

Mutationsanalyse der Exone 26 bis 52 des *PKHD1*-Gens
bei der Autosomal Rezessiv erblichen Polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD)

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Ioannis Pegiazoglou

aus

Thessaloniki (Griechenland)

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Klaus Zerres

Herr Professor
Dr. med. Jochen Riehl

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Inhalt

1	Einleitung und allgemeine Grundlagen.....	5
1.1	Definition und Häufigkeit.....	5
1.2	Klinik.....	5
1.3	Pathologische Anatomie.....	7
1.4	Pathogenese.....	8
1.5	Differentialdiagnose.....	9
1.6	Pränataldiagnostik.....	9
1.7	Genetik.....	10
1.8	Zielsetzung.....	11
2	Patienten und Methoden.....	12
2.1	Patientenkollektiv.....	12
2.2	Methoden.....	13
2.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	13
2.2.1.2	Einzelstrangkonnformations-Polymorphismen-Analyse (SSCP).....	15
2.2.1.3	Direkter Mutationsnachweis – DNA-Sequenzierung.....	16
3	Ergebnisse.....	18
3.1	Ergebnisse der Mutationsanalyse.....	18
3.1.1	Gruppe der Patienten mit schwerem Phänotyp.....	18
3.1.2	Gruppe der Patienten mit moderatem Phänotyp.....	21
3.1.3	Gruppe der Patienten mit intrafamiliärer Variabilität des Phänotyps.....	23

3.2	Polymorphismen	25
3.3	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.....	27
4	Diskussion.....	29
4.1	Mutationsdetektionsrate und Methodik	29
4.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.....	30
4.3	Bedeutung der direkten Mutationsanalyse in der Pränataldiagnostik von ARPKD.....	35
5	Zusammenfassung.....	38
6	Literatur.....	40
7	Danksagung.....	47
8	Anhang	48
9	Lebenslauf.....	68

1 Einleitung und allgemeine Grundlagen

1.1 Definition und Häufigkeit

Die autosomal – rezessive polyzystische Nierenerkrankung (Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease, ARPKD) ist eine schwer verlaufende hereditäre Erkrankung, deren Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung auf ca. 1:20,000 (Heterozygotenfrequenz von etwa 1:70) geschätzt wird. Vom klinischen und pathoanatomischen Gesichtspunkt wurde früher von der infantilen polyzystischen Nierenerkrankung (Zystennieren Typ I nach Potter) gesprochen, jedoch ist der genetisch definierte Begriff „ARPKD“ nicht streng an das Manifestationsalter in der Kindheit gebunden und wird heutzutage bevorzugt verwendet.

1.2 Klinik

Die ARPKD hat ein sehr weites Manifestationsspektrum. Die meisten betroffenen Kinder (ca. 80%) werden schon im Neonatal-/Säuglingsalter diagnostiziert, wobei die Erkrankung sich initial etwa in der Hälfte der Fälle als palpabler Bauchtumor und bei den restlichen Kindern mit Hypertonie oder mit anderen Symptomen manifestiert. In schweren Fällen kommt es intrauterin aufgrund der eingeschränkten Nierenfunktion zum Oligohydramnion, begleitet von einer Lungenhypoplasie (wahrscheinlich wegen Zwerchfellhebung durch die vergrößerten Nieren) und einer sog. Potter-Sequenz. Diese führen häufig schon pränatal oder in den ersten Lebensstagen (z.B. infolge respiratorischer Insuffizienz) zum Tod. Bei den überlebenden Patienten hängt der weitere Verlauf vom Grad der Nieren- und Leberveränderungen ab.

<i>Merkmale</i>	<i>ARPKD</i>
Hauptsymptome	Neugeborenenperiode: respiratorische Störungen bei Lungenhypoplasie später: progredient verlaufende Niereninsuffizienz, arterielle Hypertonie, portale Hypertension
Weitere Symptome	kongenitale Leberfibrose in sehr variablem Ausmass, zystische Pankreasveränderungen

Tabelle 1-1: Klinik der ARPKD {Aus: Zerres 2000; modifiziert (54)}

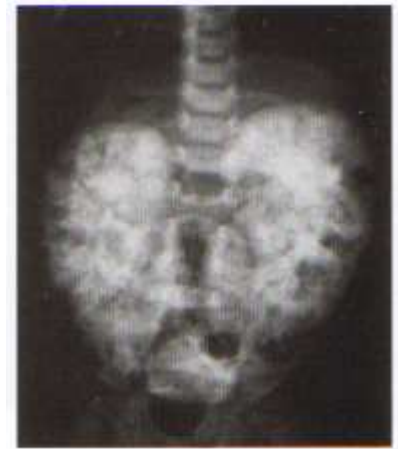
Im Mittelpunkt der Nierensymptomatik steht eine erniedrigte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) (72% der betroffenen Kinder im Alter bis zu 19 Jahren nach einem durchschnittlichen Krankheitsverlauf von 5 Jahren) (55). Neben der zunehmenden Einschränkung der GFR stellt die Hypertonie ein Hauptproblem dar (75-100% der Betroffenen). Frühzeitig macht sich eine ausgeprägte renale Konzentrationsschwäche durch eine Polyurie oder Polydipsie bemerkbar, gelegentlich beobachtet man auch eine Azidose oder einen tubulären Salzverlust (im Urin ist manchmal eine Makro- oder Mikrohämaturie, eine leichte Proteinurie und/oder eine Leukozyturie mit oder ohne Bakteriurie nachzuweisen). Im Spätstadium stehen assoziierte Symptome der Niereninsuffizienz wie Anämie und Kleinwuchs im Vordergrund (22).

Sonographische Zeichen einer Leberfibrose sowie klinische Symptome wie Hepatomegalie, Ösophagusvarizen mit Hämatemesis infolge portaler Hypertension, Milzvergrößerung mit entsprechenden Blutveränderungen treten bei fast der Hälfte der Kinder mit ARPKD schon im 1. Lebensjahr, allerdings oft auch erst im späten Kindes- und Jugendalter auf. Die Leberfunktion bleibt jedoch in der Regel intakt, zumindest bis eine Nierenersatztherapie erforderlich wird. Ein weiteres Problem stellen gelegentlich rezidivierende Harnwegsinfektionen dar.

Mittels Sonographie sind Veränderungen häufig erst nach der 30. Schwangerschaftswoche nachzuweisen. Postnatal zeigt das Ultraschallbild neben einer Vergrößerung eine diffus verstärkte Echogenität der Nieren mit verwaschener Markrindengrenze; Zysten erreichen einen Durchmesser von maximal 2mm. Mit zunehmendem Alter nimmt die relative Nierengröße ab. Eine brauchbare Klassifikation der verschiedenen sonographischen Schweregrade der ARPKD wurde von Garel 1984 (13) vorgestellt. Die intravenöse Urographie zeigt eine verzögerte Kontrastmittelausscheidung der vergrößerten Niere mit einer streifigen radiären Struktur in Nierenrinde und Nierenmark, die den erweiterten Sammelrohren entspricht (Abb. 1-1), wird jedoch heute nur noch selten durchgeführt.



a)



b)

Abb. 1-1: a) Dilatiertes Abdomen eines an ARPKD leidenden Kindes durch bilateral vergrößerte Nieren. b) Intravenöse Urographie desselben Patienten (11)

1.3 Pathologische Anatomie

Makroskopisch erscheinen die Nieren beidseitig stark vergrößert. Mikroskopisch sind praktisch nur die Sammelrohre zystisch erweitert. Der Anteil erweiterter Sammelrohre (ca. 60% bei perinataler, 10% bei juveniler Manifestation) korreliert mit der Schwere der Erkrankung. Der Zystendurchmesser nimmt mit dem Alter zu und es tritt eine interstitielle Fibrose auf (Abb. 1-2).

Bei der Leber beobachtet man eine Proliferation und Dilatation der intrahepatischen, später auch der extrahepatischen Gallengänge, die von einer zunehmenden Leberfibrose begleitet wird (sog. Duktalplattenmalformation (56)). Diese macht sich sonographisch durch verstärkte Echogenität bemerkbar.

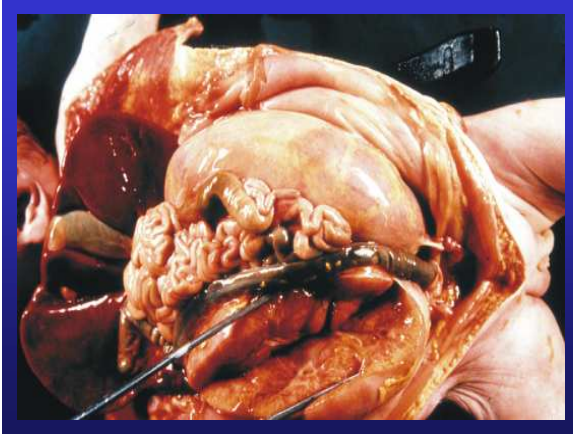


Abb. 1-2: Bauchsitus mit deutlich vergrößerten Nieren bei einem Kind mit ARPKD

1.4 Pathogenese

Die Pathogenese der ARPKD ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Die unterschiedlichen Formen von Zystennieren und die Vielzahl von Syndromen mit zystischen Nierenveränderungen (59) sprechen dafür, dass die Zystengenesse nicht einheitlich ist und dass die Niere auf eine Vielzahl von Störungen mit der Bildung von Zysten reagiert (26).

Für die Zystenentstehung sind vor allem drei Faktoren von Bedeutung:

- eine Störung des Epithelzellwachstums
- Veränderungen der tubulären Basalmembranen und der extrazellulären Matrix
- Störungen des transepithelialen Flüssigkeitstransports

Ausserdem wird die Bedeutung der Apoptose bei der Zystenentstehung diskutiert (51; 23), es bleibt jedoch die Frage offen, inwieweit es sich auch um ein sekundäres Phänomen handeln könnte, welches aufgrund der enormen Veränderung der Nieren infolge der Zystenbildung eintritt. Weitergehende Aufschlüsse werden sich aus der exakten funktionellen Analyse der Zystennierenproteine ergeben. Neueste Befunde deuten daraufhin, dass die Funktion der Cilien als Mechanosensoren über die Regulation des intrazellulären Ca^{2+} - Spiegels beeinflusst ist.

1.5 Differentialdiagnose

Die wichtigste Differentialdiagnose von ARPKD stellt die frühmanifeste Form der autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) dar. Insbesondere im Neugeborenenalter ist es klinisch schwierig, die beiden Formen auseinander zu halten. 20-30% aller Kinder mit Zystennieren zeigen bildgebende Merkmale beider Formen (26). Umso stärker kommt der Familienanamnese bei der Einordnung eine Bedeutung zu, vor allem der Ultraschalluntersuchung beider Eltern, (die älter als 30 Jahre sein sollten, (2)) : Ein negatives Ergebnis reduziert die Wahrscheinlichkeit einer ADPKD auf das Niveau einer Neumutation (34).

Weiterhin kommen differentialdiagnostisch zahlreiche Krankheitsbilder in Betracht, wie glomeruläre Zystennieren, Nephronophthise, tuberöse Sklerose, erworbene Zystennieren u.a. , die sich jedoch klinisch meist sicher abgrenzen lassen. Die kongenitale Leberfibrose (CHF) tritt zwar obligat im Rahmen der ARPKD auf, kann aber in seltenen Fällen auch bei Patienten mit ADPKD sowie bei anderen zystischen Nierenerkrankungen vorkommen. Ausserdem sollte immer an syndromale Krankheitsbilder gedacht werden, die mit Nierenzysten assoziiert sein können (z.B. Meckel-Syndrom, Jeune-Syndrom, Kurzrippen-Polydaktylie-Syndrome, Von-Hippel-Lindau-Syndrom u.a.). Viele dieser Syndrome sind heute auch durch molekulargenetische Methoden zu diagnostizieren (54).

1.6 Pränataldiagnostik

Aufgrund der häufig infausten Prognose und des frühen Todes (30-50% der betroffenen Neugeborenen sterben kurz nach der Geburt an respiratorischer Insuffizienz auf dem Boden einer Lungenhypoplasie, (15)) ist die ARPKD eine Erbkrankheit mit grosser Nachfrage nach einer vorgeburtlichen Diagnostik. Die ultrasonographische Pränataldiagnostik muss aber als unsicher eingestuft werden (53), denn selbst bei sehr früher Manifestation tritt die entscheidende Grössenzunahme der Niere häufig erst in der 2. Schwangerschaftshälfte ein. Zahlreiche Beobachtungen falsch negativer pränataler Ultraschalluntersuchungen der 1. Schwangerschaftshälfte sind Beleg hierfür. Molekulargenetische Analysen sind somit für eine sichere Pränataldiagnose unerlässlich.

1.7 Genetik

Blyth und Ockenden haben 1972 auf der Basis einer Analyse von Krankheitsverläufen bei Geschwistern 4 verschiedene Genorte für die ARPKD postuliert. Auf dem Hintergrund der klinischen Variabilität der ARPKD sowie einer hohen intrafamiliären Variabilität der Krankheitsverläufe bei einigen Geschwistern erscheint jedoch multiple Allelie, also die Existenz unterschiedlicher Ausprägungen eines einzigen Gens, eine plausible Erklärung, die durch die molekulargenetischen Befunde bestätigt wird.

Das verantwortliche Gen der ARPKD konnte 1994 von Zerres et al. auf der Basis der Analyse von 16 Multiplexfamilien auf Chromosom 6p21 lokalisiert und auf eine Region von ~ 13 cM (centiMorgan) eingegrenzt werden (52). Der Genlokus konnte in den folgenden Jahren zwischen dem Marker D6S1714 als telomerischer und KIAA0057(CA)28 als zentromerischer Grenze weiter eingegrenzt werden (30, 29, 25, 36). Mit der Kartierung des Genlokus für ARPKD war molekulargenetische Pränataldiagnostik durch Kopplungsanalyse möglich. 2002 gelang die Identifizierung des *PKHD1*-Gens zwei unabhängigen Gruppen (50; 35). Onuchic et al. waren mittels Positionsklonierung erfolgreich (28; 38; 19; 37), während Ward et al. das menschliche Gen durch Homologie zu Mutationen im PCK-Rattenmodell für polyzystische Nierenerkrankung identifizieren konnten (24; 46). Das Gen erstreckt sich über ca. 470 kb genomischer DNA und besteht aus mindestens 86 alternativ gespleissten Exonen (35). Der längste offene Leserahmen (ORF, „Open Reading Frame“) umfasst 67 Exone und kodiert für ein bioinformatisches Protein von 4074 Aminosäuren („Polyductin“ (35) / „Fibrocystin“ (50)). Laut Strukturvorhersagen handelt es sich um ein integrales Membranprotein mit einer grossen, stark glykosilierten Extrazellulärdomäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Carboxy-Terminus, der potenzielle Phosphorylierungsstellen aufweist (28). Polyductin/Fibrocystin weist keine eindeutigen Homologien zu bekannten Proteinen auf und bildet somit eine neue Proteinklasse. Nach Strukturanalyse beinhaltet Polyductin in seiner Extrazellulärdomäne verschiedene IPT-Domänen (Ig-ähnlich, Plexin, Transkriptionsfaktoren) und mehrere PbH1-Wiederholungen (Parallele-beta-Helix-1) (35). Eine Funktion als Rezeptor u./o. Adhäsionsmolekül ist denkbar.

1.8 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit ist Teil der ersten grossen systematischen Mutationsanalyse (Bergmann et al., 2003), die nach der Identifizierung des *PKHD1*-Gens durchgeführt wurde.

Das seinerzeit bekannte Spektrum ARPKD-assoziiierter *PKHD1*-Genotypen sollte durch eine systematische Mutationsanalyse der zum längsten kontinuierlichen ORF des *PKHD1*-Gens gehörenden Exone 26-52 bei 90 betroffenen Familien (148 betroffene Kinder) erweitert werden.

Zusammen mit den Ergebnissen weiterer Mutationsanalysen der restlichen Exone des *PKHD1*-Gens (2-25 und 53-67, (6)) sollte die erreichbare Mutationsdetektionsrate ermittelt werden und diese unter anderem im Hinblick auf die angewandte Methodik diskutiert werden.

Anhand der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalyse sollte versucht werden, mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei ARPKD-Patienten zu etablieren.

Schliesslich wurde zudem über die Bedeutung der direkten Mutationsanalyse des *PKHD1*-Gens in der Pränataldiagnostik von ARPKD diskutiert.

2 Patienten und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In dieser Studie fanden 90 Familien Aufnahme, die mindestens ein betroffenes Kind mit ARPKD hatten (insgesamt 148 betroffene Individuen) und wurden auf Mutationen in den Exonen 26-52 des *PKHD1*-Gens untersucht. Die Mehrzahl der in der Studie untersuchten Familien hatten im letzten Jahrzehnt eine Anfrage auf Pränataldiagnostik gestellt. Die Auswahl der Familien erfolgte nach folgenden diagnostischen Kriterien (53) :

1. Manifestation von typischen klinischen Symptomen mit charakteristischen ultrasonographischen Veränderungen (8; 13)
2. mindestens eine der folgenden Bedingungen musste erfüllt sein:
 - a. normaler Ultraschall der elterlichen Nieren (dieses Kriterium wurde bei allen ausser 3 Familien erfüllt)
 - b. klinische Zeichen oder histopathologischer Nachweis einer Leberfibrose
 - c. pathoanatomischer Nachweis von ARPKD bei einem betroffenen Geschwisterteil
 - d. Verwandtschaft der Eltern, die eine autosomal rezessive Vererbung wahrscheinlich macht.

Alle Familien stammten grösstenteils aus dem europäischen Raum, aber auch aus Nord- und Südamerika und Asien und deckten das komplette klinische Spektrum der Erkrankung ab. Je nach Ausmass der Erkrankung wurden die Phänotypen in schwer und moderat ausgeprägt unterteilt. Als schwer betroffen wurden Individuen eingestuft, die während der perinatalen oder neonatalen Periode gestorben waren, wobei die Lungenhypoplasie die häufigste Todesursache darstellte. Die Patienten, die als moderat betroffen zusammengefasst wurden, erfüllten folgende Kriterien:

1. Entwicklung der Symptomatik jenseits der Neonatalperiode
2. Überleben peri-/neonatal aufgetretener Komplikationen

Eine weitere Unterteilung innerhalb der Gruppe der moderat betroffenen Patienten war wegen der hohen Variabilität des klinischen Bildes nicht sinnvoll. Von den insgesamt 90 Familien waren bei 44 die Kinder schwer betroffen, während in 38 Familien die Patienten einen moderaten Phänotyp aufwiesen. Intrafamiliäre Variabilität des Phänotyps der betroffenen Kinder (sowohl moderat als auch schwer ausgeprägter Phänotyp zwischen den betroffenen Geschwistern) wurden bei 8 Familien beobachtet. Eine Übersicht über das Patientenkollektiv ist den Tab. 8-1 bis Tab. 8-3 im Anhang zu entnehmen.

Ein Kontrollkollektiv aus 150 gesunden Individuen, grösstenteils deutscher Abstammung, wurde mituntersucht, um in Fällen fraglicher Mutationen einen Polymorphismus ausschliessen zu können.

2.2 Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Um für die Mutationsanalyse ausreichende Mengen der Ziel-DNA zu erhalten, wurden die Exone 26-52 des *PKHD1*-Gens mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Der (Standard-)PCR-Ansatz sowie das (Standard-)PCR-Programm, die in dieser Studie angewendet wurden, sind der Tabelle 2-1 und der Tabelle 2-2 zu entnehmen. Die Oligonukleotidprimer wurden mit Hilfe des Primer3 Programmes (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) so konstruiert, dass die resultierenden PCR-Produkte eine optimale Länge (<300bp) für die nachfolgende Einzelstrangkonnformations-Polymorphismen-Analyse (single-strang conformation polymorphism analysis, SSCP) hatten. Grössere Transkriptionseinheiten (27, 32, 34) wurden in mehreren überlappenden Fragmenten aufgeteilt, deren Länge eine SSCP-Analyse ermöglichte. Die Primersequenzen, sowie deren etablierte Annealing-Temperaturen sind in Tab. 8-4 im Anhang dargestellt. Bevor die PCR-Produkte mittels SSCP weiter analysiert wurden, wurde ihre Qualität überprüft durch elektrophoretische Auftrennung (120V, 40min) auf 1%igen Agarosegelen, wobei die amplifizierten Fragmente mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden.

Komponente	Ausgangskonz.	Volumen	Endkonz.
Autoklaviertes destilliertes Wasser	–	12.8 µl	–
dNTP`s	5mM	4.0 µl	0.8mM
10xPCR-Puffer	200mM Tris-HCl (pH 8.4) 500mM KCl	2.5 µl	1x
MgCl ₂	15mM	2.5 µl	1.5mM
Primer F (forward)	10 µM	1.0 µl	0.4 µM
Primer R (reverse)	10 µM	1.0 µl	0.4 µM
Taq-DNA Polymerase	5 U/µl	0.2 µl	1.0 unit
Pat.-DNA	20 ng/µl	1.0 µl	–

Tabelle 2-1: PCR-Ansatz (25 µl)

Schritt Nr.	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Denaturierung	94	5
2	Denaturierung	94	0.5
3	Primer-Hybridisierung (anneal)	Ta	0.5
4	Polymerisation (extend)	72	1.5
5	Wdh. der Schritte 2-4 : 39x	–	–
6	Polymerisation	72	10
7	Abkühlung	4	–

Ta: annealing Temperatur Anm: Bei der Amplifikation des Exons 37 wurde Schritt Nr. 4 auf 2 min verlängert

Tabelle 2-2: PCR-Programm

2.2.1.2 Einzelstrangkonnformations-Polymorphismen-Analyse

(Single-Strang Conformation Polymorphism analysis, SSCP)

Die SSCP ist eine Methode, um die mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente auf das Vorhandensein von Sequenzveränderungen zu untersuchen. Dabei wird die Eigenschaft einzelsträngiger Nukleinsäuren genutzt, unter nicht-denaturierenden Bedingungen Sekundärstrukturen in Abhängigkeit von der Basensequenz auszubilden. Kommen Veränderungen in der zu untersuchenden Basensequenz vor, so führen die daraus resultierenden abweichenden Konformationen in der Gelelektrophorese zu einem veränderten Laufverhalten; die Banden dieser neuen Konformationen werden in ihrer Position von den Wildtyp-Banden abweichen (39; 18). Die SSCP-Analyse wurde auf 10% Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele, 49:1 Acrylamid: Bis-Acrylamid) durchgeführt. Alle PCR-Produkte wurden unter 4 verschiedenen Bedingungen analysiert. Je ein Gel mit und ohne Glycerol liefen bei Raumtemperatur und 180V, je ein Gel mit und ohne Glycerol im Kühlschrank bei 4°C und 200V für 3 Stunden. Im Anschluss wurden die DNA-Banden mittels Silberfärbung der PAA-Gele sichtbar gemacht (Tabelle 2-3). Zur Archivierung wurden die Gele auf Whatman-Papier aufgezogen und auf einem Vakuumtrockner bei 80°C für 4 Stunden getrocknet. Fragmente, die durch abweichende SSCP-Muster auffielen, wurden durch direkte Mutationsanalyse weiter untersucht.

Schritt Nr.	Zeit [min]	Reaktion
1	10	Fixieren mit 10% Ethanol
2	10	Ansäuern mit 1% HNO ₃
3	30	Färben in 0.2% AgNO ₃
4	3x1	Überschüssige Silberionen abwaschen mit Aqua dest.
5	–	Entwickeln mit Na ₂ CO ₃ /Formaldehyd (500ml/250µl) je zur Hälfte 2x zugeben
6	5	Färbung stoppen mit Essigsäure
7	–	Essigsäure auswaschen mit Aqua dest.

Tabelle 2-3: Silberfärbung der PAA-Gele

2.2.1.3 Direkter Mutationsnachweis – DNA-Sequenzierung

Da die abnormen SSCP-Laufmuster keinen Hinweis auf die Art und Position der Sequenzveränderung liefern, wurden die entsprechenden Fragmente sequenziert. Zur DNA-Sequenzierung wurde die von Sanger entwickelte Dideoxy-Kettenabbruchmethode (45) verwendet. Das Prinzip dieser DNA-Sequenziermethode besteht darin, dass Fragmente mittels kontrollierten Abbruchs enzymatischer Replikation entstehen. Die Detektion der Fragmente ermöglicht der Einbau von fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden (49; 40; 41). Zunächst wurden die PCR-Produkte (100 µl Ansatz) über den QUIAquick-PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) von Primerresten gereinigt. Danach wurden 80ng gereinigter DNA in die Sequenzier-PCR (Tabelle 2-4, Tabelle 2-5) eingesetzt, wobei als Sequenzierprimer einer der entsprechenden PCR-Primer diente, entweder der F- oder der R-Primer. Es wurde der ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die Sequenzier-PCR-Produkte wurden anschliessend gefällt, um einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erreichen. Die Analyse (Elektrophorese, Detektion der Fluoreszenzdaten, Datenauswertung) erfolgte auf einem ABI PRISM 310-DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland).

DNA	80ng
Primer F oder R	5pmol
Terminator Ready Reaction Mix	4µl
HPLC-Wasser	Ad 20µl

Tabelle 2-4: Seq-PCR-Ansatz (20 µl)

Schritt Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	96°C	10sec
2	Primer-Hybridisierung (anneal)	Ta (≤60°C)	5sec
3	Polymerisation (extend)	60°C	4min
4	Wdh. Der Schritte 1-3 : 29x	–	–

Tabelle 2-5: Seq-PCR-Programm

Wenn eine Mutation identifiziert wurde, wurde mittels Sequenzierung der Eltern-DNA die Segregation getestet. Um bei fraglichen Missense-Mutationen einen möglichen Polymorphismus auszuschliessen, wurden 150 gesunde Individuen als Kontrollkollektiv mittels SSCP-Analyse untersucht. In den Fällen, wo Mutationen in Patienten nicht West-Europäischer Abstammung identifiziert wurden, wurden zusätzlich 30 ethnisch passende Kontrollproben mitgetestet.

3 Ergebnisse

Die SSCP – Analyse der Exone 26-52 des *PKHDI*-Gens zeigte bei 36 Patienten (36/90, 40%) des untersuchten Kollektivs abnorme Laufmuster. Um die Art und Position der dadurch implizierten Sequenzveränderung zu bestimmen, wurden die entsprechenden Exone beim jeweiligen Patienten sequenziert.

3.1 Ergebnisse der Mutationsanalyse

3.1.1 Gruppe der Patienten mit schwerem Phänotyp

a) Familie 340

Bei Patient 340.1 wies das dem Exon 36 entsprechende PCR-Produkt eine zusätzliche Bande auf. Die anschliessend durchgeführte DNA-Sequenzierung erbrachte den Nachweis einer heterozygoten A-Insertion in der Nukleotidposition 5895 (das erste Nukleotid des ATG-Startcodons wurde mit 1 nummeriert). Diese Sequenzveränderung führt zu einer Verschiebung des Leserahmens („frameshift“), wodurch in Aminosäure-Position 1969 ein Stop-Codon entsteht, das zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führt.

b) Familie 215

Die SSCP-Analyse des Exons 33 zeigte bei Patient 215.1 ein verändertes Bandenmuster. Die DNA-Sequenzierung wies eine homozygote Deletion der Basen ATGG auf, die durch Verschiebung des Leserahmens („frameshift“) zu einem vorzeitigem Stop-Codon in Position 1802 führt.

c) Familie 413

Bei Patient 413.1 zeigte die aufgrund des abnormen SSCP-Musters durchgeführte DNA-Sequenzierung des Exons 32 eine homozygote GG-Deletion in der Nukleotidposition 3958. Durch die resultierende Verschiebung des Leserahmens entsteht ein Stop-Codon in Position 1322 (Abb. 3-1).

d) Familie 219

Patient 219.1 wurde bei der SSCP-Analyse des Exons 52 durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande auffällig. Die DNA-Sequenzierung wies eine heterozygote G→T-Transition der Nukleotidposition 8281 auf. Diese Basensubstitution führt zum Austausch der Asparaginsäure in Position 2761 gegen einen Tyrosin-Rest. Um einen möglichen Polymorphismus auszuschliessen, wurden mittels SSCP-Analyse weitere 150 Kontrollproben untersucht, wobei keine das mutationsentsprechende Muster aufwies.

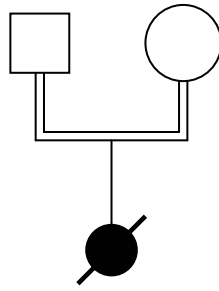
e) Familie 111

Die DNA der beiden Kinder der Familie 111 (111.1 und 111.2) wurde wegen abweichenden SSCP-Bandenmusters des Exons 27 sequenziert. Dabei wurde eine heterozygote T→A-Transition der Nukleotidposition 2990 nachgewiesen, die in einem Aminosäureaustausches Methionin→Lysin in Position 997 resultiert. Die Missense-Mutation konnte bei keinem der 150 Kontrollfälle nachgewiesen werden.

f) Familie 90

Das Exon 39 fiel bei Patient 90.1 in der SSCP-Analyse aufgrund eines abnormen Bandenmusters auf. Die DNA-Sequenzierung zeigte eine heterozygote T→C-Transition des dritten Nukleotids in Codon 2134, das somit anstatt für Leucin für Prolin kodiert. Der Basenaustausch kam unter den 150 gesunden Kontrollproben nicht vor.

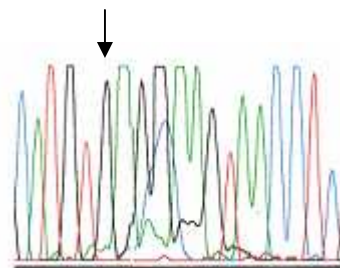
Ausserdem wies Patient 90.1 beim Exon 36 die gleiche heterozygote Sequenzveränderung wie Patient 340.1 auf (A-Insertion, siehe auch Abb. 3-2).

Fam. 413

413.1

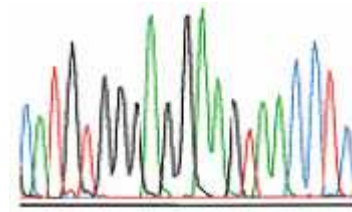
Ex 32: 3958_3959delGG (G1320fsX1322)

Ex 32: Wildtyp



CATGTGAGGAAG TAACCTC

H V R L X



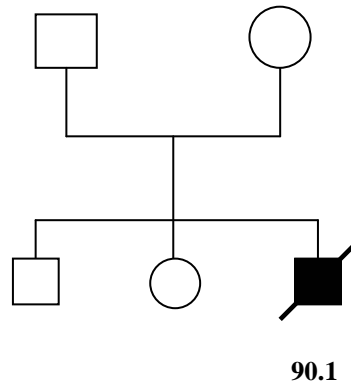
CATGTGGGAGGAAGTAACCTC

H V G G S N L

Abb. 3-1: PKHD1-Mutation bei der ARPKD-Familie 413. Die sich aus den Nukleotiden ergebende Aminosäureabfolge ist unterhalb der Intensitätsprofile dargestellt.

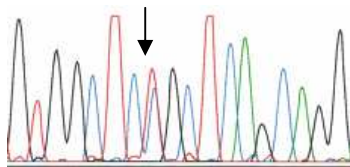
g) *Familie 91*

Die Patienten 91.1 und 91.2 zeigten beim Exon 36 das gleiche SSCP-Muster wie Patient 340.1. Die anschließend durchgeführte DNA-Sequenzierung bestätigte die Vermutung, dass die gleiche Mutation wie bei Pat. 340.1 vorliegt.

Fam. 90

Ex 39: 6401T>C (L2134P)

(väterliches Allel)



G T GGCTCTGCTCAGCAGG

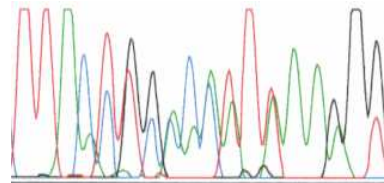
CCG

V A L L S R

P

Ex 36: 5895_5896insA (L1966fsX1969)

(mütterliches Allel)



T T A C T GCACA T TAAAG GT

TT AA C TGCAC ATTAAA GGT

L L H I K G

L T A H X

Abb. 3-2: PKHD1-Mutationen bei der ARPKD-Familie 90. Die sich aus den Nukleotiden ergebende Aminosäureabfolge ist unterhalb der Intensitätsprofile dargestellt.

3.1.2 Gruppe der Patienten mit moderatem Phänotyp*a) Familie 270*

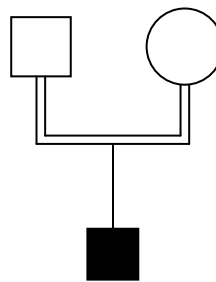
In der SSCP-Analyse des Exons 37 wurde bei Patient 270.1 ein verändertes Laufverhalten beobachtet. Die zugrunde liegende Sequenzveränderung konnte als eine homozygote T→C-Transition der Nukleotidposition 5993 identifiziert werden, die zum

Aminosäureaustausch Ile1998Thr führt (Abb. 3-3). Das dieser Sequenzvariante entsprechende SSCP-Muster wurde bei keinem der gesunden Kontrollfülle entdeckt.

b) Familie 80

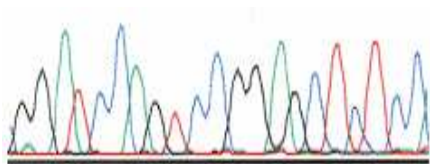
Bei Patient 80.1 konnte ein verändertes SSCP-Muster des Exons 27 nachgewiesen werden. Das SSCP-Muster unterschied sich von dem der Patienten 111.1 und 111.2, so dass angenommen wurde, dass es sich um eine andere Mutation handelt. Tatsächlich erbrachte die DNA-Sequenzierung den Nachweis eines heterozygoten C→A-Basenaustausches der Nukleotidposition 3089, der zum Austausch den Alanin gegen Glutaminsäure in Position 1030 führt. Alle 150 getesteten Kontrollproben wiesen das dem Wildtyp entsprechende Bandenmuster auf.

Fam 270



270.1

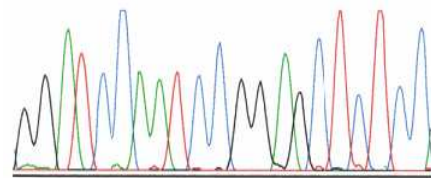
Ex 37: 5993T>C (I1998T)



G G ATCCAGTCC GGAGC TCT CC

S G T R L Q G

Ex 37: Wildtyp



GG ATCCTTACC GG AGC TCT CC

S G I R L Q G

Abb. 3-3: PKHD1-Mutation bei der ARPKD-Familie 270. Die sich aus den Nukleotiden ergebende Aminosäureabfolge ist unterhalb der Intensitätsprofile dargestellt.

c) Familie 113

Die Patienten 113.1 und 113.2 fielen bei der SSCP-Analyse des Exons 43 mit dem gleichen abnormen Bandenmuster wie die Patienten 3.1 und 3.2 auf. Tatsächlich war auch bei der Sequenzierung die gleiche Mutation (6992 T→A) zu finden.

d) Familie 106

In der SSCP-Analyse des Exons 32 liess sich nachweisen, dass bei Patient 106.1 ein abweichendes Bandenmuster vorlag, das nicht dem des Patienten 413.1 entsprach. Die anschliessend durchgeführte Sequenzierung zeigte eine heterozygote C→T-Transition der Nukleotidposition 4457, die in einem Aminosäureaustausch Prolin→Leucin in Position 1486 resultiert. Das dem Basenaustausch entsprechende SSCP-Muster konnte bei keinem der 150 Kontrollfälle nachgewiesen werden.

3.1.3 Gruppe der Patienten mit intrafamiliärer Variabilität des Phänotyps*a) Familie 151*

Das dem Exon 30 entsprechende PCR-Produkt wurde aufgrund eines auffälligen Laufmusters in der SSCP-Analyse sequenziert. Dabei wurde ein heterozygoter G→A-Basenaustausch der Nukleotidposition 3367 entdeckt, der zum Aminosäureaustausch Gly1123Ser führt. Alle mitgetesteten gesunden Kontrollen waren bezüglich dieser Sequenzvariante negativ.

b) Familie 3

Bei den Patienten 3.1 und 3.2 konnten in der SSCP-Analyse veränderte Bandenmuster des Exons 43 nachgewiesen werden. Die DNA-Sequenzierung wies eine heterozygote T→A-Transition des zweiten Nukleotids in Codon 2331 auf, das somit anstatt für Isoleucin für Lysin kodiert. Das dem Basenaustausch entsprechende SSCP-Muster konnte bei keinem der 150 Kontrollfälle nachgewiesen werden.

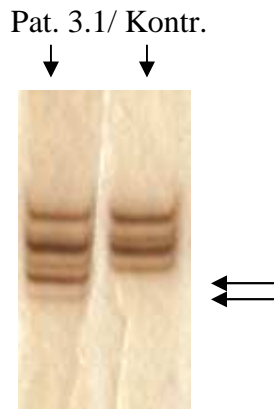


Abb. 3-4: SSCP-Analyse des Exons 43 mit verändertem Bandenmuster des Patienten 3.1

Von den insgesamt 11 unterschiedlichen identifizierten Mutationen (Tab. 3-1) waren 9 Veränderungen in der Literatur zuvor nicht beschrieben. Das Spektrum der bekannten Mutationen in den Exonen 26 bis 52 des *PKHD1*-Gens konnte somit durch die Ergebnisse dieser Arbeit von 13 auf 22 erweitert werden.

Art der Mutation	Lokalisation	cDNA-Veränderung	Aminosäure-Veränderung	Herkunft
Deletion/Insertion	Ex32	3958_3959delGG	G1320fsX1322	Inuit
	Ex33	5378_IVS+1delATGG	D1793fsX1802	Türkei
	Ex36*	5895_5896insA	L1966fsX1969	Frankreich, UK
Missense	Ex27	2990T>A	M997K	Deutschland
	Ex27	3089C>A	A1030E	Deutschland
	Ex30	3367G>A	G1123S	Deutschland
	Ex32	4457C>T	P1486L	Deutschland
	Ex37	5993T>C	I1998T	Türkei
	Ex39	6401T>C	L2134P	Frankreich
	Ex43**	6992T>A	I2231K	Finnland
	Ex52	8281G>T	D2761Y	Finnland

Tab. 3-1: In dieser Arbeit identifizierte Mutationen in den Exonen 26-52 des *PKHD1*-Gens ;

*: beschrieben auch in Onuchic et al. 2002; **: beschrieben auch in Ward et al. 2002

3.2 Polymorphismen

Zusätzlich zu den oben erwähnten pathogenen Mutationen wurde eine Anzahl von apathogenen Sequenzvarianten beobachtet. Insgesamt wurden 18 von den bei der SSCP-Analyse mit abweichendem Laufmuster aufgefallenen Proben als Polymorphismen identifiziert. Hierbei handelt es sich um:

- 1) intronische Veränderungen, die nicht die sog. kanonischen Splice-Sites (Bereiche, die für ein korrektes Herausschneiden der intronischen DNA aus dem primären mRNA-Strang bedeutsam sind) betrafen, oder
- 2) stille exonische Veränderungen (kein Aminosäureaustausch), oder
- 3) Veränderungen, die nicht mit der Erkrankung segregierten und/oder bei einer Anzahl von gesunden Kontrollproben zu finden waren.

Die konkrete Art und Lokalisation der entdeckten Polymorphismen sind den Tabellen Tab. 3-2 - Tab. 3-4 zu entnehmen:

<i>Lokalisation</i>	<i>cDNA-/Nukleotid-Veränderung</i>	<i>Allel-Frequenz unter Kontrollen</i>
IVS32	c.5236 + 14A>G	30/600 (5%)
IVS52	c.8302 + 12T>A	56/800 (7%)

Tab. 3-2: intronische Veränderungen

<i>Lokalisation</i>	<i>cDNA-/Nukleotid-Veränderung</i>	<i>Aminosäure-Veränderung</i>	<i>Allel-Frequenz unter Kontrollen</i>
Ex 30	c.3407A>G	Y1136C	1/400 (0.25%)
Ex 32*	c.3785C>T	A1262V	100/1000 (10%)

Tab. 3-3: exonische Veränderungen mit Aminosäureaustausch, *: beschrieben auch in Ward et al. 2002

<i>Lokalisation</i>	<i>cDNA-/Nukleotid-Veränderung</i>	<i>Aminosäure-Veränderung</i>	<i>Allel-Frequenz unter Kontrollen</i>
Ex 27	c.3024C>T	A1008A	1/300 (0.33%)
Ex 30	c.3393G>A	A1131A	1/400 (0.25%)
Ex 30	c.3537T>C	N1179N	5/500 (1%)
Ex 32*	c.3756G>C	L1252L	24/800 (3%)
Ex 32	c.4101A>G	Q1367Q	1/400 (0.25%)
Ex 32*;**	c.4920A>C	V1640V	5/1000 (0.5%)
Ex 32	c.5100C>T	T1700T	1/400 (0.25%)
Ex 36	c.5896C>T	L1966L	16/400 (4%)
Ex 39	c.6400C>T	L2134L	0/300 (0%)
Ex 39	c.6462T>C	V2154V	0/300 (0%)
Ex 40	c.6636C>T	A2212A	0/300 (0%)
Ex 43	c.6900C>T	N2300N	1/300 (0.33%)
Ex 48*;**	c.7587A>G	G2529G	250/1000 (25%)
Ex 49*;**	c.7764A>G	L2588L	120/1000 (12%)

Tab. 3-4: exonische Veränderungen ohne Aminosäureaustausch , *: beschrieben auch in Ward et al. 2002; **: beschrieben auch in Onuchic et al. 2002

Anmerkung zu den Tabellen Tab. 3-2 bis Tab. 3-4: Die Allelfrequenz wurde in dieser Arbeit durch Überprüfung von bis zu 150 Kontrollproben (300 Allelen) auf gleichartige Veränderungen bestimmt. Für die hier angegebenen Allelenfrequenzen wurde auch auf die Ergebnisse weiterer vorheriger und nachfolgender Studien zurückgegriffen (50, 35, 5, 7, 12, 42).

Von den 18 in dieser Arbeit identifizierten Polymorphismen waren 14 zuvor in der Literatur nicht beschrieben. Dadurch konnte das Spektrum der in den Exonen 26-52 des *PKHD1*-Gens bekannten Polymorphismen von 5 auf 19 erweitert werden.

3.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Die Familien wurden zur Untersuchung möglicher Genotyp-Phänotyp Korrelationen nach der Klinik in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt: die Gruppe mit schwerem Phänotyp, wobei die Patienten in der perinatalen oder neonatalen Periode gestorben sind, die Gruppe mit moderatem Phänotyp, wobei die Patienten die neonatale Periode überlebt haben und schließlich die Gruppe mit intrafamiliärer Variabilität des Phänotyps.

Die Einteilung der Mutationen erfolgte je nach auslösendem Effekt in Missense-Mutationen und in Mutationen, die zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen (Tab. 3-1). Bei der letzten fanden Insertionen und Deletionen mit Verschiebung des Leserahmens (frame shifting) Aufnahme.

Die Mutationsanalyse zeigte, dass es sich bei mehr als 2/3 der nachgewiesenen Mutationen bei den schwer betroffenen Patienten um trunkierende Mutationen handelt (7 von 10, 70%). Diese scheinen demnach häufiger mit einer schweren Manifestationsform von ARPKD assoziiert zu sein. Auf der anderen Seite waren in der Patientengruppe mit moderatem klinischen Verlauf alle Mutationen, die identifiziert wurden, Missense-Mutationen. Es liegt also die Vermutung nahe, dass dieser Mutationstyp häufiger mit Patienten mit moderaterem Verlauf der Erkrankung assoziiert ist. Die geringe Datenmenge in der Gruppe der Patienten mit intrafamiliärer Variabilität des Phänotyps (8 Familien, 2 nachgewiesene Mutationen in den Exonen 26-52 des *PKHD1*-Gens) erlaubt leider keine verlässliche Aussage.

Einen weiteren Beitrag zur Untersuchung möglicher Genotyp-Phänotyp Korrelationen können Patienten leisten, bei denen die identifizierten Mutationen homozygot vorliegen. In dieser Arbeit sind alle Patienten, die eine trunkierende Mutation im homozygoten Zustand hatten, kurz nach der Geburt verstorben. Die Missense-Mutation I1998T wurde im homozygoten Zustand bei einer türkischen blutsverwandten Familie (270) identifiziert, deren betroffenes Kind einen moderaten Erkrankungsverlauf zeigte. Unter der Hypothese, dass alle trunkierende Mutationen zu einem kompletten Funktionsverlust des Proteins führen, sollte die Art und Position der Missense-Mutation die entscheidende Variable darstellen, die den klinischen Verlauf bei heterozygoten Patienten mit einer trunkierenden und einer Missense-Mutation bestimmt. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass die Missense-Mutationen L2134P und D2761Y mit perinatalem/neonatalem Versterben assoziiert sind, während die Missense-Mutation A1030E eher mit einem moderatem Phänotyp

einhergeht. Letztere ist auch in einer der IPT-Domänen des Proteins lokalisiert. Allerdings konnte für den Rest der in dieser Arbeit in den Exonen 26-52 des *PKHD1*-Gens identifizierten Mutationen keine Struktur-Funktion-Korrelation charakterisiert werden, da diese in Regionen ohne vorhergesagte Homologie zu bislang bekannten Proteinsequenzen liegen.

4 Diskussion

4.1 Mutationsdetektionsrate und Methodik

In dieser Arbeit wurde die erste große systematische Mutationsanalyse in den Exonen 26-52 des längsten kontinuierlichen ORF des *PKHD1*-Gens mittels SSCP-Analyse durchgeführt. Dabei wurde zusammen mit den Ergebnissen entsprechender Mutationsanalysen in den Exonen 2-25 und 53-67 (Bergmann et al. 2003) eine Mutationsdetektionsrate von 61% erreicht (2 Mutationen konnten bei 45% der Familien, 1 Mutation bei 33% der Familien und keine Mutation bei 22% der Familien identifiziert werden).

Bei den nachgewiesenen Mutationen handelte es sich grösstenteils um jeweils verschiedene, familienspezifische Veränderungen („private mutations“), was mit der Existenz vieler unterschiedlicher Haplotypen auf ARPKD-Chromosomen übereinstimmt (52, 53). Alle entdeckten Mutationen unabhängig vom Mutationstyp sind relativ gleichmässig über den gesamten untersuchten Bereich des *PKHD1*-Gens verteilt, eine Beobachtung, die durch nachfolgende Mutationsanalysen (42, 12, 7, 5) bestätigt wurde.

In der Gruppe der schwer betroffenen Patienten wurde eine Mutationsdetektionsrate von 77% erreicht. Ähnlich hoch war die Detektionsrate bei Patienten mit intrafamiliär variablem Phänotyp (75%). Allerdings konnten in der Gruppe mit moderatem Phänotyp nur 30 von 76 Mutationen (40%) identifiziert werden. Insgesamt blieben bei 15 der 38 Familien in dieser Gruppe (39.5%) die Mutationen auf beiden Allelen unentdeckt. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass bei einem Teil der Patienten dieser Gruppe eine falsche Diagnosestellung erfolgte, da bei der Mehrheit Patienten mit milderem klinischen Verlauf keine histopathologische Absicherung der Diagnose durchgeführt wurde. Auf der anderen Seite könnten die unentdeckt gebliebenen Sequenzveränderungen in zusätzlichen Exonen, die nicht im längsten kontinuierlichen ORF enthalten sind, oder auch in anderen Bereichen des Gens, die regulierende Funktionen haben, lokalisiert sein. Obwohl sich in allen bisherigen Analysen keine sicheren Anhaltspunkte für einen zweiten Genlokus von ARPKD ergaben (53, 52, 1, 17) muss bei Patienten ohne nachgewiesene Mutationen auch die Möglichkeit einer Lokusheterogenie in Betracht gezogen werden.

Ein weiterer die erreichte Detektionsrate beeinflussender Faktor liegt möglicherweise in der für das Mutationsscreening angewandten Methode (SSCP mit 4 Laufbedingungen, siehe auch

Kapitel 2.2.1.2). Die maximale Sensitivität der SSCP wird in der Literatur (21, 33) als bis zu 90% angegeben. Allerdings ist die erreichbare Sensitivität von der Anzahl der Laufbedingungen und der gewählten Fragmentlänge abhängig und kann dadurch geringer ausfallen. Die Bedeutung der für das Mutationsscreening angewandten Methode für die erreichte Detektionsrate unterstreichen die Ergebnisse von Bergmann et al. (7). In dieser Studie konnte unter Anwendung von DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography) in einem Kollektiv von 106 Familien mit moderat betroffenen Patienten (Entwicklung der Symptomatik jenseits der Neonatalperiode oder Überleben peri/neonatal aufgetretener Komplikationen) eine Mutationsdetektionsrate von 76% erreicht werden. Ausserdem werden Deletionen gesamter Exone oder genomische Rearrangements mittels SSCP nicht erfasst. Vielmehr können Deletionen oder Duplikationen von wenigen Kilobasen nicht durch PCR-basierte Detektionsmethoden entdeckt werden (48, 47). Zwei kürzlich beschriebene Techniken, MAPH (Multiplex Amplification and Probe Hybridisation) und MLPA (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification) erlauben nun die Detektion solcher mittelgrosser Rearrangements mittels Screening für das Vorhandensein einer Deletion oder Duplikation von bis zu 40 Ziel-Sequenzen (47). Beide Methoden basieren auf die sequenz-spezifische Probenhybridisation genomischer DNA, gefolgt von Amplifikation der hybridisierten Probe und semi-quantitativer Analyse der resultierenden PCR-Produkte.

4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Ein erwarteter Nutzen von der Identifikation menschlicher Erkrankungsgene ist die Fähigkeit, die molekulare Basis der klinischen Variabilität von Erkrankungspräsentation und -folgen zu verstehen. Eine solche Korrelation zwischen dem vorliegenden molekularen Defekt und dem klinischen Verlauf kann einerseits die Patientenbehandlung verbessern und andererseits dem Verstehen der molekularen Erkrankungspathogenese beitragen (12).

Innerhalb des Patientenkollektivs dieser Arbeit wurde das breite Spektrum der klinischen Präsentation von ARPKD in 3 Gruppen (schwer, moderat, intrafamiliär variabel) unterteilt, abhängig vom Überleben der Peri-/Neonatalzeit (siehe auch Kap. 2.1). Dieser Parameter wurde als Grenze gewählt, weil er verlässlich bei allen Patienten zu eruieren war. Allerdings spiegelt diese Unterteilung angesichts der deutlich besseren Prognose von Patienten, die die Neonatalzeit überleben (16), eine stark vereinfachte Sicht wider.

Alle Patienten dieser Studie mit zwei trunkierenden Mutationen sind in der Peri-/Neonatalzeit gestorben, während Patienten, die die Neonatalzeit überlebt haben, mindestens eine Missense-Mutation hatten. Die Umkehrung dieser Aussage trifft allerdings nicht zu; das Vorhandensein einer Missense-Mutation stellt keine Überlebensgarantie dar. Insgesamt kann man aber behaupten, dass Missense-Mutationen häufiger bei moderat betroffenen Patienten beobachtet werden {5 von insgesamt 5 identifizierten Mutationen (100%) in Exon 26-52, 23 von insgesamt 28 identifizierten Mutationen (82%) in Exon 2-67}, während trunkierende Mutationen häufiger mit Patienten mit schwerem Phänotyp assoziiert sind {7 von insgesamt 10 identifizierten Mutationen (70%) in Exon 26-52, 39 von insgesamt 69 identifizierten Mutationen (56%) in Exon 2-67}.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, die als Teil der Arbeit von Bergmann et al. (2003) veröffentlicht sind, bestätigen somit die Feststellungen in den Arbeiten von Onuchic et al. (2002 b), Furu et al. (2003), Rossetti et al. (2003) und Bergmann et al. (2004 b, 2005). Ein direkter Vergleich der prozentualen Anteile der in den jeweiligen Patientengruppen identifizierten Mutationstypen war allerdings nur mit den Arbeiten von Bergmann et al. (2003, 2004 b, 2005) möglich, da bei den anderen Arbeiten vollständige Angaben über die genaue Zusammensetzung des Patientekollektivs fehlen (Tab. 4-1). In der Arbeit von Bergmann et al. 2004 b fanden nur Familien mit schwer betroffenen Kindern Aufnahme, die während der perinatalen oder neonatalen Periode gestorben waren. Bei Bergmann et al. 2005 bestand das Patientekollektiv aus 126 Familien. Bei 106 Familien zeigten die Patienten einen moderaten Phänotyp mit Entwicklung der Symptomatik jenseits der Neonatalperiode oder Überleben peri/neonatal aufgetretener Komplikationen, während bei 20 Familien eine intrafamiliäre Variabilität des Phänotyps mit sowohl moderat als auch schwer betroffenen Kindern (peri/neonataler Tod) bestand. (In der nachfolgenden Tabelle wurden bei der Berechnung der Prozentsätze nur die Familien mit moderat betroffenen Kindern berücksichtigt).

	Bergmann et al. 2003/ diese Arbeit	Bergmann et al. 2004 b	Bergmann et al. 2005
untersuchter Bereich des <i>PKHD1</i>-Gens	Exon 2 bis 67/ (Exon 26 bis 52)	Exon 2 bis 67	Exon 2 bis 67
angewandte Methode bei der indirekten Mutationsanalyse	SSCP	DHPLC	DHPLC
Patientengruppe mit moderatem Phänotyp:			
trunkierende Mutationen	18% / (0%)	--	23%
Missense-Mutationen	82% / (100%)	--	77%
Patientengruppe mit schwerem Phänotyp:			
trunkierende Mutationen	59% / (70%)	66%	--
Missense-Mutationen	41% / (30%)	34%	--

Tab. 4-1: Vergleich der prozentualen Anteile der nachgewiesenen Mutationstypen in den unterschiedlichen Phänotypgruppen verschiedener *PKHD1*-Mutationsanalysen

Aus Tab. 4-1 geht eine deutliche Korrelation zwischen Phänotyp und Mutationstyp hervor: in den Patientengruppen mit schwerem Phänotyp konnten mehr als die Hälfte der Mutationen (59% bis 66%) entdeckt werden. Auf der anderen Seite konnten bei Patienten mit moderatem Phänotyp Missense-Mutationen mehr als zweimal so häufig (77% statt 23%) identifiziert werden. Der hohe Anteil von in dieser Arbeit entdeckten Missense-Mutationen in der Patientengruppe mit moderatem Phänotyp ist am ehesten durch die geringe Datenmenge zu erklären (5 identifizierte Mutationen bei insgesamt 4 Familien).

Kompletter Funktionsverlust des Proteins ist die wahrscheinlichste Erklärung für den peri-/neonatalen Exitus aller Patienten mit zwei Mutationen, die zum Kettenabbruch führen (7, 6). Im Gegensatz dazu stellen Missense-Mutationen möglicherweise hypomorphe Allele dar, die in verschiedenen Graden einer Funktionseinschränkung, bis hin zum kompletten Funktionsverlust resultieren (12, 7).

Sharp et al. haben kürzlich eine weitere Mutationsanalyse des *PKHD1*-Gens bei insgesamt 75 ARPKD-Patienten durchgeführt und konnten bei 56 Patienten beide Mutationen identifizieren. Um einen Vergleich dieser Daten mit den unsrigen zu ermöglichen, wurden nur die Patienten berücksichtigt, bei denen beide Mutationen entdeckt werden konnten (Tab. 4-2).

Es fällt auf, dass obwohl der Anteil an entdeckten Missense-Mutationen bei den moderat betroffenen Patienten in beiden Arbeiten vergleichbar hoch ist (80% vs. 77%), der Anteil jedoch der trunkierenden Mutationen in der Patientengruppe mit schwerem Phänotyp bei Sharp et al. deutlich niedriger liegt (44% vs. 59%). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied stellt die Tatsache dar, dass es sich bei 15% der von Sharp et al. identifizierten Mutationen in dieser Gruppe um Splice-site-Mutationen handelt. Diese könnten sowohl zu einem vorzeitigen Kettenabbruch mit kompletten Funktionsverlust des Protein führen, als auch zu einem hypomorphen Allel, wenn nur eine begrenzte Anzahl von Aminosäuren entfernt werden.

Mutationstyp: Allelzahl und prozentualer Anteil

Phänotyp:	trunkierende Mutationen	Splice-site Mutationen	Missense- Mutationen
	Sharp et al. 2005/ <i>Bergmann et al. 2003</i>	Sharp et al. 2005/ <i>Bergmann et al. 2003</i>	Sharp et al. 2005/ <i>Bergmann et al.2003</i>
schwer betroffen	32 (44%)	11 (15%)	29 (40%)
	35 (60%)	0 (0%)	23 (40%)
moderat betroffen	6 (15%)	2 (5%)	30 (80%)
	3 (30%)	0 (0%)	3 (70%)

Tab. 4-2: Vergleich der Ergebnisse der nachgewiesenen Mutationstypen in den unterschiedlichen Phänotypgruppen zwischen Sharp et al. (2005) und Bergmann et al. (2003).

Bei 8 Familien in dieser Arbeit liegt eine phänotypische Variabilität zwischen den Geschwistern (sowohl schwer, als auch moderat betroffene Patienten) vor. Diese intrafamiliäre Variabilität der Klinik wird bei ca. 20% von ARPKD-Familien beschrieben (7, 9) und stellt einen wichtigen Faktor dar, der die mögliche Vorhersagbarkeit des klinischen Bildes bei Mutationsträgern begrenzt. Die intrafamiliäre Diskordanz des klinischen Verlaufes könnte durch Unterschiede in der nachgeburtlichen intensivmedizinischen Versorgung begründet werden. Dies würde am ehesten für die Familien zutreffen, bei denen das erstgeborene Kind schwer betroffen war. Die daraus resultierende erhöhte Sensibilität sowohl der Eltern als auch der betreuenden Ärzte bezüglich einer möglichen ARPKD-Erkrankung könnte den moderateren klinischen Verlauf nachfolgender Geschwister erklären (Familien 1, 2, 105, 316). Die intrafamiliäre klinische Variabilität bestimmter Patienten unserer Studie unterstreicht die Tatsache, dass der Phänotyp nicht allein auf Basis des Genotyps erklärt werden kann. Vielmehr hängt er auch von weiteren modifizierenden Einflüssen wie andere Gene, epigenetischen Faktoren und von Umwelteinflüssen ab (14, 53, 12). Von den epigenetischen Faktoren wird wahrscheinlich alternatives Splicing als modifizierender Faktor eine wichtige Rolle spielen (7).

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den meisten nachgewiesenen Mutationen des *PKHD1*-Gens um jeweils verschiedene familienspezifische Veränderungen („private mutations“) handelt (35, 50, 42, 12, 6, 5, 7), wird eine Klassifikation der identifizierten Missense-Mutationen nach Phänotyp erschwert. Die ausgeprägte allelische Heterogenität des *PKHD1*-Gens und die hohe Rate an heterozygot vorliegenden Veränderungen {anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und zusammen mit den Ergebnissen weiterer durchgeführter Mutationsanalysen in den Exonen 2-25 und 53-67 (Bergmann et al., 2003) konnten bei 40 Familien beide Mutationen identifiziert werden, bei 20 davon (50%) handelt es sich um Heterozygote} stellen eine grosse Herausforderung dar, beim Versuch, zuverlässige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu etablieren. Weitere Mutationsanalysen mit grossen Patientenkollektiven werden nötig sein, um Genaueres über mögliche Korrelationen aussagen zu können.

4.3 Bedeutung der direkten Mutationsanalyse in der Pränataldiagnostik von ARPKD

Aufgrund der häufig infausten Prognose und des frühen Todes ist die ARPKD eine Erbkrankheit mit grosser Nachfrage nach einer molekulargenetischen Pränatal-Diagnostik. Die Kartierung des Genlokus für ARPKD auf Chromosom 6 in der Region 6p21-cen durch Zerres et al. im Jahre 1994 ermöglichte eine frühe und verlässliche Pränataldiagnostik in Form der indirekten Genotypdiagnostik (Haplotypenanalyse). Nachfolgende Voraussetzungen sollten bei Anwendung der molekulargenetischen Pränataldiagnostik bei der ARPKD bedacht werden (54):

- Zweifelsfreie Diagnose bei Indexpatienten unter Einschluss der Sonographie von Nieren und Leber.
- Ein unauffälliges Ergebnis der renalen Ultraschalluntersuchung bei den Eltern des betroffenen Kindes ist für die Pränataldiagnostik unabdingbar.
- Blutproben (DNA) der Eltern und des betroffenen Kindes sowie evtl. weiterer Geschwister werden benötigt. Sollte das betroffene Kind zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits verstorben sein, kann möglicherweise DNA aus evtl. vorhandenem Gewebe (Paraffinblock bzw. histologischen Präparaten) extrahiert werden (nicht immer möglich!).
- Die Voruntersuchungen sollten möglichst vor Eintritt einer Schwangerschaft abgeschlossen sein.
- Obwohl es bisher keine Hinweise für genetische Heterogenie gibt, kann aufgrund der begrenzten Erfahrung diese Möglichkeit bisher noch nicht sicher ausgeschlossen werden. Ein mögliches Risiko für weitere Genorte typischer Fälle beträgt jedoch sicherlich deutlich weniger als 5%.

Voraussetzung für die pränatale DNA-Diagnostik ist entsprechend der Richtlinien des Berufsverbands Medizinische Genetik e.V. eine humangenetische Beratung.

Bis heute war die Haplotyp-basierte Pränataldiagnostik von ARPKD von der Informativität der Mikrosatelliten-Marker und fehlender intragenischer Rekombination abhängig. Aufgrund

der normalerweise kleinen Familiengröße v.a. moderat betroffener Patienten, ohne pathoanatomischen ARPKD-Nachweis, war die diagnostische Sicherheit jedoch in Einzelfällen eingeschränkt.

Die Identifizierung von *PKHD1* als verantwortliches Gen für ARPKD erlaubt nun eine direkte Mutationsanalyse auch bei Patienten, die aus kleinen, nicht-blutsverwandten Familien mit nur einem betroffenen Kind stammen. Bei Familien mit diagnostischen Unsicherheiten sowie in Familien ohne histologischer Diagnosesicherung des Indexpatienten sollte vor dem Angebot einer Pränataldiagnostik eine Mutationsanalyse des *PKHD1*-Gens durchgeführt werden.

Allerdings weist die *PKHD1*-Mutationsanalyse besondere Schwierigkeiten auf, einerseits wegen der enormen Gengröße, andererseits wegen multipler Spleiss-Varianten und der ausgeprägten allelischen Heterogenität. Da es sich bei ~ 50% der identifizierten Veränderungen um Missense-Mutationen handelt, erfordert die Differenzierung zwischen pathogenen Nukleotid-Austauschen und einer signifikanten Anzahl von Aminosäure-austauschenden Polymorphismen, welche harmlose Sequenzvarianten darstellen, besondere Aufmerksamkeit. Die Einrichtung einer Datenbank für bekannte *PKHD1*-Mutationen (URL: <http://www.humgen.rwth-aachen.de>) soll die Gefahr minimieren, Polymorphismen als krankheitsassoziierte Mutationen zu missinterpretieren (58, 4).

Aus den oben genannten Herausforderungen und Einschränkungen beim *PKHD1*-Mutationscreening geht hervor, dass der Einsatz der direkten *PKHD1*-Mutationsanalyse in der Pränataldiagnostik eine strenge Indikationsstellung erfordert (58):

- Familien, bei denen keine DNA des Indexpatienten zur Verfügung steht,
- Patienten mit diagnostischen Zweifeln,
- Patienten ohne histopathologischer Bestätigung der Diagnose (mind. Leberbiopsie),
- Mangelnde Informativität

Die Haplotypen-Analyse mit Mikrosatelliten-Markern und intragenischen Polymorphismen wird füglich bei Familien mit gesicherter ARPKD-Diagnose weiterhin nützlich sein. Bei

Familien jedoch mit diagnostischen Herausforderungen, die die Voraussetzungen für eine Haplotypenanalyse nicht erfüllen, wird eine direkte Analyse die einzige Möglichkeit sein, eine molekulargenetische Diagnose zu etablieren.

5 Zusammenfassung

Die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) ist eine meist schwer verlaufende hereditäre Nephropathie des Kindesalters, deren Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung ca. 1: 20,000 beträgt.

Der Genort für ARPKD (*PKHD1*-Genlocus) konnte im Jahre 1994 auf Chromosom 6 in der Region 6p21-cen kartiert werden. 2002 gelang es zwei unabhängigen Forschergruppen die Identifizierung des *PKHD1*-Gens.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels SSCP-Analyse die Exone 26-52 des längsten kontinuierlichen offenen Leserahmens des *PKHD1*-Gens auf Mutationen bei 90 betroffenen Familien (148 betroffene Kinder) untersucht.

Von 11 verschiedenen, als pathogen einzustufenden Mutationen, die nachgewiesen werden konnten, waren 9 Veränderungen in der Literatur zuvor nicht beschrieben; darunter befinden sich 2 Deletions- / Insertions-Mutationen und 7 Missense-Mutationen.

Weiterhin konnten 18 verschiedene Polymorphismen nachgewiesen werden, von denen 14 in der Literatur zuvor nicht beschrieben waren.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und zusammen mit den Ergebnissen weiterer durchgeführter Mutationsanalysen in den Exonen 2-25 und 53-67 (Bergmann et al., 2003) konnte eine Mutationsdetektionsrate von 61% erreicht werden (2 Mutationen konnten bei 40 Familien (45%), 1 Mutation bei 30 Familien (33%) und keine Mutation bei 20 Familien (22%) identifiziert werden).

Ein wichtiger dieser Detektionsrate beeinflussender Faktor liegt in der für das Mutationscreening angewandten Methode (SSCP-Analyse mit 4 Laufbedingungen), womit keine Deletionen gesamter Exone oder grosse genomische Umbauten erfasst werden. Bergmann et al. gelang 2005 die Identifizierung 3 grosser Deletionen mittels DHPLC und RT-PCR bei 3 verschiedenen Patienten (3). Ausserdem scheint der Einsatz von zwei kürzlich beschriebenen Techniken (MAPH und MLPA) bei der Detektion solcher mittelgrosser Umbauten vielversprechend zu sein.

Die Analyse möglicher Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zeigt, dass Missense-Mutationen signifikant häufiger mit einer moderateren Klinik von ARPKD assoziiert sind, während zu einem Kettenabbruch führende Mutationen eher bei Patienten mit schwerem klinischen Verlauf auftreten.

Ferner ist nach den Analyseergebnissen das Vorliegen von zu Kettenabbruch führenden Mutationen auf beiden Allelen immer mit dem peri- / neonatalem Versterben des Patienten verbunden, während für das Überleben dieser kritischen Zeitperiode das Vorliegen mindestens einer Missense-Mutation notwendig ist.

Die Identifizierung von *PKHD1* als verantwortliches Gen für ARPKD erlaubt eine molekulargenetische Pränataldiagnostik in Form der direkten Mutationsanalyse auch bei Familien, welche die Voraussetzungen für eine Haplotypenanalyse nicht erfüllen. Allerdings erfordert der Einsatz der direkten *PKHD1*-Mutationsanalyse in der Pränataldiagnostik aufgrund der enormen Gengrösse und der daraus resultierenden Schwierigkeiten eine strenge Indikationsstellung.

6 Literatur

1. Alvarez V, Malaga S, Navarro M, Espinosa L, Hidalgo E, Badia J, Alvarez R, Coto E (2000) Analysis of chromosome 6p in Spanish families with recessive polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 14: 205-207
2. Bear JC, Parfrey PS, Morgan JM, Martin CJ, Cramer BC (1992) Autosomal dominant polycystic kidney disease: New information for genetic counseling. *Am J Med Genet* 43: 548-553
3. Bergmann C, Kupper F, Schmitt CP, Vester U, Neuhaus TJ, Senderek J, Zerres K (2005) Multi-exon deletions of PKHD1-Gene cause autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *J Med Genet* 42
4. Bergmann C, Senderek J, Küpper F, Schneider F, Dornia C, Windelen E, Eggermann T, Rudnik-Schöneborn S, Kirfel J, Furu L, Onuchic LF, Rossetti S, Harris PC, Somlo S, Guay-Woodford L, Gernino GG, Moser M, Büttner R, Zerres K (2004 a) PKHD1 Mutations in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD). *Hum Mut* 23: 453-463
5. Bergmann C, Senderek J, Schneider F, Dornia C, Küpper F, Eggermann T, Rudnik-Schöneborn S, Kirfel J, Moser M, Büttner R, Zerres K (2004 b) PKHD1 Mutations in Families Requesting Prenatal Diagnosis for Autosomal Polycystic Kidney Disease (ARPKD). *Hum Mut* 23: 487-495
6. Bergmann C, Senderek J, Sedlacek B, Pegiazoglou I, Puglia P, Eggermann T, Rudnik-Schöneborn S, Furu L, Onuchic LF, De Baca M, Germino GG, Guay-Woodford L, Somlo S, Moser M, Büttner R, Zerres K (2003) Spectrum of Mutations in the Gene for Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD/PKHD1). *J Am Soc Nephrol* 13: 76-89
7. Bergmann C, Senderek J, Windelen E, Küpper F, Middeldorf I, Schneider F, Dornia C, Rudnik-Schöneborn S, Konrad M, Schmitt CP, Seeman T, Neuhaus TJ, Vester U, Kirfel J, Büttner R, Zerres K and members of the APN (Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie) (2005) Clinical consequences

- of *PKHD1* mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney Int* 67: 829-848
8. Blickman JG, Bramson RT, Herrin JT (1995) Autosomal recessive polycystic kidney disease: long-term sonographic findings in patients surviving the neonatal period. *Am J Roentgenol* 164: 1247-1250
 9. Deget F, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K (1995) Course of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) in siblings: a clinical comparison of 20 sibships. *Clin Genet* 47: 248-253
 10. Eggermann T, Nöthen MM, Propping P, Schwanitz G (1993) Molecular diagnosis of trisomy 18 using DNA recovered from paraffin embedded tissues and possible implications for genetic counseling. *Ann Genet* 36: 214-216
 11. Ellis D (2002) Nephrology. In: Basil JZ, Davis HW (eds) *Atlas of Pediatric Physical Diagnosis*. Mosby; 4(13): 470
 12. Furu L, Onuchic LF, Gharavi A, Hou X, Esquivel EL, Nagasawa Y, Bergmann C, Senderek J, Avner E, Zerres K, Germino GG, Guay-Woodford LM, Somlo S (2003) Milder Presentation of Recessive Polycystic Kidney Disease Requires Presence of Amino Acid Substitution Mutations. *J Am Soc Nephrol* 14: 2004-2014
 13. Garel L (1984) Sonography of renal cystic disease and dysplasia in infants and children. In: Brodehl J and Ehrlich JHH (eds) *Pediatric nephrology*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, S. 359-362
 14. Guay-Woodford LM (1996) Autosomal recessive polycystic kidney disease: clinical and genetic profiles. In: Watson ML, Torres VE (eds) *Polycystic kidney disease*. Oxford: Oxford University Press; S. 237-266
 15. Guay-Woodford LM (2002) Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD): New Insights from the Identification of the ARPKD Gene, *PKHD1*. *Pediatric Research* 52: 830-831
 16. Guay-Woodford LM, Desmond RA (2003) Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics* 111: 1072-1080

17. Guay-Woodford LM, Mücher G, Hopkins SD, Avner ED, Germino GG, Guillot AP, Herrin J, Holleman R, Irons DA, Primack W, Thompson PD, Waldo FB, Lunt PW, Zerres K (1995) The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosom 6p21.1-p12: Implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 56: 1101-1107
18. Hayashi K (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1: 34-38
19. Hofmann Y, Becker J, Wright F, Avner ED, Mrug M, Guay-Woodford LM, Somlo S, Zerres K, Germino GG, Onuchic LF (2000) Genomic structure of the gene for the human P1 protein (MCM3) and its exclusion as a candidate for autosomal recessive polycystic kidney disease. *Eur J Hum Genet* 8: 163-166
20. Jeffrey G, Chakrabarti S, Hegele R, Adams P (1999) Polymorphism in intron 4 of HFE may cause overestimation of C282Y homozygote prevalence in haemochromatosis. *Nat Genet* 22: 325-326
21. Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner P, Cheadle JP, O'Donovan MC (1999) Optimal Temperature Selection for Mutation Detection by Denaturing HPLC and Comparison to Single-Stranded Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis. *Clinical Chemistry* 45: 1133-1140
22. Konrad M, Zerres K, Wühl E, Rudnik-Schoneborn S, Holtkamp U, Scharer K (1995) Body growth in children with polycystic kidney disease. *Acta Paediatr* 84: 1227-1232
23. Kovacs J, Gomba S (1998) Analysis of the role of apoptosis and cell proliferation in renal cystic disorders. *Kidney Blood Press Res* 21: 325-328
24. Lager DJ, Qian Q, Bengal RJ, Ishibashi M, Torres VE (2001) The pck rat: Anew model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int* 59: 126-136
25. Lens XM, Onuchic LF, Wu G, Hayashi T, Daoust M, Mochizuki T, Santarina LB, Stockwin JM, Mücher G, Becker J, Sweeny WE, Avner ED, Guay-Woodford L,

- Zerres K, Somlo S, Germino GG (1997) An integrated and physical map of the autosomal recessive polycystic kidney disease region. *Genomics* 41: 463-466
26. McDonald RA, Watkins SL, Avner D (1999) Polycystic kidney disease. In: Barrat TM, Avner EP, Harmon WE (eds) *Pediatric nephrology*. Lippinkott, Williams & Wilkins, Baltimore; 4: 459-474
27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 16: 1215
28. Moser M, Pscherer A, Roth C, Becker J, Mücher G, Zerres K, Dixkens C, Weis J, Guay-Woodford L, Büttner R, Fassler R (1997) Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cell in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev* 11: 1938-1948
29. Mücher G, Becker J, Knapp M, Buttner R, Moser M, Rudnik-Schöneborn S, Somlo S, Germino G, Onuchic L, Avner E, Guaey-Woodford L, Zerres K (1998) Fine mapping of the autosomal recessive polycystic kidney disease locus (PKHD1) and the genes MUT, RDS, CSNK2 beta, and GSTA 1 at 6p21.1-p12. *Genomics* 48: 40-5
30. Mücher G, Wirth B, Zerres K (1994) Refining the map and defining flanking markers of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease on chromosome 6p21.1-reference2. *Am J Hum Genet* 55: 1281-1284
31. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
32. Nicolau C, Torra R, Bianchi L, Vilana R, Gilabert R, Darnell A, Bru C (2000) Abdominal sonographic study of autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Clin Ultrasound* 28: 277-282
33. Nollau P und Wagener C (1997) Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clinical Chemistry* 43: 1114-1128
34. Ogborn MR (1994): Polycystic kidney disease – a truly pediatric problem. *Pediatr Nephrol* 8: 762-767

35. Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y, Hou X, Eggermann T, Ren Z, Bergmann C, Senderek J, Esquivel E, Zeltner R, Rudnik-Schöneborn S, Mrug M, Sweeney W, Avner ED, Zerres K, Guay-Woodford LM, Somlo S, Germino GG (2002) PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet* 70: 1305-17
36. Onuchic LF, Mrug M, Hou X, Eggermann T, Bergmann C, Zerres K, Avner ED, Furu L, Somlo S, Nagasawa Y, Germino GG, Guay-Woodford LM (2002 a) Refinement of the autosomal recessive polycystic kidney disease (PKHD1) interval and exclusion of an EF hand-containing gene as a PKHD1 Candidate gene *Am J Med Genet* 15: 346-352
37. Onuchic LF, Mrug M, Hou X, Nagasawa Y, Furu L, Eggermann T, Bergmann C, Mücher G, Avner ED, Zerres K, Somlo S, Germino GG, Guay-Woodford LM (2002) Refinement of the autosomal recessive polycystic kidney disease (PKHD1) interval and exclusion of an EF hand-containing gene as PKHD1 candidate gene. *Am J Med Genet* 110: 346-352
38. Onuchic LF, Mrug M, Lakings AL, Mücher G, Becker J, Zerres K, Avner ED, Dixit M, Somlo S, Germino GG, Guay-Woodford LM (1999) Genomic organization of the KIAA0057 gene that encodes a TRAM-like protein and its exclusion as a polycystic kidney and hepatic disease 1 (PKHD1) candidate gene. *Mamm Genome* 10: 1175-1178
39. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770
40. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxy-nucleotides. *Science* 238: 336-341
41. Rao VB (1994) Direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Anal Biochem* 216: 1-14

42. Rosetti S, Torra R, Coto E, Consugar M, Kubly V, Malaga S, Navarro M, El-Youssef M, Torres VE, Harris PC (2003) A complete mutation screen of PKHD1 in autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD) pedigrees. *Kidney Int* 64: 391-403
43. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166
44. Saiki RK, Scharf S, Faloona FA, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
45. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
46. Sanzen T, Harada K, Yasoshima M, Kawamura Y, Ishibashi M, Nakanuma Y (2001) Polycystic kidney rat is a novel animal model of Caroli's disease associated with congenital hepatic fibrosis. *Am J Pathol* 158: 1605-1612
47. Sellner L, Taylor G (2004) MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat* 23: 413-419
48. Sharp AM, Messiaen LM, Page G, Antignac C, Gubler M-C, Onuchic LF, Somlo S, Germino GG, Guay-Woodford LM (2005) Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in ARPKD cohorts. *J Med Genet* 42: 336-349
49. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SBH and Hood LE (1986) Fluorescence detection I automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674-679
50. Ward CJ, Hogan MC, Rosetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE, Harris PC (2002) The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 30: 259-269

51. Woo D (1995) Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 333: 18-25
52. Zerres K, Mücher G, Bachner L et al. (1994) Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nature Genetics* 7: 429-432
53. Zerres K, Mücher G, Becker J, Steinkamm C, Rudnik-Schöneborn S, Heikkila P, Rapola J, Salonen R, Germino GG, Onuchic L, Somlo S, Arner ED, Harman LA, Stockwin JM, Guay-Woodford LM (1998a) Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am J Med Genet* 76: 137-144
54. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S (2000) Polyzystische Nierenerkrankungen. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg) *Handbuch der Molekularen Medizin. Monogen bedingte Erbkrankheiten, Teil 2*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo; 1(9): 281-295
55. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Deget F, Holtkamp U, Brodehl J, Geisert J, Schärer K, Arbeitsgemeinschaft für pädiatrische Nephrologie (1996) Autosomal recessive polycystic kidney disease in 115 children: Clinical presentation, course and influence of gender. *Acta Paediatr* 85: 437-445
56. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Senderek J, Eggermann T, Bergmann C. *JN* 2003; 16: 453-458
57. Zerres K, Schärer K (2002) Zystische Nierenerkrankungen. In: Schärer K, Mehls O (Hrsg) *Pädiatrische Nephrologie*. Springer, Heidelberg; 1(13): 95-101
58. Zerres K, Senderek J, Rudnik-Schöneborn S, Eggermann T, Kunze J, Mononen T, Kääriäinen H, Kirfel J, Moser M, Büttner R, Bergmann C (2004) New options for prenatal diagnosis in autosomal recessive polycystic kidney disease by mutation analysis for the PKHD1 gene. *Clin Genet* 66: 53-57
59. Zerres K, Völpel MC, Weiss H (1984) Cystic kidneys. Genetics, pathologic Anatomy, clinical picture and prenatal diagnosis. *Hum Genet* 68: 104-135

7 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei...

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Zerres für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, für die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums der RWTH Aachen und für die Übernahme des Referates,

Herrn Prof. Dr. med. Jochen Riehl für die freundliche Übernahme des Korreferates,

Herrn Dr. med. Carsten Bergmann und Herrn Dr. med. Jan Senderek für die optimale Betreuung und fachliche Begleitung bei der Durchführung der Arbeit,

allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik, insbesondere Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Eggermann für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit im praktischen Teil der Arbeit,

Frau Patricia Puglia und Frau Dr. med. Beate Sedlacek für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit,

allen Familien für die freundliche Teilnahme an der Studie,

meinen Eltern, Thomas und Anna Pegiazoglou, für die Ermöglichung des Studiums und ihre vielseitige Unterstützung,

meiner Schwester, Maria Pegiazoglou, für die menschliche Unterstützung,

meiner Lebenspartnerin, Athina Kapagerof, für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung zu jedem Zeitpunkt.

8 Anhang

Tab. 8-1: ARPKD-Patienten/Familien mit schwerer Ausprägung des Phänotyps

Familie	Herkunft	Genotyp	Patient	Ge- schlecht	Alter bei Untersuchung/ Tod	letzter	Zusätzliche Befunde
90	Frankreich	Ex36: L1966fsX1969 (M) Ex39: L2134P (P) {Ex58: I3081V (P)}	90.1	F	† 1 M		SC 0.5, HTN, vergrößerte Leber, portaler HTN, Leberversagen wg. ascend. Cholangitis, PM
91	Frankreich	Ex36: L1966fsX1969 (P)	91.1	M	† perinatal		RD, PM
			91.2	F	† CVS/TOP		
95 (C)	Türkei	Ex16: R496P (P) Ex16: R496P (M)	95.1	M	† perinatal		RD
			95.2	F	† perinatal		RD
			95.3	F	† perinatal		RD, PM
			95.4	M	† CVS/TOP		PM
			95.5	F	† CVS/TOP		
108	Finnland	Ex16: R496X (P) Ex61: V3471G (M)	108.1	F	† perinatal		RD, PM
			108.2	M	† US/TOP		OH, PSP 22 (GW), PM

111	Deutschland	Ex3: T36M (M)	111.1	F	† perinatal	RD, PM
		Ex27: M997K (P)	111.2	M	† perinatal	RD, PM
118	Deutschland	Ex3: T36M (P) Ex3: F42fsX63 (M)	118.1	F	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (32 GW), RD, PM
126	Italien		126.1	M	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (32 GW), RD, PM
133	Finnland	Ex16: R496X (M)	133.1	F	† perinatal	RD, PM
		Ex61: V3471G (P)	133.2	M	† US/TOP	OH, vergrößerte Nieren, PSP (22 GW), PM
			133.3	F	† CVS/TOP	PM
165	Finnland	Ex16: R496X (P)	165.1	M	† perinatal	OH, RD, PM
		Ex61: V3471G (M)	165.2	M	† CVS/TOP	PM
			165.3	F	† CVS/TOP	
			165.4	M	† CVS/TOP	
182	Finnland	Ex16: R496X (P)	182.1	F	† perinatal	OH, RD, PM
185	Deutschland		185.1	M	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (36 GW), RD, PM
			185.2	F	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (28 GW), RD, PM

188 (C)	Pakistan	Ex9: G223S (P)	188.1	M	† perinatal	OH, RD, PM
		Ex9: G223S (M)	188.2	M	† perinatal	RD
			188.3	F	† perinatal	RD
			188.4	M	† perinatal	RD
			188.5	F	† perinatal	RD
197	Deutschland	Ex3: T36M (P)	197.1	M	† 1 Woche	OH, RD, HTN, PM
		Ex61: L3413fsX3432 (M)	197.2	M	† 1 Monat	RD, SC 0.8, HTN, Anämie, Sepsis, PM
200	Dänemark	Ex7: T166fsX178 (M)	200.1	M	† perinatal	RD, PM
			200.2	M	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren (31 GW), RD
215 (C)	Türkei	Ex33: D1793fsX1802 (P) Ex33: D1793fsX1802(M)	215.1	M	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren (30 GW), RD, PM
219	Finnland	Ex16: R496X (P) Ex52: D2761Y (M)	219.1	M	† perinatal	OH, RD, PM
220	Albanien		220.1	M	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (31 GW), RD, PM
			220.2	F	† US/TOP	OH, vergrößerte Nieren, PSP (22 GW)
			220.3	M	† US/TOP	OH, vergrößerte Nieren, PSP (23 GW), PM

225 (C)	Niederlande	Ex21: D703N (P)	225.1	F	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (34 GW), RD, PM OH, vergrößerte Nieren, PSP (31 GW), RD, PM
		Ex21: D703N (M)	225.2	F	† perinatal	
			225.3	M	† CVS/TOP	
226	Deutschland		226.1	M	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (31 GW), RD, PM PM
			226.2	F	† CVS/TOP	
228	Finnland	Ex16: R496X (P)	228.1	M	† perinatal	OH, RD, PM PM
		Ex16: R496X (M)	228.2	F	† CVS/TOP	
			228.3	F	† CVS/TOP	
229	Finnland	Ex3: T36M (M)	229.1	F	† perinatal	RD, PM
		Ex57: I2957 (P)				
251 (C)	Türkei	Ex14: P356fsX357 (P)	251.1	F	† perinatal	OH, RD, PM OH, vergrößerte Nieren, PSP (29 GW), PM
		Ex14: P356fsX357 (M)	251.2	F	† US/TOP	
254	UK	Ex24: P805L (P)	254.1	F	† perinatal	OH, RD, PM

264 (C)	Türkei	Ex14: R328X (P) Ex14: R328X (M)	264.1	F	† 3 W.	OH, RD, HTN, ESRD, Sepsis, PM
282	Australien	Ex3: T36M	282.1	F	† perinatal	OH, RD, PM
			282.2	F	† CVS/TOP	PM
			282.3	M	† CVS/TOP	
290 (C)	Türkei	Ex14: P356fsX357 (P) Ex14: P356fsX357 (M)	290.1	F	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (34 GW), RD, PM
			290.2	M	† CVS/TOP	PM
297 (C)	Israel /Arabien	Ex61: R3482C (P) Ex61: R3482C (M)	297.1	F	† perinatal	RD
			297.2	M	† perinatal	OH (28 GW), RD, PM
			297.3	M	† CVS/TOP	
330 (C)	Finnland	Ex16: R496X (P) Ex16: R496X (M)	330.1	F	† perinatal	OH (32 GW), RD, PM
333	Finnland	Ex16: R496X (M)	333.1	M	† perinatal	OH, RD, PM
337	UK	Ex3: T36M	337.1	M	† perinatal	RD, PM

340	UK	Ex11: S237fsX244 (P) Ex36: L1966fsX1969(M)	340.1	M	† perinatal	OH (30 GW), RD, PM
353	USA	Ex3: T36M (M) Ex16: G470fsX480 (P)	353.1	M	† perinatal	OH (34 GW), RD, PM
360 (C)	Israel /Arabien	Ex61: R3482C (P)	360.1	M	† perinatal	RD
		Ex61: R3482C (M)	360.2	F	† perinatal	RD
			360.3	F	† perinatal	RD, PM
384	Deutschland	Ex61: R3482C (P)	384.1	F	† perinatal	OH, RD, PM
385	Finnland	Ex16: R496X (P)	385.1	M	† perinatal	RD, PM
		Ex16: R496X (M)				
413 (C)	Inuit (Kanada)	Ex32: G1320fsX1322 (P) Ex32: G1320fsX1322 (M)	413.1	F	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (26 GW), RD, PM
427	UK	Ex3: T36M (M)	427.1	M	† 3 W.	OH, RD, HTN, Anurie, SC 5.2 (3. Woche), PM
		Ex61: L3494fsX3528 (P)				
440 (C)	Türkei	Ex62: I3658fsX3664 (P)	440.1	M	† perinatal	OH (33 GW), RD, PM
		Ex62: I3658fsX3664 (M)				
441	Deutschland		441.1	F	† perinatal	OH (33 GW), RD, PM

451	Finnland	Ex16: R496X (P) Ex16: R496X (M)	451.1	M	† 2 W.	RD, HTN, SC 4.6 (2. Woche)
452	Deutschland	Ex3: T36M	452.1	M	† perinatal	RD, PM
			452.2	M	† US/TOP	OH, vergrößerte Nieren, PSP (22 GW), PM
470 (C)	Syrien	Ex58: R3107X (P) Ex58: R3107X (M)	470.1	M	† perinatal	OH, vergrößerte Nieren, PSP (33 GW), RD, PM
483	Finnland	Ex16: R496X (P) Ex16: R496X (M)	483.1	F	† perinatal	OH (20 GW), RD, PM
494	Finnland	Ex16: R496X (P)	494.1	M	† perinatal	OH (35 GW), RD, PM

Tab. 8-2: ARPKD-Patienten/Familien mit intrafamiliärer Variabilität des Phänotyps

Familie	Herkunft	Genotyp	Patient	Geschlecht	Alter bei letzter Untersuchung/ Tod	Nieren- beteiligung	Leber- beteiligung	Art. Hyper- tension	Zusätzliche Befunde
1	Finnland	Ex3: T36M (P)	1.1	F	† 1 M.				RD, PM
		Ex61: V3471G (M)	2.1	M	15 J.	SC 0.6, Cl-Krea 61 (5 J.), SC 2.2 (15 J.)	Bx CHF (2 J.)	Ja (2 J.)	RD (erste 4 Tage)
2	Finnland	Ex3: T36M (P)	2.1	F	† perinatal				RD, PM
		Ex3: T36M (M)	2.1	F	5 J.	SC 3.0 (3 J.), Nierenversagen (5 J.)	Echogenität ↑ (5 J.)	Ja (2 J.)	RD, Anämie, Wachstumsretardierung
3	Finnland	IVS13-1G>A (P)	3.1	F	18 J.	SC 0.4, Cl-Krea 131 (2 J.), SC 2.8 (18 J.)	Bx CHF (2 J.)	Ja (5 J.)	
		Ex43: I2331K (M)	3.2	M	† 1 M.	Nierenversagen (1 Monat)		Ja (Geburt)	RD, PM
59	Türkei	Ex58: R3107X (P)	59.1	M	† 1 J.	SC 1.6, Cl-Krea 15 (neonatal), SC 2.9 (10 Monate)	Echogenität ↑ (4 M.)	Ja (Geburt)	OH, Anämie
		Ex59: D3293V (M)	59.2	M	† perinatal	SC 0.8 (Geburt)			OH, vergrößerte Nieren, PSP (28 GW), RD, PM

			59.3	M	† 2 J.	SC 2.1 (1 J.), Nierenversagen (2 J.)	Echogenität ↑ (1 J.)	Ja (Geburt)	
105	Italien	Ex9: I222V (M)	105.1	F	† perinatal				RD, PM
		Ex58: R3240X (P)	105.2	M	† perinatal				RD, PM
			105.3	F	7 J.	SC 0.3 (1 J.), SC 0.7 (7 J.)	US normal (7 J.)	Ja (1 J.)	
127	UK	Ex3: T36M	127.1	F	6 J.	Nierenversagen (2 J.), Nieren- transplantation (2 J.), SC 0.9 (6 J.)	Vergrößerung	Ja (Geburt)	
			127.2	M	† perinatal				RD, PM
151	Deutschland	Ex21: W656C (M)	151.1	M	6 J.	SC 0.6, Cl-Krea 27 (1 J.), SC 1.0 (6 J.)		Ja (Geburt)	OH
		Ex30: G1123S (P)	151.2	M	† perinatal				OH, RD, PM
316	Deutschland	Ex61: R3482C	316.1	M	† perinatal				RD, PM
			316.2	F	24 J.	Nierenversagen, Nieren- transplantation (9 J.), Abstoßung (11 J.), Nieren- transplantation (15J.), Abstoßung (22 J.)	Bx CHF, Caroli- Syndrom (23 J.)	Ja (2 J.)	Anämie, wartet auf kombinierte Niern- Leber- Transplantation (24 J.)

Tab. 8-3: ARPKD-Patienten/Familien mit milder Ausprägung des Phänotyps

Familie	Herkunft	Genotyp	Patient	Geschlecht	Alter bei letzter Untersuchung /Tod	Nierenbeteiligung	Leberbeteiligung	Art. Hypertension	Zusätzliche Befunde
9	Deutschland	Ex3: T36M	9.1	F	18 J.	SC 0.5 (12 J.), SC 0.7 (18 J.)	US normal (18 J.)	Nein (18 J.)	
			9.2	M	8 J.	SC 0.7 (2 J.), SC 0.6 (8 J.)	Echogenität ↑ (8 J.)	Nein (8 J.)	
12	Deutschland	Ex3: T36M	12.1	F	33 J.	SC 2.3 (33 J.)	bx CHF (25 J.)	Nein (33 J.)	
			12.2	F	31 J.	SC 0.6 (14 J.), SC 1.3 (18 J.), SC 1.6 (21 J.), Nierenversagen (28 J.), RTX (29 J.), SC 1.4 (31 J.)	US normal (14 J.)	Nein (31 J.)	Intrakranielle Aneurysmen, komplikationslose SS (31 J.)
27	Deutschland	Ex3: T36M	27.1	F	6 J.	SC 0.7 (1 J.), SC 3.5 (3 J.), Nierenversagen, Dialyse (4 J.) SC 4.8 (6 J.)	bx CHF (2 J.), vergrößert	Nein (6 J.)	
			27.2	F	† 3 J.	SC 2.2 (Geburt), Nierenversagen, Dialyse (1 J.), SC 5.2 (3 J.)	bx CHF (1.5 J.)	Ja (Geburt)	Caput medusae (1.5 J.), PM

32	Deutschland	Ex3: T36M	32.1	M	22 J.	SC 0.4 (3 J.), SC 4.4 (15 J.), Nierenversagen (16 J.), RTX (18 J.), Dialyse (22 J.)	Echogenität ↑, portaler HTN, HSM (12 J.), LTX (22 J.)	Ja (3 J.)	Ösophagusvarizenblutung (16 J.)
			32.2	F	16 J.	SC 0.5 (2 J.), SC 1.7 (6 J.), SC 5.2 (9 J.), Nierenversagen (10 J.), RTX (11 J.), SC 3.0 (16 J.)	Echogenität ↑, HSM, portaler HTN (8 J.)	Ja (2 J.)	Ösophagusvarizen (8 J.)
41	Deutschland	Ex3: T36M (P)	41.1	F	12 J.	SC 1.3, Cl-Krea 64 (6 J.), SC 1.7, Cl-Krea 45 (12 J.)	bX CHF (3 J.), HSM, portaler HTN (11 J.)	Ja (2 J.)	Wachstumsretardierung, Enuresis, Anämei, Hyperparathyreoidismus
43	Deutschland		43.1	F	13 J.	SC 0.8 (4 J.), SC 3.6, Cl-Krea 25 (13 J.)	bx CHF (8 J.)	Ja (1 J.)	Wachstumsretardierung, Enuresis, Anämei, Hyperparathyreoidismus

45	Deutschland		45.1	M	13 J.	SC 1.4 (1 J.), SC 0.7 (4 J.), SC 1.1, Cl-Krea 80 (13 J.)	Echogenität ↑ (1 J.), bx CHF (8 J.), HSM, portaler HTN (13 J.)	Ja (1 J.)	Wachstumsretardierung
48	Belgien		48.1	M	26 J.	Nierenversagen, Dialyse (15 J.), RTX (19 J.), SC 2.5 (26 J.)	HSM, Echogenität ↑ (26 J.)	Ja (3 J.)	Thrombozytopenie (26 J.)
			48.2	F	18 J.	Nierenversagen, kombinierte Leber-NierenTransplantation((11 J.), SC 2.7 (18 J.)	portaler HTN, bx CHF (10 J.)	Ja (1 J.)	Ösophagusvarizenblutung (10 J.)
53 (C)	Israel/Arabien		53.1	F	2 J.	SC 2.4 (2 J.)	bx CHF (1 J.)	Ja (1 J.)	
56	Finnland	Ex16: R496X (P) Ex61: V3471G (M)	56.1	F	17 J.	SC 6.5 (14 J.), Nierentransplantation (17 J.)	bx CHF (4 J.), HSM, portaler HTN (14 J.)	Ja (Geburt)	Ösophagusvarizenblutung (14 J.)
57	Israel/Arabien	IVS16+1G>A	57.1	M	2 J.	SC 0.9 (2 J.)	bx CHF (2 J.)	Ja (Geburt)	
73	Deutschland		73.1	F	14 J.	SC 0.6 (1 J.), SC 1.0, Cl-Krea 53 (7 J.), SC 1.2, Cl-Krea 45 (14 J.)	HSM, portaler HTN (8 J.), bx CHF (11 J.)	Ja (1 J.)	Thrombozytopenie, Ösophagusvarizenblutung
77	Portugal	Ex14: G369fsX412 (M)	77.1	M	12 J.	SC 1.4 (3 J.), Nierenversagen (7 J.), RTX (8 J.), SC 3.1 (12 J.)	bx CHF (1 J.), portaler HTN (2 J.)	Ja (1 J.)	Wachstumsretardierung, Ösophagusvarizen
			77.2	F	CVS/TOP				

78	Italien		78.1	M	7 J.	SC 1.1 (7 J.)	Echogenität ↑, HSM, portaler HTN (7 J.)	Ja (5 J.)	Ösophagusvarizen (6 J.)
80	Deutschland	Ex27: A1030E (P) Ex58: L3166fsX3161 (M)	80.1	M	8 J.	SC 0.3, CI-Krea 110 (2 J.), SC 1.2 (8 J.)	HSM, Echogenität ↑, dilatierte Gallengänge (8 J.)	Ja (1 J.)	Wachstumsretardierung
81	Schweden		81.1	M	9 J.	Nierenversagen, RTX (4 J.), SC 0.8 (9 J.)	vergrößert, bx CHF (3 J.), portaler HTN (6 J.)	Ja (3 J.)	Ösophagusvarizen (7 J.)
84	Italien		84.1	M	11 J.	SC 3.5 (11 J.)	US normal (11 J.)	Ja (3 J.)	
88	Brasilien		88.1	F	11 J.	SC 2.5 (3 J.), Nierenversagen (10 J.), RTX (11 J.)	vergrößert (3 J.), Echogenität ↑, portaler HTN (11 J.)	Ja (Geburt)	
96	Frankreich		96.1	F	8 J.	SC 1.2 (8 J.)	vergrößert, Echogenität ↑ (8 J.)	Ja (1 J.)	
			96.2	F	3 J.	SC 0.7 (3 J.)	vergrößert, Echogenität ↑ (3 J.)	Ja (Geburt)	
97	Schweden		97.1	M	10 J.	Nierenversagen, RTX (5 J.), SC 2.1 (10 J.)	bx CHF (4 J.), HSM, portaler HTN (7 J.)	Ja (Geburt), normal seit RTX	Ösophagusvarizen (8 J.)

101	Deutschland		101.1	M	20 J.	Nierenversagen, Dialyse (16 J.), kombinierte Leber-Nieren-Transplantation (18 J.)	Echogenität ↑, HSM, portaler HTN (5 J.), bx CHF (16 J.)	Ja (3 J.)	Ösophagus-varizenblutung (5 J.), Panzytopenie (17 J.)
106	Deutschland	Ex32: P1486L (M)	106.1	M	11 J.	SC 1.8 (1 J.), SC 3.2 (4 J.), Nierenversagen (7 J.), RTX (8 J.), Abstoßung (10 J.)	portaler HTN (10 J.)	Ja (1 J.)	Ösophagus-varizen (10 J.), kombinierte Leber-Nieren-Transplantation geplant (11 J.)
113	Finnland	Ex16: R496X (P) Ex43: I2331K (M)	113.1	F	5 J.	SC 0.4, Cl-Krea 110 (5 J.)	US normal	Ja (5 J.)	
			113.2	F	4 J.	SC 0.5 (4 J.)	Echogenität ↑ (4 J.)	Nein (4 J.)	
124	Schweiz		124.1	M	13 J.	SC 0.4 (2 J.), SC 0.9 (13 J.)	US normal (13 J.)	Ja (1 J.)	
135	Venezuela		135.1	M	14 J.	SC 0.9 (14 J.)		Nein	
			135.2	F	11 J.	SC 0.6 (11 J.)		Nein	
			135.3	M	8 J.	SC 0.7 (8 J.)	vergrößert, portaler HTN, bx CHF (6 J.)	Nein	Ösophagus-varizen (8 J.)
163	Deutschland	Ex3: T36M	163.1	F	7 J.	SC 0.7, Cl-Krea 31 (1 M.), SC 0.3 (1 J.), SC 0.7 (3 J.), SC 1.2, Cl-Krea 43 (7 J.)	US normal (1 J.), HSM, Echogenität ↑, erweiterte Gallengänge (7 J.)	Ja (Geburt)	Hyperparathyreoidismus

195	Deutschland	Ex3: T36M	195.1	M	14 J.	SC 0.6 (14 J.)	US normal (14 J.)	Nein (14 J.)	
231	Slowenien	Ex3: T36M	231.1	M	21 J.	Nierenversagen, Dialyse (14 J.), SC 8.5 (21 J.)	HSM (2 J.), Echogenität ↑, portaler HTN (12 J.)	Ja (2 J.)	Ösophagus- varizen, Thrombozyto- penie (12 J.)
			231.2	F	18 J.	SC 3.3 (18 J.)	HSM (1 J.), Echogenität ↑, portaler HTN (10 J.)	Ja (3 J.)	
260 (C)	Türkei	Ex16: I473S (P) Ex16: I473S (M)	260.1	F	1 J.	SC 0.5 (1 J.)	US normal	Ja (Geburt)	
270 (C)	Türkei	Ex37: I998T (P) Ex37: I998T (M)	270.1	M	2 J.	SC 0.4 (1 M.), CI-Krea 64 (4 M.), SC 0.5 (2 J.)	US normal (4 M.), Echogenität ↑ (2 J.)	Ja (Geburt)	OH (31 GW), RD, Anämie
277	Tschechische Republik	Ex3: T36M (M)	277.1	F	4 J.	SC 1.2 (2 M.), SC 0.8 (3 J.), SC 1.0, CI-Krea 38 (4 J.)	HSM, Echogenität ↑ (2 M.)	Ja (2 M.)	Anämie
299	Finnland	Ex16: R496X (P)	299.1	F	† 2 J.	SC 0.7 (2 J.)	US normal	Ja (Geburt)	OH, Tod aufgrund von angeborenem Herzfehler
324	Deutschland	Ex3: T36M	324.1	M	3 J.	SC 1.0, CI-Krea 43 (1 J.), SC 1.3, CI-Krea 38 (3 J.)	Echogenität ↑ (1 J.)	Ja (6 M.)	Anämie (6 M.)
357	Deutschland	Ex3: T36M	357.1	F	4 J.	SC 0.5 (5 M.), SC 1.4 (4 J.)	MRT: CHF, Aszites, erweiterte Gallen- gänge (5 M.)	Ja (Geburt)	Anämie

408	Italien		408.1	F	1 J.	SC 0.8 (1 J.)	vergrößert, Echogenität ↑, γ-GT ↑, erweiterte Gallen- gänge (1 J.)	Ja (Geburt)	
457	Griechenland	Ex3: T36M (M)	457.1	F	4 J.	SC 0.5 (1 J.), 1.7 (4 J.)	US normal	Ja (Geburt)	OH, vergrößerte Nieren, PSP (28 GW)
			457.2	F	US/TOP			OH, vergrößerte Nieren, PSP (19 GW), PM	
483	Deutschland	Ex3: T36M	483.1	F	1 J.	SC 0.3 (1 J.)	Echogenität ↑ (1 J.)	Ja (Geburt)	
485	Deutschland	Ex3: T36M	485.1	F	4 J.	SC 0.5, Cl-Krea 105 (4 J.)	bx CHF, erweiterte Gallen- gänge (3 J.)	Ja (1 J.)	Thrombozyto- penie, Anämie

Legende für die Tabellen 8.1 - 8.3:

(C) = bekannte Kosanguinität

(P) = väterliches betroffenes Allel

(M) = mütterliches betroffenes Allel

CVS/TOP = Pränataldiagnostik durch Chorionzottenbiopsie (CVS) mit darauf folgender Haplotypenanalyse und anschliessendem Schwangerschaftsabbruch

US/TOP = durch sonographische Befunde gestellter Verdacht auf das Vorliegen von ARPKD und anschliessender Schwangerschaftsabbruch

† = verstorben

W. = Wochen

M. = Monate

J. = Jahre

SC = Serum-Kreatini (mg/dl)

Cl-Krea = Kreatinin-Clearance (ml/min/1.73m²)

RTX = Nierentransplantation

US = Ultraschall

MRT = Magnetresonanztomographie

bx = Leberbiopsie

CHF = kongenitale hepatische Fibrose

Portalaler HTN = portaler Hypertonus

HSM = Hepatosplenomegalie

LTX = Lebertransplantation

HTN = arterieller Hypertonus

OH = Oligohydramnion

PSP = „pepper and salt pattern“: charakteristischer Befund in der pränatalen Ultraschalluntersuchung

GW = Gestationswoche

RD = respiratorische Störung

PM = post mortem mit charakteristischen für ARPKD, typischen Befunden in Nieren und Leber

F = weiblich

M = männlich

Die in dieser Arbeit in den Exonen 26 bis 52 des längsten kontinuierlichen offenen Leserahmens (ORF) des *PKHD1*-Gens identifizierten Mutationen sind durch Fettschrift hervorgehoben. Zur vollständigen Darstellung der Ergebnisse der Mutationsanalyse für das gesamte *PKHD1*-Gen wurden die in den Exonen 2 bis 25 und 53 bis 67 entdeckten Veränderungen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, freundlicherweise von Frau Beate Sedlacek und Frau Patricia Puglia zur Verfügung gestellt.

Fragment	Forward – Primer (5'→3')	Reverse – Primer (5'→3')	Annealing Temperatur (°C)
Exon 26	TGGAAAAGAAATTTGCCTCA	GGCCTCTAACAAAATCACTGC	58
Exon 27	GGGCAGAGAAGGAACATTTG	GAACACTAGCTTCAGAGGCTCA	55
Exon 28	TTGTCTGCCTGTATGGTTGG	CAGTGGTCACTCACCCAGAG	60
Exon 29	TGGAGTTCTCTCCCTTAAGTCAG	TGCCCTTTTTATAGGACCAATG	61
Exon 30	CCCCACATGTCAGAGGCTAT	AGCTGAATGCTAGACCATCAAA	60
Exon 31	GACAGTTTGCTCTTCTCCTCAA	TCTCTCTGACCTCACTGGCA	60
Exon 32.1	CCACAGGTGCTATGAATTC	AGGGTTTCACACCAGATG	60
Exon 32.2	TGTGACATTGTGAACTTAACGG	GTGACTACTGGTGTGCTG	60
Exon 32.3	AAGGCTTCACTTTCATGTATGAA	CGTACTTGGAGAGGATAGATG	60
Exon 32.4	TGGATGCTCCATCCCTCTCA	CCTCACAGTAAGTATGGTCC	60
Exon 32.5	ATCTTCCCATCGCAGGGTTCG	ATGACAGGACTTGCCTCTT	60
Exon 32.6	AGTCCTGGTCAATGGGCTAA	TGACAGGTAGTGGGGTCTG	60
Exon 32.7	CTTCCTTGCAATGTAACTTTT	GCTTCCACCATGTAAGCTG	57
Exon 32.8	GCCCCAAGTGTTTCATTAT	GATACCAAAGTCCATCTACCTC	55
Exon 32.9	ACAGGGAATGGCTCTGTTG	CCACACAGGGTGACATTC	55
Exon 32.10	AGGAGCTGCAAACATTGA	GTGTGCTGTCTTATTTGC	50
Exon 33	AAGGGAGATTTGCCTGTATGA	GAATTAACCAAAGAATATCATTT CCA	59
Exon 34	GGTCAAAGGAGGACACAGGA	TCCACCCAGCCTTACTCTC	60
Exon 35	AGCTAATGGCTTGCAATGAT	TCGCTGCCATTTGGACTAA	59

Exon 36	CCAACCCAGCTCTCTGTTTT	CAGAAAGTTTCCCTCCTCCA	60
Exon 37	CAAACCGGTGAGCCTTATCC	TTCCACTGCTAGACACAGCT	60
Exon 38	AAATTATCTGGACAACCTTTTCTC	AGACCCAATACAAATGTCCA	59
Exon 39	TTGGAGTGATGTCCTCAGTTCT	GCAATGCCATCTATCATCAGAC	60
Exon 40	CATAGCTTTAGGTTCTCTGGACTT	TGCCTTAAACATGGGAGAAA	60
Exon 41	CAACAGAATCTCAGGAGCCA	TTGGGGAGAATTCATTGTGA	60
Exon 42	TGCAGCATCTCTTGTTTTCC	ATTTTGCCATCAGGCTTGTC	60
Exon 43	TCAAGGGTGTTGAGTTGAGTACA	TTGAGAAAGAACTTTATGCCCTC	60
Exon 44	GCAACCTTATCATACATGGGG	TGTGAAATCATAAGACAGCCAAA	60
Exon 45	TTGGCTTAATTCATTCTGTTTCA	TGTGAGAAAACAAGTGACAGTTT TAAT	60
Exon 46	AACCAAGCCTCAGACCTTTG	GGCCCAGCACATGTAATTTTGT	60
Exon 47	TCCAGTTTTCTTATTTTGCTTTCA	TGGGCCTTATTTATCATCTGTTC	60
Exon 48	TTGCTATTTGTGCCATTGTG	ATGCCCATCGGCAAGCTA	60
Exon 49	TTGGATTCAGAATGAGCAAAT	TGAGAATGCAGCATACCAACT	60
Exon 50	TGATGGGGTTCCTTACTAAATGA	TGGTGATTTCTGACTATGTGCTC	60
Exon 51	TTTTCTCACGTGTGACTGTCTTT	AGGACTGATACCTGCCTGTTT	60
Exon 52	GAATTTGGAAGTTATCACAATGG A	GGGTTCAGCCTGTCTGTGAT	57

Tab. 8-4: Zur PCR verwendete Primerpaare und deren Annealing-Temperaturen für die Exone 26 - 52 des *PKHDI*-Gens

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Pegiazoglou
Vorname: Ioannis
Geburtsdatum: 23.04.1980
Geburtsort: Thessaloniki/GR
Staatsangehörigkeit: Griechisch
Familienstand: ledig
Familie: Thomas und Anna Pegiazoglou,
Schwester Maria

Schulbildung

1986-1992 Grundschule 94 Thessaloniki
1992-1998 Gymnasium Deutsche Schule Thessaloniki
06/1998: Abschluss Allgemeine Hochschulreife,
Griechisches Apolytirion und Deutsches Abitur

Schulbegleitende Tätigkeiten

Teilnahme an Schüleraustauschprogrammen
09/1995 Thessaloniki/Griechenland – Kiel/Deutschland

Studium

10/1998-05/2005 Humanmedizin-Studium an der RWTH Aachen, Deutschland
09/2000: Ärztliche Vorprüfung
08/2001: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04/2004 - 08/2004	Pädiatrie am Universitätsklinikum Aachen
08/2004 - 11/2004	Chirurgie am Kantonsspital Winterthur /CH
11/2004 - 03/2005	Innere Medizin am Universitätsklinikum Aachen

Famulaturen

03/2001	Innere Medizin – Nephrologie, Universitätsklinikum Aachen
03/2001	Humangenetik, Universitätsklinikum Aachen
08/2002	Gynäkologie und Geburtshilfe, ärztliche Praxis Athen
02/2003	Pädiatrie, Universitätsklinikum Aachen
03/2001	Anästhesie, Luisenhospital Aachen

Studiumbegleitende Tätigkeiten

07/2001	Laborpraktikum „Molekulargenetische Diagnostik“, Universitätsklinikum Aachen
10/2002 - 03/2003	Chirurgischer Basic Skill-Course am Universitätsklinikum Aachen
04/2003 - 09/2003	Chirurgischer Advanced Skill-Course am Universitätsklinikum Aachen
05/2004	Teilnahme am „Teddybär-Krankenhaus“ Aachen
06/2004 - 07/2004	Sonographie Kurs am Universitätsklinikum Aachen
09/2004	Ultraschall-Fortbildungskurs „Sonographisch diagnostizierte fetale Nierenpathologie in der Schwangerschaft“
03/2005	Fortbildung Frauenheilkunde „Endometriose-zwischen „State of the Art“ und Grundlagenforschung“
04/2005	Fortbildung Frauenheilkunde „I. Aachen Update Gynäkologische Onkologie-Zervixkarzinom“

Beruflicher Werdegang

Seit 03/2006	Assistenzarzt in der Chirurgischen Universitäts-Kinderlinik und Poliklinik des Inselspitals Bern, Schweiz
--------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------

Bern, 01. September 2006