

Aus der Klinik- und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin im
Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. K. Ullrich
Pädiatrische Nephrologie
Leiter: Professor Dr. med. D. E. Müller-Wiefel

***BMP4*-Mutationsanalyse in einer unselektierten Kohorte
von 234 Kindern mit kongenitalen Anomalien der Nieren
und ableitenden Harnwege (CAKUT)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Raphael-Sebastian Schild
aus Rendsburg

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 21.10.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Thaiss

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Schäfer

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	6
2. Einleitung	7
2.1. Kongenitale Anomalien der Niere und des Harntraktes	7
2.1.1. Anlage- und Differenzierungsstörungen	7
2.1.2. Stenosen des harnableitenden Systems	9
2.1.3. Vesikoureteraler Reflux	9
2.1.4. Lage- / Formanomalien und Doppelungsfehlbildungen	10
2.1.5. Anomalien des unteren Harntraktes	10
2.2. Klinische Manifestationen der CAKUT	11
2.3. Pathogenese der CAKUT	11
2.3.1. Die normale Entwicklung der Niere und des Harntraktes	12
2.3.2. Klassische Theorien zur Pathogenese der CAKUT	14
2.3.2.1. Obstruktionstheorie	14
2.3.2.2. Die <i>Budding</i> -Hypothese und der Übergang zur heutigen Sicht	14
2.3.3. Hinweise für gemeinsame genetische Ursachen der CAKUT	16
2.3.4. Molekulare Pathologie und Genetik der CAKUT	17
2.3.4.1. An der Nephrogenese beteiligte Gene	18
2.4. <i>BMP4</i>	21
2.4.1. <i>BMP4</i> als Entwicklungsgen	22
2.4.2. <i>BMP4</i> als Kandidatengen für CAKUT - Funktion in der Nierenentwicklung	22
2.4.2.1. Embryonales Expressionsmuster in der Maus	22
2.4.2.2. <i>bmp4 knockout</i> Mausmodelle	23
2.4.2.3. Wirkung auf Sprossung und Verzweigung des Ureters - <i>in vitro</i> Daten	24
2.4.3. Strukturelle Organisation des <i>BMP4</i> Gens	25
2.4.4. Struktur des Proteins, Reifung und Wirkmechanismus	26
3. Materialien und Methoden	28
3.1. Materialien	28
3.1.1. Geräte	28
3.1.2. Chemikalien	29
3.1.2.1. Polymerasekettenreaktion	29
3.1.2.2. Agarosegel-Elektrophorese	29
3.1.2.3. SSCA	30

3.1.2.4. Sequenzierung.....	30
3.1.3. Software und Datenbanken	31
3.2. Methoden	32
3.2.1. Synthese der Oligonukleotidprimer	32
3.2.2. Polymerasekettenreaktion	33
3.2.2.1. Optimierung der Annealingtemperatur	35
3.2.3. Agarosegel-Elektrophorese	35
3.2.4. Einzelstrangkonnformations-Analyse (<i>Single Strand Conformation Analysis, SSCA</i>)..	36
3.2.5. Enzymatische DNA-Sequenzierung	38
3.2.6. Untersuchung einer Assoziation des Polymorphismus mit dem Phänotyp im Fall-Kontroll-Vergleich	39
3.2.6.1. Ermittlung der Allelfrequenzen aus der Genotypenverteilung	40
3.2.6.2. Prüfung auf Hardy-Weinberg Disäquilibrium	40
3.2.6.3. Pearson χ^2 - Test	41
3.2.7. Untersuchung der Mutationen auf potentielle Alteration des Spleißvorganges.....	43
3.3. Patienten und Kontrollen	45
4. Ergebnisse	46
4.1. Charakterisierung der Patientenkohorte	46
4.2. Homozygote Punktmutation p.N150K (c.450C→G).....	49
4.2.1. Untersuchung auf potentielle Alteration des Spleißvorganges durch c.450C→G.....	51
4.2.2. Phänotyp HD 136.....	51
4.2.3. Untersuchung der Familie des Patienten HD136.....	52
4.3. Synonyme heterozygote Punktmutation c.240G→A (p.P80).....	54
4.3.1. Phänotyp und Familienuntersuchung.....	56
4.3.2. Untersuchung auf potentielle Alteration des Spleißvorganges durch c.240G→A.....	56
4.4. Synonyme heterozygote Punktmutation c.813C→T (p.L271)	57
4.4.1. Phänotyp und Familienuntersuchung.....	58
4.4.2. Untersuchung auf potentielle Alteration des Spleißvorganges durch c.813C→T	59
4.5. Polymorphismus p.V152A (c.455T→C)	60
4.5.1. Statistische Untersuchung des Polymorphismus.....	60
4.5.1.1. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht innerhalb der Gruppen.....	61
4.5.1.2. Assoziation der Allele mit den renalen Phänotypen	61

5. Diskussion.....	63
5.1. Polymorphismus p.V152A in <i>BMP4</i>	63
5.2. Mutationen in <i>BMP4</i>	64
5.2.1. Stumme Mutationen c.240G→A und c.813C→T.....	65
5.2.1.1. Genotypen und mögliche funktionelle Konsequenzen	66
5.2.1.2. Pathogenetische Relevanz der stummen Mutationen.....	66
5.2.2. Mutation p.N150K.....	67
5.2.2.1. Genotyp p.N150K und mögliche funktionelle Folgen für das Protein	67
5.2.2.2. Phänotyp des Mutationsträgers HD136	69
5.2.2.3. <i>DACHI</i> Mutation in der Familie	70
5.2.2.4. Phänotypen und Genotypen in der Familie des Patienten	71
5.2.2.5. Mutation p.N150K als pathogene Mutation in einem oligogenen/polygenen Kontext.....	73
5.2.3. Weitere Missense-Mutationen in <i>BMP4</i>	77
5.2.4. Vergleich der Phänotypen mit dem <i>BMP4</i> -Mausmodell	77
5.3. Zusammenfassende Betrachtung und Konsequenzen aus den Ergebnissen	78
6. Zusammenfassung	79
7. Literaturverzeichnis	80
8. Anhang.....	86
8.1. Verzeichnisse	86
8.1.1. Abkürzungen.....	86
8.1.2. Abbildungen.....	88
8.2. Danksagung	89
8.3. Lebenslauf.....	89
8.4. Eidesstattliche Erklärung.....	91

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die angeborenen Anomalien der Niere und des Harntraktes (*congenital anomalies of the kidney and urinary tract*, CAKUT) stellen die häufigste Ursache für chronisches Nierenversagen bei Säuglingen und Kleinkindern dar. Isolierte CAKUT manifestieren sich meist sporadisch. In einem Teil der Fälle wird jedoch auch bei diesen ein familiäres Auftreten beobachtet. Dies führte zu der Vermutung, dass genetische Faktoren maßgeblich an der Entstehung dieser Fehlbildungen beteiligt sein könnten. Bislang sind wenige Gene identifiziert worden, für die eine Beteiligung an der Pathogenese syndromaler oder isolierter CAKUT nachgewiesen werden konnte. Daneben existieren eine Vielzahl an Kandidatengenen, welche im Tiermodell zu Nierenentwicklungsstörungen führen, bei denen jedoch ihre Relevanz für die humanen CAKUT ungeklärt ist. Hierzu gehört das Gen *BMP4*, dessen Inaktivierung im Mausmodell unter anderem zur Ausbildung eines dem menschlichen CAKUT-Komplex ähnelnden Spektrums an Fehlbildungen führt. Humane Mutationen in *BMP4* sind bislang nur in niedriger Frequenz und mit unklarer pathogenetischer Relevanz bei Patienten mit Neuralrohrdefekten und Hypospadie beschrieben worden.

Ausgehend von der Vermutung, dass Varianten in *BMP4* auch beim Menschen ursächlich an der Pathogenese der CAKUT beteiligt sein könnten, soll mit der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Mutationen oder Polymorphismen in *BMP4* beim Menschen mit dem Auftreten von CAKUT assoziiert sind. Dafür wurden in einer unselektierten Kohorte von 234 pädiatrischen Patienten mit CAKUT die proteinkodierenden Exone und angrenzenden Intronbereiche des *BMP4* Gens mittels SSCP-Analyse und Sequenzierung auf Veränderungen untersucht. Für jede gefundene Variante wurde im Rahmen eines Fall-Kontroll-Vergleiches das Auftreten in einer Kontrollkohorte gesunder Patienten untersucht.

2. Einleitung

Im Folgenden sollen die wesentlichen klinischen und pathogenetischen Aspekte der kongenitalen Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege kurz dargestellt werden. Der Fragestellung der Arbeit entsprechend wird hierbei der Schwerpunkt auf den aktuellen Wissensstand zur Genetik und molekularen Pathologie dieser Fehlbildungen gelegt. Zum Schluss soll auf das hier untersuchte Gen *BMP4* und seine Bedeutung für die Nephrogenese eingegangen werden.

2.1. Kongenitale Anomalien der Niere und des Harntraktes

Angeborene Anomalien der Niere und des Harntraktes (*congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT*) kommen bei etwa 3-6 von 1000 Lebendgeburten vor und stellen die häufigste Ursache für chronisches Nierenversagen bei Säuglingen und Kleinkindern dar (Limwongse *et al.* 1999). Der Begriff fasst eine große Gruppe klinisch sowie morphologisch sehr unterschiedlicher Krankheitsbilder zusammen, die durch das gleichzeitige Auftreten von Anlagestörungen der Niere und des Harntraktes charakterisiert sind. Im engeren Sinne werden dazu die Fehlbildungen des oberen Harntraktes gezählt, für die aufgrund ihres kombinierten und variablen Auftretens beim Menschen und im Tiermodell zum Teil von einer einheitlichen Genese auszugehen ist (Pope *et al.* 1999). Daneben werden auch die Fehlbildungen des unteren Harntraktes zu den CAKUT gerechnet. Im Folgenden sollen die einzelnen Entitäten des CAKUT Komplexes kurz charakterisiert werden.

2.1.1. Anlage- und Differenzierungsstörungen

Zu den Anlage- und Differenzierungsstörungen der Nieren gehören die Agenesie, die Hypoplasie und die verschiedenen Formen der Dysplasie, welche mit oder ohne Entwicklung von Zysten einhergehen können (Limwongse *et al.* 1999; Watkins *et al.* 1999; Woolf 2000; Schärer 2002).

Die Nierenagenesie bezeichnet das komplette Fehlen einer oder beider Nieren. Die einseitige Agenesie hat eine Häufigkeit von etwa 1:500 bis 1:1000 (Woolf 2000). Während letztere häufig asymptomatisch bleibt, führt die bilaterale Agenesie schon intrauterin zum Oligohydramnion und zur Lungenhypoplasie (Potter-Sequenz) und war für lange Zeit mit dem Leben nicht vereinbar. Als Hypoplasie bezeichnet man die Anlage einer zu kleinen Niere. Eine isolierte Hypoplasie geht mit einer verringerten Anzahl normal differenzierter Nephrone einher und verursacht primär meist keine kritische Einschränkung der Nierenfunktion (Watkins *et al.* 1999; Schärer 2002). Sie ist häufig mit einer Dysplasie kombiniert (Hypodysplasie). Der Dysplasie liegt eine Differenzierungsstörung zugrunde, die zu einer qualitativen Veränderung des Nierengewebes führt. Sie geht oft mit der Ausbildung von Zysten einher und führt zu einer variablen Funktionseinschränkung in Abhängigkeit vom Anteil des funktionsfähigen Restparenchyms. Die häufigste und klinisch wichtigste Form ist die multizystische Nierendysplasie (*multicystic dysplastic kidney disease, MCDKD*), welche bei etwa einem von 5000 Kindern vorkommt (Hartman u. Shochat 1989) und sich durch multiple große Zysten, ein nahezu fehlendes, stark dysplastisches Nierenparenchym und eine häufige begleitende Ureteratresie auszeichnet. Die betroffene Niere ist funktionslos. Beidseitiges Auftreten führt meist schon intrauterin zur Potter Sequenz. Der klinische Verlauf und die Therapiebedürftigkeit bei einseitiger multizystischer Dysplasie hängen, ähnlich wie bei den übrigen Dysplasieformen, stark von dem Auftreten begleitender kontralateraler Fehlbildungen ab (Atiyeh *et al.* 1992).

Die polyzystischen Nierenerkrankungen (*polycystic kidney diseases, PKD*) werden, aufgrund ihrer klaren genetischen Ätiologie mit monogenen Vererbungsmustern, nicht zu den CAKUT gerechnet, sollen aber hier dennoch erwähnt werden, da die klinische Abgrenzung von den zystischen Dysplasien nicht immer eindeutig ist. Die Erkrankungen treten immer beidseitig auf. Die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist die häufigste Form und betrifft eines von 800 lebend geborenen Kindern (Wilson 2004). Die Erkrankung führt meist erst im Erwachsenenalter zur Niereninsuffizienz. ADPKD wird durch Mutationen in den Genen *PKD1* oder *PKD2* verursacht (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) ist sehr viel seltener (1:20.000), wird

jedoch fast immer schon innerhalb des ersten Lebensjahres klinisch manifest. Die Erkrankung wird durch Mutationen im PKHD1 Gen verursacht (Ward *et al.* 2002).

2.1.2. Stenosen des harnableitenden Systems

Stenosen der ableitenden Harnwege können als Ureterabgangsstenose, als Uretermündungsstenose oder als infravesikale Stenose auftreten, hier vor allem als posteriore Harnröhrenklappen. Neben der dysplastischen kommt hier die obstruktive Komponente in der Pathogenese der Nierenfunktionsstörung zum Tragen, welche zur Dilatation der Harnwege proximal der Stenose führt. Die begleitende Dysplasie kann primär oder sekundär, durch druckbedingte Parenchymschädigung entstehen. (Harrison *et al.* 1983; Peters *et al.* 1992). Die durch die Harnabflussstörung entstehende Hydronephrose gehört zu den häufigsten pränatal diagnostizierten Harntraktanomalien (Limwongse *et al.* 1999).

2.1.3. Vesikoureteraler Reflux

Ein vesikoureteraler Reflux bezeichnet einen Rückfluss von Harn von der Blase in den Ureter oder bis in das Nierenbecken (vesikoureterorener Reflux). Er kommt mit einer Häufigkeit von 1:50 bis 1:100 vor und wird entweder primär durch eine Insuffizienz des Ventilmechanismus der Uretermündung und Anomalien der distalen Ureterwand, oder sekundär durch eine infravesikale Obstruktion verursacht. Prädisponierende Fehlbildung für einen primären Reflux ist eine Ektopie der Uretermündung, ein sekundärer Reflux kann bei Harnröhrenklappen entstehen. Der vesikoureterale Reflux ist eine häufige Begleiterscheinung anderer Harntraktanomalien und ist in einigen Fällen deren einzige Manifestation. Komplikationen in Form von rezidivierenden aufsteigenden Pyelonephritiden können zur dauerhaften morphologischen Nierenschädigung führen, die früher unter dem Begriff der „Refluxnephropathie“ zusammengefasst wurden, wenngleich es heute naheliegt, auch hier eine primäre, genetisch bedingte Anlagestörung als Ursache anzunehmen (Limwongse *et al.* 1999; Watkins *et al.* 1999; Woolf 2000; Schärer 2002).

2.1.4. Lage- / Formanomalien und Doppelungsfehlbildungen

Die Nierenektomie gehört zu den Lageanomalien und kommt durch einen unvollständigen Aszensus der Niere während des Wachstums des Feten zustande. Man unterscheidet die ungekreuzte von der gekreuzten Ektomie; bei letzterer kreuzt der Ureter der ektopen Niere die Mittellinie. Verschmelzungsanomalien sind häufig mit einer Ektomie kombiniert und entstehen durch Fusion von Teilen der Niere vor dem Aszensus (Hufeisenniere, Kuchenniere). Doppelungsfehlbildungen der Niere (Ren Duplex) sind sehr häufig und bleiben meist asymptomatisch. Der Ureter ist entweder ganz mit betroffen (Ureter duplex) oder vereinigt sich noch vor Einmündung in die Blase (Ureter fissus). Als Minimalvariante besteht lediglich ein dichotomes Nierenbecken. Die Lage- und Formanomalien und die Doppelnieren stellen per se keine krankhaften Veränderungen dar. Für den klinischen Verlauf entscheidend sind begleitende Obstruktionen und/oder Dysplasien (Limwongse *et al.* 1999; Watkins *et al.* 1999; Woolf 2000; Schärer 2002).

2.1.5. Anomalien des unteren Harntraktes

Die Anomalien des unteren Harntraktes sind ebenfalls den CAKUT zuzuordnen. Hierzu gehören neben Anomalien der Blase wie der Blasenektrophie, vor allem die klinisch bedeutsamen Anomalien der männlichen Urethra, wie die bereits oben erwähnten Urethralklappen. Sie führen häufig zu einer kongenitalen Hydronephrose und zeigen oft eine schlechte Prognose in Bezug auf die spätere Nierenfunktion (Anumba *et al.* 2005). Die obstruierenden Veränderungen des unteren Harntraktes sind – ebenso wie die des oberen Harntraktes – häufig mit renaler Dysplasie vergesellschaftet (Stephens *et al.* 1996). Als Ursache kommt hier unter anderem eine durch den intrauterinen Harnaufstau bedingte sekundäre Differenzierungsstörung des Nierenparenchyms in Frage (Harrison *et al.* 1983; Peters *et al.* 1992). Hinweise auf tatsächliche gemeinsame genetische Ursachen sind derzeit noch weit weniger deutlich als dies bei den Anomalien der oberen Harnwege der Fall ist (Limwongse *et al.* 1999; Watkins *et al.* 1999; Woolf 2000; Schärer 2002).

2.2. Klinische Manifestationen der CAKUT

Der klinische Verlauf der CAKUT ist entsprechend dem breiten Spektrum an Fehlbildungen sehr variabel und kann von asymptomatischen Verläufen bis zur schweren Niereninsuffizienz reichen. Zu den häufigeren klinischen Symptomen, die zur Diagnosestellung führen, gehören fieberhafte Harnwegsinfektionen und Enuresis, sowie abdominelle Koliken und eine tastbare Raumforderung bei zystisch vergrößerten Nieren oder Harntransportstörungen (Müller-Wiefel u. Conrad 2000). Letztere werden oft schon intrauterin durch die Sonographie erkannt. Entscheidend für den klinischen Verlauf und die Prognose der Patienten ist immer die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz. Neben der morphologischen bildgebenden Diagnostik steht somit die frühzeitige Überwachung und Erhaltung der Nierenfunktion im Zentrum der Bemühungen von Diagnostik und Therapie (Kemper u. Müller-Wiefel 2001). Das Spektrum der therapeutischen Optionen reicht dabei von den konservativen medikamentösen und chirurgisch rekonstruktiven Therapieformen zum Erhalt der Nierenfunktion bis hin zu den Verfahren der Nierenersatztherapie und der Nierentransplantation nach dem Eintreten einer terminalen Niereninsuffizienz.

2.3. Pathogenese der CAKUT

Zur Entstehung der CAKUT existieren eine Vielzahl von Theorien. Das zum Teil familiäre Muster bei inkompletter Penetranz und variabler Expressivität sowie das syndromale Auftreten führten schon früh zu der Vermutung, dass zumindest einige der CAKUT-Formen gemeinsame genetische Ursachen haben (Pope *et al.* 1999). Vor allem jedoch die Entdeckung essentieller Nierenentwicklungsgene mit Hilfe von Tiermodellen hat diese Annahmen in den letzten Jahren nachhaltig untermauert (Woolf 2000; Vainio u. Lin 2002). Im Folgenden sollen dennoch auch die klassischen Theorien kurz vorgestellt werden, da diese zum Teil noch innerhalb der neueren Konzepte Bestand haben. Da die Kenntnis der normalen Embryologie der Niere und des harnableitenden Systems essentiell für das Verständnis ist, soll diese vorher kurz dargestellt werden.

2.3.1. Die normale Entwicklung der Niere und des Harntraktes

Die definitive menschliche Niere (Nachniere, Metanephros) entwickelt sich aus zwei Systemen, die beide mesodermalen Ursprungs sind: 1) dem metanephrogenen Mesenchym, das im kaudalen Teil des intermediären Mesoderms liegt, und 2) dem primären Ureter oder Nachnierengang, der aus dem Wolff'schen Gang (Urnierengang) entspringt und als tubuloepitheliale Struktur in das metanephrogene Mesenchym einwächst (Abbildung 2.1). Die hierbei ablaufenden wechselseitigen induktiven Prozesse sind wesentlich für die Ausdifferenzierung des Nierenparenchyms. Um den 28. Tag der Embryonalentwicklung beginnt diese Entwicklung mit dem Aussprossen der Ureterknospe aus dem kaudalen Teil des Urnierenganges kurz vor dessen Einmündung in die Kloake (Saxén 1987). Der aus der Ureterknospe hervorgehende primäre Ureter wächst nun nach kraniodorsal in das metanephrogene Blastem ein. Durch Längenwachstum und dichotome Verzweigung (Verzweigungsmorphogenese, *branching morphogenesis*) entstehen aus ihm im weiteren Verlauf die primären und sekundären Nierenkelche, die Sammelrohre sowie deren Verbindungsstücke. Die Spitzen des sich verzweigenden Ureters induzieren dabei von Beginn an im angrenzenden Blastemgewebe die mesenchymal-epitheliale Transformation der nephrogenen Stammzellen, welche die Tubulogenese, den Beginn der Nephronbildung markiert (Abbildung 2.1): Während die noch blinden Enden der Sammelrohre sich zu Ampullen erweitern, verdichtet sich das angrenzende Mesenchym zu kappenförmigen Zellhaufen (*caps*). Innerhalb dieser *caps* entstehen beidseits der Ampullenhäuse wiederum Zellnester, sogenannte prä-tubuläre Aggregate, die im Folgenden eine mesenchymal-epitheliale Differenzierung durchlaufen und die Nierenbläschen, die Vorläufer der Nephrone bilden. Gleichzeitig verzweigt sich das ampulläre Sammelrohrendstück zu zwei kurzen Ästen, den Verbindungsstücken. Aus jedem Nierenbläschen entsteht nun durch Längenwachstum und Differenzierung ein zunächst kommaförmiger, später S-förmiger Tubulus (*s-shaped body*), der Anschluss an das Verbindungsstück des Sammelrohres findet und aus dem sich im Folgenden das Glomerulus sowie proximaler und distaler Tubulus entwickeln. Bis zur Geburt entstehen so durchschnittlich etwa 1.000.000 Nephrone (Vainio u. Lin 2002).

Die Harnblase entsteht aus dem Sinus urogenitalis, dem durch das Urorektalseptum vom Rektum separierten ventralen Anteil der früheren Kloake. Sie ist somit größtenteils entodermalen Ursprungs. Während des Wachstums des Sinus urogenitalis nimmt dieser immer größere Teile des Wolff'schen Ganges und später auch der Ureteren in sich auf, so dass letztere schließlich separate Mündungen bekommen. Gleichzeitig verlagern sich die Ostien der Ureteren nach kranial lateral bis zu ihrem endgültigen Platz im Trigonum vesicae, während die Wolff'schen Gänge kaudal verbleiben und dort in die Urethra münden. Bei der Frau obliterieren sie, beim Mann bringen sie den Ductus deferens sowie Teile der Vesica seminalis hervor (Kapitel nach Saxén 1987; Dressler 2002; Piscione u. Rosenblum 2002; Sariola 2002; Vainio u. Lin 2002; Shah *et al.* 2004).

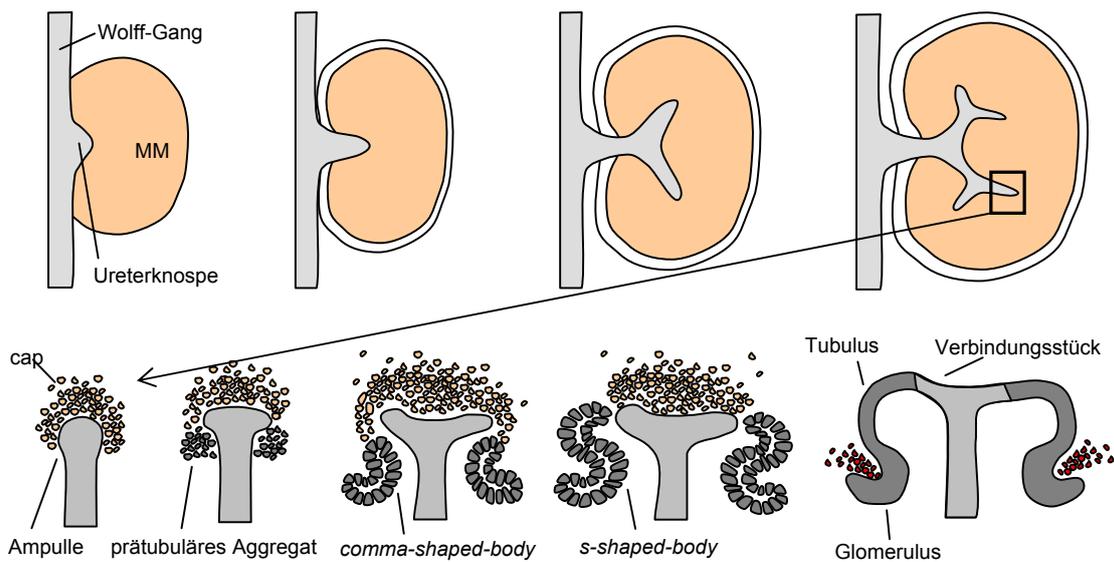


Abbildung 2.1: Uretersprossung, Ureterverzweigung und frühe Tubulogenese. Der primäre Ureter entspringt aus dem Wolff'schen Gang, wächst in das metanephrogene Mesenchym (MM) ein und verzweigt sich (*branching morphogenesis*). An den Spitzen des Ureters kondensiert das Mesenchym, unterläuft eine mesenchymal-epitheliale Transformation und bildet die Vorläufer der Nephronen. Durch Invasion von Gefäßzellen kommt es zur Ausbildung der Glomeruli. *Eigene Abbildung.*

2.3.2. Klassische Theorien zur Pathogenese der CAKUT

2.3.2.1. Obstruktionstheorie

Zu den klassischen Theorien zur Entstehung der CAKUT gehört die Obstruktionstheorie, welche die Dysplasie der Nieren als Folge einer bereits fetal bestehenden Harnwegsobstruktion sieht. Hiernach sind die mit dem resultierenden Harnstau einhergehenden physikalischen Belastungen der Niere und des Ureters Ursache der Dysplasie des Nierengewebes. Dieser Annahme liegt die Beobachtung zugrunde, dass eine künstlich herbeigeführte Obstruktion der Ureteren bei Schafsfeten zur Ausbildung kleiner, zystisch dysplastischer Nieren führt (Harrison *et al.* 1983; Peters *et al.* 1992). Diese Beobachtungen ließen sich auch im Mausmodell bestätigen, welches sich aufgrund der zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossenen Nephrogenese auch für eine postnatale experimentelle Ureterobstruktion eignet (Lange-Sperandio *et al.* 2002). Neben den physikalischen Scherkräften führen bei diesen Mäusen auch Veränderungen der Sekretion von Wachstumsfaktoren sowie eine Infiltration von Makrophagen über eine vermehrte Apoptose zur Parenchymdysplasie. Als mögliche Ursachen einer fetalen Obstruktion beim Menschen werden unter anderem eine Kompression durch Gefäße und eine dadurch bedingte Wachstumsstörung der Ureterwand (Pope *et al.* 1999), lokalisierte Anomalien in der Organisation der Wandmuskulatur mit folgender Störung der Peristaltik und eine fehlerhafte Rekanalisation der physiologischen Obstruktion des Ureters angenommen, welche vor dem Beginn der Urinproduktion in der Niere auftritt (Alcaraz *et al.* 1991). Bei letzterer ist jedoch nicht gesichert, ob es sich um eine echte Obliteration oder lediglich um einen vorübergehenden Kollaps des Ureterlumens nach Ausfall der Urinbildung in der Niere handelt. Ebenso ist es bisher nicht gelungen, eine Korrelation zwischen dem Grad der herbeigeführten Obstruktion und der resultierenden Parenchymveränderungen der Niere experimentell nachzuweisen (Stephens *et al.* 1996).

2.3.2.2. Die *Budding*-Hypothese und der Übergang zur heutigen Sicht

Die Beobachtung einer Korrelation zwischen dem Ort der Uretermündung in die Harnblase, dem Grad der renalen Dysplasie und dem Auftreten anderer Ureteranomalien in

menschlichen Embryonen und Neugeborenen mit Doppelnieren, veranlasste Mackie und Stevens 1975 zur Aufstellung einer Hypothese, welche alle drei Erscheinungen als Folge einer einzigen Ursache sieht: Danach ist eine Ektopie der Ureterknospe sowohl für die Hypoplasie oder Dysplasie verantwortlich, da der Ureter an seiner ektopen Position auf ein nur schwach differenziertes metanephrogenes Mesenchym trifft, als auch für die ektope Mündung des Ureters in die Harnblase: Ein zu weit kranial aus dem Urnierengang entspringender Ureter wird nach Aufnahme des ersteren in die Harnblase eine kaudale Position bekommen, während ein kaudal ektoper Ureter nach Abschluss der Entwicklung kranial-lateral des normalen Ostiums in die Harnblase münden wird (Mackie u. Stephens 1975). Ersteres führt häufig zu einer Obstruktion des distalen Ureters, letzteres eher zu einer Insuffizienz des Ostiums und damit zu einem vesikoureteralen Reflux durch einen gestörten Ventilmechanismus (Abbildung 2.2). Die Harnabflussstörung ist nach dieser Hypothese also nicht Ursache der Dysplasie sondern mit ihr gemeinsam die Folge einer fehlerhaften, d.h. ektopen Aussprossung der Ureterknospe.

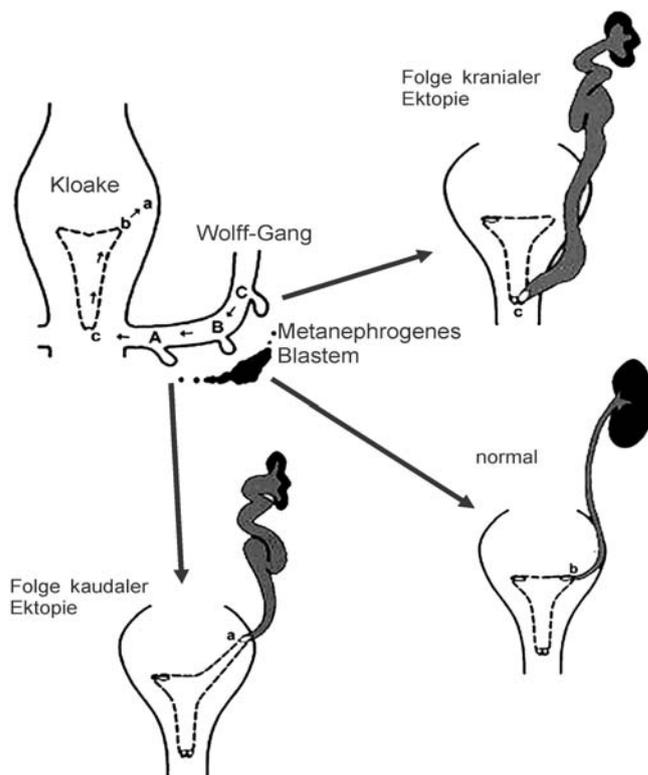


Abbildung 2.2: Die „Budding“-Hypothese.

Ektope Sprossung des Ureters (A, C) führt 1.) zu einer Ektopie der definitiven Uretermündung (a, c) mit konsekutivem Reflux oder Obstruktion sowie 2.) zu einer Dysplasie des Nierengewebes.

Abbildung nach Ichikawa 2002.

Diese Theorie bildet mit ihrem universellen Ansatz noch immer eine der Grundlagen für die heute vorherrschende Sichtweise, nach der Störungen der komplexen Interaktion zwischen dem Ureter und dem metanephrogenen Blastem den zentralen Pathomechanismus für die Entstehung der CAKUT darstellen. Das Verständnis dieser Vorgänge hat sich dabei in den letzten Jahren vor allem durch die Entwicklung genetischer Tiermodelle und die hierdurch möglich gewordene Identifizierung essentieller Nierenentwicklungsgene stark erweitert. Eine Auswahl dieser Gene und der Signalwege an denen sie beteiligt sind soll im folgenden Abschnitt vorgestellt werden. Nachfolgend wird eingehender auf das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen *BMP4* und seine Bedeutung für die Nephrogenese eingegangen.

2.3.3. Hinweise für gemeinsame genetische Ursachen der CAKUT

Isolierte, also nicht-syndromale CAKUT treten in der Regel sporadisch auf. Eine Reihe von Beobachtungen sprechen jedoch für eine gemeinsame Ätiologie und teilweise genetische Determinierung dieser heterogenen Gruppe von Erkrankungen. Zum Ersten treten die Fehlbildungen häufig kombiniert auf. Einseitige Dysplasien und Agenesien beispielsweise gehen häufig mit einem Reflux oder einer Obstruktion auf der kontra- oder ipsilateralen Seite einher (Atiyeh *et al.* 1992; Atiyeh *et al.* 1993). Zum Zweiten wird auch bei den nicht-syndromalen CAKUT-Formen in etwa 10 % der Fälle ein familiäres Auftreten beobachtet (Weber *et al.* 2006), darunter auch typische mendelnde Erbgänge mit variabler Penetranz. Das Auftreten verschiedener CAKUT Entitäten innerhalb eines Stammbaums spricht dabei zudem dafür, dass in diesen Fällen eine gemeinsame genetische Ursache zu verschiedenen Phänotypen des CAKUT Komplexes führen kann (Squiers *et al.* 1987). Neben dem isolierten Vorkommen können Nieren- und Harnwegsfehlbildungen auch im Rahmen von komplexen Fehlbildungssyndromen auftreten, von denen einige klassischen Vererbungsmustern folgen. Von den mittlerweile über 500 bekannten Syndromen mit Beteiligung des Harntraktes seien hier einige genannt, bei denen Harntraktfehlbildungen regelhaft vorkommen und bei denen die auslösenden Gene identifiziert sind (Ichikawa *et al.* 2002; Nakanishi u. Yoshikawa 2003; Schedl 2007). Hierzu gehören das Reno-Kolobom-Syndrom (RCS), das Branchio-Oto-Renale Syndrom

(BOR-Syndrom) sowie das Renale Zysten und Diabetes Syndrom (*Renal Cysts and Diabetes Syndrome, RCAD-Syndrom*). Eine eingehendere Beschreibung dieser Syndrome soll in Kapitel 2.3.4.1 erfolgen. Von den Syndromen abzugrenzen sind Assoziationen von überzufällig häufig miteinander vergesellschafteten Fehlbildungen, die jedoch keine offensichtlich einheitliche Ätiologie haben. Als Beispiel für eine mit Harntraktanomalien einhergehende Assoziation sei hier die VACTERL-Assoziation genannt, welche neben Nierenfehlbildungen mit Fehlbildungen der Wirbelkörper, des Magen-Darm-Traktes (Analatresie, Ösophago-tracheale Fisteln), des Herzens und der Extremitäten (Radiusaplasie) einhergehen kann (Limwongse *et al.* 1999; Schärer 2002).

2.3.4. Molekulare Pathologie und Genetik der CAKUT

Als Ursache der CAKUT werden heute zunehmend Defekte in einem oder mehreren essentiellen Nierenentwicklungsgenen vermutet, die zu einer Störung der reziproken Interaktion zwischen dem Ureter und dem metanephrogenen Mesenchym und deren Abkömmlingen führen (Ichikawa *et al.* 2002; Schedl 2007). Störungen dieser Interaktion können in jedem Abschnitt der Nierenentwicklung auftreten (Abbildung 2.3). Hierbei ist zu erwähnen, dass die frühen Vorgänge der Nierenentwicklung und ihre Beeinträchtigung durch den Funktionsverlust einzelner Gene unter anderem deshalb besser untersucht sind, weil die späteren Ereignisse, wie etwa die Ausdifferenzierung kortikaler und medullärer Sammelrohre, an denen diese Gene möglicherweise ebenfalls beteiligt sind, in vielen Mausmodellen aufgrund der fehlerhaften frühen Schritte überhaupt nicht mehr oder nicht mehr in typischer Weise ablaufen (Piscione u. Rosenblum 2002). Die folgende Auswahl berücksichtigt daher insbesondere diejenigen Gene, deren Produkte in den initialen Schritt der Nierenentwicklung, die Uretersprossung, eingreifen. Erwähnt werden sollen darüber hinaus solche Gene, bei denen humane Mutationen im Zusammenhang mit syndromalen oder isolierten CAKUT beschrieben sind.

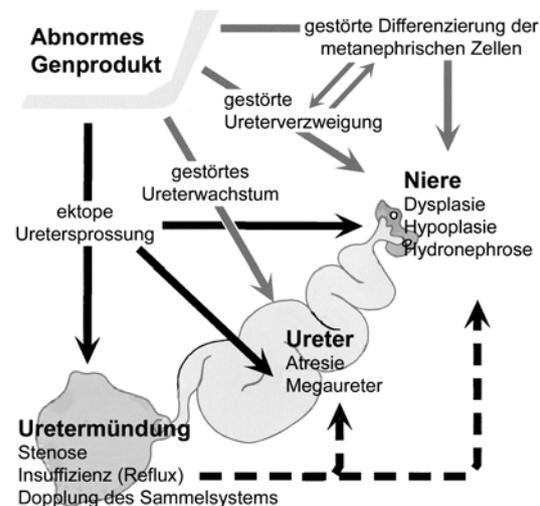


Abbildung 2.3: Modell für die Entstehung verschiedener CAKUT Entitäten aus einem Gendefekt.

Die Fehlentwicklung der Gewebe kann sowohl – entsprechend der „Budding“-Hypothese – durch eine initiale Ureterektomie (schwarze Pfeile), als auch direkt durch das abnorme Genprodukt während der späteren Entwicklungsabschnitte mit verursacht werden (graue Pfeile). Zudem können intrauterine Obstruktion und Reflux sekundäre Differenzierungsstörungen von Ureter und Niere bewirken (gestrichelte Pfeile).

Abbildung modifiziert nach Ichikawa 2002.

2.3.4.1. An der Nephrogenese beteiligte Gene

Es sind bislang über 30 Gene bekannt, deren Inaktivierung im Tiermodell zur Nierenfehlentwicklung führt (Piscione u. Rosenblum 2002; Vainio u. Lin 2002). Diese Nierenentwicklungsgene kodieren für sehr unterschiedliche Klassen von Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Proteoglykane und Hormonrezeptoren. Bei einigen wenigen Genen ist zudem bekannt, dass Mutationen auch beim Menschen zu CAKUT führen, wobei es sich hierbei meist um syndromale Formen handelt (Nakanishi u. Yoshikawa 2003; Schedl 2007). Eine Übersicht dieser Gene gibt Tabelle 2.1.

Bei den komplexen Steuerungsvorgängen während der Uretersprossung und der nachfolgenden Schritte nimmt der *glial-cell-line-derived neurotrophic factor (Gdnf)*, ein peptidischer Wachstumsfaktor aus der TGF- β Familie (Lin *et al.* 1993), eine zentrale Stellung ein. Gdnf wird bei Mäusen im periureteralen metanephrogenen Mesenchym exprimiert, und ist ein essentieller Faktor für die Initiierung der Sprossung und Verzweigung des Ureters (Sainio *et al.* 1997). Bei Mäusen mit einer homozygoten Nullmutation des *gdnf*-Gens oder seiner Rezeptorgene *c-ret* und *gfral* bleibt die Uretersprossung aus. Sie entwickeln eine bilaterale Nierenagenesie (Sanchez *et al.* 1996),

während heterozygote *knock-out* Mäuse hypoplastische Nieren entwickeln, vermutlich als Folge einer verminderten Verzweigung des Ureters (Cullen-McEwen *et al.* 2001).

Viele der weiteren bisher bekannten essentiellen Nierenentwicklungsgene entfalten ihre Wirkung offensichtlich durch direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression oder Wirkung von Gdnf oder seiner Rezeptoren (Abbildung 2.4). Homozygote Deletionen in diesen Genen können bei Mäusen, in Analogie zum *Gdnf* *-/-* Phänotyp, ebenfalls zur bilateralen Nierenagenesie durch fehlerhafte Uretersprossung führen, während Haploinsuffizienz, ähnlich wie bei den dominant vererbten humanen Syndromen, ein breites Spektrum an Nierenfehlbildungen hervorbringen kann. Im Folgenden soll eine Auswahl dieser Gene kurz dargestellt werden, da auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen *BMP4* in diesen Signalweg eingreift. In diese Gruppe gehört Pax2, ein Transkriptionsfaktor der *paired-box* Familie, welcher im metanephrogenen Mesenchym exprimiert wird (Brophy *et al.* 2001). Die homozygote Deletion von *Pax2* führt bei Mäusen zur Agenesie des gesamten Urogenitaltraktes (Torres *et al.* 1995); heterozygote Nullmutation führt zur Entwicklung hypoplastischer oder zystisch-dysplastischer Nieren (Favor *et al.* 1996). Mutationen in *PAX2* sind beim Menschen Ursache des dominant

Gen	Klinisches Syndrom	Renaler Phänotyp	
<i>EYA1</i> <i>SIX1</i>	Branchio-Oto-Renales Syndrom	unilaterale Agenesie, Hypodysplasie, dichotomes Nierenbecken	(Abdelhak <i>et al.</i> 1997; Ruf <i>et al.</i> 2004)
<i>HNF-1β</i> (<i>TCF2</i>)	Renale Zysten und Diabetes Syndrom (RCAD); auch isolierte renale Malformationen	Zysten, zystische Dysplasie, unilaterale Agenesie	(Bingham <i>et al.</i> 2001; Edghill <i>et al.</i> 2006; Uliniski <i>et al.</i> 2006)
<i>PAX2</i>	Reno-Kolobom-Syndrom; auch isolierte renale Malformationen	Hypoplasie, Dysplasie, vesikoureteraler Reflux, Oligomeganephronie	(Sanyanusin <i>et al.</i> 1995; Weber <i>et al.</i> 2006)
<i>SALL1</i>	Townes-Brocks-Syndrom	Hypoplasie, Dysplasie, vesikoureteraler Reflux	(Kohlhase <i>et al.</i> 1998)
<i>WT1</i>	WAGR-Syndrom, Frasier-Syndrom, Denys-Drash-Syndrom, Wilms-Tumor	Ureter-/Urethraanomalien, nephrotisches Syndrom	(Pelletier <i>et al.</i> 1991; Pelletier <i>et al.</i> 1991; Barbaux <i>et al.</i> 1997)

Tabelle 2.1: Gene, in denen Mutationen syndromale CAKUT-Formen beim Menschen verursachen können (Auswahl).

vererbten Reno-Kolobom-Syndroms, welches durch renale Hypoplasie und Dysplasie, vesikoureteralen Reflux, sowie Kolobome des Nervus opticus charakterisiert ist (Sanyanusin *et al.* 1995). In niedriger Frequenz sind *PAX2*-Mutationen zudem bei Patienten mit isolierter renaler Hypodysplasie beschrieben (Nishimoto *et al.* 2001; Weber *et al.* 2006).

Das Eya-Six-Dach-Netzwerk

Ebenfalls vermutlich über eine Transkriptionsaktivierung von *GDNF* wirkt das Genprodukt von *EYA1*, eines Homologen des *eyes-absent* Gens der Drosophila Fliege. Homozygote *eya1*-Nullmutanten entwickeln, analog zum *pax2* *-/-* Phänotyp, eine bilaterale Nierenagenesie (Xu *et al.* 1999). Mutationen in *EYA1* finden sich bei Patienten mit dem autosomal-dominant vererbten Branchio-Oto-Renalen Syndrom (BOR-Syndrom), welches neben Nierenfehlbildungen (Hypodysplasie, dichotomes Nierenbecken, Agenesie) mit Fehlbildungen des ersten und zweiten Kiemenbogens und Defekten des Außen-, Mittel-, und Innenohres einhergeht (Abdelhak *et al.* 1997). *Eya1* entfaltet seine Wirkung offensichtlich nicht direkt über DNA-bindende Motive, sondern wirkt als ein Kofaktor für den Transkriptionsfaktor *Six1*, dessen Gen *SIX1* ein Homologes des Drosophila *sine oculis* (*so*) Gens ist. In Übereinstimmung hiermit können Mutationen in den DNA- oder *Eya1*-Bindungsdomänen von *SIX1* ebenfalls zum BOR-Syndrom führen (Ruf *et al.* 2004).

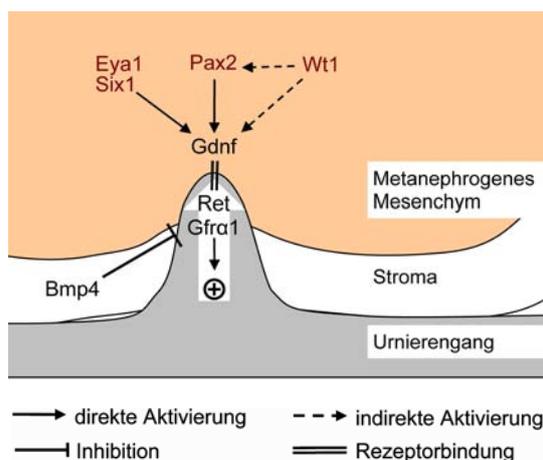


Abbildung 2.4: An der Uretersprossung beteiligte Gene und ihre Interaktion. Die Regulation erfolgt in erster Linie über eine Beeinflussung der Transkription oder Wirkung von *Gdnf*, des zentralen Initiators der Uretersprossung. *Bmp4* wirkt in diesem frühen Stadium als *Gdnf*-Antagonist und verhindert so eine ektope oder zusätzliche Sprossung (s.a. Abbildung 2.5). Transkriptionsfaktoren sind dunkelrot, Wachstumsfaktoren schwarz dargestellt.

Eigene Abbildung.

EYAI und *SIX1* bilden zusammen mit *DACHI* – einem weiteren Kofaktor von *SIX1* – ein regulatorisches Netzwerk von Entwicklungsgenen, welche zueinander teils synergistische, teils antagonistische Wirkung entfalten können (Xu *et al.* 1999; Li *et al.* 2003). *DACHI*, das humane Homologe des *Drosophila dachshund*-Gens, wird ebenfalls in der embryonalen Niere exprimiert. Für *DACHI* sind bislang keine humanen Mutationen beschrieben. Auch die untersuchten murinen *dach1*-Nullmutanten zeigen keine renalen Anomalien (Davis *et al.* 2001). Es ist jedoch bekannt, dass die Expression von *DACHI* in fetalen menschlichen dysplastischen Nieren im Vergleich zu gesunden Nieren herunterreguliert ist (Jain *et al.* 2007). Zudem sind Nierenfehlbildungen bei Patienten mit einer Deletion 13q im Bereich des *DACHI*-Gens beschrieben (Vats *et al.* 2003). Es kann demnach bislang lediglich als Kandidatengen für Nierenfehlbildungen gelten, soll hier jedoch aufgrund der Relevanz für die Diskussion der Ergebnisse kurz erwähnt werden.

2.4. BMP4

Das *bone morphogenetic protein 4* (BMP-4) ist ein sekretorischer Wachstumsfaktor aus der *transforming growth factor β* (TGF- β) Familie, einer großen Gruppe strukturverwandter autokrin und parakrin wirkender sekretorischer Signalmoleküle. BMPs wirken auf diverse biologische Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung ein und sind hierdurch an der Steuerung der Embryogenese, von der Differenzierung der Keimblätter, in erster Linie der Induktion des Mesoderms, bis zur Morphogenese nahezu aller Organsysteme beteiligt (Hogan 1996). Sie wurden zuerst über ihre Fähigkeit entdeckt, *in vitro* zu ektopter Knochenneubildung zu führen (Wozney *et al.* 1988). Die sehr seltene *Fibrodysplasia ossificans progressiva*, welche mit ektopter Knochenbildung einhergeht ist mit der Überexpression von BMP-4 assoziiert (Shafritz *et al.* 1996). Die Ursache wird in einer gestörten BMP-4 Signaltransduktion vermutet, kausale Mutationen in BMP-4, oder an seinem Signalweg beteiligter Gene, sind bislang jedoch nicht beschrieben (Kaplan *et al.* 2006). Darüber hinaus wird für zahlreiche weitere Gruppen von Erkrankungen, wie Tumorerkrankungen, Knochenstoffwechselstörungen und Gefäßerkrankungen eine pathogenetische Rolle der BMPs angenommen (Chen *et al.*

2004). Im Folgenden soll – entsprechend der Fragestellung der vorliegenden Arbeit - in erster Linie die Rolle von *BMP4* als Entwicklungsgen und speziell seine Rolle in der Entwicklung der Nieren beleuchtet werden, welche es zu einem Kandidatengen für die Entwicklung der humanen CAKUT macht. Hierzu soll zunächst der aktuelle Wissensstand über die Funktion von BMP-4 auf zellulärer Ebene und auf der Ebene des Organismus dargestellt werden. In den darauf folgenden Abschnitten wird genauer auf die Struktur und Organisation des *BMP4* Gens, sowie auf den Aufbau, die Prozessierung und die biochemische Wirkungsentfaltung des Proteins eingegangen.

2.4.1. *BMP4* als Entwicklungsgen

Bmp4 wird während der Embryogenese weitläufig exprimiert. Homozygote Deletionen bei Mäusen sind letal durch Ausbleiben der Mesodermbildung (Winnier *et al.* 1995). Beobachtungen an heterozygoten Nullmutanten und Modellen mit gewebspezifischer Inaktivierung des *bmp4* Gens sprechen darüber hinaus für zahlreiche Funktionen von *bmp4* während späterer Entwicklungsschritte bis zur Morphogenese vieler Organsysteme. Hierzu gehören in erster Linie das Herz, die Extremitäten, die kraniofazialen Strukturen und die Nieren (Jiao *et al.* 2003; Selever *et al.* 2004; Liu *et al.* 2005). Die Tatsache, dass im Tiermodell sowohl ein Funktionsverlust als auch ein Funktionsgewinn, etwa in Form eines konstitutionell aktiven *bmp-4* Rezeptors oder Verlust eines Antagonisten, zu Fehlbildungen führen kann, spricht hierbei für die Notwendigkeit einer genauen zeitlichen und örtlichen Regulation der *bmp4*-Dosis für eine ungestörte Entwicklung dieser Organsysteme (Brunet *et al.* 1998; Hu *et al.* 2003).

2.4.2. *BMP4* als Kandidatengen für CAKUT - Funktion in der Nierenentwicklung

2.4.2.1. Embryonales Expressionsmuster in der Maus

Bmp4 und seine Rezeptoren zeigen in den Nieren gesunder Mäuse ein charakteristisches zeitliches und örtliches Expressionsmuster. Im Stadium der Uretersprossung wird *bmp4* im Mesenchym exprimiert, welches den Wolff'schen Gang umgibt, jedoch nicht am Ort der

Sprossung selbst (Abbildung 2.5). In der Folge wird es - analog dazu - im nun entstandenen mesenchymalen Stroma exprimiert, welches den Stamm und die Äste des Ureters umgibt, jedoch nicht an den Spitzen des sich verzweigenden Ureters in der Peripherie des metanephrogenen Mesenchyms (Miyazaki *et al.* 2000; Raatikainen-Ahokas *et al.* 2000). Die bmp4-Rezeptoren Alk-6 und Alk-3 werden im Epithel des Wolff'schen Ganges und des Ureters exprimiert.

2.4.2.2. *bmp4* knockout Mausmodelle

Während Mäuse mit einer homozygoten Nullmutation im *bmp4*-Gen schon intrauterin sterben (Winnier *et al.* 1995), sind heterozygote *bmp4-knockout* Mäuse lebensfähig und zeigen abhängig von ihrem genetischen Hintergrund ein Spektrum charakteristischer Fehlbildungen. Neben Skelettfehlbildungen, Augenfehlbildungen, kraniofazialen Defekten und Anomalien der männlichen Anhangsdrüsen gehören dazu auch dem menschlichen CAKUT-Komplex ähnelnde Anomalien der Nieren und des Harntraktes (Dunn *et al.* 1997). Etwa die Hälfte der Tiere mit heterozygoter *bmp4*-Nullmutation entwickeln makroskopisch erkennbar CAKUT, davon haben etwa 60 % hypoplastische Nieren mit zystisch-dysplastischen Arealen, welche den multizystisch dysplastischen Nieren beim Menschen ähneln. 32 % haben eine Hydroureteronephrose mit kaudaler Ektopie der Uretermündung und bei 8 % bestehen Doppelnieren in Verbindung mit einem Ureter fissus (Miyazaki *et al.* 2000). Histologisch zeigen diese Nieren weniger nephrogene Komponenten wie Kondensate und *s-shaped bodies* und eine reduzierte Länge des Ureters und seiner Zweige. Als mögliche Erklärung für die spätere kaudale Ektopie der Uretermündung zeigen diese Mäuse zudem eine kraniale Ektopie der Ureterknospe. Dies lässt eine Beteiligung von *bmp4* an der Suppression einer ektopen Uretersprossung vermuten. Der bei einem Teil der Tiere vorhandene Ureter fissus entsteht demnach vermutlich durch eine erneute Aussprossung (oder verfrühte Verzweigung) aus dem primären Ureter bei unzureichender Inhibition durch eine zu geringe *bmp4*-Dosis.

Hierfür sprechen auch Beobachtungen an Mäusen mit einer homozygoten Nullmutation des *greml* Gens, eines spezifischen Antagonisten von *bmp4*. Diese entwickeln eine bilaterale Nierenagenesie durch fehlende Uretersprossung und zeigen eine erhöhte

Signalaktivität von *bmp-4* im Bereich der ausbleibenden Uretersprossung (Michos *et al.* 2004). Die Zugabe von exogenem gremlin-1 führt in diesen Nieren *in vitro* zur Uretersprossung und Wiederherstellung des *gdnf*-Signalweges. *Gremlin-1* ermöglicht also die Uretersprossung durch lokale Inhibition der *bmp4* Wirkung (Michos *et al.* 2007).

2.4.2.3. Wirkung auf Sprossung und Verzweigung des Ureters - *in vitro* Daten

Die aus den beobachteten Mausphänotypen abgeleitete Hypothese einer inhibitorischen Wirkung von *bmp4* auf die Sprossung und Verzweigung des Ureters wird durch *in vitro* Untersuchungen untermauert. In der Organkultur führt exogen zugeführtes *bmp4* zu einer Inhibition der Sprossung und Verzweigung bei gleichzeitiger Verstärkung des Längenwachstums des Ureters und seiner Äste (Miyazaki *et al.* 2000; Raatikainen-Ahokas *et al.* 2000; Miyazaki *et al.* 2003; Bush *et al.* 2004). Dabei kommt es gleichzeitig auch zur

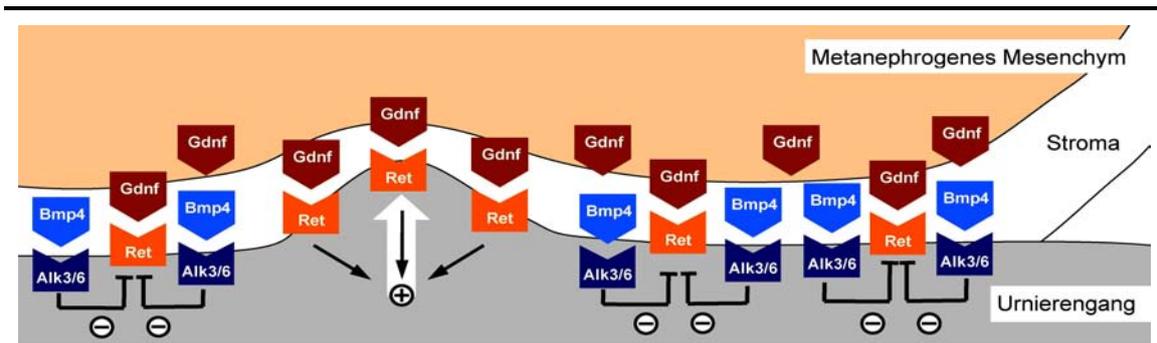
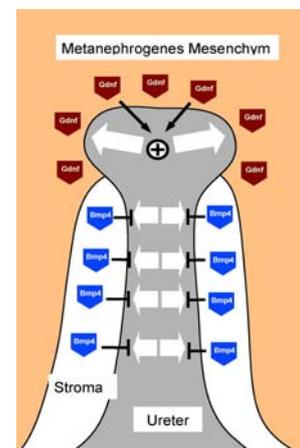


Abbildung 2.5: Regulation der Uretersprossung und Ureterverzweigung durch *Bmp4*. *Gdnf* wird im metanephrogenen Mesenchym weitläufig exprimiert, *Bmp4* jedoch nur an den „ektopen“ Stellen im Stroma um den Urierengang (oben) und den späteren Ureter (rechts). Dort inhibiert es die Wirkung von *Gdnf* und damit eine ektote Sprossung. In Analogie hierzu kommt es zudem zu einer Inhibition der Verzweigung des Ureters im Bereich des Ureterstammes und zu einer Förderung des Längenwachstums.

Eigene Abbildung (rechts) und modifiziert nach Ichikawa *et al.* 2002 und Miyazaki *et al.* 2000 (oben).



Störung der Kondensation des metanephrogenen Mesenchyms an den Ureterspitzen, welche zeitgleich mit der Verzweigung abläuft. Expressionstests zeigen, dass diese Inhibition der Verzweigung mit einer Unterdrückung der Expression von Wnt11, eines Markers für die Sprossung und Verzweigung des Ureters, im Ureterepithel einhergeht. Die Expression von *gdnf* – welcher seine Wirkung unter anderem über eine Stimulation der *wnt11*-Expression entfaltet – bleibt hierbei jedoch unbeeinflusst. Dies lässt den Schluss zu, dass *bmp-4* durch Antagonisierung der *gdnf*-Wirkung die Sprossung und Verzweigung des Ureters unterdrückt (Miyazaki u. Ichikawa 2003). In Verbindung mit dem Expressionsmuster von *bmp-4*, welches eine Aussparung an der Stelle der Uretersprossung zeigt, kann vermutet werden, dass *bmp-4* durch Antagonisierung der *gdnf*-Wirkung eine zusätzliche oder ektope Sprossung des Ureters verhindert (Abbildung 2.5). Dies kann auch als Erklärung für die im *bmp4* $-/+$ Mausmodell beobachtete Ureterektopie dienen.

Aus den Untersuchungen am Mausmodell und in der Organkultur ergibt sich bislang zwar kein lückenloses Modell über die Entstehung des renalen Phänotyps in diesen Tieren. Es zeigen sich jedoch deutliche Hinweise, dass *bmp4* während verschiedener Stadien der Nephrogenese zahlreiche Funktionen erfüllt, von der Inhibition einer ektope Uretersprossung durch Antagonisierung der Wirkung von Gdnf über die Regulation der Verzweigungsmorphogenese bis hin zur Differenzierung des metanephrogenen Mesenchyms. Interessanterweise kann dabei sowohl ein Funktionsverlust des *bmp4* Gens, als auch ein Funktionsgewinn in Form eines konstitutionell aktiven *bmp4*-Rezeptors (Alk-3) im Mausmodell zur Entwicklung eines renalen Phänotyps führen (Hu *et al.* 2003). Dies unterstreicht die Hypothese, dass eine genaue örtliche und zeitliche Regulation der Expression von *bmp4* essentiell für eine normale Nephrogenese ist.

2.4.3. Strukturelle Organisation des *BMP4* Gens

Das Gen *BMP4* liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 14 an Position 14q22- q23 und umspannt auf genomischer Ebene etwa 7 kb (van den Wijngaard *et al.* 1995). Es liegt auf dem Minusstrang und besteht aus 5 Exonen welche durch alternatives Spleißen zur Entstehung von drei verschiedenen Transkriptvarianten führen. Variante 1 besteht aus den Exonen 1, 3, 4 und 5, Variante 3 aus den Exonen 2, 3, 4 und 5 (van den Wijngaard *et al.*

1996). Variante 2 ähnelt der ersten, besitzt jedoch eine abweichende Spleißakzeptorstelle an Exon 1. Die kodierende Sequenz (*coding sequence, CDS*) setzt sich aus Teilen der Exone 4 und 5 zusammen und ist für alle Transkriptvarianten identisch (Abbildung 2.6). *BMP4* ist ein naher Verwandter des *decapentaplegic (dpp)* Gens der Drosophila Fliege und damit über eine weite Strecke evolutionär konserviert. Weitere orthologe Gene anderer Spezies sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

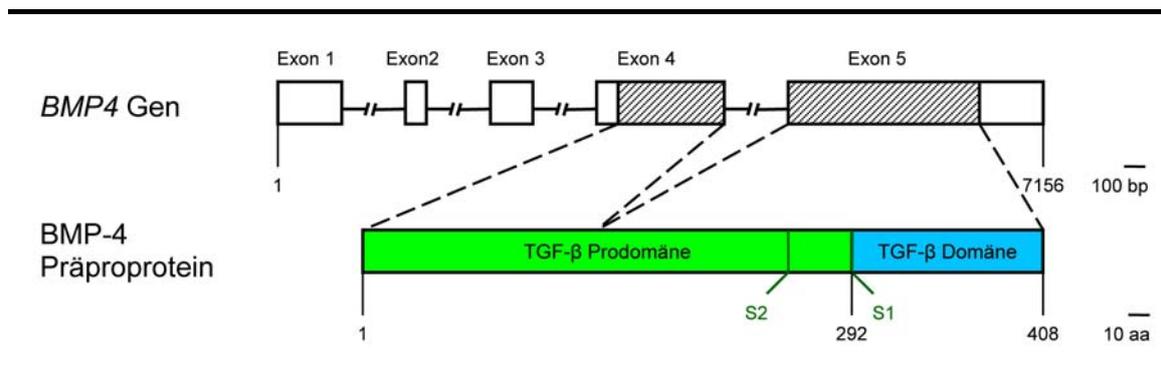


Abbildung 2.6: Genomische Organisation des *BMP4* Gens und Aufbau des Präproteins. Exon 1 und 2 werden im Primärtranskript alternativ verwendet (nicht dargestellt). Die Sequenz des resultierenden Präproproteins ist für alle Transkriptvarianten identisch. An den Positionen S1 und S2 erfolgt die sequentielle Spaltung im Rahmen der Proteinreifung.

Mensch	Pavian	Kuh	Fledermaus	Maus	Ratte	Huhn	Zebrafisch
100%	99.5%	98.0%	97.8%	97.1%	96.3%	83.3%	71.1%

Tabelle 2.2: Orthologe Gene des humanen *BMP4*. Dargestellt ist die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz (Katoh u. Katoh 2005)

2.4.4. Struktur des Proteins, Reifung und Wirkmechanismus

Das Gen *BMP4* kodiert für ein 408 Aminosäuren langes Protein, welches – wie alle Mitglieder der TGF- β Familie – zunächst als inaktives Vorläufermolekül synthetisiert wird (Aono *et al.* 1995). Im Rahmen eines Reifungsprozesses erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum die Dimerisation der evolutionär hochkonservierten, carboxyterminalen Domänen (TGF- β Domänen) und die proteolytische Abspaltung der großen vorgelagerten Prodomänen im Bereich einer ersten Konsensussequenz (S1; Abbildung 2.6). Die so

entstandenen Homodimere aus den TGF- β Domänen stellen die aktive Form von BMP-4 dar, bleiben jedoch zunächst kovalent an die Prodomänen gebunden. Erst nach erneuter proteolytischer Spaltung im Bereich einer zweiten Konsensussequenz (S2) innerhalb der Prodomäne werden die aktiven Homodimere von der Prodomäne getrennt (Cui *et al.* 1998; Constam u. Robertson 1999). Bleibt diese zweite Spaltung aus, so kommt es zur verstärkten lysosomalen Degradation und somit zur starken Reduktion der Wirksamkeit von BMP-4. Letzteres wird als ein möglicher Mechanismus für eine gewebespezifische Regulation der BMP-4 Wirkung gesehen.

BMP-4 entfaltet seine zelluläre Wirkung über die Bindung an Komplexe aus zwei verschiedenen Typen von Serin-/Threoninkinaserezeptoren (Typ I und Typ II), welche durch gegenseitige Phosphorylierung zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade führen (Attisano u. Wrana 2002). Einige BMPs zeigen untereinander eine Redundanz bezüglich ihrer Wirkung (Oxburgh *et al.* 2005), zudem kann derselbe Ligand durch Bindung an verschiedene Rezeptorkomplexe gewebsspezifisch unterschiedliche intrazelluläre Wirkungen erzielen (Derynck u. Zhang 2003). BMP-4 wirkt vor allem über die Typ I-Rezeptoren Alk-3 und Alk-6 (*activin receptor-like kinase*).

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Elektrophoresekammern:	Mini-Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA Multiphor II Electrophoresis System; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Geldokumentation:	Gel Doc; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Kühlgerät:	Multi Temp III; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Laborwaage:	Kern und Sohn GmbH, Balingen
Magnetrührer:	IKA–Combimag RCO; IKA Werke, Staufen
Mikrowelle:	R 212D; Sharp
Schüttelgeräte:	Celloshake Variospeed; Biotec Fischer, Reiskirchen Polymax 2040; Heidolph, München
Spannungsquellen:	Electrophoresis Power Supply EPS 3500; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden Power Supply EPS 1001; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Thermocycler:	My Cycler; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Trockengerät:	Gel Dryer Model 583; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA

Vortex Mixer: Reax Top; Heidolph, München

Zentrifuge: Mini Centrifuge; VWR International, Darmstadt

Centrifuge 5402; Eppendorf, Hamburg

3.1.2. Chemikalien

3.1.2.1. Polymerasekettenreaktion

Wasser: Aqua ad injectabilia; Braun, Melsungen

Dimethylsulfoxid: DMSO; Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande

Mononukleotide: dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 100 mM; Sigma, München

Polymerase: Taq DNA Polymerase; Sigma, München

Puffer: 10X PCR-Buffer; Sigma, München

3.1.2.2. Agarosegel-Elektrophorese

Agarose: Agarose Ultra Pure; Life Technologies, Paisley, Schottland

Borsäure: Borsäure; Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ethidiumbromid: Ethidiumbromid; Sigma, München

Ficoll: Ficoll, Typ 400; Sigma, München

Tris-Puffer: Tris Pufferan; Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Xylencyanol: Xylencyanol, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

3.1.2.3. SSCA

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

3.1.2.4. Sequenzierung

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

3.1.3. Software und Datenbanken

Geldokumentation:	Quantity One 1-D Analysis Software; Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Sequenzierung:	Chromas (Version 1.45); Griffith University, Southport, Australien Sequence Pilot (Version 2.1); JSI Medical Systems GmbH, Kippenheim
Primerdesign:	Primer3; Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA; http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Statistiksoftware:	Microsoft Excel; Microsoft Corporation, Redmond, USA SPSS 11.0 ; SPSS GmbH, München
Datenbanken:	NCBI (National Center for Biotechnology Information); http://www.ncbi.nlm.nih.gov ENSEMBL; http://www.ensembl.org OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM
Sequenzanalysesoftware	ESE-Finder: http://rulai.cshl.edu/cgi- bin/tools/ESE3/esefinder.cgi RESCUE-ESE: http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/

3.2. Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurde die DNA von 234 Patienten mit Fehlbildungen der Niere und ableitenden Harnwege auf Veränderungen in den proteinkodierenden Abschnitten des *BMP4*-Gens untersucht. Hierzu wurden zunächst aus peripher venösem EDTA-Blut die DNA extrahiert und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion die entsprechenden Sequenzen amplifiziert. Die Amplifikate wurden anschließend durch eine Einzelstrangkonnformations-Analyse (*single-strand conformation analysis, SSCA*) auf Sequenzvariationen hin untersucht. Fanden sich hierbei Auffälligkeiten, so wurde eine Sequenzierung des entsprechenden Abschnittes angeschlossen. Bestätigte sich hierdurch der Verdacht einer Mutation, wurde – wenn möglich – eine genetische Untersuchung der Familie angeschlossen und eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation des Patienten und der Familienmitglieder erstellt. Zusätzlich wurde jeweils eine Kontrollgruppe von Patienten ohne Nierenerkrankung in dem betroffenen Exonabschnitt auf das Vorkommen entsprechender Veränderungen untersucht. Bei Vorliegen eines Polymorphismus wurde für jedes Laufmuster exemplarisch durch Sequenzierung der entsprechende Genotyp ermittelt. Die Auswertung des Polymorphismus erfolgte dann anhand des Laufverhaltens in der SSC-Analyse. Um Hinweise auf eine mögliche pathogenetische Relevanz zu erhalten, wurden die Allelfrequenzen mit denen in der Kontrollkohorte verglichen und beide Gruppen auf eine mögliche Selektion eines bestimmten Genotyps untersucht.

3.2.1. Synthese der Oligonukleotidprimer

Für die Auswahl der Primer wurde die *coding sequence* (CDS) der Transkriptvariante 1 des *BMP4*-Gens mit einem *basic local alignment search tool* (BLAST) gegen das humane Chromosom 14 (GenBank Referenzsequenz: NT 026437) abgeglichen, um die Exongrenzen zu ermitteln (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die Primer wurden mit dem Programm Primer3 entworfen (Rozen u. Skaletsky 2000; http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Die Primer wurden dabei so gewählt, dass die kodierenden Exone (Exon 4 und 5) des *BMP4*-Gens mitsamt der exonnahen Intronbereiche zur Beurteilung der Spleißstellen erfasst wurden (Tabelle 3.1). Wo notwendig, wurden die

Primer	Sequenz	Länge (bp)	T _a (°C)	Länge des PCR-Produktes (bp)
4A forward	5'-CCTCTAGCCAGTCCCACCAG-3'	20	62	260
4A reverse	5'-GGACTTCGAGGCGACACTT-3'	19		
4B forward	5'-ATGACGGCACTCTTGCTAGG-3'	20	60	290
4B reverse	5'-TGGTGTATTATTATTCTTTAACCTTC-3'	26		
5A forward	5'-GGTGTGTATATCTGTCTATCCTCAAG-3'	26	61	264
5A reverse	5'-CTTCTACTGCCATGGGGACT-3'	20		
5B forward	5'-AGTTGAGGTGGTCAGCCAGT-3'	20	55	283
5B reverse	5'-TCGTTACCTCAAGGGAGTGG-3'	20		
5C forward	5'-CATCATGGCCAAAGGTGAC-3'	19	65	289
5C reverse	5'-GTTATGAAGCCCCAGCAG-3'	19		
5D forward	5'-TCCAGTAGTCGTGTGATGAGG-3'	21	56	265
5D reverse	5'-TTCTTTTCCCCTCCTTCC-3'	20		

Tabelle 3.1: Zur Amplifikation verwendete Primer. Angegeben sind auch die Annealingtemperaturen T_a und die Länge der resultierenden Amplifikate.

Exone in mehrere Abschnitte aufgeteilt, um Amplifikate von über 300 Basenpaaren Länge zu vermeiden, da in diesen Fällen die Sensitivität der SSCP-Elektrophorese sinkt.

3.2.2. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Vervielfältigung definierter DNA-Sequenzen *in vitro* (Saiki *et al.* 1985). Mit ihr ist es möglich, aus einer sehr großen Ausgangssequenz, wie in diesem Fall der gesamten genomischen DNA, eine spezifische Zielsequenz selektiv zu amplifizieren. In einem Ansatz werden die zu kopierende DNA (*template-DNA*), eine thermostabile Polymerase, Mononukleotide sowie zwei zu den 3'-Enden der Zielsequenz komplementäre Oligonukleotid-Primer in einer Pufferlösung inkubiert. Die Reaktion besteht dabei aus drei sich zyklisch wiederholenden temperaturabhängigen Schritten: Im ersten, dem Denaturierungsschritt werden die Ansätze auf 93-95°C erhitzt, wobei die DNA-Doppelstränge getrennt werden. Im zweiten, dem Annealingschritt, hybridisieren die im Überschuss vorhandenen Primer mit der *template-DNA*. Die hierfür optimale Temperatur ist von der Primersequenz abhängig und liegt meist zwischen 50 °C und 70 °C. Der letzte

Schritt, der Elongationsschritt, wird bei 70-75°C, im Bereich des Temperaturoptimums der verwendeten Polymerase, durchgeführt. Hierbei werden diejenigen Primer, die an einen Strang der *template-DNA* gebunden haben, durch die Polymerase verlängert, wobei die *template-DNA* als Matrize dient. Die nun zum Doppelstrang vervollständigten Abschnitte dienen im nächsten Schritt wiederum als Matrize für die Polymerase. Im Idealfall verdoppelt sich so die Anzahl der Amplifikate der Zielsequenz mit jedem Reaktionszyklus. Möglich wird diese Reaktion durch die Verwendung einer hitzestabilen Polymerase, die durch die hohen Temperaturen während der Denaturierung nicht inaktiviert wird. In diesem Fall wurde hierfür die Taq-Polymerase aus dem in warmen Quellen vorkommenden Bakterium *Thermophilus aquaticus* verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus:

2 µl 10xPCR-Puffer
 2 µl dNTPs
 0,8 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µL)
 0,8 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µL)
 0,2 µl DMSO
 0,16 µl Taq-Polymerase
 5 µl Template-DNA (20 ng/µL)
 ad 20 µl *aqua ad injectabilia*

Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle bestehend aus einem Ansatz ohne DNA mit inkubiert. Die Reaktion wurde automatisiert in einem Thermocycler (MyCycler, BioRad) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	94° C	5 Minuten
36 Zyklen mit je		
1. Denaturierung	94° C	20 Sekunden
2. Annealing	(s.Tab. 3.1)	20 Sekunden
3. Elongation	72° C	20 Sekunden
Terminale Elongation	72° C	7 Minuten

Tabelle 3.2: Protokoll für die Polymerasekettenreaktion.

3.2.2.1. Optimierung der Annealingtemperatur

Die Spezifität und die Ergiebigkeit der PCR sind in großem Ausmaß von der Beschaffenheit der Primer und der gewählten Annealingtemperatur abhängig. Ist diese zu hoch, so sinkt der Anteil der gebundenen Primer während des Annealings und mit ihr der Ertrag der Reaktion. Ist sie zu niedrig, so steigt der Anteil unspezifischer Reaktionsprodukte durch Bindung der Primer an anderer Stelle der *template-DNA*. Die Annealingtemperatur (T_a) sollte um etwa 5°C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegen. Diese lässt sich näherungsweise aus ihrem GC-Gehalt mittels folgender Gleichung berechnen:

$$T_m = (4 \times (G+C)) + (2 \times (A+T))$$

Für die vorliegende Arbeit wurde die optimale Annealingtemperatur T_a für jedes Primerpaar zusätzlich experimentell bestimmt (Tabelle 3.1). Hierfür wurden für jedes Primerpaar Polymerasekettenreaktionen mit Kontrollproben bei verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt und die niedrigste Temperatur ermittelt, bei der noch keine unspezifischen Produkte in Agarosegel-Elektrophorese erkennbar waren.

3.2.3. Agarosegel-Elektrophorese

Von jedem PCR-Produkt wurde zur Überprüfung der Spezifität sowie des Ertrages der Reaktion stichprobenartig eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Die Elektrophorese in einem Agarosegel ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 0,5 kb und 25 kb Länge. Die DNA wird dabei in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt, wobei der Fragmentlängen-Trennbereich in erster Linie von der Agarosekonzentration im Gel abhängt. Für die vorliegende Arbeit wurden, entsprechend der erwarteten Fragmentgrößen von ca. 300 bp, Gele mit 1,3 % Agarose verwendet (0,4 g Agarose, 30 ml 1 x TBE, 4,0 µl Ethidiumbromid). Zur späteren Anfärbung wurde den Gelen Ethidiumbromid zugesetzt. Je 4 µl der Probe wurden mit 2 µl eines Ladepuffers (10% 10 x TBE, 40% Ficoll 400, 0,1% Xylolencyanol, 50% Aqua ad injectabilia) auf ein Agarosegel aufgetragen, und für 20 Minuten bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Banden wurden unter UV-Licht sichtbar

gemacht und die Ergebnisse mit einem Geldokumentationssystem (BioRad, USA) dokumentiert. Zum Ausschluss von unspezifischen Amplifikaten aufgrund von Verunreinigungen des PCR-Ansatzes mit Fremd-DNA wurde zudem eine bei jeder PCR mit inkubierte Negativkontrolle auf das Gel aufgetragen.

3.2.4. Einzelstrangkonnformations-Analyse (*Single Strand Conformation Analysis, SSCA*)

In der Einzelstrangkonnformations-Analyse (*single strand conformation analysis, SSCA*) können Sequenzvariationen in DNA-Abschnitten durch Polyacrylamidgelelektrophorese als Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (*single strand conformation polymorphism, SSCP*) nachgewiesen werden (Orita *et al.* 1989; Markoff *et al.* 1997). Grundlage hierfür ist die Eigenschaft von denaturierter DNA, durch Basenpaarung innerhalb der Einzelstränge sequenzspezifische Sekundärstrukturen auszubilden, welche in der Elektrophorese in einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel ein charakteristisches Laufverhalten zeigen. Schon der Austausch einer einzelnen Base kann so zu einer Konformationsänderung und somit zu einem vom Wildtyp abweichenden Bandenmuster führen (Abbildung 3.1). Die Sensitivität ist dabei von den Untersuchungsbedingungen, dem untersuchten DNA-Abschnitt sowie der Art der Sequenzvariation abhängig und liegt bei 87 - 96 %, wobei heterozygote Punktmutationen mit größerer Zuverlässigkeit erkannt werden als homozygote (Gross *et al.* 1999). Für die SSCA-Elektrophorese wurden 3,5 µl des PCR-Produktes mit dem gleichen Volumen SSCA-Puffer (6 Teile Formamid, 1 Teil Bromphenolblau) gemischt, in einem Thermocycler bei 95°C für 10 Minuten denaturiert und anschließend zur Verhinderung der Renaturierung auf Eis gekühlt. Zuvor wurde ein Polyacrylamidgel (10 %) für 90 Minuten mit Rehydratationspuffer auf einem Schüttler rehydriert und anschließend auf einer dünnen Schicht Ethanol (70%) auf der Keramikplatte der Elektrophoresekammer platziert. Zur Präparation der Gele und der Elektroden wurde das DNA-Disc Buffer Kit PH 8,4 der Firma ETC verwendet. Je 4,7 µl des denaturierten PCR-Produktes wurden in die Taschen

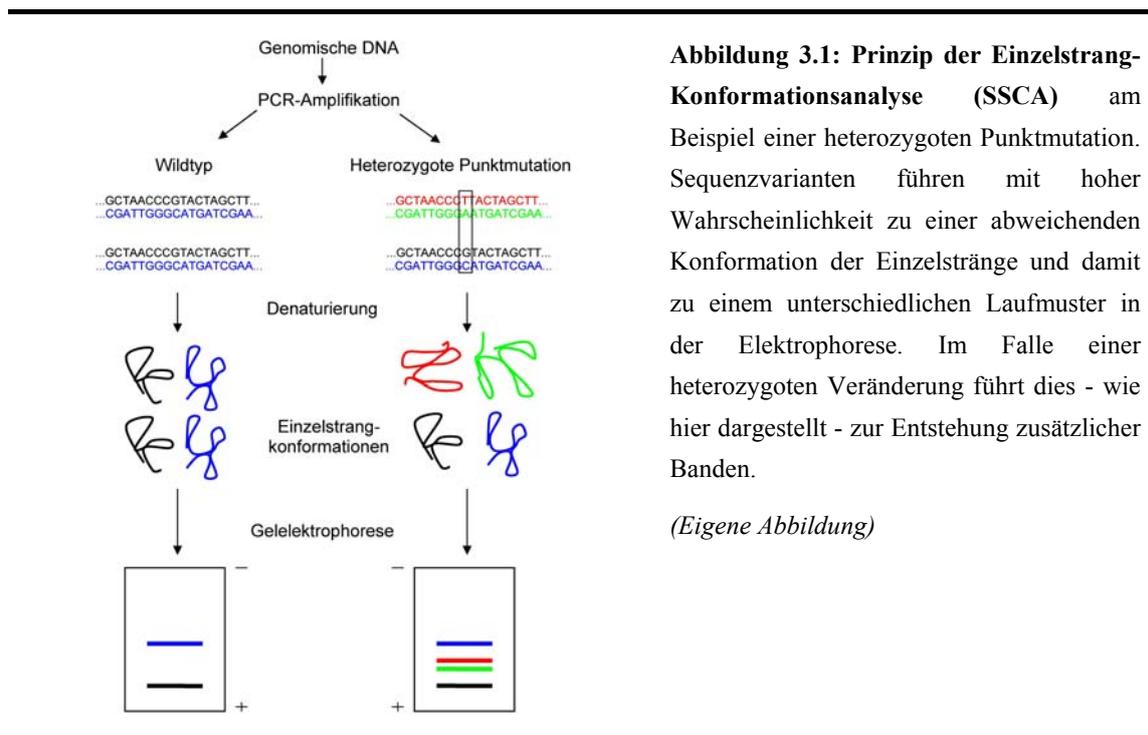


Abbildung 3.1: Prinzip der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA) am Beispiel einer heterozygoten Punktmutation. Sequenzvarianten führen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer abweichenden Konformation der Einzelstränge und damit zu einem unterschiedlichen Laufmuster in der Elektrophorese. Im Falle einer heterozygoten Veränderung führt dies - wie hier dargestellt - zur Entstehung zusätzlicher Banden.

(Eigene Abbildung)

des Gels gegeben. Die Elektrophorese erfolgte zunächst als Vorlauf für 10 Minuten bei 200 V, im Anschluss bei 600 V für 70 Minuten bei 15°C. Bei jedem Lauf wurde zur Überprüfung des Denaturierungsschrittes zusätzlich eine nichtdenaturierte Kontrolle in einer Pufferlösung (10% 10 x TBE, 40% Ficoll 400, 0,1% Bromphenolblau, 50% Aqua ad injectabilia) auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese erfolgte die Anfärbung der Polyacrylamidgele (Protokoll in Tabelle 3.3). Im Anschluß an die Färbung wurden die Gele für 50 Minuten bei 80°C in einem Geltrockner (BioRad, USA) getrocknet. Zur Auswertung wurde das Bandenmuster auf einzelne Abweichungen untersucht und im positiven Fall bei der entsprechenden Probe eine Sequenzierung angeschlossen.

Phase	Substanz/Konzentration	Volumen	Zeit
1. Waschen	Ethanollösung, 10%	0,5 l	5 min
2. Waschen	Salpetersäurelösung, 1%	0,5 l	2 min
3. Anfärbung	Silbernitratlösung, 0,2%	0,5 l	30 min
4. Waschen (2x)	<i>Aqua bidest</i>	<i>ad lib.</i>	
5. Entwicklung	Natriumhydrogencarbonatlsg., 3% + 500µl Formaldehyd	1 l	<i>ad lib.</i>
6. Fixierung	Essigsäurelösung, 10%	0,5 l	10 min

Tabelle 3.3: Protokoll zur Silbernitratfärbung der Polyacrylamidgele.

3.2.5. Enzymatische DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger basiert auf der enzymatischen Vervielfältigung eines DNA-Einzelstranges *in vitro* unter Verwendung von markierten Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP). Diese tragen keine Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom und führen somit beim Einbau in den sich verlängernden Einzelstrang zum Kettenabbruch. Gibt man nun normale Desoxynukleotide im Überschuss in den Reaktionsansatz so kommt es bei der Verlängerung an jeder Position mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zum Einbau eines ddNTP und damit zum Kettenabbruch. Trennt man das erhaltene Gemisch auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel mit einer entsprechenden Auflösung auf, so erhält man für jede Nucleotidposition eine Population an Fragmenten entsprechender Länge, welche mit dem an dieser Position eingebauten ddNTP markiert sind (Sanger *et al.* 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine zyklische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs durchgeführt. Diese erfolgt ähnlich der Polymerasekettenreaktion als zyklische Polymerisation an einer Matrizen-DNA. Durch Verwendung nur eines Primers in einem Ansatz kommt es dabei im Gegensatz zur PCR nur zur linearen Amplifikation eines Einzelstranges. Die Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter ddNTP hat zudem den Vorteil, dass die Reaktion in einem einzigen Ansatz ablaufen kann. Von den zu sequenzierenden Proben wurde zunächst eine erneute unabhängige PCR durchgeführt, um eine Sequenzvariation aufgrund eines fehlerhaften Baseneinbaus während der ersten PCR auszuschließen. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem QIA Quick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend den Protokollen des Herstellers aufgereinigt. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Der Terminationsmix enthielt neben den fluoreszenzmarkierten ddNTP die normalen dNTP sowie eine Amplitaq® DNA-Polymerase. Um die sichere Beurteilung des gesamten DNA-Abschnittes zu gewährleisten, wurden durch Zugabe der entsprechenden Primer von jedem Fragment jeweils beide Einzelstränge sequenziert. Es wurden die schon in Kapitel 3.2.1. definierten Primer verwendet.

Ein Ansatz für die Sequenzierungsreaktion enthielt:

- 3 μ l Aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1 μ l Vorwärts- oder Rückwärts-Primer (10 pmol/ μ l)
- 4 μ l Terminationsmix
- 1 μ l DMSO
- 11 μ l Aqua (HPLC)

Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Nach Gelfiltration der Sequenzierungsprodukte mit dem DYE EX 2.0 Spin Kit (Qiagen GmbH, Hilden) zur Entfernung des überschüssigen Terminationsmixes wurden die Proben auf eine Sequenzierplatte aufgetragen. Die Detektion der Banden erfolgte automatisiert in einem Kapillarsequenzierer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Die Auswertung erfolgte mit der Sequenzierungssoftware Chromas, Version 1.45 (Griffith University, Southport, Australien), sowie Sequence Pilot, Version 2.1 (JSI Medical Systems GmbH, Kippenheim).

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	94° C	45 Sekunden
25 Zyklen mit je		
1. Denaturierung	94° C	30 Sekunden
2. Annealing	57° C	15 Sekunden
3. Elongation	60° C	4 Minuten
Abkühlen der Proben	4° C	∞

Tabelle 3.4: Protokoll für die Sequenzierungsreaktion.

3.2.6. Untersuchung einer Assoziation des Polymorphismus mit dem Phänotyp im Fall-Kontroll-Vergleich

Für die Auswertung des beobachteten Polymorphismus im *BMP4*-Gen wurde nach der SSCA zunächst mindestens von einer Probe jeden Lauftyps exemplarisch eine Sequenzierung durchgeführt, um dem Bandenmuster den entsprechenden Genotyp

zuordnen zu können. Aus den auf diese Weise ermittelten Genotyphäufigkeiten wurden die Allelfrequenzen in der Patienten- und Kontrollgruppe berechnet und miteinander verglichen. Darüberhinaus wurde die Allelfrequenz für beide Gruppen zur Berechnung der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Genotypenverteilung herangezogen. Diese wurde innerhalb der Gruppen jeweils mit der beobachteten Verteilung verglichen, um eine mögliche Selektion eines bestimmten Genotyps innerhalb der Patientengruppe zu erfassen. Zur Prüfung auf Signifikanz der beobachteten Unterschiede wurde jeweils der χ^2 - Test nach Pearson verwendet (Balding 2006).

3.2.6.1. Ermittlung der Allelfrequenzen aus der Genotypenverteilung

Aus der beobachteten Genotypenverteilung lässt sich die Allelfrequenz, die relative Häufigkeit eines Allels in der untersuchten Population, ermitteln. Hierfür wird die absolute Häufigkeit eines Allels, entsprechend der Summe aus der doppelten Anzahl der für das entsprechende Allel homozygoten Individuen und der einfachen Zahl der Heterozygoten, durch die Gesamtanzahl der Allele in der Population dividiert (Gleichung 3.1). Die Allelfrequenz ist demnach gleichzusetzen mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieses Allels am entsprechenden Locus bei einem zufällig ausgewählten Individuum der Population.

3.2.6.2. Prüfung auf Hardy-Weinberg Disäquilibrium

Die Hardy-Weinberg-Gleichung beschreibt die Verteilung von Genotypen in einer Mendel-Population (Mayo 2008). Sie besagt, dass die Allelfrequenzen in jeder Generation

$$p_A = \frac{\text{Anzahl}(AA) \times 2 + \text{Anzahl}(Aa)}{N}$$

Gleichung 3.1: Ermittlung der Allelfrequenzen einer Population aus den Genotypen. p_A = Allelfrequenz für das Allel A, $\text{Anzahl}(AA)$ = Anzahl der für Allel A homozygoten Individuen, $\text{Anzahl}(Aa)$ = Anzahl der für Allel A heterozygoten Individuen, N = Gesamtanzahl der Allele in der Population entsprechend der doppelten Zahl der diploiden Individuen.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Gleichung 3.2: Die Hardy-Weinberg-Gleichung. p und q bezeichnen die Allelfrequenzen. p^2 = Wahrscheinlichkeit für Homozygotie bezüglich des einen Allels, q^2 = Wahrscheinlichkeit für Homozygotie bezüglich des anderen Allels, $2pq$ = Wahrscheinlichkeit für Heterozygotie an dem entsprechenden Locus.

konstant bleiben und die Genotypfrequenzen sich aus den Allelfrequenzen ergeben. Demnach errechnet sich bei bekannten Einzelwahrscheinlichkeiten p bzw. q für das Auftreten zweier Allele an einem autosomalen Locus, die erwartete relative Häufigkeit von Homozygotie für die entsprechenden Allele mit p^2 bzw. q^2 , die Wahrscheinlichkeit für Heterozygotie mit $2pq$. Sind in der Population nur 2 verschiedene Allele vorhanden, gilt $p+q = 1$. Hieraus ergibt sich die Hardy-Weinberg-Gleichung (Gleichung 3.2). Entspricht die Verteilung der Genotypen in einer Population diesen Verhältnissen, so befindet sie sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Äquilibrium). Damit die Regel uneingeschränkt angewendet werden kann, muss die Population die Voraussetzungen für eine Mendel-Population erfüllen. Für diese wird unter anderem gefordert, dass kein Selektionsvorteil für einen der Genotypen besteht. Das Hardy-Weinberg-Gesetz wird hier angewandt, um Hinweise auf einen im Patientenkollektiv bestehenden Selektionsdruck hinsichtlich eines bestimmten Genotyps zu erhalten.

3.2.6.3. Pearson χ^2 - Test

Der χ^2 - Test ist ein statistisches Verfahren zur Überprüfung der Eigenschaften einer Grundgesamtheit anhand einer Stichprobe. Der Test basiert auf dem Vergleich empirisch beobachteter Häufigkeiten mit den nach der jeweiligen Modellvorstellung über die Grundgesamtheit erwarteten Häufigkeiten. Die Unterschiede dieser beiden Häufigkeiten werden quantifiziert und zur Überprüfung der Modellvorstellung (Hypothese) herangezogen. Es gibt verschiedene Formen dieses Tests. Der χ^2 – Test auf Unabhängigkeit wird in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Allelfrequenzen in der Patienten- und Kontrollkohorte auf signifikante Unterschiede zu überprüfen (Assoziationsstudie). Zum anderen wird der χ^2 – Test angewandt, um die beobachtete Genotypverteilung auf eine

Abweichung vom Verteilungsmodell des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes zu überprüfen. Er eignet sich für Stichproben mit höheren Allel-/Genotypfrequenzen. Bei geringen Frequenzen sind andere Methoden, wie etwa Fischers exakter Test zu bevorzugen (Balding 2006).

Der χ^2 – Unabhängigkeitstest überprüft die Unabhängigkeit zweier Merkmale. Grundprinzip ist der Vergleich der beobachteten Häufigkeiten der Merkmalskombinationen mit den bei Unabhängigkeit zu erwartenden Häufigkeiten. Vergleicht man ein Merkmal A mit m Ausprägungen j und ein Merkmal B mit r Ausprägungen k und stellt man die beobachteten absoluten Häufigkeiten der Merkmalskombinationen n_{jk} in einer Kontingenztafel dar, so lassen sich die bei Unabhängigkeit erwarteten absoluten Häufigkeiten n_{jk}^* für jede Merkmalskombination aus den Randsummen der Tafel ermitteln mit: $n_{jk}^* = n_{Aj} \cdot n_{Bk} / n$ (Tabelle 3.5).

	B _{k=1}	B _{k=2}	...	B _r	Σ
A _{j=1}	n ₁₁	n ₁₂	...	n _{1r}	n _{A1}
A _{j=2}	n ₂₁	n ₂₂	...	n _{2r}	n _{A2}
...
A _m	n _{1m}	n _{2m}	...	n _{mr}	n _{Am}
Σ	n _{B1}	n _{B2}		n _{Br}	n

Tabelle 3.5: Kontingenztafel zur Prüfung auf Unabhängigkeit zweier Merkmale mit beliebig vielen Ausprägungen. m = Anzahl der Ausprägungen (j) von Merkmal A; r = Anzahl der Ausprägungen (k) von Merkmal B. Die Randsummen sind mit Σ bezeichnet.

Im Test wird nun eine Prüfgröße V ermittelt, welche die – mit den Erwartungswerten normierten – quadrierten Abweichungen der beobachteten Häufigkeiten von den erwarteten Häufigkeiten $(n_{jk}^* - n_{jk})^2$ aufsummiert, und für die Testentscheidung auf Unabhängigkeit herangezogen wird:

$$V = \sum_{k=1}^r \sum_{j=1}^m \frac{(n_{jk}^* - n_{jk})^2}{n_{jk}^*}$$

Diese Prüfgröße ist bei ausreichend großen Stichproben annähernd χ^2 - verteilt mit (r-1) (m-1) Freiheitsgraden. Die zu testende Hypothese wird wie folgt festgelegt:

Nullhypothese H₀: Merkmal A und B sind voneinander unabhängig

Alternativhypothese H_1 : Merkmal A und B sind nicht voneinander unabhängig.

Aus dem Signifikanzniveau α , d.h. der oberen Grenze für die Wahrscheinlichkeit der fälschlichen Ablehnung der Nullhypothese (Fehler 1. Art), und den Freiheitsgraden der Prüfgröße V ergibt sich nun der kritische Wert zur Testentscheidung als das entsprechende Quantil der χ^2 -Verteilung: $\chi^2_{((r-1)(s-1); 1-\alpha)}$. Ist V größer so wird die Nullhypothese verworfen. Aus V ergibt sich damit auch der p-Wert der Stichprobe, als die Wahrscheinlichkeit, mit der bei zutreffender Nullhypothese das beobachtete oder ein extremeres Ergebnis zu erwarten wäre. Für den Vergleich der Allelfrequenzen ergibt sich in der vorliegenden Arbeit eine Kontingenztafel mit 2 x 2 Feldern (Vierfeldertafel). Die zugehörige Prüfgröße V ist dann χ^2 -verteilt mit einem Freiheitsgrad.

Für die Prüfung auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibriums wird der χ^2 -Verteilungstest verwendet. Die Nullhypothese lautet hier: Die Verteilung befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Entsprechend wird die erwartete Genotypverteilung durch die Hardy-Weinberg-Gleichung berechnet und mit der beobachteten Verteilung verglichen. Bei Vorliegen nur zweier Allele ist die zugehörige Prüfgröße V in diesem Fall χ^2 -verteilt mit einem Freiheitsgrad. Bei einem gewählten Signifikanzniveau von 0,05 ergibt sich für V ein kritischer Wert von 3,84, dem 0,95 Quantil der χ^2 -Verteilung. Ein beobachtetes V von 3,841 entspräche damit einem p-Wert von 0,05. Ein solcher oder höherer Wert für V würde also bei zutreffender Nullhypothese nur in 5 % der Fälle beobachtet werden, das Ergebnis wird als statistisch signifikant angesehen.

3.2.7. Untersuchung der Mutationen auf potentielle Alteration des Spleißvorganges

Stumme Mutationen führen primär nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins. Sie können jedoch zu einer Störung der Spleißvorgänge führen (Spleißmutationen). Die Folgen solcher Mutationen können von subtilen Effekten auf die mRNA-Stabilität bis zur Entstehung funktionell inaktiver Proteine reichen. Auf diese Weise können nicht nur stumme Mutationen funktionelle Relevanz erlangen, auch Missense-Mutationen können auf diese Weise weit größere Auswirkungen haben, als es der Austausch einer einzelnen Aminosäure erwarten ließe. Nach Schätzungen führen bis zu

15 % aller krankheitsverursachenden Punktmutationen zu Veränderungen des Spleißvorganges (Krawczak *et al.* 1992). Zu solchen Spleißmutationen werden klassischerweise Mutationen gezählt, welche eine Spleißstelle inaktivieren und hierdurch zum Überspringen eines Exons führen, oder welche zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle beziehungsweise der direkten Entstehung einer neuen ektopten Spleißstellen führen. Spleißstellen zeichnen sich durch hochkonservierte Konsensussequenzen aus (Padgett *et al.* 1986). Neben der Einführung ektopter Spleißstellen gibt es zudem weitere Möglichkeiten, durch die auch exonische Mutationen Relevanz für den Spleißvorgang erhalten können (Cartegni *et al.* 2002). Zu den für die Erkennung eines Exons durch das Spleißosom essentiellen RNA-Motiven zählen demnach neben den klassischen intronischen Spleiß-Konsensussequenzen auch exonische Motive, welche spezifisch von einer Untergruppe RNA-bindender Spleißfaktoren (Serin-/Argininreiche Proteine, SR-Proteine) erkannt werden, und welche auf diese Weise als Aktivatoren (*exonic splicing enhancers, ESE*) oder Repressoren (*exonic splicing silencers, ESS*) des Spleißvorganges fungieren können (Liu *et al.* 1998). Mutationen innerhalb eines solchen Motivs sind in letzter Zeit für verschiedene Krankheiten, wie etwa die Spinale Muskelatrophie beschrieben und funktionell charakterisiert worden (Cartegni u. Krainer 2002).

Da angenommen wird, dass viele der bislang als funktionell nicht relevant eingestuft stummen Mutationen und Polymorphismen über diesen Mechanismus wirksam sein könnten, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Mutationen auf eine mögliche Beeinflussung eines solchen ESE-Motivs untersucht. Hierfür wurden die von den Mutationen betroffenen Abschnitte der Wildtyp-cDNA mit Hilfe zweier Algorithmen auf das Vorhandensein potentieller ESE-Konsensussequenzen untersucht (Fairbrother *et al.* 2002, RESCUE-ESE: <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>; Cartegni *et al.* 2003; Smith *et al.* 2006, ESE-Finder: http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi). Hierfür wird für jede Position der eingegebenen Suchsequenz ein abstrakter Punktwert (*score*) errechnet, welcher die Ähnlichkeit der eingegebenen Sequenz in diesem Bereich mit den experimentell ermittelten ESE-Konsensussequenzen verschiedener SR-Proteine widerspiegelt. Lagen die Mutationen innerhalb einer potentiellen ESE-Sequenz, so wurde überprüft, ob sich diese Eigenschaften durch Einführung der humanen Mutationen ändern, es also zu einer Unterbrechung des vorhergesagten Spleißverstärkermotivs und damit

potentiell zu einer Störung des Spleißvorganges durch die beobachtete Mutation kommen könnte. Für die Vorhersage potentieller neuer Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstellen wurde ebenfalls ein Algorithmus oben genannter Internetresource verwendet (*ESE-Finder*).

3.3. Patienten und Kontrollen

Eingeschlossen wurden Patienten aus mehreren europäischen pädiatrisch-nephrologischen Zentren, welche dort wegen klinisch manifester kongenitaler Harntraktanomalien behandelt worden waren. Patienten mit isoliertem vesikoureteralem Reflux ohne Nachweis zu Grunde liegender Fehlbildungen wurden erst ab einem Reflux zweiten Grades in die Untersuchung eingeschlossen. Die morphologische Diagnostik erfolgte bei allen Patienten in erster Linie mittels Ultraschall, zur Funktionsdiagnostik wurde in den meisten Fällen neben den üblichen Blut- und Urinuntersuchungen die Nierenszintigraphie eingesetzt. Ein vesikoureteraler Reflux wurde mit der Miktionscystourethrographie (MCU) oder Miktionsurosonographie nachgewiesen. Die Blutentnahme zur DNA-Gewinnung erfolgte nach Aufklärung über die Inhalte und Ziele der Untersuchung und nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten und ihrer Eltern. Für die Untersuchung liegt eine Genehmigung der Ethikkommission Heidelberg vor.

Alle Kontrollen stammten aus einer Kohorte gesunder Individuen ohne bekannte Fehlbildungen der Niere oder Harnwege. Die Kontrollkohorte wurde in ihrer Zusammensetzung bezüglich ihrer Herkunft annähernd an die Patientengruppe angepasst um Stratifikationseffekte bei den Assoziationsuntersuchungen zu verringern. Ein exaktes angleichen (*matching*) war nicht möglich.

4. Ergebnisse

Für die vorliegende Arbeit wurde die DNA von 234 Patienten mit CAKUT auf Sequenzvariationen in allen proteinkodierenden Exonen des *BMP4*-Gens mitsamt der angrenzenden Intronbereiche untersucht. Es wurde dabei bei einem Patienten eine nichtsynonyme Punktmutation, sowie bei zwei Patienten eine synonyme Punktmutation identifiziert. Darüber hinaus wurde ein bereits beschriebener Polymorphismus in Exon 5 bezüglich einer möglichen pathogenetischen Relevanz ausgewertet. Alle Positionsangaben beziehen sich im Folgenden auf die kodierende Sequenz (*CDS*) der *BMP4* cDNA Transkriptvariante 1 (GenBank Referenzsequenz: NM 001202) und das BMP-4 Präproprotein (Referenzsequenz: NP 001193) für die DNA-Ebene und die Proteinebene respektive.

4.1. Charakterisierung der Patientenkohorte

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten handelt es sich um eine unselektierte Kohorte von 234 nicht verwandten Individuen mit klinisch manifesten kongenitalen Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt dieser Untersuchung lag bei 9 ½ Jahren im arithmetischen Mittel, der Median lag bei 9 Jahren. Der älteste Patient war 25 ½ Jahre alt, der jüngste 1 ½ Monate. 75,3 % der Patienten stammte aus Südosteuropa (Türkei, Mazedonien, Serbien und Montenegro), 24,7 % stammten aus Deutschland und Westeuropa (Tabelle 4.1).

Alter (Jahre)	9 ½ (Mittelwert)	9 (Median)	Tabelle 4.1: Zusammen- setzung des Patienten- kollektivs. n bezeichnet jeweils die Anzahl der im entsprechenden Merkmal untersuchten Patienten
Geschlecht	37,9% weiblich	62,1% männlich	
Herkunft (aus einer Kohorte von n=198)	75,3% Südosteuropa	24,7% Westeuropa	
Extrarenale Symptome (aus einer Kohorte von n=184)	18,5%		
Positive Familienanamnese (aus einer Kohorte von n=189)	12,7%		

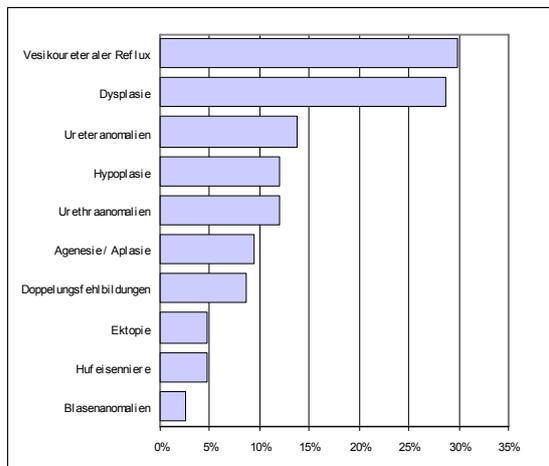


Abbildung 4.1: Renale Phänotypen in der Patientenkohorte. Angaben in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl. Mehrfachzählungen möglich.

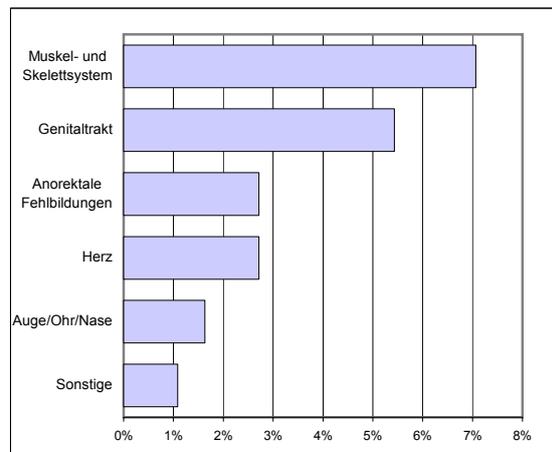


Abbildung 4.2: Extrarenale Malformationen im Patientenkollektiv nach betroffenen Organsystemen. Angaben in Prozent bezogen auf die Anzahl der in Bezug auf das Merkmal informativen Patienten (n=184). Mehrfachzählungen möglich.

Bei 12,7 % der Patienten bestand eine positive Familienanamnese im Hinblick auf angeborene Erkrankungen der Nieren oder des Harntraktes, bei 18,5 % lagen zusätzlich zur renalen Erkrankung auch extrarenale Symptome vor. Zu diesen gehörten vor allem Fehlbildungen an verschiedenen Organen (Abbildung 4.2), welche in einem Teil der Fälle im Rahmen komplexerer Fehlbildungssyndrome oder Assoziationen, wie dem Prune-Belly-Syndrom (8 Individuen) oder der VACTERL-Assoziation (1 Individuum) auftraten. Des Weiteren gehörten hierzu Chromosomenanomalien wie das Ullrich-Turner-Syndrom

Normale GFR	123	(62,8%)
Chronische Niereninsuffizienz (ohne Nierenersatztherapie)	23	(11,7%)
Terminale Niereninsuffizienz (Dialyse oder Transplantation)	50	(25,5%)

Tabelle 4.2: Nierenfunktion im Patientenkollektiv. Angegeben ist die absolute Zahl der Patienten mit klinisch manifester Niereninsuffizienz sowie ihr Anteil an denjenigen mit dokumentierter Nierenfunktion (aus einer Kohorte von n=196).

(2 Individuen). Die renalen Phänotypen des Patientenkollektivs zeigten in Bezug auf Morphologie und klinische Manifestation die gesamte Bandbreite des CAKUT-Komplexes (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.1). Im Durchschnitt entfielen dabei auf jeden Patienten 1,4 renale Diagnosen. Bei 37 % der Patienten bestand zum Zeitpunkt der Untersuchung eine chronische Niereninsuffizienz, bei einem Viertel der Patienten war bereits eine dauerhafte Nierenersatztherapie oder eine Nierentransplantation notwendig geworden. (Tabelle 4.2)

Diagnosen	Gesamt		davon bilateral	
Aplasie/ Agenesie	22	9,4%	-	-
Hypoplasie	28	12,0%	9	32,1%
Dysplasie	64	28,7%	31	48,4%
Dysplasie mit Zysten	10	4,3%	7	57,1%
Dysplasie ohne Zysten	33	14,1%	24	72,7%
Multizystische Dysplasie	23	9,8%	3	13,0%
Oligomeganephronie	1	0,4%	-	-
Ektopie	11	4,7%	3	27,3%
Hufeisenniere	11	4,7%	-	-
Doppelungsfehlbildungen	20	8,6%	4	20,0%
Doppelniere	7	3,0%	2	28,6%
Ureter fissus/ Ureter duplex	13	5,6%	2	15,4%
Ureteranomalien	32	13,7%	4	12,5%
Ureterstenose	22	9,4%	4	18,2%
Megaureter (primär+refluxiv)	4	1,7%	-	-
Ureterektopie	2	0,9%	-	-
Ureterozele	4	1,7%	-	-
Blasenanomalien	6	2,6%	-	-
Urethraanomalien	28	11,9%	-	-
hintere Urethralklappen	23	9,8%	-	-
andere Urethrafehlbildungen	5	2,1%	-	-
Vesikoureteraler Reflux	76	32,5%	37	48,1%

Tabelle 4.3: Nierenfehlbildungen im Patientenkollektiv. Angegeben sind jeweils die absolute Zahl der betroffenen Patienten und ihr Anteil an der Gesamtheit sowie für jede Diagnose die absolute und relative Häufigkeit des bilateralen Auftretens. Mehrfachzählungen möglich.

4.2. Homozygote Punktmutation p.N150K (c.450C→G)

Im Exon 5 des *BMP4*-Gens zeigte sich bei dem Patienten HD136 in der SSCA ein von den anderen Proben abweichendes Bandenmuster (Abbildung 4.3). Die im Anschluß durchgeführte Sequenzierung des entsprechenden Abschnittes zeigte eine homozygote Basensubstitution an Position 450 der cDNA. An dieser Position ist bei dem Patienten im Gegensatz zum Wildtyp die Pyrimidinbase Cytosin durch die Purinbase Guanin ausgetauscht. (Abbildung 4.4). Es handelt sich hierbei um einen Austausch an der dritten Position des Codons *Adenin-Adenin-Cytosin*. Diese Position ist zweifach degeneriert, d.h. es gibt genau eine Möglichkeit für eine synonyme Substitution. Die hier vorliegende Transversion C→G führt in der Aminosäuresequenz zu einem Austausch der polaren ungeladenen Aminosäure Asparagin durch die ebenfalls polare, positiv geladene (basische) Aminosäure Lysin. Der Austausch betrifft beide Allele, es handelt sich also um eine homozygote Sequenzvariation. Da der Träger der Variation aus der Türkei stammt, wurden, um einen möglicherweise nur in dieser Bevölkerungsgruppe häufiger vorkommenden Polymorphismus auszuschließen, in die Kontrollgruppe 50 ebenfalls aus der Türkei stammende Individuen aufgenommen. Die beschriebene Veränderung wurde bei keiner der insgesamt 184 in diesem Exonabschnitt untersuchten Kontrollen gefunden.

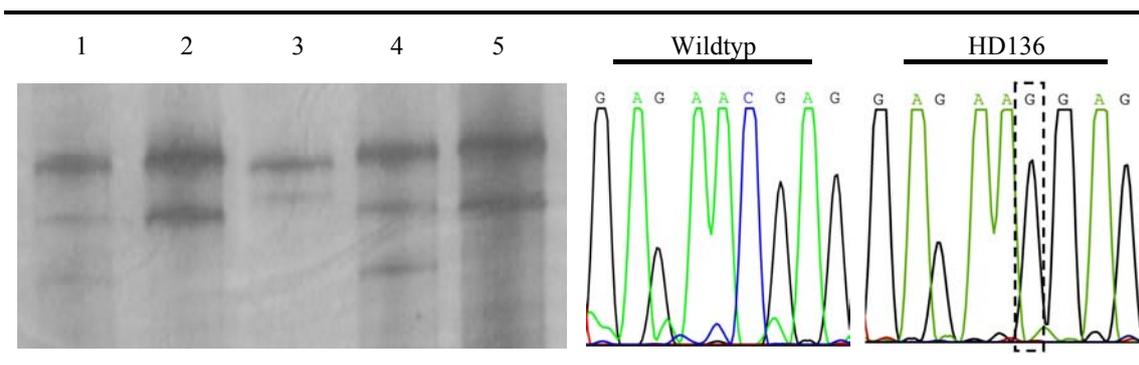


Abbildung 4.3: SSCA von Exon 5 Abschnitt D des *BMP4* Gens des Patienten HD136. Das Bandenmuster (Spalte 3) weicht deutlich von den dargestellten Wildtypen ab (Spalten 1,2,4 und 5). Die unterschiedlichen Laufmuster des Wildtyps werden durch den benachbarten Polymorphismus verursacht.

Abbildung 4.4: Nucleotidsequenz des Patienten HD136 im Bereich der Mutation. An Position 450 der cDNA ist in beiden Allelen die Base Cytosin durch Guanin ersetzt.

Es handelt sich damit um eine homozygote nichtsynonyme Punktmutation. Die Mutation liegt in der, im Gegensatz zum hochkonservierten C-terminalen Bereich des Proteins, weniger stark konservierten Prodomäne von *BMP4* (Abbildung 4.5). Auf die Bedeutung der Domänen und mögliche Folgen der Mutation wird in Abschnitt 5.2.1 näher eingegangen. Ein Homologievergleich der entsprechenden Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies zeigt, dass die entsprechende Aminosäureposition innerhalb der Familie der Säugetiere sowie beim Huhn und Krallenfrosch konserviert ist (Tabelle 4.4). Innerhalb der der humanen BMPs zeigt sich keine Konservierung der entsprechenden Aminosäure; sie ist damit spezifisch für BMP4 (Tabelle 4.5).

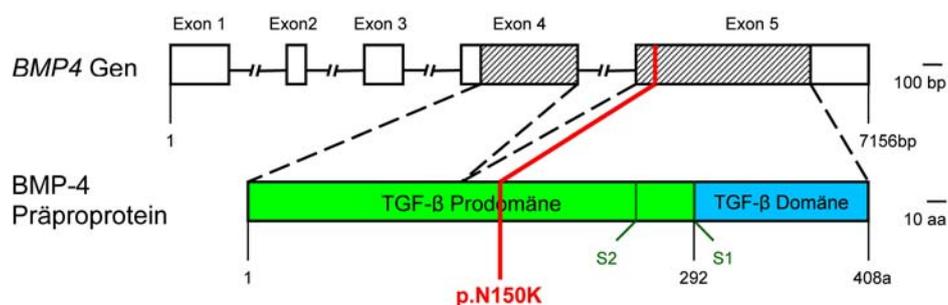


Abbildung 4.5: Position der Mutation p.N150K im *BMP4* Gen und dem Vorläuferprotein. S1 und S2 bezeichnen die Konsensussequenzen für die proteolytische Spaltung im Rahmen der Proteinreifung (*cleavage sites*).

Spezies	Ref.-Seq.	N150K V152A																						
Homo sapiens	NP_001193	F	L	F	N	L	S	S	I	P	E	N	E	V	I	S	S	A	E	L	R	L	F	R
Canis familiaris	XP_547817	F	L	F	N	L	S	S	I	P	E	N	E	V	I	S	S	A	E	L	R	L	F	R
Mus musculus	NP_031580	F	L	F	N	L	S	S	I	P	E	N	E	V	I	S	S	A	E	L	R	L	F	R
R. norvegicus	NP_036959	F	F	F	N	L	S	S	I	P	E	N	E	V	I	S	S	A	E	L	R	L	F	R
X. tropicalis	Q90YD6	F	V	F	N	L	S	S	I	P	E	N	E	V	I	S	S	A	E	L	R	L	Y	R
Gallus gallus	NP_990568	F	V	F	N	L	S	S	V	P	D	N	E	V	I	S	S	A	E	L	R	L	Y	R
Fugu rubripes	Q8JIJ5	F	L	F	N	L	S	S	I	P	E	D	E	L	L	S	S	A	E	L	R	L	Y	R
Danio rerio	NP_571417	F	V	F	N	L	S	S	I	P	E	D	E	L	I	S	T	A	E	L	R	V	Y	R
D. melanogaster	NP_477311.1	L	H	F	D	V	K	S	I	P	A	D	E	K	L	K	A	A	E	L	Q	L	T	R

Tabelle 4.4: Alignment der BMP4 Aminosäuresequenz verschiedener Spezies im Bereich der Mutation N150K und des Polymorphismus V152A (Pfeile).

Gen	Ref.-Seq.		N150K	V152A																				
BMP4	NP 001193.1	F	L	F	N	L	S	S	I	P	E	N	E	V	I	S	S	A	E	L	R	L	F	R
BMP2	NP 001191.1	F	F	F	N	L	S	S	I	P	T	E	E	F	I	T	S	A	E	L	Q	V	F	R
BMP7	NP 001710.1	F	-	-	D	L	S	K	I	P	E	G	E	A	V	T	A	A	E	F	R	I	Y	K
BMP6	NP 001709.1	F	K	F	N	L	S	Q	I	P	E	G	E	V	V	T	A	A	E	F	R	I	Y	K
BMP5	NP 066551.1	F	R	F	D	L	T	Q	I	P	H	G	E	A	V	T	A	A	E	F	R	I	Y	K
BMP8B	NP 001711.2	F	R	F	D	L	T	Q	I	P	A	G	E	A	V	T	A	A	E	F	R	I	Y	K
BMP8A	NP 861525.1	F	R	F	D	L	T	Q	I	P	A	G	E	A	V	T	A	A	E	F	R	I	Y	K
BMP10	NP 055297.1	L	L	F	N	V	S	-	I	P	H	H	E	E	V	I	M	A	E	L	R	L	Y	T

Tabelle 4.5: Homologievergleich zwischen den Mitgliedern der humanen BMP-Familie im Bereich der Mutation N150K und des Polymorphismus V152A (Pfeile).

4.2.1. Untersuchung auf potentielle Alteration des Spleißvorganges durch c.450C→G

Da auch nichtsynonyme Mutationen durch Beeinflussung des Spleißvorganges eine über die Aminosäuresubstitution hinausgehende Beeinträchtigung der Proteinfunktion zur Folge haben können, wurde die Mutation mit statistischen Methoden auf eine potentielle Beeinflussung des Spleißvorganges untersucht (zur Methodik siehe Kapitel 3.2.7). Die Mutation führt keine neue exonische Spleißkonsensussequenz ein. Auch liegt im Bereich der Mutation - nach den hier verwendeten Methoden zur Vorhersage - keine Konsensussequenz für einen exonischen Spleißverstärker. Es ergibt sich somit kein Hinweis auf eine zusätzliche Beeinflussung des Spleißvorganges durch die Mutation.

4.2.2. Phänotyp HD 136

Der Patient hat eine angeborene beidseitige zystische Nierendysplasie, welche im Alter von 5 4/12 Jahren zur Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz führte. Im Alter von 5 11/12 Jahren erfolgte die allogene Nierentransplantation. Sonographisch hatten sich vor der Transplantation beidseits vergrößerte Nieren gezeigt (>97 P.) mit multiplen

hypoechoenen Bezirken in Mark und Rinde, sowie einem hyperechoenen Parenchym. Aufgrund dieses Befundes war zunächst wegen des ebenfalls betroffenen Vaters (beidseitig asymptomatische multiple parapelve Nierenzysten) die Diagnose einer autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung gestellt worden. Eine erneute Evaluation dieser Aufnahmen und der aktuelle Befund ergaben jedoch ein eher zu einer zystischen Dysplasie passendes Bild. Die aktuelle Sonographie der Eigennieren im Alter von 14 Jahren zeigt beidseits hyperechogene Nieren mit multiplen, bis 3 cm großen Zysten (Abbildung 4.6). Die Nierenvolumina liegen mit 93 ml rechts und 90 ml links jeweils im Bereich der 80. Perzentile. Als extrarenale Symptome besteht bei dem Patienten eine angeborene Ptosis des linken Augenlides. Bei der Geburt bestand zudem ein Hodenhochstand rechts.

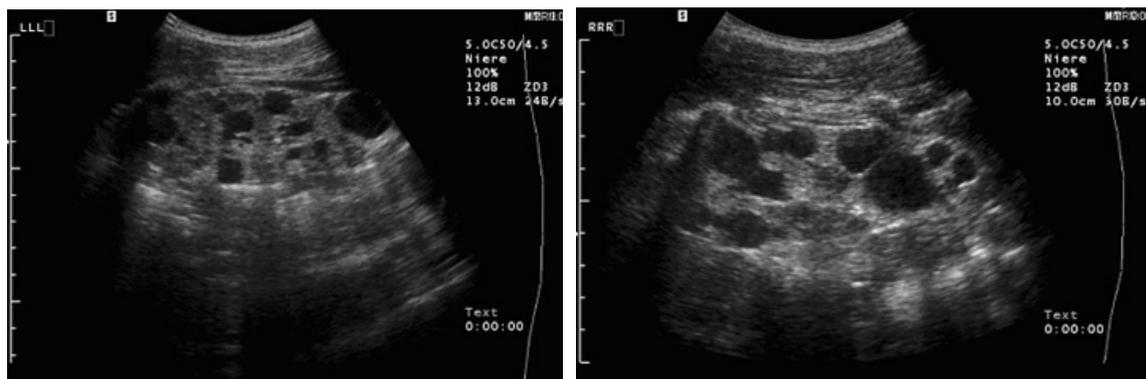


Abbildung 4.6: Ultraschallbefund der Eigennieren des Mutationsträgers HD136. Untersuchung im Alter von 14 Jahren. Links: linke Niere; rechts: rechte Niere

4.2.3. Untersuchung der Familie des Patienten HD136

Durch SSCA und Sequenzierung wurden die Genotypen der nahen Verwandten des Patienten bestimmt. Die beschriebene Mutation konnte in heterozygoter Form bei einer Schwester, beiden Eltern, sowie bei der Großmutter und einem Onkel mütterlicherseits nachgewiesen werden. Es handelt sich demnach um eine Keimbahnmutation. Die jüngere Schwester des Patienten (HD76) weist als einziges Familienmitglied ebenfalls die

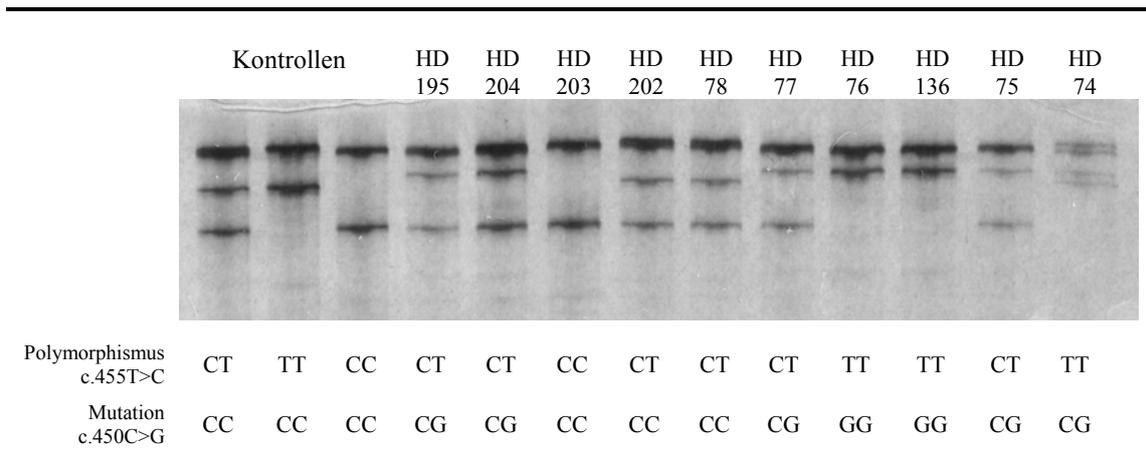


Abbildung 4.7: SSCA von Exon 5 Abschnitt D des *BMP4*-Gens in der Familie des Mutationsträgers. Spalte 1-3: Wildtypsequenzen; Spalten 4 -13: Familie des Patienten HD136. Für jedes Bandenmuster sind die zugehörigen durch Sequenzierung ermittelten Genotypen angegeben. Eine Schwester des Patienten (HD76) trägt ebenfalls die homozygote Mutation. Fünf weitere Familienmitglieder tragen die Mutation in heterozygoter Form. Es handelt sich somit um eine Keimbahnmutation.

Mutation in homozygotem Zustand auf. Der Stammbaum erfüllt somit nicht die Voraussetzungen für einen monogenen rezessiven Erbgang. Der in unmittelbarer Nachbarschaft liegende Polymorphismus p.V152A kosegregiert wie erwartet bei allen untersuchten Mitgliedern der Familie mit der Mutation (Abbildung 4.7).

Der Vater des Patienten hat sonographisch beidseits asymptotische multiple parapelveale Nierenzysten. Die Nierenultraschalluntersuchung bei der Mutter und bei den Geschwistern des Patienten war unauffällig. Bei den übrigen Familienmitgliedern ist keine Sonographie der Nieren erfolgt. Bei keinem der bezüglich ihres Genotyps untersuchten Angehörigen des Patienten ist eine Niereninsuffizienz oder eine sonstige symptomatische Erkrankung der Nieren bekannt. Ein Onkel des Patienten zweiten Grades (III-9) ist jedoch in jungen Jahren anamnestisch an einer zystischen Nierenerkrankung verstorben, zwei seiner Geschwister (eineiige Zwillinge III-10 und III-11) sind kurz nach der Geburt aus unbekannter Ursache verstorben. Genaue Informationen zur Art der Erkrankung bei diesen Patienten liegen nicht vor. Aus den Daten über Genotypen und Phänotypen in der Familie wurde ein Stammbaum erstellt. Bei den Eltern des Patienten besteht doppelte Konsanguinität vierten Grades, d.h. sowohl ihre Väter als auch ihre Mütter sind jeweils Geschwister (Abbildung 4.8). Es gibt auf der Ebene der Urgroßeltern des Patienten also nur vier verschiedene Vorfahren.

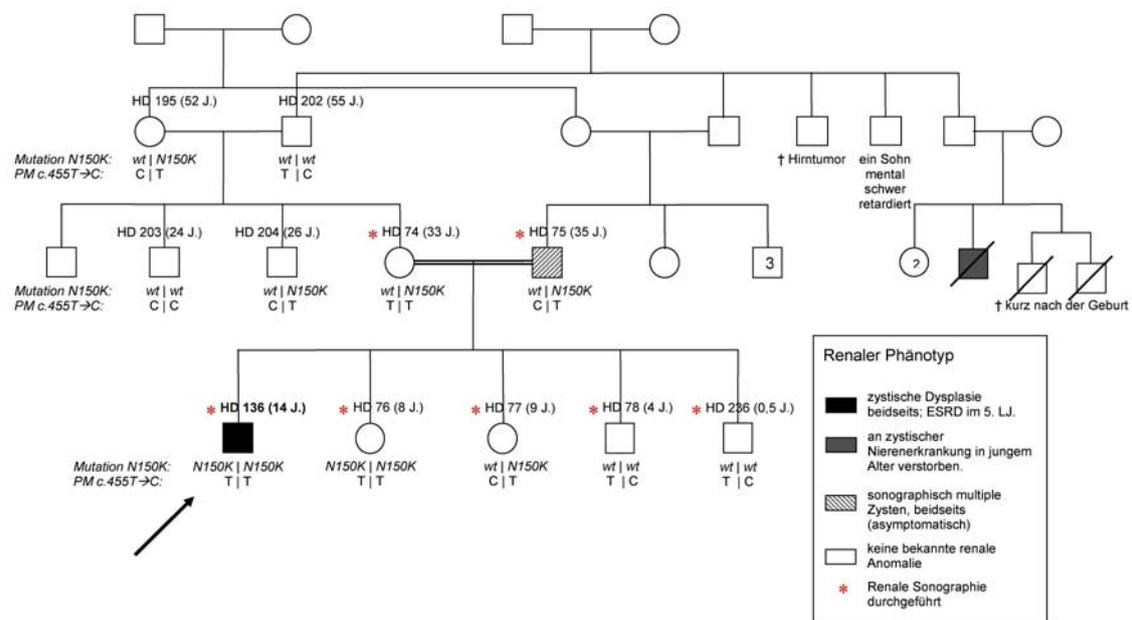


Abbildung 4.8: Stammbaum der Familie des Mutationsträgers HD136. Dargestellt sind die renalen Phänotypen sowie der *BMP4*-Genotyp bezüglich der Mutation p.N150K und des in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen Polymorphismus c.455T→C. Neben dem Indexpatienten gibt es einen zweiten homozygoten Mutationsträger (HD76) sowie fünf Träger der heterozygoten Mutation. Der Polymorphismus c.455T→C kosegregiert bei allen Individuen mit dem Locus der Mutation.

4.3. Synonyme heterozygote Punktmutation c.240G→A (p.P80)

Bei dem Patienten ANKA45 wurde in Exon 4 ebenfalls ein abweichendes Laufmuster in der SSCA gefunden (Abbildung 4.9). Die angeschlossene Sequenzierung zeigte einen heterozygoten Basenaustausch an Position 240 der kodierenden Sequenz (Abbildung 4.10). Die hier in der Wildtypsequenz vorkommende Base Guanin ist bei dem Patienten durch Adenin ersetzt. Es handelt sich um die dritte Position des Codons *Cytosin-Cytosin-Guanin*, durch den Basenaustausch entsteht die Sequenz *Cytosin-Cytosin-Adenin*. Beide Triplets codieren für die Aminosäure Prolin an Position 80 des Proteins, es kommt also durch die Sequenzvariation auf DNA-Ebene nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz.

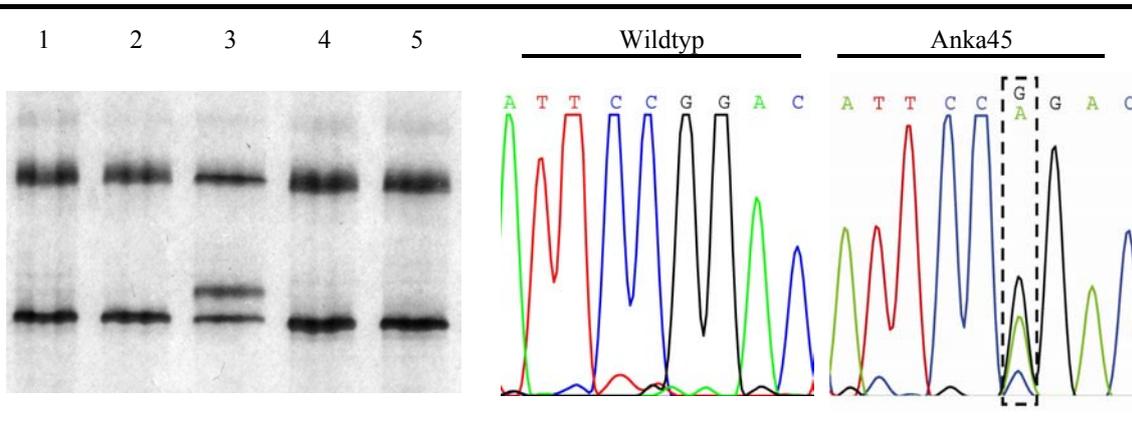


Abbildung 4.9: SSCA von Exon 4 Abschnitt A des Patienten ANKA45 (Spalte 3). Es zeigt sich eine zusätzliche Bande im Vergleich zum Muster des Wildtyps (Spalten 1, 2, 4 und 5).

Abbildung 4.10: Nucleotidsequenz des Patienten ANKA45 im Bereich der Mutation. Es besteht eine heterozygote Einzelnukleotidsubstitution G→A an Position 240 der cDNA im Vergleich zum Wildtyp.

Bei keinem weiteren Patienten, sowie keinem der 185 in diesem Abschnitt untersuchten Kontrollindividuen wurde ein solches Bandenmuster in der SSC-Analyse beobachtet. Es handelt sich somit um eine stumme (synonyme) Mutation (Abbildung 4.11). Da auch stumme Mutationen Auswirkungen auf die Genfunktion haben können, wurde ein Homologievergleich des Abschnittes auf DNA-Ebene angestellt. Die Nukleotidposition 240 ist evolutionär innerhalb der Säugetiere nicht vollständig konserviert (Tabelle 4.6).

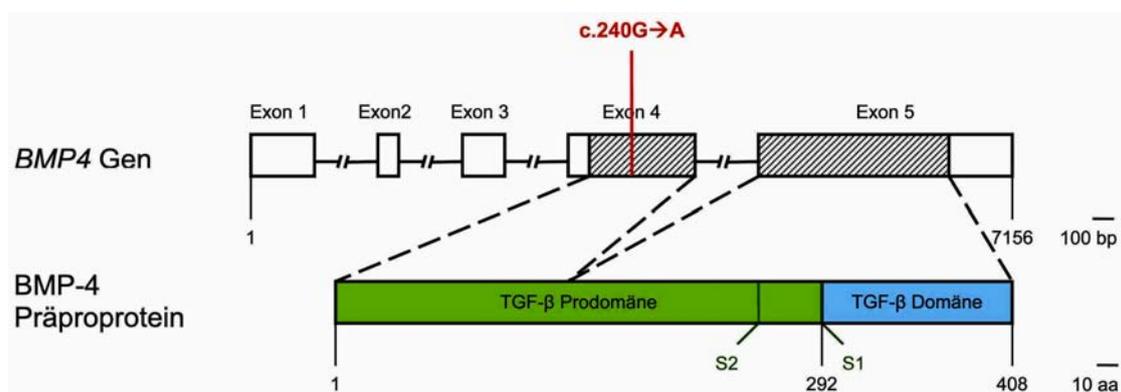


Abbildung 4.11: Position der Mutation c.240G→A im BMP4 Gen. Die Mutation liegt in Exon 4 und führt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Präproteins. S1 und S2 bezeichnen die Konsensussequenzen für die proteolytische Spaltung im Rahmen der Proteinreifung.

Spezies	Ref.-Seq.	
Homo sapiens	NM_001202	G C C G T C A T T C C C G G A C T A C A T G C G
Mus musculus	NM_007554	G C C G T C A T T C C C G G A T T A C A T G A G
Rattus norvegicus	NM_012827	G C C G T C A T C C C C G G A T T A C A T G A G
Canis familiaris	XM_547817	G C C G T C A T C C C C A G A T T A C A T G C G
Gallus gallus	NM_205237	G C C G T C A T C C C C C A G T T A C A T G C T
Xenop. tropicalis	AJ315161	G T G G T G G T G C C C C G C G T A T A T G C G
Danio rerio	NM_131342	G C C G T C G T A C C A C A G T A T C T G C T

Tabelle 4.6: Alignment der Nukleotidsequenzen des *BMP4* Gens verschiedener Spezies im Bereich der Mutation c.240G→A (Pfeil).

4.3.1. Phänotyp und Familienuntersuchung

Der Träger der Mutation stammt aus der Türkei und war zum Zeitpunkt der Untersuchung 18 Jahre alt. Es besteht eine linksseitige Nierenagenesie bei unauffälliger rechter Niere und insgesamt normaler Nierenfunktion (Kreatinin 0,91 mg/dl, GFR 85 ml/min/1,73 m² KOF). Eine genetische Untersuchung der Familie des Mutationsträgers konnte nicht durchgeführt werden. In der Familie sind keine Nierenerkrankungen bekannt, sowohl die Mutter als auch die beiden Geschwister des Patienten zeigten sonographisch unauffällige Nieren.

4.3.2. Untersuchung auf potentielle Alteration des Spleißvorganges durch c.240G→A

Um Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung des Spleißvorganges durch die stumme Mutation zu erhalten, wurde der Bereich der Mutation mit Hilfe einer DNA-Analysesoftware auf Vorliegen exonischer Spleißverstärkermotive (ESE) sowie auf Einführung einer kryptischen Spleißstelle durch die Mutation untersucht (zur Methodik siehe Kapitel 3.2.7). Die Mutation führt nicht zur Entstehung einer Konsensussequenz für eine neue ektopische Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstelle. Zudem wurde keines der in der Wildtypsequenz vorhergesagten potentiellen ESE-Motive durch die identifizierte Mutation inaktiviert. Es ergibt sich somit kein Anhalt für eine Störung des Spleißvorganges durch die Mutation c.240G→A.

4.4. Synonyme heterozygote Punktmutation c.813C→T (p.L271)

In Exon 5 Abschnitt C des *BMP4* Gens wurde bei dem Patienten ANKA 116 ebenfalls ein auffälliges Laufverhalten beobachtet (Abbildung 4.12). Als Ursache hierfür zeigte sich bei der Sequenzierung eine Einzelbasensubstitution. An Position 813 der cDNA, der dritten Position des Codons 271, ist die im Wildtyp vorkommende Base Cytosin gegen Thymin ausgetauscht (Abbildung 4.13 und 4.14). Aus der Basenfolge *Cytosin-Thymin-Cytosin* wird durch den Austausch die Sequenz *Cytosin-Thymin-Thymin*. Beide Triplets kodieren für die unpolare Aminosäure Leucin. In keiner der 136 untersuchten Individuen der Kontrollgruppe, sowie in keinem weiteren Patienten wurde die beschriebene Sequenzvariation beobachtet. Es handelt sich damit ebenfalls um eine synonyme Punktmutation. Für die entsprechende Nukleotidposition wurde auch hier ein Homologievergleich angestellt (Tabelle 4.7). Die Position ist evolutionär über die Säugetiere hinaus konserviert.

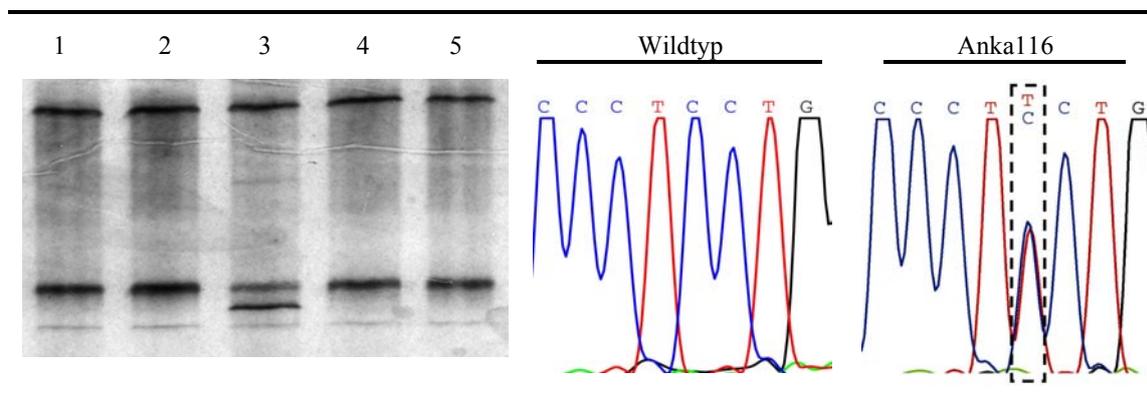


Abbildung 4.12: SSCP von Exon 4 Abschnitt C des Patienten ANKA116 (Spalte 3). Es zeigen sich zwei zusätzliche Banden im Vergleich zum Wildtypmuster (Spalten 1, 2, 4 und 5).

Abbildung 4.13: Nucleotidsequenz des Patienten ANKA116 im Bereich der Mutation. Rechts: ANKA116, links: Wildtyp. Es besteht eine heterozygote Einzelnukleotidsubstitution C→T an Position 813 der cDNA im Vergleich zum Wildtyp.

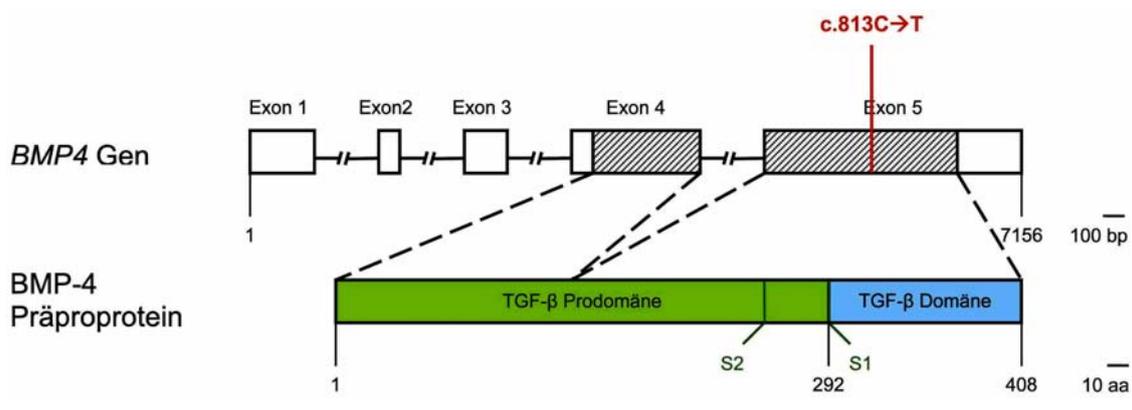


Abbildung 4.14: Position der Mutation c.813C→T im *BMP4* Gen. Die Mutation liegt in Exon 5 und führt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Präproteins. S1 und S2 bezeichnen die Konsensussequenzen für die proteolytische Spaltung im Rahmen der Proteinreifung.

Spezies	Ref.-Seq.	
Homo sapiens	NM_001202	C T C C G G C C C C T C C T G G T C A C C
Rattus norvegicus	NM_012827	C T C C G G C C C C T C C T G G T C A C T
Mus musculus	NM_007554	C T C C G G C C C C T C C T G G T C A C T
Canis familiaris	XM_547817	C T C C G G C C C C T C C T G G T C A C T
Gallus gallus	NM_205237	C T C A G G C C G C T C C T G G T C A C C
Xenop. tropicalis	AJ315161	A T G A G A C C G C T T T T A A T T A C A
Danio rerio	NM_131342	C T A C G C C C C C T G C T G G T C A C A

Tabelle 4.7: Alignment der Nukleotidsequenzen des *BMP4* Gens verschiedener Spezies im Bereich der Mutation c.813C→T (Pfeil).

4.4.1. Phänotyp und Familienuntersuchung

Der von der Mutation betroffene Patient stammt ebenfalls aus der Türkei und war zum Zeitpunkt der Untersuchung 11 Jahre alt. Es besteht eine chronische Niereninsuffizienz (Kreatinin 2 mg/dl, GFR 43 ml/Minute/1.73 m²) bei angeborener linksseitiger Uretermündungsstenose mit funktionsloser linker Niere und einem rechtsseitigen vesikoureteralen Reflux (Grad III). Die linke Niere wurde entfernt.

Bei den Eltern des Patienten besteht Konsanguinität ersten Grades. In der Familie sind keine Nierenerkrankungen bekannt, die Kontrollsonographie der Nieren zeigte bei allen

untersuchten Familienmitgliedern einen Normalbefund. Eine genetische Untersuchung der Angehörigen des Patienten konnte nicht durchgeführt werden.

4.4.2. Untersuchung auf potentielle Alteration des Spleißvorganges durch c.813C→T

Auch diese Mutation wurde auf potentielle Beeinflussung des Spleißvorganges untersucht. Es wird durch die Mutation keine neue Konsensussequenz für eine Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstelle eingeführt. Die stumme Mutation c.813C→T liegt jedoch innerhalb potentieller ESE-Konsensusmotive für drei verschiedene SR-Proteine (SF2/ASF, SC35 und SRp40). Zur Theorie und Methodik wird auf Kapitel 3.2.7 verwiesen. Durch die Einfügung der stummen Mutation wird eines dieser *High-score* Motive auf einen unterschwelligen Wert verringert (Tabelle 4.8). Sollte das hier beobachtete Motiv tatsächlich einem funktionell aktiven exonischen Spleißverstärker entsprechen, so wäre eine Zerstörung des Motives durch die stumme Mutation und als Folge ein fehlerhafter Spleißvorgang durch das SF2/ASF-Protein denkbar. Es könnte sich somit um eine Spleißmutation handeln.

	Wildtypsequenz		mutierte Sequenz c.813C→T
	CTCCTGG		CTTCTGG
Score (SF2/ASF-Protein)	2,31669	→	0,24783

Tabelle 4.8: Beeinträchtigung eines High-Score ESE-Konsensusmotivs für das SF2/ASF-Protein durch die stumme Mutation c.813C→T. Der Schwellenwert für ein signifikantes Ergebnis des Scores (*high-score*) liegt bei 1,867 Punkten (Cartegni et al. 2003, Smith et al. 2006).

4.5. Polymorphismus p.V152A (c.455T→C)

Bei diesem vorbeschriebenen Polymorphismus (Mangino *et al.* 1999) handelt es sich um einen Einzelnukleotidpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) in Exon 5 des *BMP4* Gens. Durch einen nichtsynonymen Basenaustausch von Thymin zu Cytosin an Position 455 der cDNA kommt es zur Substitution von Valin durch Alanin an Position 152 des Proteins. Beide Aminosäuren sind unpolar und ungeladen. Insgesamt wurden 224 Patienten und 184 Kontrollindividuen auf den beschriebenen Polymorphismus hin untersucht. Die in der Elektrophorese beobachteten Laufmuster und die diesen zu Grunde liegenden Genotypen sind in Abbildung 4.15 dargestellt.

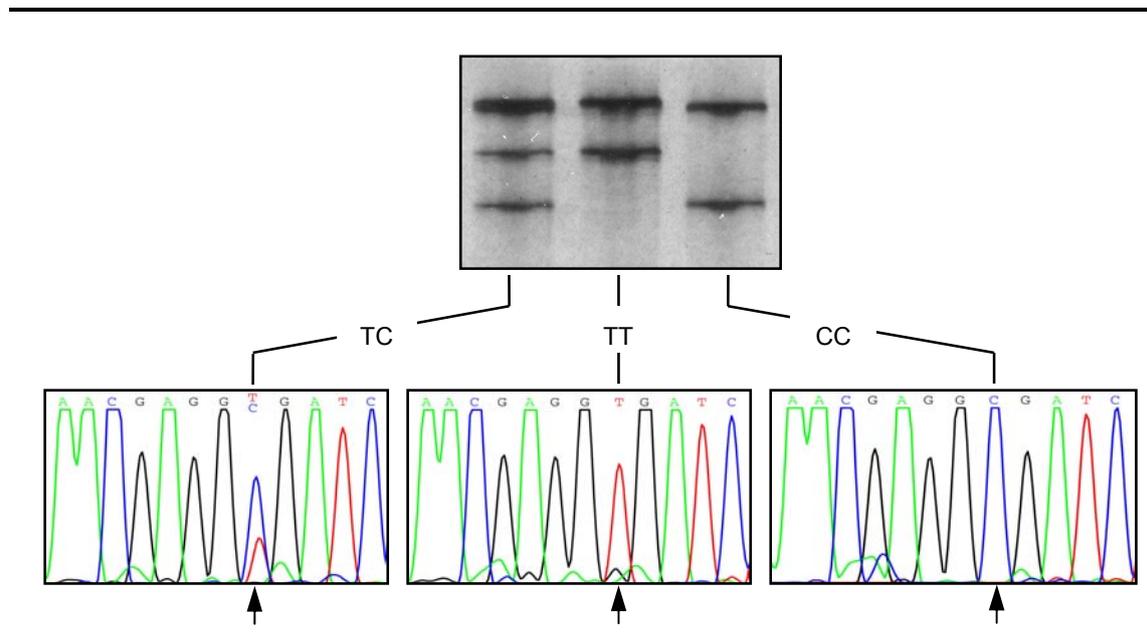


Abbildung 4.15: Polymorphismus c.455T→C in Exon 5 des *BMP4* Gens. Exemplarisch dargestellt sind die unterschiedlichen Laufmuster in der SSCA und die Ergebnisse der Kapillarsequenzierung. Die Position des Polymorphismus ist mit einem Pfeil markiert.

4.5.1. Statistische Untersuchung des Polymorphismus

Zur Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen dem beobachteten Polymorphismus und dem Auftreten von CAKUT wurden die Allelfrequenzen berechnet

und zwischen Patienten- und Kontrollkohorte verglichen. Zudem wurde die Verteilung der Genotypen innerhalb der Gruppen auf das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes überprüft.

4.5.1.1. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht innerhalb der Gruppen

Im χ^2 – Test auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibriums in einem System mit zwei Allelen ergibt sich als kritische Grenze für die Testentscheidung bei einem gewählten Signifikanzniveau von 5 % das 0,95 Quantil der χ^2 – Verteilung mit einem Freiheitsgrad: $\chi^2_{(1;0,95)} = 3,841$. Aus den beobachteten und erwarteten Werten (Tabelle 4.9) ergibt sich für die Patientengruppe diese Prüfgröße mit $V = 0,205$ (entsprechend $p = 0,65$). Für die Kontrollgruppe ergibt sich $V = 0,516$ ($p = 0,47$). Eine Ablehnung der Nullhypothese wird hierdurch nicht gerechtfertigt. Beide Populationen befinden sich also im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Zusätzlich wurden aus dem Patientenkollektiv Subpopulationen nach dem renalen Phänotyp gebildet und separat auf ein Hardy-Weinberg-Ungleichgewicht geprüft. Auch hier zeigte sich für keine der Populationen eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Daten nicht dargestellt).

	n		Genotypen			Allelfrequenzen	
			TT	TC	CC	T	C
Patienten	224	Beobachtet	61	115	48	0,53	0,47
		Erwartet (n. H.W.)	62,7	111,6	49,7		
Kontrollen	184	Beobachtet	45	87	52	0,48	0,52
		Erwartet (n. H.W.)	42,6	91,9	49,6		

Tabelle 4.9: Beobachtete und erwartete Verteilung der Genotypen bezüglich des Polymorphismus p.V152A in der Patienten- und Kontrollgruppe. Es zeigt sich in beiden Gruppen keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,65$ und $0,47$ respektive).

4.5.1.2. Assoziation der Allele mit den renalen Phänotypen

Für den Vergleich der Allelhäufigkeiten zwischen Patienten- und Kontrollgruppe wurde der χ^2 – Test auf Unabhängigkeit angewendet. Es ergibt sich eine Kontingenztafel mit 2×2

Feldern, für die Testentscheidung ist also das 0,95 – Quantil der χ^2 – Verteilung mit einem Freiheitsgrad: $\chi^2_{(1;0,95)} = 3,841$ maßgeblich. Für die Prüfgröße ergibt sich $V = 1,8654$ ($p=0,17$). Es gibt demnach keinen signifikanten Unterschied zwischen den Allelfrequenzen der beiden Gruppen. Zusätzlich wurden aus dem Patientenkollektiv nach dem renalen Phänotyp Subgruppen gebildet und ihre Allelfrequenzen mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Für keine dieser Subgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Allelfrequenzen (Daten nicht dargestellt).

	Allelhäufigkeit		
	T	C	
Patienten	237 (227,3)	211 (220,7)	Tabelle 4.10: Beobachtete Allelhäufigkeiten am Locus des Polymorphismus in beiden Gruppen. In Klammern sind die bei Unabhängigkeit erwarteten Häufigkeiten dargestellt, die sich aus den Randsummen ergeben. Es ergibt sich im Chi-Quadrat Test kein signifikanter Unterschied in den Allelfrequenzen zwischen den Gruppen ($p=0,17$).
Kontrollen	177 (186,7)	191 (181,3)	

5. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Sequenzvariationen in *BMP4* beim Menschen mit dem Auftreten von CAKUT assoziiert sind. Hierzu wurde die DNA von 234 Patienten mittels SSCA-Screening und Sequenzierung auf das Vorkommen von Mutationen und Polymorphismen in den kodierenden Regionen des *BMP4* Gens untersucht. Es wurden dabei drei Mutationen identifiziert. Zudem wurde ein bekannter Polymorphismus auf Assoziation mit dem Phänotyp geprüft. Die Ergebnisse sollen im Folgenden bezüglich der Fragestellung gewertet und, unter Einbeziehung des aktuellen Wissensstandes zur Pathogenese, molekularen Pathologie und Genetik der CAKUT, in einen Gesamtzusammenhang gestellt werden.

5.1. Polymorphismus p.V152A in *BMP4*

Bei dem beobachteten Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism, SNP*) p.V152A im *BMP4* Gen handelt es sich um einen bereits beschriebenen Polymorphismus (Mangino *et al.* 1999). Für einige Erkrankungen sind bereits Assoziationsstudien für diesen Polymorphismus durchgeführt worden, mit widersprüchlichen oder nicht eindeutigen Ergebnissen. Eine Assoziation mit einer erniedrigten Hüftknochendichte bei Frauen nach der Menopause, als Hinweis auf eine Rolle in der Pathogenese der Osteoporose (Ramesh Babu *et al.* 2005) konnte an anderen Kollektiven nicht bestätigt werden (Choi *et al.* 2006). In einer Assoziationsstudie bei Kindern mit Neuralrohrdefekten zeigte sich eine leicht erhöhte Anzahl Heterozygoter in der Kontrollgruppe bei gleichen Allelfrequenzen als möglicher Hinweis auf einen protektiven Effekt dieses Genotyps (Felder *et al.* 2002).

In der vorliegenden Untersuchung ergab sich kein Anhalt für eine Assoziation des Polymorphismus p.V152A mit dem Auftreten von CAKUT. Der Vergleich der Allelfrequenzen zwischen beiden Gruppen erbrachte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,17$) und sowohl die Patienten- als auch die Kontrollkohorte befanden sich bezüglich des Polymorphismus im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,65$ und $p = 0,47$ respektive). Die funktionellen Konsequenzen des Aminosäureaustausches der beiden unpolaren

Aminosäuren Valin und Alanin sind, angesichts bislang fehlender funktioneller Analysen, nicht bekannt. Insgesamt bleibt die funktionelle Relevanz des Polymorphismus fraglich.

Eine mögliche Fehlerquelle bei Assoziationsstudien sind Stratifikationseffekte innerhalb der Patienten- und Kontrollkohorte, welche durch unterschiedliche Zusammensetzung beider Gruppen im Hinblick auf mögliche weitere Einflussfaktoren, wie Herkunft, Geschlecht und Alter entstehen (Balding 2006). Hierdurch können nicht nur scheinbare Assoziationen entstehen, sondern auch tatsächlich vorhandene Assoziationen maskiert werden. Die relativ starken Unterschiede in der Allelfrequenz des Polymorphismus p.V152A zwischen den Bevölkerungsgruppen stellen eine solche potentielle Fehlerquelle für den Fall-Kontroll-Vergleich dar. Die mittlere Allelfrequenz wird mit 0,63 für das T-Allel und 0,37 für das C-Allel angegeben bei insgesamt 451 untersuchten Individuen. (*The Single Nucleotide Polymorphism Database, dbSNP*; refSNP: rs17563) In der kaukasischen und hispanischen Bevölkerungsgruppe ist das phylogenetisch jüngere C-Allel dabei mit deutlich höherer Frequenz vertreten (0,532 bis 0,608 und 0,522 respektive) als bei Angehörigen der afrikanischen (0,192 bis 0,271) und asiatischen (0,182 bis 0,322) Bevölkerungsgruppe. Um diesen Fehler zu vermindern wurde die Kontrollkohorte in Bezug auf die Herkunft annäherungsweise an die Patientenkohorte angepasst. Ein exaktes Angleichen (*matching*), auch in Bezug auf andere Einflussfaktoren, war aufgrund unvollständiger Daten nicht möglich.

5.2. Mutationen in *BMP4*

Bei den identifizierten Mutationen im *BMP4* Gen handelt es sich um eine homozygote nichtsynonyme Nukleotidsubstitution, sowie um zwei heterozygote synonyme (stumme) Nukleotidsubstitutionen. Die Mutation p.N150K wurde im Anschluss an diese Arbeit im Zebrafischmodell funktionell untersucht (Weber *et al.* 2008). Darüber hinaus wurden in einer Nachfolgeuntersuchung zwei weitere nicht-synonyme Mutationen im *BMP4* Gen gefunden. Die Ergebnisse dieser weiterführenden Untersuchungen sind nicht Teil dieser Arbeit, sollen allerdings dennoch in der Diskussion mit erwähnt werden, da sie weitere Einsicht in die Rolle von *BMP4* bei der Entstehung renaler Fehlbildungen liefern.

Humane Mutationen in *BMP4* wurden bislang nur in einzelnen Fällen beschrieben. Chen et al. fanden unter 90 Patienten mit sporadischer Hypospadie bei insgesamt drei Patienten heterozygote Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Prodomäne von *BMP4*, welche bei 190 untersuchten Kontrollpersonen nicht nachweisbar waren (Chen et al. 2006). Felder et al. beschrieben 4 ebenfalls heterozygote Aminosäuresubstitutionen in den Exonen 4 und 5 des *BMP4* Gens unter 179 Patienten mit Neuralrohrdefekten (Felder et al. 2002). Zwei dieser Mutationen traten je einmal auch in einer Kohorte von 161 gesunden Kontrollpersonen auf (*The Human Gene Mutations Database, HGMD*). Es handelt sich bei all diesen Varianten um subtile Veränderungen im Sinne von Aminosäuresubstitutionen oder stummen Mutationen. Für keine dieser Mutationen konnte bislang eine funktionelle Relevanz oder ein kausaler Zusammenhang mit der jeweils untersuchten Erkrankung zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Mutation	Betroffener Bereich
179 Patienten mit Spina bifida aperta (Felder et al. 2002)	
S91C heterozygot	Prodomäne
T225A heterozygot	Prodomäne
R226W heterozygot	Prodomäne
S367T heterozygot	TGF-β Domäne
90 Patienten mit isolierter Hypospadie (Chen et al. 2006)	
H207D heterozygot	Prodomäne
R223H heterozygot	Prodomäne
H251Y heterozygot	Prodomäne

Tabelle 2.4: Beschriebene humane Mutationen im *BMP4* Gen.

5.2.1. Stumme Mutationen c.240G→A und c.813C→T

Bei zwei Patienten wurden synonyme (stumme) heterozygote Punktmutationen identifiziert, welche jeweils in einer Kontrollkohorte von 185 respektive 136 gesunden Patienten nicht nachweisbar waren. Dies spricht gegen das Vorliegen seltener Polymorphismen und für eine mögliche pathogenetische Relevanz der Veränderungen.

5.2.1.1. Genotypen und mögliche funktionelle Konsequenzen

Bei den Mutationen handelt es sich um heterozygote, synonyme Nukleotidsubstitutionen in Exon 4 und 5 des *BMP4* Gens (Abbildung 4.11; Abbildung 4.14). Eine genetische Untersuchung der Familienmitglieder konnte leider nicht durchgeführt werden.

Stumme Mutationen führen zwar primär nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz, können aber dennoch durch Beeinflussung des Spleißvorganges funktionelle Relevanz erlangen (Krawczak *et al.* 1992). Auf die verschiedenen hierbei beteiligten Mechanismen wurde bereits in Kapitel 3.2.7. eingegangen. Keine der beiden hier beobachteten stummen Mutationen führt nach den hier verwendeten Vorhersagemethoden eine Konsensussequenz ein, welche die Entstehung einer neuen, ektopen Spleißstelle vermuten lässt. Die Mutation c.813C→T führt jedoch zur Inaktivierung einer vorhergesagten Konsensussequenz für einen exonischen Spleißverstärker (*exonic splicing enhancer, ESE*). Bei solchen ESE handelt es sich um exonische Motive, welche – neben den eigentlichen Spleißstellen – für die Bindung des Spleißosoms und damit den korrekten Ablauf des Spleißvorganges essentiell sein können. Veränderungen in diesen Motiven können zu Störungen des Spleißvorganges wie etwa dem Überspringen von Exonen (*exon skipping*) führen (Cartegni *et al.* 2002). Hierbei ist zu erwähnen, dass die zur Vorhersage solcher Motive errechneten Punktwerte (*scores*) ab einem statistisch ermittelten Schwellenwert als signifikant angesehen werden, das entsprechende Motiv (*High-Score-Motif*) also Eigenschaften eines ESE besitzt (Cartegni *et al.* 2003; Smith *et al.* 2006). Ob es in dem speziellen Fall auch tatsächlich als ESE wirkt, ist mit dieser Methode nicht zu beweisen. Sollte die im Bereich der Mutation c.813C→T identifizierte Konsensussequenz einem tatsächlich funktionell aktiven ESE entsprechen, könnte die Mutation zu einer Beeinträchtigung dieser Funktion und damit zu einem fehlerhaften Spleißvorgang führen.

5.2.1.2. Pathogenetische Relevanz der stummen Mutationen

Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation lässt sich aufgrund der fehlenden Genotypisierung der Familien nicht aufstellen. Es bleibt unklar, ob es sich um *de novo* Mutationen handelt, oder ob jeweils ein Elternteil ein gesunder Mutationsträger ist. Für eine pathogenetische

Relevanz der stummen Mutationen spricht dennoch die Tatsache, dass die beobachteten Varianten bei keiner der untersuchten Kontrollpersonen nachgewiesen werden konnten. Denkbar wären Auswirkungen der Mutationen auf den Spleißvorgang und damit auf die Stabilität der mRNA oder die Funktion des Proteins. Für die Mutation p.L271 (c.813C→T) ergeben sich hier Hinweise auf die Störung eines potentiellen ESE-Konsensusmotivs. Dies lässt eine Spleißmutation möglich erscheinen. Eine eindeutige Aussage über die pathogenetische Relevanz der beiden stummen Mutationen kann ohne funktionelle Untersuchungen jedoch nicht getroffen werden.

5.2.2. Mutation p.N150K

Bei dem Patienten HD136 wurde eine homozygote Aminosäuresubstitution im *BMP4* Gen gefunden. Bei keinem der 184 untersuchten gesunden Kontrollindividuen konnte die Sequenzveränderung in *BMP4* nachgewiesen werden. Dies spricht gegen das Vorliegen eines seltenen Polymorphismus und für eine pathogenetische Relevanz der Veränderung. In der Familie des Patienten wurden ebenfalls die Genotypen bestimmt. Es handelt sich um eine Keimbahnmutation in einer stark konsanguinen Familie. Ein gesundes Familienmitglied trägt ebenfalls die Mutation in homozygoter Form, so dass die formalen genetischen Voraussetzungen für einen monogenen rezessiven Erbgang nicht erfüllt sind (vgl. Kapitel 5.2.2.4). Da es sich auch um einen komplexen Erbgang handeln könnte, sollen im Folgenden die Ergebnisse systematisch in Bezug auf eine mögliche pathogenetische Relevanz der Mutation gewertet werden.

5.2.2.1. Genotyp p.N150K und mögliche funktionelle Folgen für das Protein

Die Mutation p.N150K führt zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin gegen Lysin. Die Ähnlichkeit von Aminosäuren lässt sich anhand ihrer Polarität, Molekülgröße und ihrer chemischen Zusammensetzung quantifizieren (Grantham 1974). Für die hier vorliegende Substitution ergibt sich ein Ähnlichkeitsscore von 94 auf einer Skala von fünf (für die sehr ähnlichen Aminosäuren Leucin und Isoleucin) bis 215 (für Cystin und Tryptophan). Diese Zahl kann jedoch, ohne das Wissen um die spezifische Funktion der Aminosäure im Protein, nur einen Anhalt dafür bieten, ob die neue Aminosäure die gleiche

Funktion übernehmen kann wie die ursprünglich vorhandene. Für eine funktionelle Relevanz auf der Aminosäureebene spricht die relativ hohe evolutionäre Konservierung der von der Substitution betroffenen Aminosäurenposition (Kapitel 4.2, Tabelle 4.4).

Die Mutation liegt in der Prodomäne von *BMP4* (Kapitel 4.2, Abbildung 4.5). Für diese Domäne ist bekannt, dass sie eine wichtige Funktion bei der Dimerisierung der Vorläuferproteine erfüllt und zudem Konsensussequenzen für die proteolytische Abspaltung der Prodomäne enthält, welche zur Bildung der biologisch aktiven Form von BMP4 führt (Cui *et al.* 2001). Die Mutation liegt zwar nicht innerhalb einer bekannten Konsensussequenz für diese Abspaltung (*cleavage site*), denkbar wäre jedoch, dass sie die Fähigkeit des Präproteins zur Dimerisierung beeinflusst. Für verschiedene Mitglieder der TGF- β Familie sind bereits solche pathogenen Mutationen innerhalb der Prodomäne beschrieben worden: Eine dominante Missense-Mutation in der Prodomäne von BMP15 führt zu einer autosomal dominanten Form der ovariellen Dysgenese (Di Pasquale *et al.* 2004), Mutationen in der Prodomäne von TGF- β 1 führen zur autosomal dominanten diaphysären Dysplasie, der Camurati-Engelmann Erkrankung (Kinoshita *et al.* 2000). Dies unterstreicht die Wichtigkeit dieser Domäne für eine intakte Funktion des reifen Proteins.

Funktionelle Untersuchung der Mutation im Zebrafischmodell

Um den Einfluss der identifizierten Mutationen auf die Funktion des Proteins zu untersuchen, wurde im Anschluss an diese Arbeit ein mRNA Überexpressionsassay im Zebrafischmodell durchgeführt. Hierbei wird mRNA in hohen Konzentrationen in

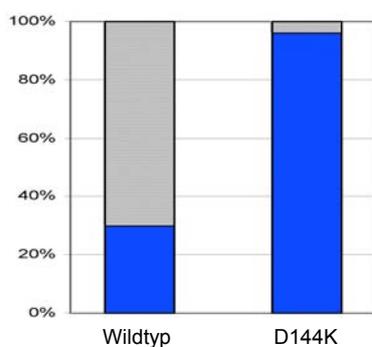


Abbildung 5.1: *BMP4* mRNA-Überexpressionsassay im Zebrafisch. Dargestellt ist der Anteil von Embryonen mit normalem Phänotyp nach Injektion von Wildtyp-mRNA (links) und nach Injektion von mRNA mit der zur humanen Mutation p.N150K analogen Mutation (rechts). Die Mutation führt zu einer Verminderung der dorsalisierenden Wirkung von *bmp4* und damit zu einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion *in vivo*. Injektion von 25 μ g mRNA. Es wurden jeweils mindestens 100 Embryonen untersucht (Weber *et al.* 2008).

Zebrafischembryonen injiziert und die Wirkung auf die Entwicklung der Embryonen beobachtet. Durch Vergleich der Phänotypen nach Injektion von Wildtyp-mRNA und mutierter mRNA lässt sich eine Aussage über eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion durch die Sequenzveränderungen treffen. Die Injektion von *bmp4* mRNA in Zebrafischembryonen im 1-Zell-Stadium führt zu einer dosisabhängigen Dorsalisierung, also zur verminderten Formation des Mesoendoderms bei diesen Tieren (Neave *et al.* 1997). Injektion von mRNA, welche die zu den humanen Mutationen analogen Sequenzvarianten trägt, führt in einem Großteil der Fälle nicht zu einer solchen Dorsalisierung. Die beobachteten humanen Mutationen führen im Zebrafischmodell also zu einem Verlust der Proteinfunktion (Weber *et al.* 2008).

5.2.2.2. Phänotyp des Mutationsträgers HD136

Der Sonographiebefund des Patienten spricht am ehesten für das Vorliegen einer beidseitigen zystischen Dysplasie. Der ursprünglich aufgrund des betroffenen Vaters bestehende Verdacht einer autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) ließ sich sonographisch jedoch auch nach erneuter Evaluation der Befunde nicht gänzlich ausschließen. Auch der klinische Verlauf mit terminaler Niereninsuffizienz bereits im Alter von 5 Jahren spricht nicht gegen das Vorliegen dominanter Zystennieren, da diese sich in einem Teil der Fälle schon früh manifestieren können (Kaariainen *et al.* 1988). Auch innerhalb von Familien sind Fälle mit variabler Expressivität beschrieben, was schon früh die Existenz von Modifikatorallelen vermuten ließ und in dieser Familie einen frühen Ausbruch der Erkrankung des Patienten bei gleichzeitig klinisch noch gesundem Vater erklären könnte (Zerres *et al.* 1985). Das Vorliegen einer autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD) ist aufgrund der frühen Niereninsuffizienz und der hohen Konsanguinität in der Familie ebenfalls denkbar. Eine am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen durchgeführte Mutationsanalyse im *PKHD1* Gen blieb bei dem Patienten jedoch ohne Ergebnis. Bei 95 % der Familien mit ARPKD kann eine solche kausale Mutation im *PKHD1* Gen nachgewiesen werden (Bergmann *et al.* 2004). Unter dem Vorbehalt einer Mutationsdetektionsrate von etwa 80% bei der verwendeten Screeningmethode kann somit das Vorliegen einer ARPKD bei dem Patienten als unwahrscheinlich angesehen werden. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde

bei dem Patienten zudem eine Sequenzierung des *HNF-1 β* Gens durchgeführt. Mutationen im *HNF-1 β* Gen sind mit hoher Frequenz bei Patienten mit isolierten renalen Malformationen wie Zysten, Hypoplasie oder unilateraler Agenesie beschrieben worden (Ulinski *et al.* 2006; Vgl. auch Kapitel 2.3.4.1.). Die Sequenzierung in *HNF-1 β* zeigte einen unauffälligen Befund in unserem Indexpatienten. Da etwa die Hälfte der *HNF-1 β* Mutationsträger heterozygote Deletionen aufweisen, welche mit einer Standardsequenzierung nicht nachweisbar sind, kann eine Mutation im *HNF-1 β* Gen bei dem Patienten jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

5.2.2.3. *DACH1* Mutation in der Familie

In der Familie ist, neben der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten *BMP4*-Mutation, bereits eine Keimbahnmutation in einem weiteren möglichen Nierenentwicklungsgen bekannt. Es handelt sich um eine nichtsynonyme Punktmutation in Exon 10 des *DACH1* Gens. Die Mutation liegt an Position 2044 der cDNA (c.2044C \rightarrow T; Referenzsequenz: NM_080759.3), und führt an Position 682 des Proteins (der häufigsten und längsten Isoform a) zu einem Austausch der Aminosäure Arginin durch Cystein (p.R682C; Referenzsequenz: NP_542937.1). Die Sequenzveränderung wurde in keiner der 41 untersuchten Kontrollindividuen gefunden. Polymorphismen in den kodierenden Regionen des *DACH1* Gens wurden bislang nicht beschrieben (*The Single Nucleotide Polymorphism Database*, dbSNP). *DACH1* bildet zusammen mit *EYAI* und der *SIX*-Gruppe ein regulatorisches Netzwerk von embryonalen Genen, die in der Nierenentwicklung eine wichtige Rolle spielen (Li *et al.* 2003; Vgl. auch Kapitel 2.3.4.1.). Da die funktionelle und pathogenetische Relevanz sowohl der *BMP4*-Mutation, als auch der Mutation im *DACH1* Gen in der Familie *a priori* als unklar angesehen werden muss, soll zunächst jede für sich auf eine Kosegregation mit dem Phänotyp untersucht werden. Der Polymorphismus p.V152A im *BMP4* Gen segregiert in der Familie mit der Mutation p.N150K, weshalb er hierbei außer Acht gelassen werden soll. Die Beurteilung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation erfolgt unter dem Vorbehalt, dass einige der Familienmitglieder – insbesondere die jüngeren Geschwister des Patienten – aufgrund ihres jungen Alters möglicherweise noch nicht erkrankt sind, bezüglich ihres Phänotyps also nur eingeschränkt informativ sind.

5.2.2.4. Phänotypen und Genotypen in der Familie des Patienten

Abbildung 5.2 zeigt den Stammbaum der Familie des Mutationsträgers. Der subklinisch betroffene Vater des Patienten HD75 und der betroffene Onkel zweiten Grades (III-9) sprechen für eine erbliche Komponente der renalen Erkrankung in dieser Familie. Die Phänotypenverteilung spricht dabei für einen dominanten Erbgang mit inkompletter Penetranz, da Individuen in aufeinander folgenden Generationen betroffen sind, jedoch nicht in allen Generationen. Betrachtet man die Zysten des Vaters als erworben, so kommt jedoch, nicht zuletzt in Anbetracht der hohen Konsanguinität in der Familie, auch ein rezessiver Erbgang in Betracht. Eine erworbene zystische Nierenerkrankung (*acquired cystic kidney disease, ACKD*) kann unter anderem bei Niereninsuffizienz oder langjähriger Dialyse entstehen und differentialdiagnostische Schwierigkeiten gegenüber angeborenen zystischen Nierenerkrankungen bereiten (Zerres *et al.* 1985). Das Auftreten in bereits relativ jungem Alter (35 Jahre), die parapelvine Lage der Zysten und das Fehlen einer entsprechenden Disposition sprechen jedoch für eine angeborene Ursache der renalen Zysten beim Vater des Patienten.

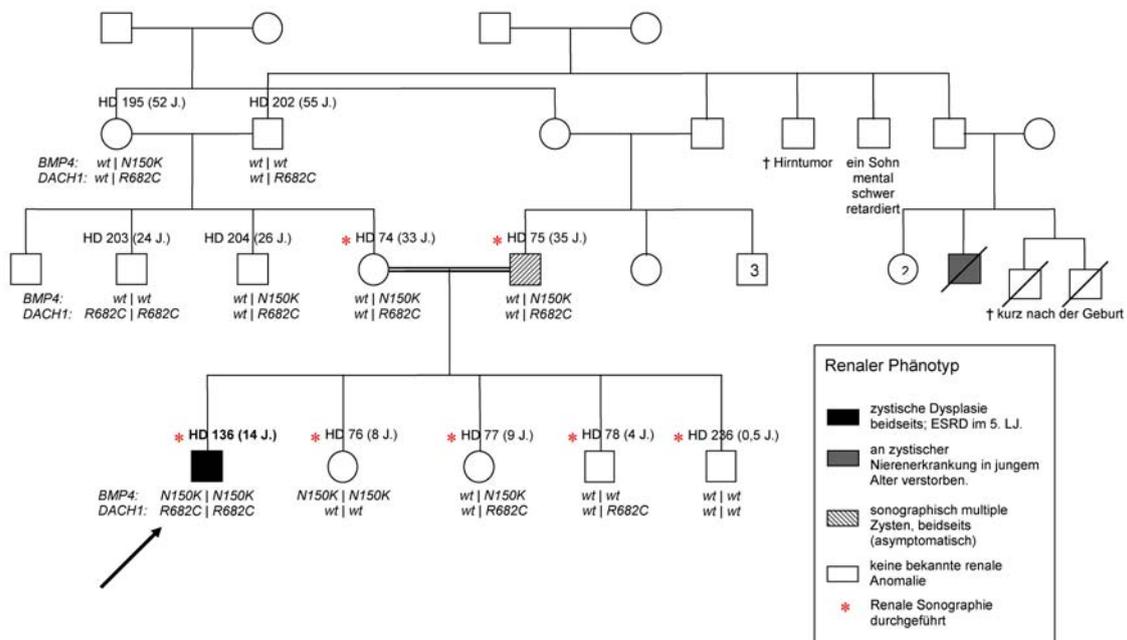


Abbildung 5.2: Phänotypen in der Familie HD136 und Genotypen in *BMP4* und *DACH1*. Dargestellt sind die Genotypen bezüglich der *BMP4*-Mutation p.N150K und der *DACH1*-Mutation p.R682C. Der Indexpatient HD136 zeigt als einziger den doppelt homozygoten Genotyp (Pfeil).

Genotyp-Phänotyp-Korrelation in Bezug auf die Mutation in *BMP4*

Der Patient HD136 ist homozygot für die Mutation p.N150K. Der Stammbaum erfüllt in Bezug auf die beobachtete *BMP4* Mutation jedoch nicht die formalen Voraussetzungen für einen autosomal rezessiven Erbgang, da es neben dem homozygoten Betroffenen auch eine gesunde homozygote Mutationsträgerin gibt (HD76) und zudem ein heterozygoter Mutationsträger einen renalen Phänotyp zeigt (HD75). Das gleichzeitige Vorliegen von gesunden Homozygoten und erkrankten Heterozygoten spricht damit eindeutig gegen eine monogene rezessive Vererbung.

Genotyp-Phänotyp-Korrelation in Bezug auf die Mutation in *DACH1*

Der Indexpatient ist homozygot für die *DACH1* Mutation p.R682C. Auch hier spricht jedoch der nicht betroffene homozygote Mutationsträger (HD203) sowie die Tatsache, dass einer der heterozygoten Mutationsträger einen renalen Phänotyp zeigt (HD75), gegen einen rezessiven Erbgang. Für keine der beiden Mutationen erfüllt der Stammbaum somit die formal-genetischen Anforderungen an einen monogenen Erbgang.

Genotyp-Phänotyp-Korrelation unter Berücksichtigung beider Mutationen

Der Patient ist als einziger doppelt homozygot für die Mutationen in *BMP4* und *DACH1*. Von den fünf Familienmitgliedern mit doppelter Heterozygotie für die Mutationen, also mit Mutationen in beiden Genen, besteht bei einem eine sonographische Auffälligkeit (HD75), zwei sind sonographisch unauffällig (HD74 und HD77). Bei zwei weiteren ist keine Sonographie der Nieren erfolgt (HD195 und HD204). Vier Individuen sind nur in einem der beiden Gene betroffen (HD76, HD78, HD202, HD203). Sie sind ebenfalls klinisch gesund, zwei waren sonographisch unauffällig (HD76 und HD78), die anderen wurden nicht untersucht.

Die Konstellation mit dem Patienten als einzigem klinisch Erkranktem unter den genotypisierten Individuen und einzigem doppelt homozygotem Mutationsträger spricht für eine pathogenetische Relevanz und möglicherweise synergistische Wirkung beider Mutationen. Möglich wäre eine digenische, tetra-allelische Vererbung (vgl. hierzu auch Kapitel 5.2.2.5.). Ein solches Modell lässt sich allerdings bei der geringen Datenmenge mit nur einem Stammbaum und ohne Kenntnis des Genotyps des zweiten klinisch betroffenen,

jedoch leider verstorbenen Familienmitglieds (III-9) nicht zweifelsfrei bestätigen. Zudem spricht gegen einen solchen Vererbungsmodus, dass auch einer der doppelt heterozygoten Mutationsträger einen abgeschwächten renalen Phänotyp zeigt. Letzteres spricht für einen möglichen Gendosiseffekt der beiden Mutationen. Für eine synergistische Wirkung beider Mutationen spricht neben dem doppelt homozygoten Erkrankten die Tatsache, dass mindestens einer der doppelt Heterozygoten einen renalen Phänotyp zeigt, die beiden einfach Homozygoten jedoch nicht (HD76 und HD203). Da nur einer der doppelt heterozygoten Genotypen (HD75) einen renalen Phänotyp zeigt, ist zu vermuten, dass noch weitere Modifikatorgene oder nicht genetische Faktoren an der Entstehung der Erkrankung in dieser Familie beteiligt sind.

Die Einordnung des erkrankten Onkels zweiten Grades des Patienten (III-9) und dessen früh verstorbenen Geschwister (III-10 und III-11) ist problematisch, da weder der Genotyp noch die genauen Phänotypen bekannt sind. Die Konsanguinität der Eltern des Patienten in Verbindung mit der Tatsache, dass es sich bei der *BMP4*-Mutation um eine sehr seltene Variante handelt - die Wahrscheinlichkeit für eine von außen in die Familie getragene Mutation also gering ist - machen es hochwahrscheinlich, dass der Patient und seine Schwester autozygot für den Locus der Mutation sind, beide mutierten *BMP4*-Allele also von einer einzigen Kopie eines der Urgroßeltern mütterlicherseits stammen. Die Allele wären somit abstammungsidentisch (*identical by descent, IBD*). Dies würde das Vorliegen der *BMP4*-Mutation bei III-9 zunächst unwahrscheinlich machen. Die *DACHI*-Mutation ist dahingegen offensichtlich in beiden Familienzweigen vorhanden (HD 202 ist heterozygot). Dies spricht für eine möglicherweise schon bei den Großeltern HD195 und HD202 bestehende Konsanguinität, und lässt es möglich erscheinen, dass auch III-9 die *BMP4*-Mutation von einem gemeinsamen Vorfahren geerbt haben könnte.

5.2.2.5. Mutation p.N150K als pathogene Mutation in einem oligogenen/polygenen Kontext

Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation in der Familie sowie der Fall-Kontroll-Vergleich legen eine pathogenetische Relevanz der gefundenen Mutation im *BMP4* Gen nahe. Unter Einbeziehung der zweiten Mutation im *DACHI* Gen lässt die Konstellation mit dem

Patienten als einzigem doppelt homozygotem Mutationsträger, den zum Teil subklinisch betroffenen doppelt Heterozygoten, sowie den gesunden einfach homozygoten Mutationsträgern eine synergistische Wirkung der beiden Mutationen unter dem Einfluss weiterer Loci oder nicht-genetischer Faktoren in Verbindung mit einem Gendosiseffekt vermuten.

CAKUT als polygen determinierte Erkrankung

Solche so genannten polygenen oder oligogenen Vererbungsmodi werden in jüngster Zeit zunehmend als Ursache insbesondere der isolierten CAKUT Formen diskutiert (Ichikawa *et al.* 2002). Polygen vererbte Merkmale werden durch eine Vielzahl von Genen determiniert. Sie führen zu komplexen Vererbungsmustern und können so als sporadische Merkmale erscheinen. Sie entziehen sich auf diese Weise konventionellen Strategien zur Identifikation der krankheitsauslösenden Gene, wie etwa Kopplungsanalysen (Badano u. Katsanis 2002). Zu den polygen vererbten Merkmalen gehören die kontinuierlichen (quantitativen) Merkmale, wie etwa die Körpergröße. Ihre Ausprägung zeigt eine Normalverteilung. Die Ausweitung dieser Vorstellung auf diskontinuierliche (Extremfall: dichotome) Merkmale, wie etwa das Auftreten einer Fehlbildung, führte zu der Annahme einer zu Grunde liegenden, polygen determinierten, stufenlosen Anfälligkeit (analog zu einem quantitativen Merkmal) in Verbindung mit einem Schwellenwert, ab welchem sich ein Merkmal manifestiert (Falconer 1996). Demnach führen viele kleine Veränderungen in solchen Anfälligkeitsgenen, im Zusammenspiel mit äußeren Einflüssen, ab einer bestimmten Schwelle zur Ausprägung einer Krankheit.

Die Entdeckung oligogener Erbgänge und die Tatsache, dass auch scheinbar monogene Erkrankungen durch weitere Gene modifiziert werden können, hat in den letzten Jahren zu der Ansicht geführt, dass zwischen den klassischen monogenen Erbkrankheiten mit mendelnden Vererbungsmustern und solchen polygenen, komplexen Merkmalen ein fließender Übergang besteht (Badano u. Katsanis 2002). In der Mitte dieses Kontinuums liegen die oligogenen Krankheiten, welche durch Veränderungen in einigen wenigen Loci verursacht werden und daher eine klare genetische Ätiologie haben, jedoch ebenfalls zu einem komplexen Vererbungsmuster führen. Bei einem digenischen Erbgang sind synergistische Veränderungen in zwei verschiedenen Genen für die Ausprägung eines

Merkmals notwendig. Hierbei kann sowohl eine doppelte Heterozygotie (diallelische Vererbung; Kajiwara *et al.* 1994) als auch Heterozygotie für den einen Locus in Kombination mit Homozygotie oder compound Heterozygotie für einen zweiten Locus (triallelische Vererbung; Katsanis *et al.* 2001) zur Krankheit führen. In Einzelfällen sind auch Familien mit tetraallelischer digenischer Vererbung beschrieben, bei welcher vier mutierte Allele für die Ausprägung eines Merkmals notwendig sind (Katsanis *et al.* 2002). Ebenfalls zu den oligogenen Erkrankungen werden primär monogen vererbte Erkrankungen gezählt, bei denen eines oder mehrere Modifikatorgene (*Modifier*) an der Entstehung der Krankheit mit beteiligt sind. Im Gegensatz zu den digenischen Erbgängen sind Veränderungen in einem Modifikatorgen für die Ausprägung eines Phänotyps weder hinreichend noch notwendig. Sie können jedoch sowohl die Expressivität als auch die Penetranz eines Merkmals, also die Schwere einer Krankheit und das Risiko ihres Auftretens, beeinflussen. Entsprechend wäre für den hier beobachteten Stammbaum – ungeachtet der Mutation in *DACHI* – auch ein monogener *BMP4*-Erbgang mit Beteiligung eines Penetranz-modifizierenden Modifikatorgens denkbar, welches die Ausprägung des Phänotyps bei der homozygoten Schwester (HD76) supprimiert. Ein ähnliches Vererbungsmodell ist für bestimmte Formen der rezessiv vererbten Taubheit beschrieben (Riazuddin *et al.* 2000). Die Grenzen zwischen monogener Vererbung mit Einfluss eines Modifikatorgens und digenischer Vererbung sind fließend, da Erkrankungen, für die digenische Vererbungsmodi beschrieben wurden, je nach Art der Mutation auch monogen vererbt werden können (Katsanis *et al.* 2001). Beispiele für oligogen vererbte Erkrankungen sind in Tabelle 5.1 angeführt.

	primärer Locus	sekundärer Locus	Effekt
Digenisch			
M. Hirschsprung	RET	GDNF	digenisch
Bardet-Biedl-Syndrom	BBS6 /-2 /-4	BBS6 /-2 /-4	digenisch, triallelisch
Retinitis pigmentosa	RDS	ROM1	digenisch
Nephrotisches Syndrom	NPHS1	NPHS2	digenisch
Monogen mit Modifikatorgen			
M. Alzheimer	APP	TGFB1	Modifikator der Expressivität
Brustkrebs	BRCA1	HRAS1	Modifikator der Penetranz/ des Risikos

Tabelle 5.1: Erkrankungen mit oligogener Vererbung (Badano u. Katsanis 2002).

Mögliche digenische Effekte zwischen *BMP4* und *DACH1*

Zwar lässt sich ein eindeutiger tetra-allelischer Erbgang in der Familie des Patienten HD136 aus den erhobenen Daten nicht ableiten. Die Konstellation deutet allerdings stark daraufhin, dass synergistische digenische Effekte, möglicherweise unter dem Einfluss weiterer Modifikatoren, dem komplexen Vererbungsmuster des renalen Phänotyps in der Familie zu Grunde liegen. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen aus den *BMP4* Tiermodellen: Die inkomplette Penetranz der Nierenfehlbildungen und ihre Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Mäuse deutet auch hier auf eine Beteiligung zusätzlicher genetischer Modifikatoren hin. Bei einigen dieser Tiere kommt es trotz nachweislich verringerter renaler *bmp4*-Expression (infolge *bmp4*-Haploinsuffizienz) nicht zu einer histomorphologisch sichtbaren renalen Pathologie (Cain u. Bertram 2006). Dies lässt Kompensationsmechanismen vermuten, welche den Funktionsverlust von *BMP4* bis zu einer gewissen Schwelle ausgleichen können. Durch das Hinzukommen zusätzlicher genetischer Veränderungen kann es dann - dem genetischen Schwellenwertmodell entsprechend - zur Überlastung dieser Mechanismen und zur Entstehung der renalen Fehlbildung kommen.

Bislang gibt es nur wenig experimentelle Daten zur Interaktion von *DACH1* und *BMP4*, welche als Grundlage für ein biologisches Modell zur Unterstützung der hier aufgestellten Hypothese dienen könnten. *Dach1* antagonisiert in Brustkrebszelllinien die TGF- β Signalgebung durch Bindung von Smad4, eines intrazellulären Signalmoleküls, welches auch an der Signaltransduktion von *Bmp4* beteiligt ist (Attisano u. Wrana 2002; Wu *et al.* 2003). Zudem unterdrückt exogen zugeführtes *Bmp4* in der Organkultur die Expression von *Dach1* während der frühen Stadien der Extremitätenentwicklung der Maus (Horner *et al.* 2002). Dies unterstreicht die Hypothese einer Interaktion dieser beiden Gene, steht jedoch zunächst im Widerspruch zu der hier vermuteten synergistischen Wirkung der beiden Mutationen. *Dach1* kann jedoch, innerhalb des regulatorischen Netzwerkes mit *Eya1* und *Six1*, sowohl als Korepressor als auch Koaktivator der Transkriptionsaktivierung durch *Six1* wirken (Li *et al.* 2003). *Eya1* fungiert hierbei als molekularer Schalter. Ein Funktionsverlust in *Dach1* könnte demnach, durch eine gestörte Korepressorfunktion, auch eine synergistische Wirkung zu einem Funktionsverlust in *Bmp4* entfalten.

5.2.3. Weitere Missense-Mutationen in *BMP4*

Neben den in dieser Arbeit identifizierten Mutationen fanden sich im Rahmen anschließender Untersuchungen der Arbeitsgruppe zwei weitere Mutationen bei vier unverwandten CAKUT-Patienten (Weber *et al.* 2008). Ein Patient trug ebenfalls die Mutation p.N150K, jedoch in heterozygoter Form. Der Patient stammt aus der Türkei. Es besteht keine bekannte Verwandtschaft zu dem im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationsträger. Auf die zusätzlichen in der Folge identifizierten Mutationen soll in der Diskussion nicht im Detail eingegangen werden, da sie nicht Ergebnis der vorliegenden Arbeit waren. Sie wurden im Rahmen eines abweichenden Studienentwurfs mit stärkerer Eingrenzung der zu untersuchenden Kohorte auf Fehlbildungen des oberen Harntraktes identifiziert. Dennoch unterstützen sie die hier aufgestellte Hypothese einer pathogenetischen Mitbeteiligung von *BMP4*-Mutationen an der Genese der CAKUT beim Menschen.

5.2.4. Vergleich der Phänotypen mit dem *BMP4*-Mausmodell

Die Phänotypen der Mutationsträger entsprechen im Wesentlichen den aus den *bmp4 knock-out* Tiermodellen beschriebenen Phänotypen, in welchem zystische Dysplasien (wie beim Träger der Mutation p.N150K) ebenso vorkommen wie die Hydronephrose und der vesikoureterale Reflux (Mutationsträger p.L271). Einzig die unilaterale Agenesie (Mutationsträger p.P80) ist unter den murinen Phänotypen nicht beschrieben (Miyazaki *et al.* 2000). Auch die weiteren im Anschluss an diese Arbeit identifizierten Mutationsträger entsprechen den im Mausmodell beobachteten Phänotypen (Weber *et al.* 2008). Dies steht im Einklang mit der hier aufgestellten Hypothese, dass die *BMP4*-Dysfunktion bei diesen Patienten 1) über eine fehlerhafte, d.h. ektope Sprossung des Ureters zur Obstruktion/Reflux, sowie 2) durch ebendiese Ureterektopie und durch die Störung der nachfolgenden Verzweigungsmorphogenese (*branching morphogenesis*) zur Dysplasie des Nierengewebes führt. Entsprechend kommen Fehlbildungen des unteren Harntraktes, wie etwa Urethralklappen oder Blasenanomalien, welche nicht mit dieser Hypothese erklärt werden können, unter den Mutationsträgern nicht vor.

5.3. Zusammenfassende Betrachtung und Konsequenzen aus den Ergebnissen

Mit der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Mutationen im Gen *BMP4* bei Kindern mit Nieren- und Harnwegsfehlbildungen identifiziert. Die Ergebnisse stützen damit die zuvor aufgestellte Hypothese, dass *BMP4*-Mutationen – in allerdings sehr niedriger Frequenz und mit inkompletter Penetranz – an der Pathogenese der CAKUT beim Menschen beteiligt sind. In Anbetracht der begrenzten Sensitivität der verwendeten Screeningmethode und der Möglichkeit weiterer Mutationen in nicht kodierenden Regionen des Gens, wie etwa Promotormutationen, könnte die tatsächliche Mutationsfrequenz höher liegen.

Die Signifikanz der stummen Mutationen bleibt unklar. Für die Mutation p.N150K konnte jedoch in funktionellen Studien eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion gezeigt werden (Weber *et al.* 2008). Die bekannte Dosisempfindlichkeit für *BMP4* während der Nephrogenese im Mausmodell und die Notwendigkeit der Einhaltung eines genauen örtlichen und zeitlichen Expressionsmusters sprechen zudem dafür, dass in diesem Gen auch subtile Sequenzveränderungen über eine Veränderung der Aktivität oder Stabilität des Proteins pathogen wirken können (Dunn *et al.* 1997; Miyazaki *et al.* 2000). Bei allen bislang beschriebenen humanen *BMP4* Mutationen handelt es sich ebenfalls um solche geringfügigen Variationen (Felder *et al.* 2002; Chen *et al.* 2006). Es kann postuliert werden, dass schwere Funktionsverlustmutationen in *BMP4* – analog zum Mausmodell – bereits intrauterin zum Tod führen und daher beim Menschen nicht beobachtet werden. Der starke Hinweis auf eine oligogene Vererbung des renalen Phänotyps unter Beteiligung von *BMP4* und *DACHI* in der Familie des Mutationsträgers p.N150K spricht zudem erneut dafür, dass in einem nicht unwesentlichen Teil der CAKUT erst das kumulative Auftreten verschiedener genetischer Veränderungen zur Entstehung der Fehlbildung führt (Ichikawa *et al.* 2002). Zukünftige Strategien zur Identifizierung krankheitsauslösender Gene sollten daher insbesondere das Augenmerk auf Methoden legen, welche geeignet sind, eine Vielzahl an vermuteten Anfälligkeitsloci auf Assoziation zu untersuchen, und damit auch komplexe Vererbungsmuster zu erfassen, wie dies etwa mit genomweiten Assoziationsstudien erreicht wird (McCarthy *et al.* 2008).

6. Zusammenfassung

Die kongenitalen Anomalien der Niere und des Harntraktes (CAKUT) sind eine heterogene Gruppe von Fehlbildungen mit einer multifaktoriellen Genese. Aufgrund familiären Auftretens in einem Teil der Fälle und aufgrund der Erkenntnisse aus Tiermodellen wird jedoch eine maßgebliche Beteiligung genetischer Faktoren an ihrer Entstehung angenommen. Das Gen *BMP4* wird während der Embryogenese der Maus in der Niere exprimiert. Haploinsuffizienz führt unter anderem zu einer Störung der Nephrogenese und zur Ausbildung eines dem menschlichen CAKUT-Komplex ähnelnden Spektrums an Fehlbildungen. Mit der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Mutationen in *BMP4* auch beim Menschen mit dem Auftreten von CAKUT assoziiert sind. Dafür wurde in einer unselektierten Kohorte von 234 pädiatrischen Patienten mit CAKUT ein SSCA-Screening in den proteinkodierenden Exonen und angrenzenden Intronbereichen des *BMP4* Gens durchgeführt. Bei drei Patienten wurden dabei exonische Mutationen gefunden. In einem Fall handelte es sich um eine homozygote nichtsynonyme Nukleotidsubstitution (p.N150K), in den beiden anderen um heterozygote synonyme (stumme) Nukleotidsubstitutionen (c.240G→A und c.813C→T). Keine der Veränderungen war bei den untersuchten Kontrollindividuen nachzuweisen (n= 184, 185 und 136 respektive). Mit dieser Arbeit wurden somit erstmals Mutationen in *BMP4* bei Kindern mit angeborenen Fehlbildungen der Nieren und Harnwege identifiziert. Anschließende funktionelle Untersuchungen im Zebrafischmodell zeigen, dass es durch die Mutation p.N150K zu einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion kommt. Der Träger der Mutation trägt daneben eine homozygote Punktmutation in *DACHI*, einem weiteren Kandidatengen für CAKUT. Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation im Stammbaum dieses Patienten weist auf eine synergistische Wirkung der beiden Mutationen im Rahmen eines oligogenen oder polygenen Erbganges hin. Der vorbeschriebene Polymorphismus p.V152A im *BMP4* Gen zeigte keine Assoziation mit dem CAKUT-Phänotyp.

Die Daten stützen die Hypothese, dass subtile Sequenzvariationen in *BMP4* in niedriger Frequenz und im Zusammenwirken mit weiteren genetischen und nicht-genetischen Faktoren an der Entstehung der CAKUT beim Menschen beteiligt sind.

7. Literaturverzeichnis

- Abdelhak, S., V. Kalatzis, et al. (1997) A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* 15(2): 157-64
- Alcaraz, A., F. Vinaixa, et al. (1991) Obstruction and recanalization of the ureter during embryonic development. *J Urol* 145(2): 410-6
- Anumba, D. O., J. E. Scott, et al. (2005) Diagnosis and outcome of fetal lower urinary tract obstruction in the northern region of England. *Prenat Diagn* 25(1): 7-13
- Aono, A., M. Hazama, et al. (1995) Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 210(3): 670-7
- Atiyeh, B., D. Husmann, et al. (1992) Contralateral renal abnormalities in multicystic-dysplastic kidney disease. *J Pediatr* 121(1): 65-7
- Atiyeh, B., D. Husmann, et al. (1993) Contralateral renal abnormalities in patients with renal agenesis and noncystic renal dysplasia. *Pediatrics* 91(4): 812-5
- Attisano, L. und J. L. Wrana (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296(5573): 1646-7
- Badano, J. L. und N. Katsanis (2002) Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet* 3(10): 779-89
- Balding, D. J. (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 7(10): 781-91
- Barboux, S., P. Niaudet, et al. (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17(4): 467-70
- Bergmann, C., J. Senderek, et al. (2004) PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mutat* 23(5): 453-63
- Bingham, C., M. P. Bulman, et al. (2001) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 68(1): 219-24
- Brophy, P. D., L. Ostrom, et al. (2001) Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. *Development* 128(23): 4747-56
- Brunet, L. J., J. A. McMahon, et al. (1998) Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280(5368): 1455-7
- Bush, K. T., H. Sakurai, et al. (2004) TGF-beta superfamily members modulate growth, branching, shaping, and patterning of the ureteric bud. *Dev Biol* 266(2): 285-98
- Cain, J. E. und J. F. Bertram (2006) Ureteric branching morphogenesis in BMP4 heterozygous mutant mice. *J Anat* 209(6): 745-55
- Cartegni, L., S. L. Chew, et al. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3(4): 285-98
- Cartegni, L. und A. R. Krainer (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30(4): 377-84
- Cartegni, L., J. Wang, et al. (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3568-71
- Chen, D., M. Zhao, et al. (2004) Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22(4): 233-41
- Chen, T., Q. Li, et al. (2006) Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet*

- Choi, J. Y., C. S. Shin, et al. (2006) Single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of bone morphogenetic protein genes and peripheral bone mineral density in young Korean men and women. *Calcif Tissue Int* 78(4): 203-11
- Consortium", T. E. P. K. D. (1994) The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 77(6): 881-94
- Constam, D. B. und E. J. Robertson (1999) Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* 144(1): 139-49
- Cui, Y., R. Hackenmiller, et al. (2001) The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev* 15(21): 2797-802
- Cui, Y., F. Jean, et al. (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Embo J* 17(16): 4735-43
- Cullen-McEwen, L. A., J. Drago, et al. (2001) Nephron endowment in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) heterozygous mice. *Kidney Int* 60(1): 31-6
- Davis, R. J., W. Shen, et al. (2001) Dach1 mutant mice bear no gross abnormalities in eye, limb, and brain development and exhibit postnatal lethality. *Mol Cell Biol* 21(5): 1484-90
- Derynck, R. und Y. E. Zhang (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425(6958): 577-84
- Di Pasquale, E., P. Beck-Peccoz, et al. (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 75(1): 106-11
- Dressler, G. (2002) Tubulogenesis in the developing mammalian kidney. *Trends Cell Biol* 12(8): 390-5
- Dunn, N. R., G. E. Winnier, et al. (1997) Haploinsufficient phenotypes in Bmp4 heterozygous null mice and modification by mutations in Gli3 and Alx4. *Dev Biol* 188(2): 235-47
- Edghill, E. L., C. Bingham, et al. (2006) Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J Med Genet* 43(1): 84-90
- Fairbrother, W. G., R. F. Yeh, et al. (2002) Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297(5583): 1007-13
- Falconer, D. S. (1996) Introduction to quantitative genetics. 4th edition. Longman Sci. and Tech., Harlow, UK.
- Favor, J., R. Sandulache, et al. (1996) The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13870-5
- Felder, B., K. Stegmann, et al. (2002) Evaluation of BMP4 and its specific inhibitor NOG as candidates in human neural tube defects (NTDs). *Eur J Hum Genet* 10(11): 753-6
- Grantham, R. (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185(4154): 862-4
- Gross, E., N. Arnold, et al. (1999) A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 105(1-2): 72-8
- Harrison, M. R., N. Ross, et al. (1983) Correction of congenital hydronephrosis in utero. I. The model: fetal urethral obstruction produces hydronephrosis and pulmonary hypoplasia in fetal lambs. *J Pediatr Surg* 18(3): 247-56
- Hartman, G. E. und S. J. Shochat (1989) Abdominal mass lesions in the newborn: diagnosis and treatment. *Clin Perinatol* 16(1): 123-35
- Hogan, B. L. (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10(13): 1580-94

- Horner, A., L. Shum, et al. (2002) Fibroblast growth factor signaling regulates Dach1 expression during skeletal development. *Dev Dyn* 225(1): 35-45
- Hu, M. C., T. D. Piscione, et al. (2003) Elevated SMAD1/beta-catenin molecular complexes and renal medullary cystic dysplasia in ALK3 transgenic mice. *Development* 130(12): 2753-66
- Ichikawa, I., F. Kuwayama, et al. (2002) Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. *Kidney Int* 61(3): 889-98
- Jain, S., A. A. Suarez, et al. (2007) Expression profiles of congenital renal dysplasia reveal new insights into renal development and disease. *Pediatr Nephrol* 22(7): 962-74
- Jiao, K., H. Kulesa, et al. (2003) An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev* 17(19): 2362-7
- Kaariainen, H., O. Koskimies, et al. (1988) Dominant and recessive polycystic kidney disease in children: evaluation of clinical features and laboratory data. *Pediatr Nephrol* 2(3): 296-302
- Kajiwara, K., E. L. Berson, et al. (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264(5165): 1604-8
- Kaplan, F. S., J. Fiori, et al. (2006) Dysregulation of the BMP-4 signaling pathway in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 54-65
- Katoh, Y. und M. Katoh (2005) Comparative genomics on BMP4 orthologs. *Int J Oncol* 27(2): 581-5
- Katsanis, N., S. J. Ansley, et al. (2001) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293(5538): 2256-9
- Katsanis, N., E. R. Eichers, et al. (2002) BBS4 is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance. *Am J Hum Genet* 71(1): 22-9
- Kemper, M. J. und D. E. Müller-Wiefel (2001) Renal function in congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Curr Opin Urol* 11(6): 571-5
- Kinoshita, A., T. Saito, et al. (2000) Domain-specific mutations in TGFB1 result in Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet* 26(1): 19-20
- Kohlhase, J., A. Wischermann, et al. (1998) Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* 18(1): 81-3
- Krawczak, M., J. Reiss, et al. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90(1-2): 41-54
- Lange-Sperandio, B., F. Cachat, et al. (2002) Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice. *Kidney Int* 61(2): 516-24
- Li, X., K. A. Oghi, et al. (2003) Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 426(6964): 247-54
- Limwongse, C., S. Clarren, et al. (1999) Syndromes and malformations of the urinary tract. In: T. Barratt, E. Avner and W. Harmon (Hrsg) *Pediatric Nephrology* (3rd ed.). Williams and Wilkins, Baltimore.
- Lin, L. F., D. H. Doherty, et al. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260(5111): 1130-2
- Liu, H. X., M. Zhang, et al. (1998) Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* 12(13): 1998-2012
- Liu, W., J. Selever, et al. (2005) Threshold-specific requirements for Bmp4 in mandibular development. *Dev Biol* 283(2): 282-93
- Mackie, G. G. und F. D. Stephens (1975) Duplex kidneys: a correlation of renal dysplasia with position of the ureteral orifice. *J Urol* 114(2): 274-80
- Mangino, M., I. Torrente, et al. (1999) A single-nucleotide polymorphism in the human bone morphogenetic protein-4 (BMP 4) gene. *J Hum Genet* 44(1): 76-7

- Markoff, A., A. Savov, et al. (1997) Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin Chem* 43(1): 30-3
- Mayo, O. (2008) A century of hardy-weinberg equilibrium. *Twin Res Hum Genet* 11(3): 249-56
- McCarthy, M. I., G. R. Abecasis, et al. (2008) Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 9(5): 356-69
- Michos, O., A. Goncalves, et al. (2007) Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development* 134(13): 2397-405
- Michos, O., L. Panman, et al. (2004) Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 131(14): 3401-10
- Miyazaki, Y. und I. Ichikawa (2003) Ontogeny of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. *Pediatr Int* 45(5): 598-604
- Miyazaki, Y., K. Oshima, et al. (2000) Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J Clin Invest* 105(7): 863-73
- Miyazaki, Y., K. Oshima, et al. (2003) Evidence that bone morphogenetic protein 4 has multiple biological functions during kidney and urinary tract development. *Kidney Int* 63(3): 835-44
- Müller-Wiefel, D. E. und S. Conrad (2000) Kongenitale Harntraktanomalien. In: K. KM (Hrsg) Klinische Nephrologie. Urban u. Fischer, München, Jena.
- Nakanishi, K. und N. Yoshikawa (2003) Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Pediatr Int* 45(5): 610-6
- Neave, B., N. Holder, et al. (1997) A graded response to BMP-4 spatially coordinates patterning of the mesoderm and ectoderm in the zebrafish. *Mech Dev* 62(2): 183-95
- Nishimoto, K., K. Iijima, et al. (2001) PAX2 gene mutation in a family with isolated renal hypoplasia. *J Am Soc Nephrol* 12(8): 1769-72
- Orita, M., H. Iwahana, et al. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8): 2766-70
- Oxburgh, L., A. T. Dudley, et al. (2005) BMP4 substitutes for loss of BMP7 during kidney development. *Dev Biol* 286(2): 637-46
- Padgett, R. A., P. J. Grabowski, et al. (1986) Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* 55: 1119-50
- Pelletier, J., W. Bruening, et al. (1991) Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67(2): 437-47
- Pelletier, J., W. Bruening, et al. (1991) WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 353(6343): 431-4
- Peters, C. A., M. C. Carr, et al. (1992) The response of the fetal kidney to obstruction. *J Urol* 148(2 Pt 2): 503-9
- Piscione, T. D. und N. D. Rosenblum (2002) The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights. *Differentiation* 70(6): 227-46
- Pope, J. C. t., J. W. Brock, 3rd, et al. (1999) How they begin and how they end: classic and new theories for the development and deterioration of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT. *J Am Soc Nephrol* 10(9): 2018-28
- Raatikainen-Ahokas, A., M. Hytonen, et al. (2000) BMP-4 affects the differentiation of metanephric mesenchyme and reveals an early anterior-posterior axis of the embryonic kidney. *Dev Dyn* 217(2): 146-58

- Ramesh Babu, L., S. G. Wilson, et al. (2005) Bone mass effects of a BMP4 gene polymorphism in postmenopausal women. *Bone* 36(3): 555-61
- Riazuddin, S., C. M. Castelein, et al. (2000) Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nat Genet* 26(4): 431-4
- Rozen, S. und H. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-86
- Ruf, R. G., P. X. Xu, et al. (2004) SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21): 8090-5
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350-4
- Sainio, K., P. Suvanto, et al. (1997) Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development* 124(20): 4077-87
- Sanchez, M. P., I. Silos-Santiago, et al. (1996) Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382(6586): 70-3
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7
- Sanyanusin, P., L. A. Schimmenti, et al. (1995) Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 9(4): 358-64
- Sariola, H. (2002) Nephron induction revisited: from caps to condensates. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11(1): 17-21
- Saxén, L. (1987) Organogenesis of the Kidney. Cambridge University Press, Cambridge.
- Schärer, K. (2002) Nierenhypoplasie und -dysplasie. In: K. Schärer and O. Mehls (Hrsg) Pädiatrische Nephrologie. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schedl, A. (2007) Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet* 8(10): 791-802
- Selever, J., W. Liu, et al. (2004) Bmp4 in limb bud mesoderm regulates digit pattern by controlling AER development. *Dev Biol* 276(2): 268-79
- Shafritz, A. B., E. M. Shore, et al. (1996) Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *N Engl J Med* 335(8): 555-61
- Shah, M. M., R. V. Sampogna, et al. (2004) Branching morphogenesis and kidney disease. *Development* 131(7): 1449-62
- Smith, P. J., C. Zhang, et al. (2006) An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet* 15(16): 2490-508
- Squiers, E. C., R. S. Morden, et al. (1987) Renal multicystic dysplasia: an occasional manifestation of the hereditary renal adysplasia syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 3: 279-84
- Stephens, F. D., E. D. Smith, et al. (1996) Renal hypoplasia and dysplasia in infants with posterior urethral valves. In: F. D. Stephens, E. D. Smith and J. M. Hutson (Hrsg) Congenital Anomalies of Urinary and Genital Tracts, 1st edn. ISIS Medical Media, Oxford.
- Torres, M., E. Gomez-Pardo, et al. (1995) Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 121(12): 4057-65
- Ulinski, T., S. Lescure, et al. (2006) Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J Am Soc Nephrol* 17(2): 497-503
- Vainio, S. und Y. Lin (2002) Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat Rev Genet* 3(7): 533-43
- van den Wijngaard, A., M. van Kraay, et al. (1996) Genomic organization of the human bone morphogenetic protein-4 gene: molecular basis for multiple transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 219(3): 789-94

- van den Wijngaard, A., D. O. Weghuis, et al. (1995) Fine mapping of the human bone morphogenetic protein-4 gene (BMP4) to chromosome 14q22-q23 by in situ hybridization. *Genomics* 27(3): 559-60
- Vats, A. N., C. Ishwad, et al. (2003) Steroid-resistant nephrotic syndrome and congenital anomalies of kidneys: evidence of locus on chromosome 13q. *Kidney Int* 64(1): 17-24
- Ward, C. J., M. C. Hogan, et al. (2002) The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 30(3): 259-69
- Watkins, S. L., R. A. McDonald, et al. (1999) Syndromes and malformations of the urinary tract. In: *Pediatric Nephrology* (3rd ed.), edited by Barratt TM, Avner ED, and Harmon WE. 415-425
- Weber, S., V. Moriniere, et al. (2006) Prevalence of Mutations in Renal Developmental Genes in Children with Renal Hypodysplasia: Results of the ESCAPE Study. *J Am Soc Nephrol*
- Weber, S., J. C. Taylor, et al. (2008) SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. *J Am Soc Nephrol* 19(5): 891-903
- Wilson, P. D. (2004) Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 350(2): 151-64
- Winnier, G., M. Blessing, et al. (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9(17): 2105-16
- Woolf, A. S. (2000) A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformations. *Kidney Int* 58(2): 500-12
- Wozney, J. M., V. Rosen, et al. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242(4885): 1528-34
- Wu, K., Y. Yang, et al. (2003) DACH1 inhibits transforming growth factor-beta signaling through binding Smad4. *J Biol Chem* 278(51): 51673-84
- Xu, P. X., J. Adams, et al. (1999) Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* 23(1): 113-7
- Zerres, K., R. Albrecht, et al. (1985) Acquired cystic kidney disease--a possible pitfall in genetic counseling. *Hum Genet* 71(3): 267-9
- Zerres, K., M. Hansmann, et al. (1985) Prenatal diagnosis of genetically determined early manifestation of autosomal dominant polycystic kidney disease? *Hum Genet* 71(4): 368-9

8. Anhang

8.1. Verzeichnisse

8.1.1. Abkürzungen

ADPKD	Autosomal-dominante Polyzystische Nierenerkrankung (<i>autosomal dominant polycystic kidney disease</i>)
Alk	<i>activin receptor-like kinase</i>
ARPKD	Autosomal-rezessive Polyzystische Nierenerkrankung (<i>autosomal recessive polycystic kidney disease</i>)
<i>BMP4, bmp4</i>	<i>Bone morphogenetic protein 4</i> – Gen (Mensch und Maus respektive)
BMP-4, bmp-4	<i>Bone morphogenetic Protein 4</i> (Mensch und Maus respektive)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BOR Syndrom	Branchio-Oto-Renales Syndrom
CAKUT	Kongenitale Anomalien der Niere und ableitenden Harnwege (<i>congenital anomalies of the kidney and urinary tract</i>)
CDS	Kodierende Sequenz (<i>Coding sequence</i>)
DACH1	<i>Homologue of dachshund 1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESE, ESS	<i>Exonic splicing enhancer, Exonic splicing silencer</i>
EYA1	<i>Eyes absent 1</i>

GDNF	<i>Glial-cell-line-derived neurotrophic factor</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HNF1- β	<i>Hepatocyte nuclear factor 1-β</i>
MCDKD	Multizystisch-dysplastische Nierenerkrankung (<i>multicystic dysplastic kidney disease</i>)
MZU	Miktionszystourethrographie
NTP, ddNTP	Nukleosidtriphosphat, Didesoxynukleosidtriphosphat
PAX2	<i>Paired homeobox 2</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain-reaction</i>)
PKD1, PKD2	<i>Polycystic kidney disease 1, polycystic kidney disease 2</i>
PKHD1	<i>Polycystic kidney and hepatic disease 1</i>
PM	Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
SALL1	<i>Sal-like 1</i>
SIX1	<i>Sine oculis 1</i>
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SSCA	Einzelstrangkonnformationsanalyse (<i>Single-strand conformation analysis</i>)
SSCP	Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (<i>Single-strand conformation polymorphism</i>)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
wt	Wildtyp
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>

8.1.2. Abbildungen

Abbildung 2.1: Uretersprossung, Ureterverzweigung und frühe Tubulogenese.....	13
Abbildung 2.2: Die „Budding“-Hypothese.....	15
Abbildung 2.3: Modell für die Entstehung verschiedener CAKUT Entitäten aus einem Gendefekt.....	18
Abbildung 2.4: An der Uretersprossung beteiligte Gene und ihre Interaktion.....	20
Abbildung 2.5: Regulation der Uretersprossung und Ureterverzweigung durch Bmp4.....	24
Abbildung 2.6: Genomische Organisation des <i>BMP4</i> Gens und Aufbau des Präproteins.....	26
Abbildung 3.1: Prinzip der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA).....	37
Abbildung 4.1: Renale Phänotypen in der Patientenkohorte.....	47
Abbildung 4.2: Extrarenale Malformationen im Patientenkollektiv.....	47
Abbildung 4.3: SSCA von Exon 5 Abschnitt D des <i>BMP4</i> Gens des Patienten HD136.....	49
Abbildung 4.4: Nucleotidsequenz des Patienten HD136 im Bereich der Mutation.....	49
Abbildung 4.5: Position der Mutation p.N150K im <i>BMP4</i> Gen und dem Vorläuferprotein.....	50
Abbildung 4.6: Ultraschallbefund der Eigennieren des Mutationsträgers HD136.....	52
Abbildung 4.7: SSCA von Exon 5 Abschnitt D des <i>BMP4</i> -Gens in der Familie des Mutationsträgers.....	53
Abbildung 4.8: Stammbaum der Familie des Mutationsträgers HD136.....	54
Abbildung 4.9: SSCA von Exon 4 Abschnitt A des Patienten ANKA45.....	55
Abbildung 4.10: Nucleotidsequenz des Patienten ANKA45 im Bereich der Mutation.....	55
Abbildung 4.11: Position der Mutation c.240G→A im <i>BMP4</i> Gen.....	55
Abbildung 4.12: SSCA von Exon 4 Abschnitt C des Patienten ANKA116.....	57
Abbildung 4.13: Nucleotidsequenz des Patienten ANKA116 im Bereich der Mutation.....	57
Abbildung 4.14: Position der Mutation c.813C→T im <i>BMP4</i> Gen.....	58
Abbildung 4.15: Polymorphismus c.455T→C in Exon 5 des <i>BMP4</i> Gens.....	60
Abbildung 5.1: <i>BMP4</i> mRNA-Überexpressionsassay im Zebrafisch.....	68
Abbildung 5.2: Phänotypen in der Familie HD136 und Genotypen in <i>BMP4</i> und <i>DACHI</i>	71

8.2. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Dr. med. Müller-Wiefel für die Übernahme der Betreuung und die Unterstützung meiner Arbeit.

Für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis der Sektion für Pädiatrische Nephrologie in Heidelberg möchte ich Herrn Professor Dr. med. Franz Schaefer danken.

Bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. Stefanie Weber möchte ich mich für die schöne und konstruktive Zusammenarbeit und andauernde Unterstützung bedanken. Ihre außerordentliche und ständige Hilfsbereitschaft in allen praktischen und theoretischen Belangen hat die Entstehung dieser Arbeit erst möglich gemacht.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. med. Tanja Knüppel für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung und der Datenerhebung danken.

Für die freundliche Hilfe bei der Einarbeitung in die Arbeitstechniken und ihre Hilfestellung bei methodischen Problemen danke ich Alexandra Ochs und Bärbel Phillippin.

8.4. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Informationsmittel 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. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Raphael-Sebastian Schild