mutation einen zusätzlichen Manifestationsfaktor darstellen kann.

Einen erheblichen Einfluß auf das finale Genprodukt hätte die Erzeugung einer neuen Spleißstelle durch eine aminosäurenneutrale Mutation. Die hier beschriebene Sequenzvariante generiert eine der Akzeptor-Spleißstellen-Consensussequenz entsprechende Basenfolge an Position 996 inklusive einer typischerweise vorangehenden pyrimidinreichen Sequenz und könnte sich in diesem Sinne auf die posttranskriptionale Modifikation auswirken. Interessanterweise zeigt die mutierte Sequenz in der Spleißstellenanalyse mit *SpliceView* einen Vorhersagewert von 80 für das Vorliegen einer Akzeptorspleißstelle an dieser Position. Dies ist ein hoher *Score*, der zum Beispiel dem Ergebnis der Untersuchung der realen 3'-Spleißstelle des Wildtyps von Exon 4 entspricht (vgl. Kapitel 1.1.39, Seite 60). Sollte es zu einer Aktivierung dieser Spleißstelle kommen, wäre eine Deletion der stromaufwärts gelegenen 44 Nukleotide von Exon 4 die Folge. Es würde eine Leserasterverschiebung resultieren, die zur Generierung eines vorzeitigen Stopcodons an Nukleotidposition

1080 innerhalb von Exon 5 führt (Abbildung 0.9, vgl. Kapitel 1.1.39, Seite 60). Die Defizienz der folgenden konservierten Abschnitte der carboxy-terminalen Region würde ein funktionell insuffizientes Genprodukt erzeugen.

Abbildung 0.9 Alternatives Spleißen in Exon 4



Partielle Deletion von Exon 4 durch irreguläres Spleißen an mutmaßlich alternativer Akzeptor-Spleißstelle an Position 996 und Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stopcodon in Exon 5.

Eine weitere Möglichkeit der Manifestation einer aminosäureneutralen Punktmutation ist die Beeinträchtigung sogenannter exonischer *splice enhancer* (ESE). ESE sind exonische Sequenzabschnitte, die wichtig für die Identifikation der angrenzenden intronischen Spleißstellen sind und über eine durch Bindungsproteine vermittelte Brückenbildung zwischen prä-mRNS und Spleißapparat das korrekte Zusammensetzen der kodierenden Sequenzen fördern [108] [109]. Eine Mutation in einem ESE kann unabhängig von der translationalen Bedeutung für das betreffende Codon deren Funktion deaktivieren und *exon skipping* sowie Leserahmenverschiebungen hervorrufen [109]. Mit der webbasierten Software *ESEfinder* lassen sich Sequenzen auf das Vorliegen von ESE prüfen, wobei bei Motiven mit einem Ergebniswert größer als einer zu definierenden Schwelle eine signifikante Wahrscheinlichkeit für einen ESE besteht [110] [111]. Allerdings besteht nur eine ungefähre Korrelation zwischen dem numerischen Ergebnis und der tatsächlichen ESE-Aktivität, z. B. entspricht der höchste Score nicht zwangsläufig dem effektivsten ESE-Motiv [111]. Eine entsprechende Berechnung für das wildtypische Amplikon 4 ergibt in dem der Mutation angrenzenden Sequenzabschnitt zwei Motive mit einem *Score* größer dem Standard-Schwellenwert. Die gleichen Motive werden in der Analyse der Mutante als ebenfalls mögliche Kandidaten angegeben, ohne dass eine eindeutige Reduktion der wahrscheinlichen ESE-Aktivität errechnet wird (Tabelle 0.3). Sollte dennoch das korrekte Spleißen verhindert werden, käme es zum *exon skipping* von Exon 4 mit Leserahmenverschiebung und vorzeitiger Termination der Translation an Nukleotidposition 1080 in Exon 5 (vgl. oben diskutierte Spleißstellenmutation, Kapitel 1.1.39, Seite 60).

Tabelle 0.3 ESE-Analyse des mutierten Sequenzabschnittes in Amplikon 4

Nukleotidposition	Mutante S26		Wildtyp	
	ESE-Motiv	ESE-Score	ESE-Motiv	ESE-Score
Amplikon 140 Genom 992	CGCC**A**GA	2,62	CGCCGGA	4,54
Amplikon 143 Genom 995	C**A**GATGG	3,09	CGGATGG	2,65
Schwellenwert	1,96			

Im mutationstragenden Sequenzabschnitt erkennt die Webresource ESEFinder *sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante jeweils zwei potentielle ESE-Motive an identischer Position. Die Mutation verursacht keine signifikante Reduktion des Scores auf einen Wert kleiner dem Standardschwellenwert* [111].
*Analysiert wurde das komplette Amplikon 4 (**n** ersetzt durch entsprechendes Nukleotid bei Wildtyp oder Mutante):*

```
gctgaggaac ttgggagaga gcccctttgc agggctgggc tggaattggc cgggatagga gtgggcattt gatgtgtgat
gctgttgtga cgctgttgca gaatcatccg gaccaaagtt cagcagcctt tccacccaac gccngatggg gctgggacag
gagtgaccgc ccctggccac accattggta agagggctca gggaagggga ggaaaccaga tc
```

1.1.42 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

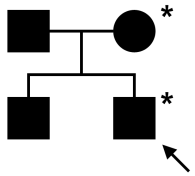
Die linksseitige Doppelniere stellt die einzige Anomalie bei *S26* dar und insbesondere an den Augen können keine weiteren wegweisenden Befunden erhoben werden. Der isolierte und zudem untypische renale Phänotyp schließen das Vorliegen eines PRS bei diesem Patienten aus.

Die dokumentierte stumme Mutation ist der erste Nukleotidaustausch in der Sequenz der PD, der bei einem Patienten mit isolierter Nephropathie identifiziert wurde. Eine mögliche Erklärung für den relativ geringen phänotypischen Schweregrad und die erhaltene Nierenfunktion wäre eine reduzierte Haploinsuffizienz im Falle des Spleißens an der mutmaßlich durch die Mutation erzeugten Konsensussequenz. Wenn im mutierten Allel die Spleißreaktion an der regulären Akzeptor-Spleißstelle und an der kryptischen Akzeptor-Spleißstelle grundsätzlich die gleiche Wahrscheinlichkeit hätte, käme es schließlich nur zu einer Verminderung um ein Viertel der normalen Produktion von intaktem PAX-2 - und nicht um die Hälfte wie bei heterozygoter Nullmutation. Auch die nur teilweise Reduktion der Aktivität eines ESE könnte das Potential haben, die Syntheserate intakten Proteins in relevantem Ausmaß zu vermindern. Welche Effekte eine quantitiv derart herabgesetzte Proteinbiosynthese von PAX-2 auf die Organentwicklung hätte, ist nicht bekannt. Daß eine Empfindlichkeit der PAX-2-abhängigen Gewebe auf die zelluläre Konzentration des Transkriptionsfaktors besteht,

zeigen die im Mausmodell schwerwiegenderen Phänotypen bei homozygoten PAX-2-Mutanten im Vergleich zu heterozygoten [59].

Gegen diese Überlegungen spricht allerdings die Inkongruenz zwischen phänotypischer Homogenität und genetischer Diversität in der Familienuntersuchung. Während bei allen anderen untersuchten Familienmitglieder ebenfalls Anlagestörungen mit linksseitigem Ureter fissus nachgewiesen wurden, zeigt lediglich die Mutter des Patienten eine identische Sequenzvariante. Vater und Bruder bleiben in der *PAX-2*-Analyse genotypisch unauffällig, so dass die Möglichkeit eines zusätzlichen Defektes in einem weiteren Nierenentwicklungsgen als Ursache für die familiäre Erkrankung zu berücksichtigen ist.

Abbildung 0.10 Stammbaum der Familie von S26



Alle untersuchten Familienmitglieder zeigen Harnwegsanomalien, jedoch nur beim Indexpatienten S26 und der Mutter kann die Sequenzabweichung nachgewiesen werden (*).

Konklusion und Ausblick

Bei 135 untersuchten Kindern eines unselektierten Patientenkollektivs mit angeborenen Fehlbildungen der Niere und ableitenden Harnwege konnten drei Mutationen in *PAX-2* nachgewiesen werden. Die klinische Examinierung von zwei dieser Patienten erzwingt die Diagnose eines PRS. Im dritten Fall zeigt sich ein isoliert renaler Phänotyp. Obwohl die aminosäureneutrale Sequenzvariante bei diesem Patienten eine Spleißstellen-Konsensussequenz mit hohem Vorhersagewert erzeugt, macht die Korrelation von klinischer und genetischer Familienanalyse einen einfachen pathogenetischen Einfluss der *PAX-2*-Variante auf den Phänotyp unwahrscheinlich.

Interessant wären weitere Untersuchungen zu dieser Sequenzabweichung vor allen Dingen in Bezug auf eine etwaige Rolle von PAX-2 als phänotypischer *modifier* anderer Sequenzabweichungen, wobei sich insgesamt kein eindeutiger Hinweis auf eine quantitativ relevante Bedeutung von *PAX-2*-Mutationen bei der Manifestation isolierter und unabhängig vom PRS auftretender Nieren- oder Harnwegsanomalien ergibt.

Weiterhin unklar bleibt die Abhängigkeit der individuellen Pathologie von der genomischen Position der zugehörigen Sequenzabweichung. Die unzureichende Korrelation von Genotyp und Phänotyp wird in dieser Arbeit bestätigt. Die hier beschriebenen Mutationen mit unzweifelhaften Auswirkungen auf die Proteinstruktur betreffen die für PAX-Proteine typische PD. Phänotypisch unterscheiden sich die Patienten jedoch erheblich voneinander. Welche Mechanismen im Einzelfall die Morphologie mitbestimmen, ist nicht bekannt. Auch bezüglich dieser Problematik stellt sich in Anbetracht des oben dargestellten intraindividuellen Nachweises von Mutationen in *PAX-2* und *DACH-1* die Frage nach der ätiologischen Bedeutung einer Koinzidenz verschiedener Sequenzvarianten. Mutationen oder Polymorphismen in verschiedenen Nierenentwicklungsgenen könnten einen gegenseitig den Phänotyp modulierenden Einfluß ausüben und so insgesamt zum einen das variable Spektrum von sporadischen CAKUT und zum anderen auch die Heterogenität familiärer Fälle erklären.

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methoden ist es in Zukunft möglich, Verdachtsfälle von papillo-renalem Syndrom auf Mutationen in PAX-2 zu untersuchen und so bei einer Bestätigung eine fundierte humangenetische Beratung der betroffenen Familien durchzuführen. Da CAKUT häufig in Kombination mit extrarenalen Fehlbildungen auftreten, erfordert diese Diagnose die Suche nach weiteren Anomalien, die Hinweise für einen genetischen Hintergrund für die Erkranknung liefern könnten.

Literaturverzeichnis

1 **Tsuchiya M, Hyashida M, Yanagihara T, Yoshida J, Takeda J, Tatsuma N, Tsugu H, Hino Y, Munakata E, Murakami M** (2003) Ultrasound screening for renal and urinary tract anomalies in healthy infants. Pediatr Int 45:617-23

2 **Kemper MJ, Müller-Wiefel DE** (2001) Renal function in congenital anomalies of the kidney and urinary tract. Curr Opon Urol 11:571-5

3 **Fivush BA, Jabs K, Neu AM, Sullivan EK, Feld L, Kohaut E, Fine R** (1998) Chronic renal insufficiency in children and adolescents: the 1996 annual report of NAPRTCS. Pediatr Nephrol 12:328-37

4 **Miklovicova D, Cornelissen M, Cransberg K, Groothoff JW, Dedik L, Schröder CH** (2005) Etiology and epidemiology of end-stage renal disease in Dutch children 1987-2001. Pediatr Nephrol 20:1136-42

5 **Mehls O, Schärer K** (2002) Chronische Niereninsuffizienz. In: Schärer K, Mehls O (Hrsg.) Pädiatrische Nephrologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

6 **Schärer K** (2002) Nierenhypoplasie und -dysplasie. In: Schärer K, Mehls O (Hrsg.) Pädiatrische Nephrologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

7 **Olbing H** (2002) Vesikoureteraler Reflux. In: Schärer K, Mehls O (Hrsg.) Pädiatrische Nephrologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

8 **Beetz R** (2002) Konnatale Uropathien. In: Schärer K, Mehls O (Hrsg.) Pädiatrische Nephrologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

9 **Pryde GP, Sedman AB, Nugent CE, Barr M** (1993) Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. J Am Soc Nephrol 3:1575-82

10 **Alwan S, Polifka JE, Friedman JM** (2005) Angiotensin II receptor antagonist treatment during pregnancy. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 73:123-30

11 **Sadler TW** (1998) Medizinische Embryologie. 9. Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart New York

12 **Piscione TD, Rosenblum ND** (2002) The molecular control of renal branching morphogenesis: Current knowledge and emerging insights. Differentiation 70:227-46

13 **Saxen L** (1987) Organogenesis of the kidney. In: Barlow PWL, Green PB, Wyle CC (Hrsg.) Developmental and Biology Series. Cambridge University Press New York

14 **Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C, French M, Tsai RWS** (2002) PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital development. Int J Dev Biol 46:535-44

15 **Beck AD** (1971) The effect of intra-uterine urinary obstruction upon the development of the fetal kidney. J Urol 105:784-9

16 **Peters CA, Carr MC, Lais A, Retik AB, Mandell J** (1992) The response of the fetal kidney to obstruction. J Urol 148:503-9

17 **Ruano-Gil D, Coca-Payeras A, Tejedo-Mateu A** (1975) Obstruction and normal recanalization of the ureter in the human embryo. Its relation to ureteric obstruction. Eur Urol 1:287-293

18 **Hanna MK** (1978) Some observations on congenital ureteropelvic junction obstruction. Urology 12:151-9

19 **Allen TD** (1970) Congenital ureteral strictures. J Urol 104:196-204

20 **Mackie GG, Stephens FD** (1975) Duplex kidneys: A correlation of renal dysplasia with position of the ureteral orifice. J Urol 114:274-80

21 **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 deterioriation of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. J Am Soc Nephrol 10:2018-28

22 **Nagata M, Shibata S, Shu Y** (2002) Pathogenesis of dysplastic kidney associated with urinary tract obstruction in utero. Nephrol Dial Transplant 17:37-38

23 **Kuwayama F, Miyazaki Y, Ichikawa I** (2002) Embryogenesis of the congenital anomalies of the kidney and the urinary tract. Nephrol Dial Transplant 17:45-47

24 **Schedl A, Hastie ND** (2000) Cross-talk in kidney development. Current Opinion in Genetics & Development 10:543-9

25 **Saarma M** (2000) GDNF - a stranger in the TGF-β superfamily? Eur J Biochem 267:6968-71

26 **Love S, Plaha P, Patel NK, Hotton GR, Brooks DJ, Gill SS** (2005) Glial cell line-derives neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. Nat Med 11:703-4

27 **Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H** (1996) Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. Nature 382:73-6

28 **Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, antonio L, Hu Z, cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW, Fox GM** (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. Cell 85:1113-24

29 **Sainio K, Suvanto P, Davies J, Wartinovaara J, Wartinovaara K** (1997) Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. Development 124:4077-87

30 **Schuchardt A, D'Agati V, Pachnis V, Constantini F** (1996) Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k-mutant mice result from defects in ureteric bud development. Development 122:1919-29

31 **Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR** (2001) Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax-2-dependent activation of glial derived neurotrophic factor gene. Development 128:4747-56

32 **Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I** (2000) Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. J Clin Invest 105:863-73

33 **Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga SI, Ozaki H, Sato S, Kawakami K** (1999) Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. Mol Cell Biol 19:6815-24

34 **Xu PX, Zheng W, Huang L, Maire P, Laclef C, Silvius D** (2003) Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney. Development 130:3085-94

35 **Brodbeck S, Besenbeck B, Englert C** (2004b) The transcription factor Six2 activates expression of the Gdnf gene as well as ist own promoter. Mech Dev 121:1211-22

36 **Brodbeck S, Englert C** (2004a) Genetic determination of nephrogenesis: The Pax/Eya/Six gene network. Pediatr Nephrol 19:249-55

37 **Sun H** (1997) Evolution of paired domains: Isolation and sequencing of jellyfish and hydra Pax genes related to Pax-6 and Pax-6. Proc Natl Acad Sci 94:5156-61

38 **Krauss S, Johansen T, Korzh V, Fjose A** (1991) Expression pattern of zebrafish pax genes suggests a role in early brain regionalization. Nature 353:267-70

39 **Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ** (1994) Homology of the eyeless gene of drosophila to the small eye gene in mice and aniridia in humans. Science 250:1259-62

40 **Nohno T, Koyama E, Myokai F, Taniguchi S, Ohuchi H, Saito T, Noji S** (1993) A chicken homeobox gene related to drosophila paired is predominantly expressed in the developing limb. Dev Biol 158:254-64

41 **Noll M** (1993) Evolution and role of Pax genes. Curr Opin Genet Dev 3:595-605

42 **Chi N, Epstein JA** (2002) Getting your pax straight: Pax proteins in development and disease. Trends Genet 18: 41-7

43 **Dahl E, Koseki H, Balling R** (1997) Pax genes and organogenesis. Bioessays 19:755-65

44 **Treisman J, Harris E, Desplan C** (1991) The paired box encodes a second DNS-binding domain in the paired homeo domain protein. Genes Dev 5:594-604

45 **Xu W, Rould MA, Jun S, Desplan C, Pabo CO** (1995) Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5A resolution reveals structural basis for pax developmental mutations. Cell 80:639-50

46 **Xu HE, Rould MA, Xu W, Epstein JA, Maas RL, Pabo CO** (1999) Crystal structure of the human Pax6 paired-domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. Genes Dev 13: 1263-75

47 **Knippers R** (2001) Molekulare Genetik. 8. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York

48 **Lechner MS, Dressler GR** (1996) Mapping of Pax-2 transcription activation domains. J Biol Chem 271:21088-93

49 **Stapleton P, Weith A, Urbanek P, Kozmik Z, Busslinger M** (1993) Chromosomal localization if seven PAX genes and cloning of a novel family nember, PAX-9. Nat Genet 3:292-8

50 **Sanyanusin P, Norrish JH, Ward TA, Nebel A, McNoe LA, Eccles MR** (1996) Genomic structure of the human PAX2 Gene. Genomics 35:258-61

51 **Adams B, Dorfler P, Aguzzi A, Kozmik Z, Urbanek P, Maurer-Fogy I, Busslinger M** (1992) Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing cns, and adult testis. Genes Dev 6:1589-607

52 **Nornes HO, Dressler GR, Knapik EW, Deutsch U, Gruss P** (1990) Spatially and temporally expression of Pax2 during murine neurogenesis. Development 109:797-809

53 **Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO, Gruss P** (1990) Pax2, a new murine paired-box-containing gene and ist expression in the developing excretory system. Development 109:787-95

54 **Dehbi M, Ghahremani M, Lechner M, Dressler G, Pelletier J** (1996) The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of wilms tumor suppressor gene (WT1). Oncogene 13:447-53

55 **Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ III, Dressler GR** (1995) Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. Development 121:867-75

56 **Zhang SL, Moini B, Ingelfinger JR** (2004) Angiotensin II increases Pax-2 expression in fetal kidney cells via the AT2 receptor. J Am Soc Nephrol 15:1452-65

57 **Keller SA, Jones JM, Boyle A, Barrow LL, Killen PD, Green DG, Kapousta NV, Hitchcock PF, Swank RT, Meisler MH** (1994) Kidney and retinal defects (Krd), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the Pax2 locus. Genomics 23:309-20

58 **Favor J, Sandaluche R, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, Chatterjee B, Senft E, Wurst W, Blanquet V, Grimes P, Sporle R, Schughart K** (1996) The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma-syndrome and results in defects of the brain, ear, eye and kidney. Proc Natl Acad Sci USA 93:13870-5

59 **Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P** (1995) Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. Development 121:4057-65

60 **Porteous S, Torban E, Cho NP et al** (2000) Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2(1Neu)+/- mutant mice. Hum Mol Genet 9:1-11

61 **Torban E, Eccles MR, Favor J, Goodyer PR** (2000) PAX2 suppresses apoptosis in renal collecting duct cells. Am J Path 157:833-41

62 **Dziarmaga A, Clark P, Stayner C, Julien JP, Torban E, Goodyer P, Ecclers M** (2003) Ureteric bud apoptosis and renal hypoplasia in transgenic PAX2-Bax fetal mice mimics the renal-coloboma syndrome. J Am Soc Nephrol 14:2767-74

63 **Rothenspieler UW, Dressler GR** (1993) Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. Dev 119:711-20

64 **Clark P, Dziarmaga A, Eccles M, Goodyer P** (2004) Rescue of defective branching nephrogenesis in renal-coloboma syndrome by the caspase inhibitor, Z-VAD-fmk. J Am Soc Nephrol 15:299-305

65 **Woolf AS** (2000) A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformation. Kidney Int 58:500-12

66 **Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, Dobyns WB, Eccles MR** (1995b) Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. Nat Genet 9:358-64

67 **Nishimoto K, Iijima K, Shirakawa T, Kitagawa K, Satomura K, Nakamura H, Yoshikawa N** (2001) PAX2 gene mutation in a family with isolated renal hypoplasia. J Am Soc Nephrol 12:1769-72

68 **Dressler GR, Douglass L** (1992) Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. Proc Natl Acad Sci USA 89:1179-83

69 **Gnarra JR, Dressler GR** (1995) Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition by antisence oligonucleotides. Cancer Res 55:4092-8

70 **Stuart ET, Haffner R, Oren M, Gruss P** (1995) Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. EMBO J 14:5638-45

71 **Dressler GR, Wilkinson JE, Rothenpieler UW, Patterson LT, Williams-Simons L, Westphal H** (1993) Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. Nature 362:65-7

72 **Ostrom K, Tang MJ, Gruss P, Dressler GR** (2000) Reduced Pax2 gene dosage increaes apoptosis and slows the progression of renal cystic disease. Dev Biol 219:250-8

73 **Bron AJ, Burgess SE, Awdry PN, Oliver D, Arden G** (1989) Papillo-renal syndrome. An inherited association of optic disc dysplasia and renal disease. Report and review of the literature. Ophthalmic Paediatr Genet 10:185-98

74 **Schimmenti LA, Pierpont ME, Carpenter BLM, Kashtan CE, Johnson MR, Dobyns WB** (1995) Autosomal dominatoptic nerve colobomas, vesikoureteral reflux, and renal anomalies. Am J Med Genet 59:204-8

75 **Schimmenti LA, Cunliffe HE, McNoe LA, Ward TA, French MC, Shim HH, Zhang YH, Proesmans W, Leys A, Byerly KA, Braddock SR, Masuno M, Imaizumi K, Devriendt K, Eccles MR** (1997) Further delineation of renal-coloboma-syndrome in patients with extreme variability of phenotype and identical PAX2 mutations. Am J Hum Genet 60:869-78

76 **Eccles MR, Schimmenti LA** (1999) Renal-coloboma syndrome: A multi-system developmental disorder caused by PAX2 mutations. Clin Genet 56:1-9

77 **Fletcher J, Hu M, Berman Y, Collins F, Grigg J, McIver M, Jüppner H, Alexander SI** (2005) Multicystic Dysplastic Kidney and Variable Phenotype in a Family with a Novel Deletion Mutation of PAX2. J Am Soc Nephrol 16: 2754-61

78 **Salomon R, Tellier AL, Attie-Bitach T, Amiel J, Vekemans M, Lyonett S, Dureau P, Niaudet P, Gubler MC, Broyer M** (2001) PAX2 mutations in oligomeganephronia. Kidney Int 59:457-62

79 **Cunliffe HE, McNoe LA, Ward TA, Devriendt K, Brunner HG, Eccles MR** (1998) The prevalence of PAX2 mutations in patients with isolated colobomas or colobomas associated with urogenital anomalies. J Med Genet 35:806-12

80 **Devriendt K, Matthijs G, van Damme B, van Caesbroeck D, Eccles M, Vanrenterghem Y, Fryns JP, Leys A** (1998) Missense mutation and hexanucleotide duplication in the PAX2 gene in two unrelated families with renal-coloboma syndrome (MIM 120330). Hum Genet 103:149-53

81 **Schimmenti LA, Shim H, Wirtschafter JD, Panzarino VA, Kashtan CE, Kirckpatrick SJ, Wargowski DS, France TD, Michel E, Dobyns WB** (1999) Homonucleotide expansion and contraction mutations of PAX2 and inclusion of Chiari 1 malformation as part of renal-coloboma syndrome. Hum Mutat 14:369-76

82 **Entrez Nucleotide**, National Center For Biotechnology Information (NCBI) *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide*

83 **NCBI Blast**, National Center For Biotechnology Information (NCBI) *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/*

84 **Mullis SA, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. Methods Enymol 155:335-50

85 **Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K** (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5:874-9

86 **Sheffield VC, Beck JS, Kwitek A, Sandstrom DW, Stone EM** (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 16:325-32

87 **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain reaction termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci 74:5463-7

88 **Analyzing Data With A Chi-Square Contingency Table**, Tutorial Buffalo State College *http://faculty.buffalostate.edu/mcmillam/problem%20spaces/Assignments/ChiSquare%20contingency%20test.htm*

89 **Shim HH, Nakamura BN, Cantor RM, Schimmenti LA** (1999) Identification of two single nucleotide polymorphisms in exon 8 of PAX2. Mol Genet Metab 68:507-10

90 **Chung GW, Edwards AO, Schimmenti LA, Manligas GS, Zhang Y, Ritter R** (2001) Renal-coloboma syndrome: Report of a novel PAX2 gene mutation. Am J Ophthalmol 132:910-3

91 **Sanyanusin P, McNoe LA, Sullivan MJ, Weaver RG, Eccles MR** (1995a) Mutation of PAX2 in two siblings with renal-coloboma syndrome. Hum Mol Genet 4:2138-4

92 **Amiel J, Audollent S, Joly D, Dureau P, Salomon R, Tellier AL, Augé J, Bouissou F, Antignac C, Gubler MC, Eccles MR, Munnich A, Vekemans M, Lyonnet S, Attié-Bitach T** (2000) PAX2 mutations in renal-coloboma syndrome: mutational hotspot and germline mosaicism. Eur j Hum Genet 8:820-6

93 **Higashide T, Wada T, Sakurai M, Yokoyama H, Sugiyama K** (2005) Macular abnormalities and optic disk anomaly associated with a new PAX2 missense mutation. Am J Ophthalmol 139:203-5

94 **Schimmenti LA, Manligas GS, Sieving PA** (2003) Optic nerve dysplasia and renal insuffiziency in a afamily with a novel PAX2 mutation, Arg155X: further ophthalmologic delineation of the renal-coloboma syndrome. Ophthalmic Genet 24:191-202

95 **Narahara K, Baker E, Ito S, Yokoyama Y, Yu S, Hewitt D, Sutherland GR, Eccles MR, Richards RI** (1997) Localistaion of a 10q breakpoint within the PAX2 gene in a patient with a de novo t(10;13) translocation and optic nerve coloboma-renal disease. J Med Genet 34:213-6

96 **Chen R, Amoui M, Zhang ZH, Mardon G** (1997) Dachshund and Eyes Absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in Drosophila. Cell 91:893-903

97 **Kozmik Z, Pfeffer P, Kralova J, Paces J, Paces V, Kalousova A, Cvekl A** (1999) Molecular cloning and expression of the human and mouse homologues of the Drosophila dachshund gene. Dev Genes Evol 209:537-45

98 **Davis RJ, Shen W, Sandler YI, Amoui M, Purcell P, Maas R, Ou CN, Vogel H, Beaudet AL, Mardon G** (2001) Dach1 mutant mice bear no gross abnormalities in eye, limb and brain development and exhibit postnatal lethality. Mol Cell Biol 21:1484-90

99 **Strachan T, Read AP** (eds.) (1996) Human molecular genetics. 1st edition Bios Scientific Publishers

100 **SpliceView** Splice Prediction By Consensus Sequences, WebGene *http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwspliceview.html*

[101] **Santos MAS, Moura G, Massey SE, Tuite MF** (2004) Driving change: The evolution of alternative genetic codes. Trends Genet 20:95-102

[102] **Plotkin JB, Robins H, Levine AJ** (2004) Tissue-specific codon usage and the expression of human genes. Proc Natl Acad Sci 101:12588-91

[103] **Bird AP, Wolffe AP** (1999) Methylation-induced repression - belts, braces and chromatin. Cell 99:451-4

[104] **Zolotukhin S, Potter M, Hauswith WW, Guy J, Muzycska N** (1996) A „humanized“ green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. J Virol 70:4646-54

[105] **Wells KD, Foster JA, Moore K, Pursel VG, Wall RJ** (1999) Codon optimization, genetic insulation, and an rtTA reporter improve performance of the tetracycline switch. Transgenic Res 8:371-81

[106] **Liljenstrom H, von Heijne G** (1987) Translation Rate Modification by preferential codon usage: Intragenic position effects. J Theor Biol 124:43-55

[107] **Katz L, Burge CB** (2003) Widespread selection for local RNA secondary structure in coding regions of bacterial genes. Genome Res 13:2042-51

[108] **Tanaka K, Watakabe A, Shimura Y** (1994) Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer. Mol Cell Biol 14(2):1347-54

[109] **Cartegni L, Chew SL, Krainer AR** (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet 3:285-98

[110] **Cartegni L, Wang J, Zhengwei Z, Zhang MQ, Krainer AR** (2003) ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. Nucleic Acids Res 31(13):3568-71

[111] **ESEfinder** Release 2.0
http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/index.html

Zusammenfassung

Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege (CAKUT, *congenital anomalies of the kidney and urinary tract*) sind die Hauptursache für die chronische Niereninsuffizienz im Kindes- und Jugendalter und erzwingen regelmäßig nierenersatztherapeutische Maßnahmen. CAKUT treten isoliert, in variabler Kombination oder als Komponente spezifischer Syndome mit Malformationen anderer Organsysteme auf und besitzen häufig einen genetischen Hintergrund. Ein Fehlbildungssysndrom mit renaler und okulärer Manifestation ist das papillo-renale Syndrom (PRS), das durch Mutationen im Nierenentwicklungsgen *PAX-2* verursacht wird. PAX-2 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Regulation von Ureterknospung und Nephroninduktion an den entscheidenden Schritten der Embryonalentwicklung der Niere beteiligt ist.

Aufgrund des extrem variablen Phänotyps von *PAX-2*-Mutationsträgern und des Nachweises einer Mutation in einem non-syndromalen CAKUT-Fall erfolgte durch die vorliegende Untersuchung eine Evaluation der Relevanz von *PAX-2*-Mutationen für die Genese von CAKUT unabhängig vom spezifischen PRS. Im Rahmen der Mutationsanalyse eines unselektierten Kollektives von 135 Kindern mit CAKUT wurden drei neue Mutationen in *PAX-2* identifiziert. Dabei handelt es sich um eine *de novo* komplexe Deletion/Insertion, eine familiäre Spleißstellen-Mutation und eine familiäre aminosäureneutrale Punktmutation. Die von den beiden erstgenannten Mutationen betroffenen Individuen zeigen neben renalen auch okuläre Anomalien und somit alle Charakteristika des PRS. Die neutrale Mutation betrifft einen Patienten und dessen Mutter mit isolierter Harnwegsanomalie. Aufgrund des gesamten genetischen Familienhintergrundes ist trotz des pathogenetischen Potentials der Mutation ein ätiologischer Einfluss auf den Phänotyp als unwahrscheinlich zu erachten.

Insgesamt ergeben sich keine sicheren Hinweise dafür, daß Mutationen in *PAX-2* in relevantem Ausmaß an der Genese von CAKUT-Manifestationen unabhängig vom PRS beteiligt sind. Vielmehr scheinen Sequenzabweichungen meist zur Entwicklung syndrom-typischer Nieren- und Augenfehlbildungen zu führen.

Anhang

PAX-2E-Referenzsequenz

Referenzsequenz *NM_003990* aus der Online-Datenbank des NCBI [82]. Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code. Numerierung nach Sanyanusin *et al.* (1996) [50] und nicht gemäß allgemeiner nomenklatorischer Übereinkünfte. Nach Exon 9 (ab Position 1634) stimmt die Numerierung mit der dort angegebenen aufgrund des Fehlens von Exon 10 in PAX-2E nicht überein.

```
   1  M   D   M   H   C   K   A   D   P   F   S   A   M   H   P   G   H   G
 544 ATG GAT ATG CAC TGC AAA GCA GAC CCC TTC TCC GCG ATG CAC CCA GGG CAC GGG

  19  G   V   N   Q   L   G   G   V   F   V   N   G   R   P   L   P   D   V
 598 GGT GTG AAC CAG CTC GGG GGG GTG TTT GTG AAC GGC CGG CCC CTA CCC GAC GTG

  37  V   R   Q   R   I   V   E   L   A   H   Q   G   V   R   P   C   D   I
 652 GTG AGG CAG CGC ATC GTG GAG CTG GCC CAC CAG GGT GTG CGG CCC TGT GAC ATC

  55  S   R   Q   L   R   V   S   H   G   C   V   S   K   I   L   G   R   Y
 706 TCC CGG CAG CTG CGG GTC AGC CAC GGC TGT GTC AGC AAA ATC CTG GGC AGG TAC

  73  Y   E   T   G   S   I   K   P   G   V   I   G   G   S   K   P   K   V
 760 TAC GAG ACC GGC AGC ATC AAG CCG GGT GTG ATC GGT GGC TCC AAG CCC AAA GTG

  91  A   T   P   K   V   V   D   K   I   A   E   Y   K   R   Q   N   P   T
 814 GCG ACG CCC AAA GTG GTG GAC AAG ATT GCT GAA TAC AAA CGA CAG AAC CCG ACT

 109  M   F   A   W   E   I   R   D   R   L   L   A   E   G   I   C   D   N
 868 ATG TTC GCC TGG GAG ATT CGA GAC CGG CTC CTG GCC GAG GGC ATC TGT GAC AAT

 127  D   T   V   P   S   V   S   S   I   N   R   I   I   R   T   K   V   Q
 922 GAC ACA GTG CCC AGC GTC TCT TCC ATC AAC AGA ATC ATC CGG ACC AAA GTT CAG

 145  Q   P   F   H   P   T   P   D   G   A   G   T   G   V   T   A   P   G
 976 CAG CCT TTC CAC CCA ACG CCG GAT GGG GCT GGG ACA GGA GTG ACC GCC CCT GGC

 163  H   T   I   V   P   S   T   A   S   P   P   V   S   S   A   S   N   D
1030 CAC ACC ATT GTT CCC AGC ACG GCC TCC CCT CCT GTT TCC AGC GCC TCC AAT GAC

 181  P   V   G   S   Y   S   I   N   G   I   L   G   I   P   R   S   N   G
1084 CCA GTG GGA TCC TAC TCC ATC AAT GGG ATC CTG GGG ATT CCT CGC TCC AAT GGT

 199  E   K   R   K   R   D   E   V   E   V   Y   T   D   P   A   H   I   R
1138 GAG AAG AGG AAA CGT GAT GAA GTT GAG GTA TAC ACT GAT CCT GCC CAC ATT AGA

 217  G   G   G   G   L   H   L   V   W   T   L   R   D   V   S   E   G   S
1192 GGA GGT GGA GGT TTG CAT CTG GTC TGG ACT TTA AGA GAT GTG TCT GAG GGC TCA

 235  V   P   N   G   D   S   Q   S   G   V   D   S   L   R   K   H   L   R
1246 GTC CCC AAT GGA GAT TCC CAG AGT GGT GTG GAC AGT TTG CGG AAG CAC TTG CGA

 253  A   D   T   F   T   Q   Q   Q   L   E   A   L   D   R   V   F   E   R
1300 GCT GAC ACC TTC ACC CAG CAG CAG CTG GAA GCT TTG GAT CGG GTC TTT GAG CGT

 271  P   S   Y   P   D   V   F   Q   A   S   E   H   I   K   S   E   Q   G
1354 CCT TCC TAC CCT GAC GTC TTC CAG GCA TCA GAG CAC ATC AAA TCA GAA CAG GGG

 289  N   E   Y   S   L   P   A   L   T   P   G   L   D   E   V   K   S   S
1408 AAC GAG TAC TCC CTC CCA GCC CTG ACC CCT GGG CTT GAT GAA GTC AAG TCG AGT

 307  L   S   A   S   T   N   P   E   L   G   S   N   V   S   G   T   Q   T
1462 CTA TCT GCA TCC ACC AAC CCT GAG CTG GGC AGC AAC GTG TCA GGC ACA CAG ACA

 325  Y   P   V   V   T   G   R   D   M   A   S   T   T   L   P   G   Y   P
1516 TAC CCA GTT GTG ACT GGT CGT GAC ATG GCG AGC ACC ACT CTG CCT GGT TAC CCC

 343  P   H   V   P   P   T   G   Q   G   S   Y   P   T   S   T   L   A   G
1570 CCT CAC GTG CCC CCC ACT GGC CAG GGA AGC TAC CCC ACC TCC ACC CTG GCA GGA

 361  M   V   P   G   S   E   F   S   G   N   P   Y   S   H   P   Q   Y   T
1624 ATG GTG CCT GGG AGC GAG TTC TCC GGC AAC CCG TAC AGC CAC CCC CAG TAC ACG

 379  A   Y   N   E   A   W   R   F   S   N   P   A   L   L   M   P   P   P
1678 GCC TAC AAC GAG GCT TGG AGA TTC AGC AAC CCC GCC TTA CTA ATG CCG CCC CCC

 397  G   P   P   L   P   L   L   P   L   P   M   T   A   T   S   Y   R   G
1732 GGT CCG CCC CTG CCG CTG CTG CCG CTG CCT ATG ACC GCC ACT AGT TAC CGC GGG

415   D   H   I   K   L   Q   A   D   S   F   G   L   H   I   V   P   V   *
1786 GAC CAC ATC AAG CTT CAG GCC GAC AGC TTC GGC CTC CAC ATC GTC CCC GTC TGA
```

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Wechselseitige Induktion von Urnierengang und Blastem..... 11
Abbildung 2.2 Konsequenzen ektoper Ureterknospung 13
Abbildung 2.3 Mutationen in Nierenentwicklungsgenen und CAKUT 13
Abbildung 2.4 GDNF-Regulation und Ureterknospung..... 15
Abbildung 2.5 PAX-2 Transkriptvarianten..... 18
Abbildung 2.6 Lokalisation konservierter Domänen von PAX-2..... 19
Abbildung 2.7 PAX-2 Genaktivität bei verschiedenen Störungen..... 22
Abbildung 3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs..... 28
Abbildung 3.2 Prinzip SSCP-Analyse 33
Abbildung 4.1 SSCP-Analyse und Sequenzierung von M2 43
Abbildung 4.2 Auswirkung der Deletion/Insertion auf mRNA-Ebene 44
Abbildung 4.3 SSCP-Analyse und Sequenzierung von V8 45
Abbildung 4.4 SSCP-Analyse und Sequenzierung von S26..... 46
Abbildung 4.5 SSCP-Analyse und Sequenzierungen von Exon 8 48
Abbildung 4.6 SSCP-Analyse und Sequenzierung Exon 12..... 50
Abbildung 5.1 Auswirkungen von 764del20ins2 auf Aminosäurenebene 55
Abbildung 5.2 Stammbaum der Familie von M2..... 57
Abbildung 5.3 Sequenzmerkmale an Intron-Exon-Grenzen..... 59
Abbildung 5.4 Skipping von Exon 4 60
Abbildung 5.5 Exonisches Spleißen von Exon 4 61
Abbildung 5.6 Stammbaum der Familie von V8 62
Abbildung 5.7 Alternatives Spleißen in Exon 4..... 65
Abbildung 5.8 Stammbaum der Familie von S26 67

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (*angiotensin-converting enzyme*)
AT	Angiotensin II
BMP	*bone morphogenetic protein*
CAKUT	*congenital anomalies of the kidney and urinary tract*
DACH	*dachshund*
ESE	*exon splice enhancer*
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EYA	*eyes absent*
GDNF	*glial cell line-derived neurotrophic factor*
GFR-α	*GDNF family receptor alpha*
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HD	*homeobox domain*
krd	*kidney and retinal defects*
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (*messenger* RNA)
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
OP	Oktapeptidmotiv
PAX	*paired domain homeobox*
PBS	*paired box binding sequence*
PCR	*polymerase chain reaction*
PD	*paired domain*
PRS	Papillo-renales Syndrom
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
SIX	*sine oculis*
SS	Spleißstelle
SSCP	*single-strand conformation polymorphism analysis*
TD	Transaktivierungsdomäne
UTR	*untranslated region*
UV	Ultraviolett
VUR	Vesikoureteraler Reflux
WT	*Wilms´ tumor suppressor gene*

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 Schwester 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 zustandekommen.

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

Meinen Eltern Margarete und Wolfgang Weber und dem Rest der Familie möchte ich dafür danken, daß sie mein Studium ermöglicht haben und daß ich mir jederzeit ihrer Hilfe und Unterstützung bei allen Vorhaben und Plänen sicher sein kann.

Ein ganz besonderer Dank gilt Anne Berger für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und stete Ansprechbarkeit. Nicht nur während des Verfassens dieser Arbeit sondern auch sonst ist sie stets mit offenen Ohren, Augen und Armen für mich da an und so ein nicht zu ersetzender Bestandteil meines Lebens.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tim Frederik Weber
Anschrift	Martinistr. 28, 20251 Hamburg
Geburtsdaten	27. Januar 1977, Hamburg

Schulbildung

1982-1983	Preschool La Jolla, Kalifornien, USA
1983-1987	Grundschule Pinneberg-Thesdorf
1987-1996	Gymnasium Theodor-Heuss-Schule, Pinneberg
Mai 1996	Abitur, Note 2,4

Studium

1998-2005	Medizinstudium an der Universität Hamburg, Gesamtnote 1,6
September 2000	Physikum, Note 1,3
August 2001	1. Staatsexamen, Note 2,0
2002-2003	Medizinstudium an der Universität Zürich
März 2004	2. Staatsexamen, Note 2,0
2004-2005	Praktisches Jahr
Oktober 2005	3. Staatsexamen, Note 1,0
Oktober 2005	Erhalt der Approbation

Beruf

seit November 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 18.11.2006

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig 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 andersweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.