

**Identifizierung von *CHD1L*-Varianten bei Patienten mit angeborenen
Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Laura Magdalena Christ
aus Merzig/Saar

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter : Prof.Dr.med.Ruthild G.Weber
2. Gutachter: Prof.Dr.Dr.Peter Bartmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.04.2013

Aus dem Institut für Humangenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen

Für meine Familie und Markus

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Die physiologische Nierenentwicklung	9
1.2 Kongenitale Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege (CAKUT)	10
1.2.1 Kongenitale Anomalien der Niere	11
1.2.2 Kongenitale Anomalien des harnableitenden Systems	14
1.3 Theorien der Pathogenese	14
1.3.1 Obstruktionstheorie	14
1.3.2 Budding Hypothese	16
1.4 Molekulare Ursachen	18
1.4.1 Genetische Determination	18
1.4.2 Identifizierte Nierenentwicklungsgene	18
1.4.2.1 Das <i>hepatocyte nuclear factor 1β</i> Gen (<i>HNF1β</i>)	18
1.4.2.2 Das Angiotensin Typ 2 und Typ 1 Rezeptor Gen (<i>AGTR2</i> , <i>AGTR1</i>)	19
1.4.2.3 Die GDNF/ <i>gfra1</i> / c-ret-Achse	21
1.5 Die Struktur der menschlichen Chromosomen	24
1.5.1 ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Enzyme	25
1.6 <i>Chromodomain helicase DNA binding protein 1-like (CHD1L)</i>	26
1.6.1 CHD1L als Chromatin-Remodeling-Enzym	27
1.7 Ziel der Arbeit	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte	29
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Pufferlösungen und Verbrauchsmaterialien	30
2.1.3 Datenbanken und Software	31
2.2 Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv	31
2.3.2 Generierung der genomischen Struktur von <i>CHD1L</i>	33
2.3.3 Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	34
2.3.3.1 Entwerfen der Primerpaare	36
2.3.4 Gelelektrophorese mittels Agarosegel	39
2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte	40
2.3.6 Sequenzierung	41
2.3.7 Auswertung der Sequenzen	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Die genomische Struktur des <i>CHD1L</i> -Gens	44

3.2 Auswahl und Etablierung der entworfenen Primerpaare	46
3.2.1 Auswahl der Primerpaare	46
3.2.2 Etablierung der Amplifikations- und Sequenzier-PCR mit den entworfenen Primerpaaren an Kontroll-DNA	48
3.3 Molekulargenetische Sequenzanalyse des Patientenkollektivs	53
3.3.1 Die detektierten heterozygoten Missense-Varianten des <i>CHD1L</i> -Gens	53
3.3.2 Fallberichte der Patienten mit detektierter Missense-Variante im <i>CHD1L</i> -Gen und Familienuntersuchungen	60
3.3.3 Sequenzanalyse des <i>CHD1L</i> -Gens am erweiterten Patientenkollektiv	65
4 Diskussion	65
5 Zusammenfassung	79
6 Abbildungen und Tabellen	81
8 Literaturverzeichnis	83
Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BLAT	<i>BLAST-Like Alignment Tool</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMP₄	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
BOR-Syndrom	Brachiootorenales Syndrom
CAKUT	<i>Congenital anomalies of the kidneys and urinary tract</i> , Kongenitale Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege
CHD₁	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 1</i>
CHD₇	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 7</i>
CHD_{1L}	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 1 like protein</i>
c-terminal	Carboxy-terminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
Ex	Exon
Exo I	<i>Exonuklease I (ExoI)</i>
EYA₁	Humanes Homolog des <i>Drosophila eyes absent 1</i> Gen
F	<i>Forward</i> , vorwärts
G	Guanin
GDNF	<i>Glial cell line derived neurotrophic factor</i>
Gfrα 1-4	<i>Glial cell line derived neurotrophic factor receptor alpha</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Gly	Glycin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
Ile	Isoleucin
KG	Körpergewicht
MCKDKD	<i>Multicystic dysplastic kidney disease</i> , Multizystische Nierendysplasie
MCUG	Miktionszysturethrogramm
Met	Methionin
min	Minute
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
NAD⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nsSNP	Nicht synonymer <i>single nucleotide polymorphism</i>
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARP₁	Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1
PAX₂	<i>Paired domain homeobox gene 2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
R	<i>Reverse</i> , rückwärts
RCAD	<i>Renal cysts and diabetes syndrome</i>
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i> , aus Garnelen
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIX1	Humanes Homolog des <i>Drosophila sine oculis</i> Gens
SNF2	<i>Sucrose non fermenting 2</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotidpolymorphismus
nsSNP	Nicht synonymer Einzelnukleotidpolymorphismus
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
T_M	Schmelztemperatur
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UMC	<i>Undifferentiated mesenchymal cells</i> , undifferenzierte mesenchymale Zellen
Val	Valin
VUR	Vesikoureteraler Reflux
WNT11	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 11</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die Patienten des im Rahmen der Arbeit untersuchten Kollektivs weisen phänotypische Veränderungen auf, die mit der Bezeichnung Kongenitalen Anomalien der Nieren und der ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidneys and urinary tract*, CAKUT) zusammengefasst werden. Da die Pathogenese dieser Krankheitsbilder in Zusammenhang mit der physiologischen Nierenentwicklung zu sehen ist, wird diese zum besseren Verständnis zunächst dargestellt. Anschließend werden die CAKUT näher beleuchtet und pathogenetische Grundlagen, sowie bisher bekannte molekulare Pathomechanismen dargelegt. Folgend wird auf das hier untersuchte Gen *CHD1L* und dessen Bedeutung für die Entstehung der CAKUT eingegangen.

1.1 Die physiologische Nierenentwicklung

Das Anlagematerial der Niere aus dem intermediären Mesoderm, das dem mittleren Keimblatt zugehörig ist, lässt sich in drei Nierengenerationen gliedern, die gemäß ihrer Anordnung von kranial nach kaudal nacheinander entstehen. Entsprechend der kraniokaudalen Anlage verläuft die Entwicklung von der Vorniere (Pronephros) über die Urnieren (Mesonephros) zur Nachnieren (Metanephros). Die Vornieren existiert zwischen der dritten und fünften Woche und bleibt bei Menschen funktionslos. Die entstandenen Tubuli und Glomeruli sind nur rudimentär angelegt und bilden sich innerhalb von drei bis fünf Tagen wieder zurück. Von Bedeutung ist jedoch die Entstehung des Vornierenganges (Wolff-Gang) der nach kaudal auswächst und die Genese der Urnieren induziert. Der Wolff-Gang wird auch als Urnierengang bezeichnet. Er unterliegt keiner Involution, sondern differenziert sich weiter. Die Urnieren besteht von der vierten bis zur achten Woche und entwickelt insgesamt 80 funktionsfähige Nephrone, deren Entwicklung und Rückbildung ebenfalls dem kraniokaudalen Richtungsmuster folgt. Der Wolff-Gang findet Anschluss an die Urnierenkanälchen und die Kloake, aus der sich die Harnblase entwickelt. Ab der fünften Embryonalwoche sprosst die Ureterknospe kranial der Einmündung in die Kloake aus dem Wolff-Gang aus. Dies geschieht unter Induktion des metanephrogenen Mesoderms der Sakralsegmente, dessen Entwicklung wiederum durch die sich kranial vorschiebende Ureterknospe induziert wird [Ichikawa *et al.*, 2002]. Die ausgesprossene Ureterknospe und das entstandene metanephrogene Blastem stellen die beiden Komponenten dar, aus denen sich

die definitive Niere, die Nachniere, entwickelt. Ab der sechsten Woche beginnt die gegenseitige Induktion dieser beiden Komponenten. Während sich der Ureter aus dem Stiel der Ureterknospe entwickelt, entstehen durch mehrere aufeinander folgende dichotome Teilungen aus dem Bläschen der Ureterknospe unter Einfluss des kappenartig aufliegenden metanephrogenen Blastems das Nierenbecken, die Nierenkelche und das Sammelrohrsystem. Unter dem Einfluss der Sammelrohre wandelt sich das metanephrogene Gewebe zu Bläschen und Schleifen, aus denen das Tubulussystem und die Glomeruli der Niere entstehen. Damit ein einheitliches Gangsystem vorliegt, verschmelzen die blinden Enden der Tubuli, die aus dem metanephrogenen Blastem entstanden sind, mit den aus der Ureterknospe hervorgegangenen Sammelrohren. Über das nun vorliegende harnableitende System werden schon intrauterin kleinere Mengen an Harn abgegeben, um eine Austrocknung der Amnionhöhle (d.h. ein Oligohydramnion oder Anhydramnion) und deren Folgen, wie zum Beispiel eine Lungenhypoplasie des Feten (Pottersequenz) oder andere konsekutive Fehlbildungen, zu verhindern. Die eigentliche Harnbildung beginnt allerdings erst nach der Geburt.

Durch Wachstum des Feten kommt es zu einem Aszensus der Niere. Hierbei wandert die Niere von ihrer Position in Höhe der Sakralsegmente eins bis drei auf ihre definitive Lage im Bereich des Thorakalsegments 12 bis zum Lumbalsegment 4 [Rohen und Lütjen-Drecoll, 2006; Ulfing, 2005].

1.2 Kongenitale Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege (CAKUT)

Unter dem Begriff der kongenitalen Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidneys and urinary tract*, CAKUT) wird ein breites Spektrum anatomisch sowie klinisch unterschiedlicher Malformationen der Niere, des ableitenden Harnsystems, der Blase und der Urethra zusammengefasst, welche sich häufig kombiniert manifestieren [Atiyeh *et al.*, 1992; Najmaldin *et al.*, 1990; Ring *et al.*, 1993; Risdon *et al.*, 1993]. CAKUT machen ein Drittel der pränatal im Ultraschall detektierte Anomalien aus [Noia *et al.*, 1996], wobei sie insgesamt bei einer von 500 Lebendgeburten diagnostiziert werden [Danemann *et al.*, 1991; Nakanishi *et al.*, 2003]. Bei Säuglingen und Kleinkindern stellen CAKUT die häufigste Ursache chronischer Niereninsuffizienz dar [Limwongse *et al.*, 1999]. Hierbei überwiegen die männlichen Patienten bei den meisten CAKUT-Entitäten [Avni *et al.*, 1992;

Coret *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1977; Najmaldin *et al.*, 1990; Ring *et al.*, 1993; Risdon *et al.*, 1993]. CAKUT-Patienten haben ein erhöhtes Risiko, im Laufe ihres Lebens an Hypertonie und anderen Störungen des kardiovaskulären Systems zu erkranken [Song und Yosypiv, 2010]. In 10-15 % der Fälle liegen zusätzlich Fehlbildungen anderer Organsysteme vor. CAKUT wurden im Zusammenhang mit über 250 Syndromen beschrieben und treten bei einem Drittel der Patienten mit Chromosomenaberrationen auf [Limwongse und Cassidy, 2003]. Die meisten CAKUT-Fälle treten jedoch isoliert auf und sind sporadisch, wobei für einige CAKUT-Entitäten eine familiäre Häufung beschrieben wurde [Song und Yosypiv, 2010].

Die klinischen Manifestationen reichen von asymptomatischen Verläufen bis hin zur schweren Niereninsuffizienz. Vorstellig werden die Patienten überwiegend mit fieberhaften Harnwegsinfekten, auffälligem Miktionsverhalten, abdominellen Beschwerden, Ödemen und Hypertonie. Zum Teil kommt es zur Kompensation durch die gesunde, kontralaterale Niere, sodass sich die Diagnose nur zufällig, zum Beispiel im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen, stellen lässt. Zur Diagnosestellung der CAKUT wird vor allem die Sonographie eingesetzt. Wird die Diagnose gestellt, müssen die Patienten langfristig betreut werden [Limwongse *et al.*, 1999]. Weiterführende Untersuchungen zur Abklärung des vollständigen Krankheitsbildes sollten durchgeführt werden. Die Überwachung der Nierenfunktion ermöglicht ein frühzeitiges therapeutisches Eingreifen, gegebenenfalls die Durchführung von Nierenersatzverfahren oder einer Nierentransplantation. Manche geringgradige Anomalien können mit konventionellen radiologischen und klinischen Methoden nicht detektiert werden und entgehen der Diagnosestellung. Dadurch ist die Prävalenz der CAKUT vermutlich höher einzustufen als es die Anzahl der detektierten Fälle erscheinen lässt [Pope *et al.*, 1999]. Wegen unvollständiger Penetranz und variabler Expressivität, die beide bei CAKUT beobachtet werden [Limwongse *et al.*, 1999, Squiers *et al.*, 1987], ist auch der Anteil erblich bedingter CAKUT wahrscheinlich höher, als es die erhobenen Zahlen vermuten lassen.

1.2.1 Kongenitale Anomalien der Niere

Bei der **Nierenagenesie** (Nierenaplasie) handelt es sich um das vollständige ein- oder beidseitige Fehlen der Niere mit Nierenarterie Ureter aufgrund fehlender Entwicklung oder frühzeitiger Degeneration der Ureterknospe. Durch diese Fehlentwicklung bleibt die

Interaktion zwischen der Ureterknospe und dem metanephrogenen Blastem aus [Song und Yosypiv, 2010] und, es entsteht keine Nachniere [Limwongse et al., 1999]. Eine Kompensation durch die kontralaterale Niere führt dazu, dass eine einseitige Nierenagenesie normalerweise asymptomatisch bleibt. Einige Studien zeigten, dass eine unilaterale Nierenagenesie häufig mit Anomalien der kontralateralen Niere einhergeht [Robson *et al.*, 1995 und Roodhofs *et al.*, 1984]. Ferner finden sich häufig Anomalien anderer Organsysteme, vor allem der Genitalorgane. Das Fehlen beider Nieren führt zum Oligohydramnion, sowie zu Spätaborten oder Todgeburten [Limwongse *et al.*, 1999]. Das empirische Risiko einer nichtsyndromalen Nierenagenesie liegt bei 3 %, wenn bei Verwandten ersten Grades eine Nierenanomalie ausgeschlossen werden kann [Van Allen, 1993]. Liegt eine Nierenagenesie ohne syndromalen Zusammenhang in der Familie vor, haben Verwandte ersten Grades ein höheres Risiko mit einer Malformation der Niere geboren zu werden bzw. worden zu sein. Daher sollte eine sonographische Abklärung der Verwandten ersten Grades bei Diagnose einer Nierenagenesie erfolgen [Robson *et al.*, 1995].

Die **Nierenhypoplasie** wird ebenfalls zu den CAKUT gezählt und bezeichnet eine verringerte Anzahl an normal differenzierten Nephronen. Die hypoplastische Niere ist kleiner und weist ein verringertes Gewicht auf. Zugrunde liegt eine abberante Interaktion zwischen Ureterknospe und metanephrogenem Gewebe, z.B. dadurch dass eine ektope Ureterknospe auf undifferenzierte mesenchymale Zellen trifft, wodurch eine optimale Interaktion und Differenzierung ausbleibt. Da die Nierenfunktion in der Regel erhalten bleibt, wird sie häufig als Zufallsbefund diagnostiziert. Ein beidseitiges Auftreten kann jedoch zur Niereninsuffizienz führen.

Bei der **Nierendysplasie** liegen eine verminderte Reifung und Differenzierung des Nierenparenchyms, sowie ein verringerter Aufbau der kortikomedullären Struktur vor. Die Funktionsfähigkeit einer dysplastischen Niere ist abhängig vom Anteil des normal differenzierten Parenchyms. Unter den Nierenpathologien tritt die Dysplasie am häufigsten auf [Woolf *et al.*, 2004]. Vielfach liegt eine Dysplasie in Kombination mit einer Nierenhypoplasie vor. Die **Nierenhypodysplasie** ist in einem Drittel der Fälle die Ursache des kindlichen Nierenversagens [Wingen *et al.*, 1999; Wühl *et al.*, 2004].

Darüber hinaus geht die Dysplasie häufig mit der Bildung von **Nierenzysten** einher. Ursächlich für die Zystenentstehung ist das Ausbleiben der Verschmelzung der aus dem metanephrogenen Blastem entstandenen Nephrone und der Sammelrohre, die sich aus der Ureterknospe entwickelt haben. Dadurch bleibt die Entwicklung eines durchgehenden Gangsystems aus und ein Abtransport des Harns nach Einsetzen der Ultrafiltration ist nicht möglich. In der Folge kommt es zur Aufblähung der Nephrone, wobei sich die Tubuli zu zentimetergroßen dünnwandigen Blasen erweitern können, die als Nierenzysten bezeichnet werden. Die Niere wird in ihrer Struktur und Funktion gestört, so dass es, abhängig vom Anteil des funktionsfähigen Restparenchyms, zu unterschiedlichen Einschränkungen, bis hin zur vollständigen Niereninsuffizienz kommen kann. Die **multizystische Nierendysplasie** (*multicystic dysplastic kidney disease, MCDKD*) ist die schwerste Form der dysplastischen CAKUT und ist mit einer Obstruktion des harnableitenden Systems kombiniert [Pope *et al.*, 1999]. Die multiplen großen Zysten verdrängen das wenige stark dysplastische Parenchym. Damit ist die betroffene Niere nicht funktionell. Ein bilaterales Auftreten führt folglich zu einem Oligohydramnion.

Die **Nierenektomie (Nierendystopie)** bezeichnet eine Lageanomalie der Niere, bedingt durch einen unvollständigen Aszensus der Niere während der Embryonalentwicklung. Ektome Nieren bleiben meist asymptomatisch, allerdings kann es durch Obstruktion des Ureters beim Auftreten von Infektionen und Nierensteinen zu Komplikationen kommen. Die **Hufeisenniere** ist die häufigste Form einer Verschmelzungsanomalie, bei der die beiden unteren Pole der Niere über eine Gewebebrücke verbunden sind. Die meisten Hufeisennieren liegen in ektoper Beckenlage oder dem Lumbalbereich [Limwongse *et al.*, 1999] und sind mit anderen urogenitalen Anomalien assoziiert [Hohenfellner *et al.*, 1992].

Die **Doppelnieren (Ren Duplex)** stellt eine Dopplungsfehlbildung dar und ist durch eine Duplikation der Ureterknospe zu einem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung bedingt. Es liegen zwei Nierenbecken vor, wobei die doppelt vorliegenden Ureteren entweder vollständig getrennt sind (Ureter duplex) oder sich vor Eintritt in die Harnblase vereinigen (Ureter fissus). Die Ren Duplex tritt häufig auf und bleibt ohne gleichzeitige Ureterpathologie meist symptomlos. Das Auftreten einer unilateralen Duplikationsanomalie ist fünf- bis sechsmal häufiger als das einer bilateralen Verdopplung [Van Allen *et al.*, 1993].

1.2.2 Kongenitale Anomalien des harnableitenden Systems

Verschiedene Anomalien des Ureters, der Urethra und der Blase werden ebenfalls unter dem Begriff CAKUT subsumiert. Beim **Ureter fissus** findet sich meist ein subklinischer Verlauf. Aufgrund von Pendelurin zwischen den beiden Ureteren kann es jedoch, genau wie beim **Ureter duplex**, zu Harnableitungsstörungen mit **vesikoureteralem Reflux (VUR)** und einer **Hydronephrose** kommen. Die Hydronephrose ist eine irreversible sackartige Ausweitung der Nephrone mit Zerstörung des Parenchyms und stellt die häufigste Ursache einer Vergrößerung des Nierenvolumens bei Neugeborenen dar [Brown *et al.*, 1987]. Der vesikoureterale Reflux bezeichnet den retrograden Harnfluss von der Blase in den Ureter bis hin zum Nierenbecken und führt zu rezidivierenden Harnwegsinfekten und Parenchymschäden.

Eine subpelvine, oft aperistaltische Verengung des Ureters wird als **Ureterabgangsstenose** bezeichnet und bleibt meist asymptomatisch. In der Sonographie sind ein erweitertes Nierenbecken und erweiterte Nierenkelche zu erkennen. Hier kann es, ebenso wie bei einer **Uretermündungsstenose** am Eintritt des Ureters in die Blase, zur Entwicklung einer Hydronephrose kommen. Aufgrund der Obstruktion kommt es proximal der Stenose zu einer Dilatation des Ureters. Bei Überschreiten des Grenzwertes von 6mm wird der dilatierte Ureter als **Megaureter** bezeichnet.

Infravesikuläre Stenosen (Urethralklappen) männlicher Neugeborener haben eine bilaterale Hydronephrose zur Folge und sind neben einer Ektopie der Uretermündung prädisponierend für die Entstehung eines vesikoureteralen Refluxes.

Stenosen sind oft mit Nierendysplasien assoziiert, was sowohl auf eine genetische Störung als auch auf eine druckbedingte Parenchymschädigung zurückzuführen ist.

1.3 Theorien der Pathogenese

Zur Erklärung der Pathogenese der unterschiedlichen CAKUT-Entitäten existiert eine Vielzahl an Theorien [Kuwayama *et al.*, 2002]. Im Folgenden sollen zwei wichtige Erklärungsansätze und ihre Gültigkeit im Hinblick auf neuere molekulargenetische Ergebnisse dargestellt werden.

1.3.1 Obstruktionstheorie

In der Obstruktionstheorie wird die physikalische Überbelastung der fetalen Niere und des Ureters aufgrund einer Harnabfluss- oder Blasenfunktionsstörung, oder auch einer dysfunktionalen Uretermündung als Ursache für Malformationen der Niere postuliert [Kuwayama *et al.*, 2002]. Bei experimentell erzeugten Ureterobstruktionen in fetalen Schafen zeigten sich ein verringertes renales Wachstum, sowie zystische und dysplastische Parenchymschäden [Peters *et al.*, 1992]. Diese und ähnliche Beobachtungen führten zu der Annahme, dass eine Obstruktion des Ureters das auslösende Ereignis für die Entstehung einer Nierendysplasie darstellt [Pope *et al.*, 1999]. Hierbei wird diskutiert, ob es sich um eine intrinsische oder extrinsische Ureterobstruktion handelt. Ruano-Gil und Tejedo-Mateu (1975) beschrieben einen 5-Wochen-alten Embryo mit Ureterohydronephrose aufgrund eines internen epithelialen Verschlusses in der Kloake. Der extrinsische Ansatz postuliert eine Obstruktion des Ureters durch komprimierende Gefäße des fetalen Arterienbaums, die zu einer gestörten Peristaltik führt. Dadurch kommt es zu einer Störung des muskulären Aufbaus der Ureterwand [Allen, 1970]. Barnett und Stephens hatten bereits 1962 beschrieben, dass angrenzende Gefäße eine partielle Ureterobstruktion verursachen können.

Jedoch liefert die Obstruktionstheorie keine hinreichende pathogenetische Erklärung, da keine Korrelation zwischen dem Grad der Obstruktion und dem Schweregrad der parenchymalen Anomalie nachgewiesen werden konnte [Stephens *et al.*, 1996] und trotz fehlender Obstruktion bei Manipulation des metanephrogenen Gewebes Parenchymschäden auftreten können [Maizels *et al.*, 1983]. Allerdings konnte in aktuellen Studien die Bedeutung einer Obstruktion in Mausmodellen für Störungen von Nierenwachstum und –differenzierung hervorgehoben werden. Hierbei zeigte sich, dass bei unilateraler Ureterobstruktion durch eine Erweiterung tubulärer Strukturen, einer veränderten Sekretion renaler Wachstumsfaktoren, sowie durch eine Infiltration von Makrophagen eine Apoptose und damit der Untergang von Nephronen und die fibröse Umwandlung des Parenchyms generiert wird [Chevalier, 2004]. Damit können obstruktiven Veränderungen sekundäre progressive Schädigungen des Nierengewebes zugeschrieben werden [Weber, 2010].

1.3.2 Budding Hypothese

Durch die Untersuchung von Gewebeproben menschlicher Embryonen und Neugeborener wurde eine Korrelation zwischen renalen Differenzierungsstörungen und dem Ort der Uretermündung in die Blase, hierbei insbesondere dem Grad der Abweichung vom normalen Mündungsort, gefunden [Mackie und Stephens, 1975; Wickramasinghe *et al.*, 1977]. Mackie und Stephens formulierten auf der Basis dieser Ergebnisse die „*bud theory*“ (Budding-Hypothese) für Anomalien der Nieren und des harnableitenden Systems [Mackie und Stephens, 1975]. Die Budding Hypothese stützt sich auf die beobachtete Korrelation zwischen dem Grad einer Nierenhypoplasie oder -dysplasie zum Einen und den Anomalien des Ureters zum Anderen. Hierbei wird die ektope Ureteraussprossung aus dem Wolff-Gang in der frühen Nephrogenese als alleiniges Schlüsselereignis für die Entstehung von Anomalien des Nierenparenchyms und des Ureters postuliert. Die Ureterknospe findet durch Wachstum des distalen Wolff-Ganges Anschluss an die Blase. Je nach Lage der ektope Ureterknospe kommt es zu unterschiedlichen Anomalien. Findet eine zu weit kaudal gelegene Aussprossung statt, resultiert daraus eine laterale Dislokation der vesikoureteralen Mündung mit Elongation des Trigonum vesicae (Abbildung 1. Ektope Ureteraussprossung bei A) und Verkürzung des submukösen Blasentunnels. Durch den ausfallenden Ventilmechanismus kommt es zum Urinrückstrom in den Ureter (VUR) und zu einer möglichen Erweiterung des Ureters zum Megaureter. Eine kraniale Ureterknospe (Abbildung 1. Ektope Ureteraussprossung bei C) generiert bei kaudal gelegener Uretermündung obstruktive Anomalien. Außerdem trifft eine ektop angelegte Ureterknospe auf nur schwach differenziertes und spärlich vorhandenes metanephrogenes Gewebe, wodurch die optimale gegenseitige Induktion zur Differenzierung beider Strukturen ausbleibt und sich beispielsweise eine Nierendysplasie entwickelt [Pope *et al.*, 1999].

Im Gegensatz zur Obstruktionstheorie, die Anomalien des Nierenparenchyms als Folge einer Belastung der fetalen Nieren durch eine Ureterobstruktion sieht, postulieren Mackie und Stephens in der Budding-Hypothese eine fehlerhafte Ontogenese als Ursache für Anomalien der Nieren und des harnableitenden Systems. Eine genetische Determination der Schäden würde erklären, warum bei vielen Patienten mit vorliegender Obstruktion trotz früher chirurgischer Intervention ein Fortschreiten des Nierenschadens nicht zu verhindern ist [Piscione und Rosenblum, 2002].

Die ektope Ureterknospung und eine fehlerhafte Interaktion des metanephrogenen Blastems mit der Ureterknospe konnten durch einige neuere Mausmodelle als Schlüsselereignisse bei der CAKUT-Entstehung bestätigt werden [Song und Yossip, 2011]. Damit liefert die Budding-Hypothese eine wichtige Grundlage zum Verständnis der CAKUT-Pathogenese und besitzt im Hinblick auf aktuelle Diskussionen und molekulargenetische Ergebnisse weiterhin Gültigkeit.

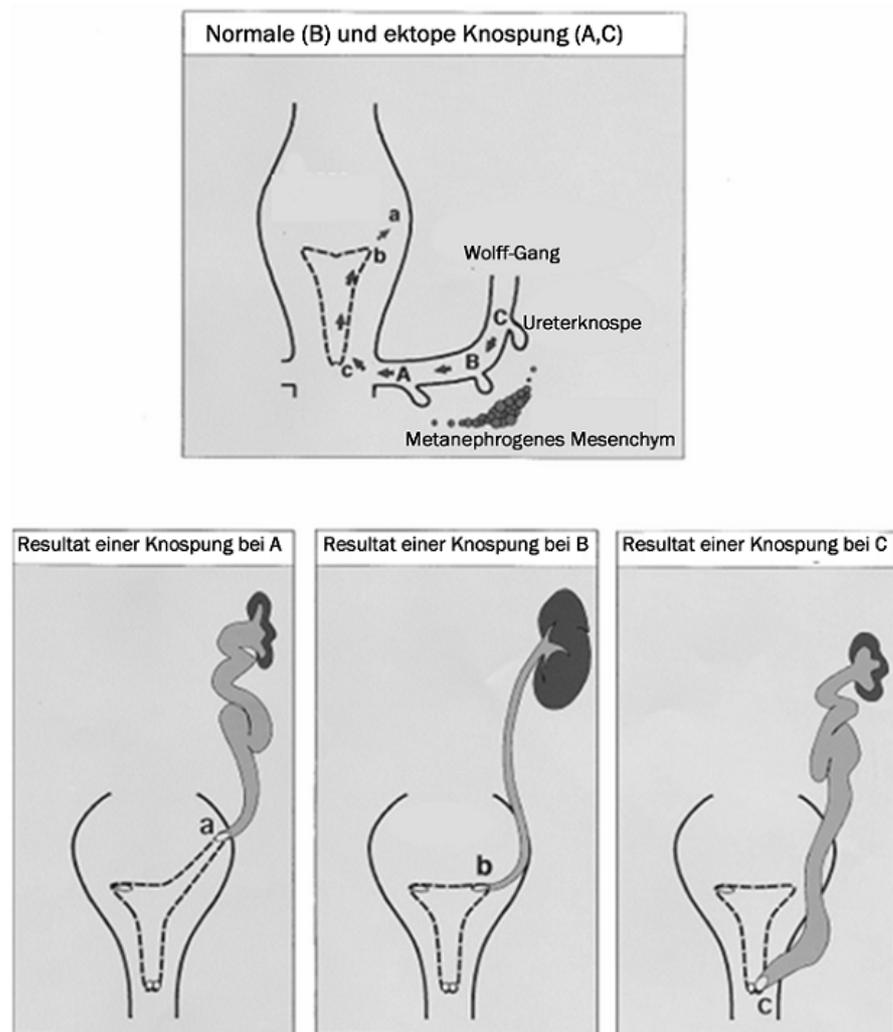


Abb. 1 Die Budding-Hypothese

Die Mündung des Ureters in die Blase ist bei regelhafter Aussprossung (B) im Trigonum vesicae der Blase zu finden. Bei ektope Aussprossung der Ureterknospe (A, C) resultiert eine ektope Uretermündung. Bei zu weit kaudaler Knospung (A) mündet der Ureter zu weit lateral und kranial, so dass das Trigonum vesicae elongiert wird und der submuköse Blasentunnel verkürzt wird. Eine zu weit kranial aussprossende Ureterknospe (C) resultiert in einer kaudal gelegenen vesikoureteralen Mündung. Bei ektope Aussprossung trifft die Ureterknospe auf nur schwach differenziertes metanephrogenes Mesenchym. (modifiziert nach Ichikawa et al., 2002)

1.4 Molekulare Ursachen

1.4.1 Genetische Determination

Das gleichzeitige Vorliegen mehrerer CAKUT-Anomalien bei einem Patienten [Atiyeh *et al.*, 1992; Najmaldin *et al.*, 1990; Ring *et al.*, 1993; Risdon *et al.*, 1993], sowie das familiäre Auftreten auch nicht-syndromaler CAKUT-Formen in 10 % der Fälle, mit zum Teil Mendelschen Erbgängen [Weber *et al.*, 2006], spricht für eine genetische Determination der Malformationen. In betroffenen Familien wurden inkomplette Penetranz [Squiers *et al.*, 1987] und variable Expressivität [Limwongse *et al.*, 1999] beobachtet. Außerdem spricht die Tatsache der häufigen Progression der Niereninsuffizienz trotz Behebung der Obstruktion für die genetische Vorprogrammierung der CAKUT [Pope *et al.*, 1999]. Hierbei kann ein monogenes, aber auch ein komplexes, multifaktorielles Vererbungsmuster zu Grunde liegen [Pope *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 2006].

1.4.2 Identifizierte Nierenentwicklungsgene

Bisher gelang es kaum die molekulare Genese der CAKUT zu entschlüsseln. In den letzten Jahren konnten jedoch Fortschritte in der Identifizierung verantwortlicher Gene gemacht werden. Obwohl Malformationen der Nieren im Verlauf der gesamten Nephrogenese entstehen können [Kuwayama *et al.*, 2002], lieferten vor allem Untersuchungen der frühen Nierenentwicklung aufschlussreiche Ergebnisse. Die Ursache dafür ist, dass spätere Schritte aufgrund vorangegangener Störungen gar nicht mehr oder nicht regulär ablaufen und somit nicht analysiert werden können [Piscione und Rosenblum, 2002]. Eine Auswahl der wichtigsten detektierten Gene, die als Nierenentwicklungsgene bezeichnet werden und für Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, sowie intrazelluläre Signalmoleküle kodieren [Constantini 2006; Dressler, 2009; Mendelsohn, 2009; Reidy und Rosenblum, 2009], sowie ihre Bedeutung in der Nephrogenese und der CAKUT-Entstehung sollen folgend dargestellt werden.

1.4.2.1 Das *hepatocyte nuclear factor 1 β* Gen (*HNF1 β*)

Das *hepatocyte nuclear factor 1 β* Gen (*HNF1 β*) kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der an der Morphogenese verschiedener Organe, zu denen auch die Niere gehört, beteiligt ist. Das humane *renal cysts and diabetes syndrome* (RCAD), das durch einen juvenilen Diabetes und

Nierenanomalien, vor allem durch zystische Malformationen, charakterisiert ist, steht im Zusammenhang mit Mutationen des *HNF1 β* -Gens [Bingham *et al.*, 2001]. In einer Studie fand sich eine Mutationsrate von 33 % im *HNF1 β* -Gen bei Kindern mit nicht-syndromalen zystischen Nierenhypoplasien oder -dysplasien, wobei 53 % der identifizierten Genveränderungen *de novo* auftraten [Ulinski *et al.*, 2006].

1.4.2.2 Das Angiotensin Typ 2 und Typ 1 Rezeptor Gen (*AGTR2*, *AGTR1*)

Das Fehlen geeigneter Tiermodelle war lange Zeit ein limitierender Faktor im Verständnis der Pathogenese der CAKUT. Durch die Entwicklung von Mausstämmen, die eine selektive Nullmutation des Angiotensin Typ 2 (AT₂) Rezeptor Gens (*Agtr2*) aufweisen, konnte ein Erfolg in der Entschlüsselung der molekularen Ursachen gemacht werden.

AGTR2 spielt als X-chromosomal vererbtes Gen in der Differenzierung der entstehenden Nieren eine wichtige Rolle. Eine Aktivierung des AT₂-Rezeptors führt zur Apoptose der umgebenden undifferenzierten mesenchymalen Zellen (*undifferentiated mesenchymal cells*, UMC) [Pope *et al.*, 1999]. Die UMC sind Zellen, die nicht an der Entstehung der Niere oder des Ureters beteiligt sind [Kakuchi *et al.*, 1995; Schutz *et al.*, 1996], sondern diese Strukturen umhüllen und eine hohe AT₂-Rezeptor-Expression besitzen [Pope *et al.*, 1999]. Am Ort der regelhaften Aussprossung der Ureterknospe findet sich allerdings keine *AGTR2* Expression [Oshima *et al.*, 2001]. Durch das erkennbare Verteilungsmuster kann die *AGTR2* Expression als ursächlich für die Verhinderung einer ektopten Ureteraussprossung gesehen werden [Stahl *et al.*, 2006]. Beim Vorliegen einer pathogenen *AGTR2*-Mutation bleibt die Apoptose der UMC aus, die essentielle Interaktion zwischen Ureterknospe und metanephrogenem Blastem kann nicht erfolgen, und das Wachstum und die Differenzierung beider Systeme werden gestört. Es kommt zu einer ektopten Aussprossung der Ureterknospe und zu konsekutiven Fehlbildungen der Niere und des Ureters. Innerhalb des Nierenparenchyms selbst bilden die UMC Septae aus, die bei nicht erfolgter Apoptose zu einer Dysplasie der Niere führen [Pope *et al.*, 1999]. Bei den Phänotypen generierter *Knockout*-Mäuse zeigten sich nahezu alle charakteristischen Hauptmerkmale der humanen CAKUT [Ichiki *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1999]. Neben dem weiten pathologischen Spektrum ließ sich auch die typische asymmetrische Verteilung und das Überwiegen männlicher Betroffener beobachten [Pope *et al.*, 1999]. Außerdem ist ein

Austausch von Adenin zu Guanin an Position 1332 (A1332G) signifikant mit der CAKUT-Entstehung assoziiert [Yerkes *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 1999].

Daneben scheint *AGTR2* andere regulatorische Funktionen in der Nierenentwicklung zu übernehmen, da die Expression während der gesamten Embryogenese bestehen bleibt [Stahl *et al.*, 2006].

Es ist jedoch davon auszugehen, dass eine Reihe weiterer Gene, die in proliferative und apoptotische Vorgänge involviert sind, am Untergang der UMC sowie an anderen CAKUT verursachenden Ereignissen beteiligt sind [Pope *et al.*, 1999]. Das Angiotensin Typ 1 (AT₁) Rezeptor Gen (*AGTR1*) ist nicht direkt mit der Entstehung der Ureterknospe assoziiert, sondern gewinnt erst perinatal an Bedeutung. Bei einer Mutation des Gens im Mausmodell findet man eine abnorme Entwicklung des Nierenbeckens und eine Verringerung der den Ureter umgebenden glatten Muskulatur [Miyazaki *et al.*, 1998], sowie eine fehlende Peristaltik [Niimura *et al.*, 2006]. Die renale tubuläre Dysgenese, eine in der Mehrzahl der Fälle aufgrund des entstehenden Oligohydramnions letal endende Anlagestörung der Nierentubuli, kann unter anderem durch eine homozygote Mutation des *AGTR1* Gens verursacht werden [Gribouval *et al.*, 2005]

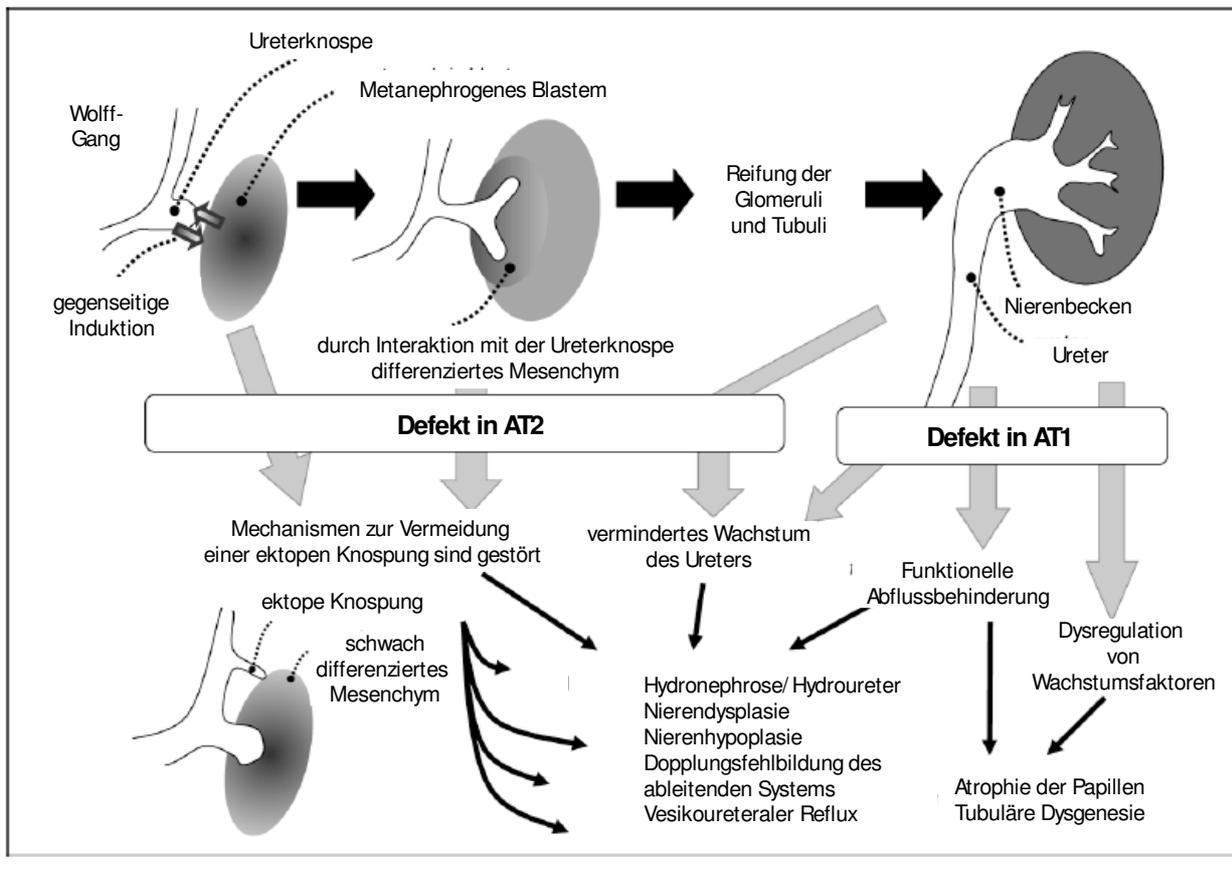


Abb. 2 Einfluss einer fehlerhaften Angiotensin-Rezeptor-Funktion auf die CAKUT-Entstehung

Eine pathogene *AGTR2*-Mutation kann zu einer ektopten Aussprossung der Ureterknospe führen, welche dann auf nur schwach differenziertes Mesenchym trifft. Die gegenseitige Induktion zu Wachstum und Differenzierung zwischen Ureterknospe und metanephrogenem Blastem bleibt aus. Bei einer Mutation des *AGTR1*-Gens kann es perinatal zu funktionellen Abflussbehinderungen kommen. *AGTR2*- und *AGTR1*- Mutationen können damit Fehlbildungen der Nieren und der ableitenden Harnwege verursachen. Daneben kann eine homozygote *AGTR1*-Mutation ursächlich für eine tubuläre Dysgenese sein. (modifiziert nach Niimura et al., 2006)

1.4.2.3 Die GDNF/ *gfr α 1*/ c-ret-Achse

Die Aussprossung der Ureterknospe und nachfolgende Schritte der Nierenentwicklung werden durch die Interaktion mit dem metanephrogenen Blastem über verschiedene Signalmoleküle vermittelt. Hierbei spielt der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) eine zentrale Rolle. Dieser Wachstumsfaktor, der zur TGF β - (*transforming growth factor*, transformierender Wachstumsfaktor) Familie gehört [Lin et al. 1993], wird im metanephrogenen Blastem exprimiert. Er vermittelt seine Signale als Dimer über den Transmembranrezeptor c-ret, der

Tyrosinkinaseaktivität besitzt und dem *glycosyl-phosphatidylinositol-anchored co receptor* (Gfra 1-4, speziell Gfra 1) [Batourina *et al.*, 2001; Eng *et al.*, 1998; Sainio *et al.*, 1997; Takahashi M, 2001; Tang *et al.*, 2002]. Durch die Aktivierung der c-ret-Tyrosinkinase über Gfra 1, das am Ort der Entstehung der Ureterknospe exprimiert wird, wird die Aussprossung am Urnierengang [Chi *et al.*, 2009; Schuchardt *et al.*, 1996] und die weitere Differenzierung der Ureterknospe induziert [Stahl *et al.*, 2006]. Eine Nullmutation des *GDNF*-, *c-ret*- oder *Gfra 1*-Gens kann aufgrund einer fehlerhaften Ureterknospung oder fehlerhaften Interaktion mit dem metanephrogenen Blastem zu Nierenagenesie, Nierenhypodysplasie und blind endenden Ureteren führen [Sainio *et al.*, 1997; Schuchardt *et al.*, 1996; Takahashi M, 2001]. Eine heterozygote Mutation verursachte in Mausmodellen eine Nierenhypoplasie [Cullen-McEwen *et al.* 2001]. Eine Reihe anderer identifizierter Gene der CAKUT-Pathogenese beeinflussen diese Achse direkt oder indirekt und führen so bei Mutation ebenfalls zu Malformationen der Nieren und des harnableitenden Systems. Im Folgenden werden nur einige dieser Gene exemplarisch vorgestellt.

Der Inhibitor *bone morphogenetic protein 4* (BMP₄), der wie GDNF zu den Wachstumsfaktoren der TGFβ-Familie gehört [Kuwayama *et al.*, 2002], spielt in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle [Hogan, 1996]. BMP₄ vermittelt seinen Einfluss auf die Entwicklungsvorgänge durch die Regulation von Zellproliferation, Apoptose, Chemotaxis und Determinierung der Keimzellentwicklung [Bush *et al.*, 2004; Miyazaki *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2003]. BMP₄ *-/- knockout*-Mäuse versterben zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Embryogenese [Lawson *et al.*, 1999]. Die Untersuchung von heterozygoten BMP₄ *+/-* Mäusen zeigte eine Reihe von Anomalien die humanen CAKUT-Phänotypen entsprechen [Miyazaki *et al.*, 2000], darunter, als Konsequenz einer ektope Aussprossung der Ureterknospe vom Wolff-Gang, eine ektope Mündung des Ureters in die Blase [Kuwayama *et al.*, 2002]. Die betroffenen Tiere waren meist männlich und es überwog ein rechtsseitiger unilateraler CAKUT [Miyazaki *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2003]. BMP₄ wird im den Wolff-Gang umgebenden metanephrogenen Gewebe exprimiert, nicht jedoch am Ort der späteren Aussprossung der Ureterknospe. Der Wachstumsfaktor inhibiert wingless type MMTV integration site family, member 11 (WNT₁₁), ein Zielmolekül der GDNF/ Gfra1/ c-ret-Achse, und verhindert so ektope Ureteraussprossungen entlang des Wolff-Ganges [Stahl *et al.*, 2006]. Nachdem die Aussprossung der

Ureterknospe abgeschlossen ist, fördert BMP₄ das weitere Wachstum des Ureters [Kuwayama *et al.*, 2002], wobei die weitere Differenzierung durch ein Fehlen der Expression an Orten des regelhaften Wachstums der Ureterknospe reguliert wird [Miyazaki *et al.*, 2000; Raatikainen-Ahokas *et al.*, 2000]. Daneben verhindert BMP₄ die Apoptose des metanephrogenen Mesenchyms [Kuwayama *et al.*, 2002].

Eine direkt verstärkende Wirkung hat dagegen der Transkriptionsfaktor *paired domain homeobox 2* (Pax2) [Brophy *et al.*, 2001]. Bei homozygoten *knockout*-Mäusen fehlt die *GDNF*-Expression, woraus durch fehlende Ureterknospung und darauf folgender Apoptose des metanephrogenen Blastems, eine Nierenagenesie resultiert. Humane Mutationen des *PAX2*-Gens verursachen das autosomal-dominant vererbte Reno-Kolobom-Syndrom [Sanyanusin *et al.*, 1995; Favor *et al.*, 1996], welches durch gleichzeitiges Vorliegen von Nierenanomalien und Kolobomen des *Nervus opticus*, begleitet durch eine Hörminderung charakterisiert ist. Die Proteinprodukte des *SIX1* (humanes Homolog des *Drosophila sine oculis*) –Gens, sowie des *EYA1* (humanes Homolog des *drosophila eyes absent 1*) -Gens haben ebenfalls einen aktivierenden Einfluss auf die *GDNF*-Expression. Da *EYA1* an der Entwicklung verschiedener Organe beteiligt ist, führen heterozygote Mutationen im *EYA1*-Gen beim Menschen neben Nierenanomalien auch zu Auffälligkeiten des Mund- und Halsbereichs, sowie der Ohren und liegen damit dem autosomal-dominant vererbten brachiootorenen Syndrom (BOR-Syndrom) zu Grunde [Abdelhak *et al.*, 1997]. Auch heterozygote Mutationen des *SIX1*-Gens können das BOR-Syndrom verursachen [Kochhar *et al.*, 2008]. Homozygote *Six1* und *Eya1 knockout*-Mäuse wiesen genau wie die Mäuse mit *Pax2*-Nullmutation eine Nierenagenesie auf. Bemerkenswert ist jedoch, dass die syndromal-assoziierten Mutationen in den Genen für *EYA1*, *SIX1* und *PAX2* bei der Untersuchung europäischer Kinder nur in 5-10 % der nicht-syndromalen CAKUT-Fälle identifiziert werden konnten [Weber *et al.*, 2006]. In Abbildung 3 ist das Zusammenspiel der beschriebenen Faktoren bei der Aussprossung der Ureterknospe dargestellt.

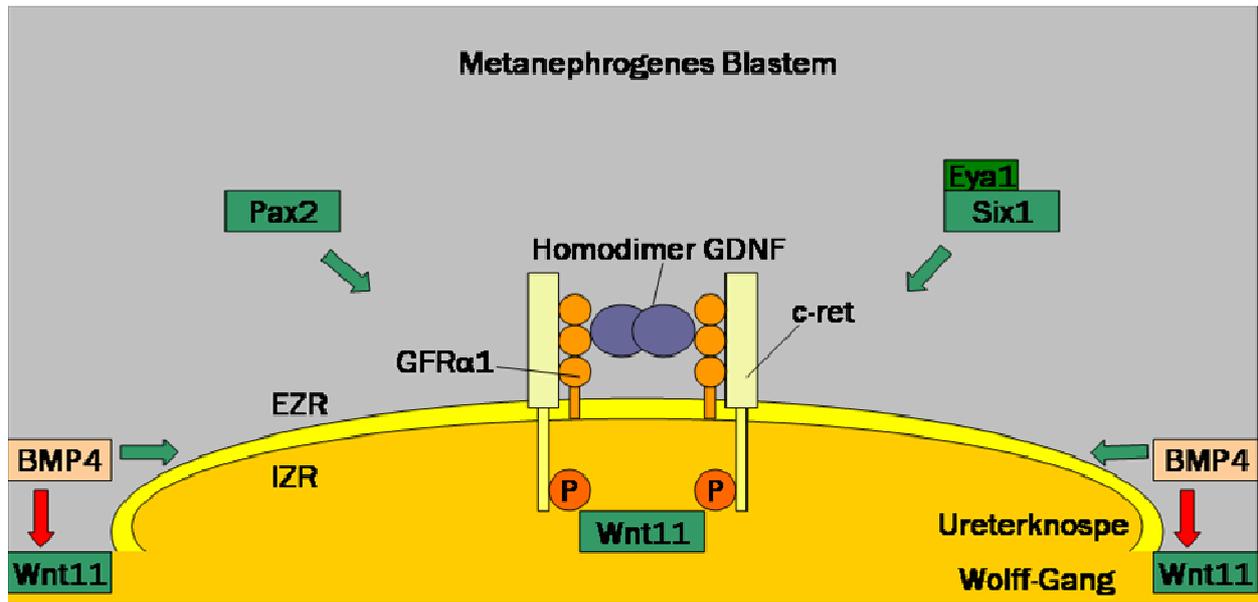


Abb. 3 Aussprossung der Ureterknospe.

Die GDNF/ Gfr α 1/ c-ret-Achse spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion der Ureterknospung und der weiteren Differenzierung. GDNF bindet als Homodimer an den membranständigen Rezeptor GFR α 1, welcher dadurch ebenfalls dimerisiert wird und eine Bindung und Dimerisation des Transmembranrezeptors c-ret bedingt. Weitere Signalmoleküle greifen regulatorisch in diese Achse ein (*modifiziert nach Sariola und Saarma, 2003*).

1.5 Die Struktur der menschlichen Chromosomen

Damit die 2 m lange menschliche DNA im 2-6 μ m großen Zellkern Platz findet, muss sie mithilfe spezifischer Proteine verpackt werden [Gottschalk *et al.*, 2009]. An dieser Kondensierung sind Histonproteine (Histone) und Nicht-Histonproteine beteiligt. Die Histone sind aufgrund des hohen Anteils basischer Aminosäuren positiv geladen und können daher mit der negativ geladenen DNA interagieren. Dies spielt für die geregelte Anordnung und Verpackung der DNA eine wichtige Rolle. Man unterscheidet die Histone H2A, H2B, H3 und H4, von denen sich je 2 Exemplare zu einem Oktamer zusammenlagern und so das Grundgerüst bilden, um das sich die DNA zweimal herum windet. Die H1-Histone verbinden jeweils zwei auf diese Weise entstandene Nukleosomen miteinander, in dem sie an den DNA-Abschnitt zwischen zwei Histonoktameren, die sogenannte *linker-DNA*, binden. Das Zusammenlagern der Nukleosomen zu einer eng spiralisierten Kette mithilfe der H1-Histone generiert die Chromatinfasern [Murken *et al.*, 2006; Passarge *et al.*, 2008].

Um das Erbgut für Transkription, Replikation oder DNA-Reparatur zugänglich zu machen, muss die dichte Verpackung der DNA gelockert werden [Downs *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Osley *et al.*, 2007]. Dies kann durch Chromatin-Remodeling-Enzyme erfolgen. Mit der Fähigkeit DNA zugänglich zu machen, spielen die Enzyme eine fundamentale Rolle in Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen, aber auch bei der Tumorgenese [Chi *et al.*, 2004; de la Serna *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2008; Krangel *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2006]. Bei den Chromatin-Remodeling-Enzymen unterscheidet man aufgrund ihrer unterschiedlichen Arbeitsweise zwei Klassen. Die erste Klasse nutzt ATP-Hydrolyse zur Veränderung der Interaktion zwischen DNA und Histonen, während die zweite Klasse Histone kovalent modifiziert [de la Serna *et al.*, 2006]. Da das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen *CHD1L* zu den ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Enzymen gehört, soll im Folgenden nur auf diese Klasse eingegangen werden.

1.5.1 ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Enzyme

ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Enzyme besitzen eine der DNA-Helikase ähnliche ATPase-Domäne [Bork *et al.*, 1993; Henikoff *et al.*, 1993]. Diese ermöglicht durch Hydrolyse des Energielieferanten ATP die Bewegung der Histone entlang der DNA, was als Nukleosomen sliding bezeichnet wird. Außerdem können die ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Enzyme Histone entfernen oder austauschen, sowie durch Aufbau neuer Nukleosomen-einheiten einen höheren Verpackungsgrad der DNA erreichen [Flaus *et al.*, 2006]. Die konservierte ATPase-Helikase-Domäne ist der SNF2-Familie (*sucrose non fermenting 2*) – Familie, einer Untergruppe der Helikase-*super family 2* (SF2), zugehörig [Corona *et al.*, 2007].

In engem Zusammenhang mit der Veränderung der Nukleosomenstruktur steht die posttranslationale Modifikation des N-terminalen Endes der Histonproteine. Durch diese Veränderung wird die hohe Affinität der gegensätzlich geladenen DNA und Histone aufgehoben. Hierbei spielen zum Beispiel Acetylierung, Methylierung und Poly-ADP-Ribosylierung der Histonenden eine wichtige Rolle. ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Enzyme besitzen neben der Helikase-Domäne Motive, die eine selektive Erkennung dieser Proteinmodifikationen ermöglichen. Die Auflockerung wird mittels Modifikationen von Histonen durch die Chromatin-Remodeller ergänzt [Ahel *et al.*, 2009].

1.6 Chromodomain helicase DNA binding protein 1-like (CHD1L)

Das *chromodomain helicase DNA binding protein 1-like (CHD1L)*-Gen, auch bekannt als *ALC1 (amplified in liver cancer 1)* ist auf dem langen Arm des Chromosoms 1 lokalisiert (1q21) und umfasst 53.153 Basenpaare (bp). Die codierende Region verfügt über 23 Exons. Das CHD1L-Protein besteht aus 897 Aminosäuren und wiegt 101 kDA. CHD1L besitzt neben der konservierten ATPase-Helikase-Domäne der SNF2-Familie (SNF2_N Domäne) eine zweite Helikase-Domäne (*helicase superfamily c-terminal domain, HELICc*) und eine carboxyterminale Makrodomäne [Ma *et al.*, 2008] (Abbildung 4).

Eine Amplifikation von 1q21 konnte in Tumoren der Blase [Simon *et al.*, 1998], der Mamma [Tirkkonen *et al.*, 1998], sowie nasopharyngealen [Fang *et al.*, 2001] und ösophagealen Tumoren [Kwong *et al.*, 2004] detektiert werden. Bei primären hepatozellulären Karzinomen (HCC) konnte die Amplifikation sogar in 58 bis 78 % der Fälle nachgewiesen werden [Guan *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 1999; Marchio *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1999]. In diesem Zusammenhang wurde *CHD1L* als mögliches Onkogen identifiziert, bei dessen Überexpression eine Zunahme der Zellproliferation [Ma *et al.*, 2008], sowie eine Inhibition der Apoptose [Chen *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2008] als charakteristische Eigenschaften eines Onkogens resultieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass transgene *CHD1L*-Mäuse Tumoren entwickeln [Chen *et al.*, 2009]. Hierdurch wurde bekräftigt, dass *CHD1L* eine Rolle in der Tumorgenese spielt.

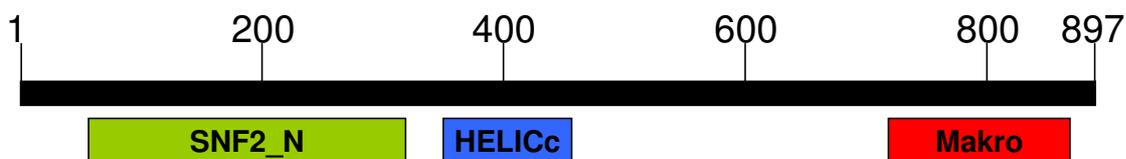


Abb. 4 Schematische Darstellung des CHD1L-Proteins und dessen funktioneller Domänen.

CHD1L enthält eine konservierte ATPase-Helikase-Domäne der SNF2-Familie (SNF2_N), eine zweite Helikase-Domäne (*helicase superfamily c-terminal domain, HELICc*) und eine carboxyterminale Makrodomäne. (*modifiziert nach Ma et al., 2008*).

1.6.1 CHD1L als Chromatin-Remodeling-Enzym

CHD1L gehört zur SNF2-Familie (SNF2_N Domäne) der ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Enzyme, die bei Transkription, Replikation und DNA-Reparatur eine wichtige Rolle spielen. Das Enzym PARP1 (Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1), welches spezifisch auf DNA-Strangbrüche reagiert [Hassa *et al.*, 2006; Lindahl *et al.*, 1995; Satoh *et al.*, 1992], synthetisiert aus NAD⁺ (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) durch sukzessives Zusammenfügen von ADP-Ribose-Einheiten an Akzeptorproteine negativ geladene Poly-ADP-Ribose-Polyemere (PAR-Polymere), katalysiert die PARibosylierung von H1-Histonen und führt so zu einer Relaxation der Chromatinstruktur [de Murcia *et al.*, 1986; Frechette *et al.*, 1985; Leduc *et al.*, 1986; Poirier *et al.*, 1982]. Neben der Strukturmodulation kann PAR für die Bindung und Rekrutierung von Chromatin-Remodeling-Enzymen im Rahmen der DNA-Reparatur verantwortlich gemacht werden [Ahel *et al.*, 2009]. Während das mit CHD1L strukturverwandte Chromodomain Helicase DNA binding Protein 1 (CHD1) eine Bindung mit methylierten H3-Histonen am Wirkort eingeht [Flanagan *et al.*, 2005; Pray-Grant *et al.*, 2005], wird CHD1L poly-ADP-Ribose-abhängig zum Ort des DNA-Schadens rekrutiert [Karras *et al.*, 2005] und bindet PAR mittels seiner Makrodomäne [Ahel *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009]. PARP1 selbst kann als stärkstes Substrat für die PARibosylierung dienen, und diese Automodifikation ist ausreichend für die Rekrutierung von CHD1L zum Ort des DNA-Schadens. Hierbei kann PARP1 auch H1-Histone in der Chromatinstruktur ersetzen [Gottschalk *et al.*, 2009]. Die ATPase-Aktivität von CHD1L kann der Helikase-Domäne zugeschrieben werden und ermöglicht ATP-abhängig Nukleosomen-Sliding, sowie die Abkopplung vom Ort des DNA-Schadens. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität und die damit verbundene Funktion als Chromatin-Remodeling-Enzym auch von einer intakten Makrodomäne abhängig ist [Gottschalk *et al.*, 2009]. Die ATPase-Aktivität wird durch DNA, vor allem aber durch das N-terminale Ende der H4-Histone der Nukleosomen, sowie durch PARP1 gesteigert [Ahel *et al.*, 2009]. Zusammenfassend konnte CHD1L als PAR-abhängiges Chromatin-Remodeling-Enzym bei der DNA-Reparatur identifiziert werden, wobei der Mechanismus des Nukleosomen-Slidings einen Zugang zur sonst dicht verpackter DNA ermöglicht [Ahel *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009].

1.7 Ziel der Arbeit

Kongenitale Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidneys and the urinary tract*, CAKUT) treten meist isoliert und sporadisch auf. Es lässt sich jedoch bei einer familiären Häufung in 10 % der Fälle eine genetische Determination vermuten, die eine inkomplette Penetranz und variable Expressivität aufweist und den Krankheitsverlauf trotz therapeutischem Eingreifen beeinflusst [Pope *et al.*, 1999]. Einige Gene, die an der molekularen Pathogenese der CAKUT beteiligt sind, konnten in den letzten Jahren identifiziert werden. Um neue chromosomale Regionen und Gene zu detektieren, deren Deletionen oder Duplikationen mit CAKUT einhergehen, wurde die Array-basierte comparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) an DNA-Proben von 30 Kindern mit unterschiedlichen CAKUT-Phänotypen und mindestens einem extrarenalen Symptom durchgeführt. Es konnte eine 2,4 Mb große Mikroduplikation in der chromosomalen Bande 1q21.1 bei einem Patienten mit unilateraler Nierenhypoplasie, einer proximalen Ureterstenose und zusätzlichen Anomalien anderer Organsysteme identifiziert werden. Unter den duplizierten Genen ist *CHD1L* (*Chromodomain Helicase DNA-binding protein 1-like, ALC1, amplified in liver cancer 1*) ein vielversprechendes Kandidatengen, dessen Veränderungen der CAKUT-Pathogenese zu Grunde liegen könnten [Weber *et al.*, 2010]. *CHD1L* ist ein Mitglied der SNF2-Familie der ATPase abhängigen Chromatin-Remodeling-Enzyme. Zu dieser Klasse gehören auch *CHD1* und *CHD7* [Flaus *et al.*, 2007]. Mutationen im Gen des mit *CHD1L* strukturverwandten ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Enzyms *CHD7* sind mit dem CHARGE-Syndrom assoziiert, dessen klinisches Erscheinungsbild auch durch Nierenanomalien charakterisiert ist [Vissers *et al.*, 2004; Lalani *et al.*, 2006; Jongmans *et al.*, 2006].

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit eine Sequenzanalyse des *CHD1L*-Gens in 85 CAKUT-Patienten durchzuführen um zu untersuchen, ob Mutationen in *CHD1L* an der CAKUT-Entstehung beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollten anhand der genomischen Struktur von *CHD1L* Primerpaare ausgewählt und etabliert werden. Die dann durchgeführte *CHD1L*-Mutationsanalyse sollte als Grundlage zur Beurteilung der Bedeutung von *CHD1L* in der Nephrogenese dienen. Diese Untersuchungen sollten einen Ausgangspunkt für Expressionsanalysen in verschiedenen humanen Geweben und an normalen fetalen, adulten und pathologischen Nierenschnitten darstellen. Außerdem sollte diese Arbeit eine Grundlage für

funktionelle Analysen von CHD1L legen. Auf diese Weise sollte die Bedeutung von *CHD1L* als Kandidatengen für die CAKUT-Pathogenese untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Elektrophoresekammer	B1	OWI Separation System Inc
Elektrophorese-Netzteil	EPS200 Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech
Gefrier- und Kühlschränke		Bosch
		Liebherr
		Siemens
Gel-Dokumentationssystem	UV-Systeme	INTAS
Heiz-/Magnetrührplatte	Elektronikrührer Monotherm	Variomag
Pipetten	Research	Eppendorf
Pipettierhilfen	Research pro	Eppendorf
Mikrowelle	820L	Privileg
Sequenzierer	ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Thermocycler	PTC 200 Peltier-Thermal Cycler	MJ Research
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex		VWR
Waage	CPA6235	Sartorius
Zentrifuge		neoLab

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Pufferlösungen und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Reagenzien

Agarose, Sigma Aldrich Corporation, St.Louis, MO, USA

Alkalische Shrimps Phosphatase (SAP), Promega, Mannheim, Deutschland

BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA

Exonuklease I (ExoI), New England BioLabs GmbH

Primer, Metabion, Martinsried, Deutschland

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix mit MgCl₂, Sigma Aldrich Corporation, St.Louis, MO, USA

Lösungen

50x TAE-Puffer: 484 g Tris, 37,2 g EDTA, 114,2 ml 100 % Essigsäure. Mit *Aqua dest.* auf 2 l auffüllen

1x TAE-Puffer: 20 ml 50x TAE-Puffer in 980 ml *Aqua dest.*

TE –4-Puffer: 10 mM Tris, 0,1 mM Na₂-EDTA, HPLC-H₂O; pH 8,0

2-log DNA-Standard (New England BioLabs GmbH): 50 µl Marker [1000 µg/ml], 850 µl 1x TAE, 100 µl Ladepuffer

Ethidiumbromidlösung, 5 ml 1% EtBr in 600 ml 1x TAE (0,008 µl/ml EtBr), Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt

Verbrauchsmaterialien (Greiner, Frickenhausen)

Eppendorfreaktionsgefäße

H₂O

Millipor steril

PCR-Tubes

Pipettenspitzen

2.1.3 Datenbanken und Software

Datenbanken

Biotoools: wwwtacg v3.0	http://biotoools.umassmed.edu/tacg4/
CCG sequence service	http://entry2ccg.ccg.uni-koeln.de/Runs/
Ensembl-Genome Browser	http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index
Metabion	http://www.metabion.de/orders/checkin.html
NCBI Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_blastByOrg.cgi
Polymorphism Phenotyping	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
UCSC-Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
UCSC-BLAT	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat

Software

<i>Chromas Lite</i> Version 2.0	Conor McCarthy
<i>Microsoft Office 2003</i>	Microsoft
<i>DNASTAR Lasergene SeqMan Pro</i> (Version 7.1)	SeqMan.Inc

2.2 Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv

Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden CAKUT-Patienten untersucht, die im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Heidelberg betreut wurden oder deren DNA dort gesammelt wurde. Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg genehmigt. Einverständniserklärungen der Patienten und/oder der Eltern lagen vor. Die vorliegenden Krankheitsbilder und Fehlbildungen, wurden durch klinische und sonographische Untersuchungen der Patienten in der pädiatrischen Nephrologie und Radiologie diagnostiziert. Unter den diagnostizierten Phänotypen fanden sich Nierenagenesien, Nierenhypoplasien sowie Dysplasien mit oder ohne Zysten. Außerdem

gehörten multizystische Nierendysplasien, Dopplungsfehlbildungen, sowie Ureterstenosen, die zum Teil zu Vesikureteralem Reflux führten, zu den vorliegenden Krankheitsbildern.

Mutationsanalysen des *CHD1L*-Gens wurde insgesamt an 85 Patienten mit einem CAKUT-Phänotyp vorgenommen. Bei 61 Patienten wurde die gesamte codierende Region von *CHD1L* analysiert. Bei 24 weiteren Patienten wurde nur das Exon 21, bei 23 das Exon 19 und bei 14 das Exon 18 untersucht, da in diesen drei Exons in der ursprünglichen Kohorte eine Variante gefunden wurde, jedoch nicht genügend DNA dieser Patienten zur Verfügung stand, um die gesamte codierende Region zu analysieren.

Daneben wurde eine Sequenzanalyse der Eltern der Patienten, bei denen eine *CHD1L*-Variante nachgewiesen werden konnte, angeschlossen.

Kontrollkollektiv

Die eingesetzte Kontroll-DNA stammte aus kernhaltigen Zellen des Blutes von gesunden Blutspendern des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

2.3 Angewandte Methoden

2.3.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Die Isolierung der DNA erfolgte nach der Aussalzmethode nach Miller [Miller *et al.*, 1988]. Aus dem mit EDTA antikoagulierten Blut wurden im ersten Schritt die kernlosen Erythrozyten, die kein genetisches Material enthalten, durch Zugabe von Lysispuffer und nach Zentrifugation mit dem Überstand entfernt. Die kernhaltigen und damit DNA-haltigen Blutzellen wurden pelletiert und mittels Natriumdodecylsulfat (SDS) und Kernlysispuffer wurden die Zell- und Kernmembran aufgelöst. Die Serinprotease Proteinkinase K baute im nächsten Schritt Zellproteine ab. Eine Aussalzung wurde durch NaCl erreicht. Abschließend konnte die DNA durch Ethanol-fällung, Abzentrifugation und Verwerfen des Überstandes gewonnen werden. Zur Fertigstellung der Stocklösung wird die isolierte DNA in TE-Puffer gelöst. Die DNA-Konzentration kann spektralphotometrisch mittels *NanoDrop* bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Die Stocklösungen werden bei -20°C aufbewahrt. Aus den Stocklösungen wurden Gebrauchslösungen hergestellt, die eine DNA-Konzentration von 10 ng/μl enthielten.

Reagenzien

- 6 M NaCl
- Proteinase K: Gebrauchslösung 10 mg/ml
- 20 % SDS
- Lysispuffer (pH 7,4): 155 ml 1 M NH₄Cl
 10 ml 1 M KHCO₃
 200 µl 0,5 M EDTA (pH 7,0)
 Mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen
- Kernlysispuffer (pH 8,0): 7,5 ml 5 M NaCl
 24 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 Mit Aqua bidest auf 500 ml auffüllen
- TE-Puffer: 2 ml 1 M Tris (pH 8,0)
 400 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 Mit Aqua bidest auf 200 ml auffüllen

2.3.2 Generierung der genomischen Struktur von *CHD1L*

Zur Generierung der genomischen Struktur von *CHD1L* wurde der Genome Browser der UCSC (Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) verwendet und das *Ref Seq gene* für *CHD1L* (NM_004284) ausgewählt. Über den Link *Genomic Sequence from assembly* und folgend den Einstellungen *CDS Exons*, sowie *One FASTA record per region (exon, intron, etc) mit 240 zusätzlichen Basenpaaren* in 5' Richtung, als auch in 3' Richtung wurde die Sequenz mit den kodierenden Exons und flankierenden Introns des gesuchten Gens ermittelt. Bei der Formatierung musste darauf geachtet werden, dass *Exons in upper case, everything else in lower case* und *die Mask repeats to: lower case* eingestellt waren.

Des Weiteren wurde die prädizierte Protein- bzw. Aminosäuresequenz von *CHD1L* über den UCSC Genome Browser und den Link *Predicted Protein* ermittelt.

Mithilfe von Online Software Biotools (<http://biotools.umassmed.edu/tacg4/>) konnten nun die genomische DNA-Sequenz sowie die prädizierte Aminosäuresequenz gemeinsam dargestellt werden. Hierzu musste die ermittelte genomische Sequenz für jedes Exon einzeln eingegeben werden. Mithilfe der Einstellungen *Entire Linear Map Long, but required for Co-Translation*

below und Linear Co-Translation: in 3 frame(s), with a 1 letter code wurde der Leserahmen ermittelt. Die Identifizierung des Leserahmens, aus den drei von Biotoools angegebenen Möglichkeiten gelang anhand der aus der UCSC-Datenbank bekannten Aminosäuresequenz. In der nun erhaltenen gemeinsamen Darstellung von genomischer Struktur und Aminosäuresequenz wurden das Start-Codon ATG, die Spleißstellen aller 23 kodierenden Exons, sowie das Stopp-Codon, in diesem Fall TAA, lokalisiert und markiert. Wichtig war hierbei, dass das Ende eines Introns und damit der Anfang eines Exons (5') durch ein ag gekennzeichnet ist (Spleiß-Akzeptor), das Ende eines Exons (3') und damit entsprechend der Beginn eines Introns durch gt (Spleiß-Donor).

2.3.3 Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die Polymerase Kettenreaktion nach Mullis [Mullis *et al.*, 1977] ist eine Methode, die es erlaubt selbst geringe Mengen an DNA *in vitro* zu amplifizieren, die dann für weitere Analysen zur Verfügung stehen. Hierzu werden Oligonukleotid-Primer, Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) und thermostabile DNA-Polymerasen, hier die *Taq* Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, eingesetzt.

Es folgen mehrere Zyklen aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation, die eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz gestatten. Beim Einsatz von spezifischen Primern wird so eine definierte DNA-Sequenz amplifiziert. Die Durchführung erfolgt in einem Thermocycler, der die erforderlichen Temperaturen für die einzelnen Phasen der PCR erzeugen kann. Das Temperatur- und Zeitprofil ist abhängig von der Länge der zu vervielfältigenden Sequenz und steigt mit höherem CG-Gehalt derselben, sowie der eingesetzten Primer an.

Dem ersten Schritt, der Denaturierung, in dem die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf Temperaturen von 90 bis 97°C in einzelsträngige DNA überführt wird, geht eine Prä-Denaturierung von 5-7 Minuten voraus. Die Denaturierung stellt die vollständige Trennung der komplementären Stränge sicher. Die drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin, bzw. die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin können auf diese Weise gelöst werden.

Dies ist eine Voraussetzung für die Anlagerung der Primer an die komplementäre einzelsträngige DNA-Matrize (Primer-*Annealing*) durch die Temperatursenkung im zweiten

Schritt. Die optimale Temperaturgenerierung im Thermocycler ist für eine spezifische Primerbindung an das Template wichtig. Eine zu hohe Temperatur lässt nur eine unzureichende Anlagerung zu, was die DNA-Amplifikation der gewünschten Zielsequenz verringern kann. Dagegen kann es bei zu geringen Temperaturen zu unspezifischen Bindungen kommen, die unerwünschte PCR-Produkte zur Folge haben können. Um eine Hybridisierung der denaturierten DNA-Stränge miteinander möglichst gering zu halten, liegen die Primer außerdem im Überschuss vor. Die „Wallace-Regel“ dient als theoretische Orientierung bei der Bestimmung der optimalen *Annealing*-Temperatur für Primerlängen von bis zu 25 Basenpaaren:

$$T_M = 2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl A+T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl C+G}).$$

T_M steht hierbei für die Schmelztemperatur, wobei empirisch gesehen die berechnete Schmelztemperatur 2-5°C über der tatsächlich beobachteten Temperatur liegt, da weitere Einflussfaktoren, wie z.B. das Vorliegen von Ionen im PCR-Puffer existieren.

Der letzte Schritt der Polymerase Kettenreaktion ist die Elongation. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase an das 3'-Ende der Primer mithilfe der dNTPs den komplementären Strang zur vorliegenden DNA-Matrize.

Die Thermostabilität der aus Bakterien gewonnenen Polymerasen gewährleistet, dass die Syntheseaktivität nicht durch die hohe Denaturierungstemperatur beeinträchtigt wird. Nur so bleiben die Enzyme für die Elongationsphase des folgenden Zykluses funktionsfähig. Am häufigsten wird die *Taq* Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet, welches in heißen Quellen seinen Lebensraum hat. Die *Taq* Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von 72°C mit einer Polymerisierungseffizienz von etwa 1000 Nukleotiden pro Minute. Sie besitzt keine Korrekturlesefunktion und ist damit nicht in der Lage falsch eingebaute dNTPs zu erkennen und wieder zu entfernen. Vom Hersteller werden der entsprechende Standardpuffer, sowie zusätzliche Reagenzien zur Optimierung der PCR mitgeliefert. Bei der *Taq* Polymerase werden MgCl_2 -Ionen eingesetzt, die bivalente Ionen abfangen und so Störungen beim Einbau der dNTPs verhindern können. Die verwendete Polymerase bestimmt neben der Länge der zu amplifizierenden Sequenz die Temperatur bei der Elongation.

In der Regel werden bei einer PCR, abhängig von der Effizienz der Primerbindung und der Menge der DNA-Templates 25-40 Zyklen durchlaufen. Um die abschließende Synthese aller

Produkte zu gewährleisten, findet am Ende der PCR eine zusätzliche Polymerisierungsphase statt.

2.3.3.1 Entwerfen der Primerpaare

Zur Amplifikation eines gewünschten DNA-Templates mittels PCR müssen die flankierenden Bereiche der Zielsequenz bekannt sein. Dann können spezifische Oligonukleotide, die Primer, konstruiert werden, die gezielt an einen der beiden Matrizenstränge binden und so den Startpunkt der Synthese des komplementären Stranges definieren und ermöglichen. Primer sind notwendig, weil die DNA-Polymerase ihre Arbeit nur an einer bereits bestehenden Nukleotidsequenz beginnen kann. Es muss sowohl ein Vorwärts-Primer (forward, F), komplementär zum Folgestrang, als auch ein Rückwärts-Primer (reverse, R), komplementär zum Leitstrang, vorliegen, deren 3'-Enden als Anfangspunkte für die DNA-Synthese von 5' nach 3' dienen. Neu synthetisierte Stränge aus dem ersten Zyklus haben durch den Primer ein definiertes 5'-Ende, jedoch ein noch nicht definiertes 3'-Ende. Die DNA-Stränge, die in den folgenden Zyklen amplifiziert werden, besitzen eine einheitliche Länge mit zwei durch die Primer definierten Enden und bestehen aus der definierten Zielsequenz.

Es muss ein optimaler Ablauf der PCR gewährleistet sein und verhindert werden, dass Primer unspezifisch an das DNA-Template binden, verwendete Primerpaare untereinander eine Bindung eingehen, oder Homodimere aus einem der eingesetzten Primer gebildet werden. Um unspezifischen Bindungen oder *allelic Dropouts* zu vermeiden, müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein:

- Die Primer sollten zum Exonstart und zum Exonende einen Abstand von mindestens 60 Basenpaaren haben.
- Die Länge der Zielsequenz sollte zwischen 150 und 1000 Basenpaaren liegen.
- Die Primer sollten ca 18-24 Basenpaare lang sein.
- Die vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin sollten in einer ausgeglichenen Verteilung vorliegen.
- Der Gehalt an GC-Bindungen sollte 50-60 % betragen.

- Ein Auftreten von mehr als drei aufeinander folgenden gleichen Basen sollte, wenn möglich, vermieden werden.
- Das 3'-Ende sollte mit GG, CC oder CG enden.

Anhand der gemäß 2.3.2 ermittelten genomischen Struktur konnten die Primerpaare unter Beachtung der oben genannten Kriterien entworfen werden. Die Länge der einzelnen Primer wurde auf 21 Basenpaare festgesetzt. Mithilfe des *Human BLAT Search* der UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) konnte die Einzigartigkeit der ermittelten Primersequenzen als Voraussetzung für einen ungestörten Ablauf der PCR sowie das Vorkommen eventueller annotierter SNPs überprüft werden. Die Auswahl von Vorwärts- und Rückwärts-Primer erfolgte in 5'-3' Richtung am Leitstrang. Damit der Rückwärts-Primer als funktionsfähiger Primer für den komplementären Folgestrang eingesetzt werden konnte, musste die ausgewählte Sequenz nach erfolgreichem Abgleich in der Datenbank mittels des *Reverse Compliment*-Programmes (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) revers komplementär gedreht werden.

Bei den Polymerasen Kettenreaktionen im Rahmen dieser Arbeit wurden die ausgewählten Primer der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und im lyophilisiertem Zustand geliefert. Mit steril filtriertem TE-4-Puffer wurde die Konzentration der jeweiligen Stammlösung entsprechend dem Synthesepplan auf 100 pmol/μl eingestellt. Mit Primer-Stammlösung und PCR-Wasser wurde eine Gebrauchslösung im Verhältnis 1:10, mit einer sich daraus ergebenden Konzentration von 10 pmol/μl, hergestellt. Die Gebrauchs- und Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.3.3.2 Durchführung der PCR

Zur Etablierung der Primer wurde DNA von zwei Kontrollpersonen als Template in die PCR eingesetzt und alle 23 Exons von *CHD1L* wurden amplifiziert. In der folgenden Gelelektrophorese war eine sichtbare Bande beweisend dafür, dass die ausgewählten Primerpaare eine Amplifikation und somit die weitere Analyse der Zielsequenz zuließen. Wichtig bei der Primeretablierung war es, die idealen Temperaturbedingungen der Primerpaare zu ermitteln.

Nach erfolgreicher Etablierung konnten die ausgewählten Primerpaare für die *CHD1L*-Mutationsanalyse bei den CAKUT-Patienten eingesetzt werden.

Zur Durchführung der PCR wurde pro *CHD1L*-Exon und Test-DNA ein Gesamtvolumen von 25 μl angesetzt, das sich aus *REDTaq*[®] *ReadyMix*TM, Vorwärts- und Rückwärts-Primer für das entsprechende Exon, der zu amplifizierenden DNA und destilliertem Wasser zusammensetzte. Der *REDTaq*[®] *ReadyMix*TM beinhaltet neben der *Taq* Polymerase einen Puffer, MgCl_2 und die zur Elongation benötigten dNTPs. Um eventuelle Verunreinigungen festzustellen, wurde für jedes Exon eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle des DNA-Templates mitgeführt. Alle Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert, um die eingesetzten Enzyme und Chemikalien zu schützen.

Die Reaktionsansätze setzten sich entsprechend folgender Tabelle zusammen:

Tab. 1: PCR-Reaktionsansatz

PCR-Ansatz	pro tube (μl)
F-Primer (10 pmol/ μl)	1,0
R-Primer (10 pmol/ μl)	1,0
dH ₂ O	5,5
Ready Mix (2fach)	12,5
DNA (10 ng/ μl)	5,0
Gesamt	25,0

F- Primer, Vorwärts-Primer; R-Primer, Rückwärtsprimer

Anhand eines vorher erstellten Pipettierschemas wurden zuerst Primer, Wasser und der *REDTaq*[®] *ReadyMix*TM in den benötigten Volumina als Premix zusammengestellt, mittels Schüttelgerät gemischt und abzentrifugiert. Der Premix wurde auf die Reaktionsröhrchen aufgeteilt und die jeweilige DNA wurde hinzugefügt. Die aus Premix und DNA pipettierten Reaktionsansätze wurden mittels Schüttelgerät gemischt, zentrifugiert und anschließend wurde die PCR im Thermocycler durchgeführt. Dieser generiert mit Standard-Temperaturprofilen optimale Bedingungen zur DNA-Amplifikation. Im Rahmen dieser Arbeit wurden

zwei verschiedene Temperaturprofile eingesetzt. Beide Programme stellen *TwoStep*-Programme dar, in denen eine höhere *Annealing*-Temperatur in den ersten 15 Zyklen zu einer spezifischen Anlagerung des Primers an die Zielsequenz führen soll. Die folgende Temperaturerniedrigung beim *Annealing* um 2°C in den letzten 20 Zyklen erhöht die Amplifikationsrate des spezifisch synthetisierten DNA-Abschnitts. Die Elongations-Temperatur entspricht dem Optimum der eingesetzten *Taq* Polymerase. Die abschließende Kühlungsphase macht ein stabiles Verweilen der PCR-Produkte im Thermocycler möglich.

Tab. 2: Temperatur-Profil der Programme *TwoStep 58* bzw. *TwoStep 60*

PCR- Schritt	Temperatur	Zeit
Prä-Denaturierung	95°C	5 min
15 Zyklen bei einer <i>Annealing</i> -Temperatur von 58°C oder 60°C		
Denaturierung	95°C	30 sec
<i>Annealing</i>	58°C oder 60°C	30 sec
Elongation	72°C	1 min 30 sec
20 Zyklen bei einer <i>Annealing</i> -Temperatur von 56°C oder 58°C		
Denaturierung	95°C	30 sec
<i>Annealing</i>	56°C oder 58°C	30 sec
Elongation	72°C	1 min 30 sec
Abschließende Polymerisierungsphase	72°C	10 min
Abkühlen	4°C	unendlich

2.3.4 Gelelektrophorese mittels Agarosegel

DNA besitzt aufgrund ihres Rückgrates aus Phosphatgruppen eine negative Ladung und wandert daher bei Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode. Diese Eigenschaft wird bei der Gelelektrophorese genutzt, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Diese Auftrennung der Moleküle erfolgt, weil kleinere Fragmente schneller wandern als größere. Die Elektrophorese dient im Rahmen dieser Arbeit der Detektion des erwarteten PCR-Produktes, da nur bei erfolgreicher Amplifikation eine Bande im Gel nachgewiesen werden konnte. Bei der Herstellung eines 2 % Agarosegels wurde neben 2 g Agarose 100 ml 1x TAE-Puffer eingesetzt.

Nach Erhitzen in der Mikrowelle wurde das Gel für 10-15 Minuten auf einer Magnetplatte gemischt, abgekühlt und anschließend in noch flüssigem Zustand in eine Gelkammer mit einliegendem Kamm, der die benötigten Probentaschen formte, gegossen. Die Kammer mit dem fest gewordenen Agarosegel wurde im Folgenden mit TAE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel komplett von Pufferlösung bedeckt war. Nach Abschluss der PCR wurden 8 µl des Produktes, sowie 10 µl eines 2log DNA-Standards, der zur Größenbestimmung und groben Quantifizierung der DNA dient, in die Taschen des Agarosegels geladen. In der Kammer wurde nun ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 200 mA angelegt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der fluoreszierenden Substanz Ethidiumbromid, die aufgrund ihrer aromatischen Ringstruktur UV-Licht absorbiert und sichtbares Licht emittiert. Einzelne Ethidiumbromidmoleküle können aufgrund ihrer planaren Struktur zwischen vorhandene DNA-Basen interkalieren, wodurch das Anregespektrum von Ethidiumbromid erhöht wird. Bei Exposition im UV-Licht leuchtet das Gel an Stellen, an denen DNA vorhanden ist, folglich hell auf, während sich das restliche Gel ohne DNA dunkel darstellt. Hierbei besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen der DNA-Menge und der Helligkeit. Die dargestellten Banden wurden zur Dokumentation fotografiert.

Eine vorhandene Bande mit passender Länge dient als Nachweis für die Amplifikation der gewünschten Zielsequenz. Liegen mehrere Banden vor, zeigt dies, dass die *Annealing*-Temperatur, die die Spezifität der Primer-Bindung gewährleisten soll, nicht ausreichend hoch gewählt ist.

2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur weiteren Analyse der PCR-Produkte ist eine Aufreinigung notwendig, mittels der störende Komponenten, besonders nicht eingebaute Primer und Nukleotide entfernt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür die Enzyme *Exonuklease I (ExoI)* und alkalische Shrimp Phosphatase (SAP) eingesetzt. *ExoI* katalysiert dabei den Abbau kurzer Oligonukleotide, während SAP einzelne Nukleotide beseitigt. Das PCR-Produkt wurde wie in Tabelle 3 angegeben mit den Aufreinigungsenzymen versetzt und für 20 Minuten bei 37°C, sowie anschließend für 30 Minuten bei 72°C inkubiert, damit die aufgereinigte amplifizierte DNA für die Sequenzierung zur Verfügung stand.

Tab. 3: Reaktionsansatz zur Aufreinigung der PCR-Produkte

	Volumen [in μl]
ExoI (20U/ μl)	0,075
SAP 1U/ μl	0,3
dH ₂ O	1,625
PCR-Produkt	8
Gesamt	10

Exo I, Exonuklease I; SAP, alkalische Shrimp Phosphatase.

2.3.6 Sequenzierung

Mithilfe der Sequenzierung ist die Bestimmung der Basenabfolge eines DNA-Templates und somit die Detektion von Mutationen anhand der Sequenzanalyse möglich. Die durchgeführten Sequenzierungen im Rahmen der Primeretablierung und der Analyse des *CHD1L*-Gens im Patientenkollektiv beruhen auf der Didesoxymethode nach Franz Sanger [Sanger *et al.*, 1977]. Die enzymatische DNA-Vervielfältigung erfolgte hierbei unter Einsatz von dNTPs und ddNTPs, die eine für die jeweilige Base spezifische Fluoreszenzmarkierung aufweisen. Ein wichtiger Schritt bei der DNA-Synthese ist die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der Hydroxygruppe am 3'-Kohlenstoffeiniger Zucker des schon bestehenden Polynukleotids und dem 5'-Kohlenstoffatom des neu einzufügenden Nukleotids. Den ddNTPs fehlt jedoch die 3'-Hydroxylgruppe zur Ausbildung einer weiteren Phosphodiesterbindung. Damit kommt es mit dem Einbau eines ddNTPs zum Kettenabbruch.

Die Sequenzierung verläuft nach einem der PCR ähnlichen Prinzip, wobei nur ein spezifischer Primer als Starthilfe eingesetzt wird, kein Primerpaar. Eine DNA-Polymerase synthetisiert bei der Sequenzier-Reaktion linear den zu sequenzierenden Strang. Bei Vorliegen von ddNTPs und dNTPs im Reaktionsgemisch kommt es im Verlauf an jeder Position zum zufälligen Einbau des zur Matrize komplementären ddNTPs in die wachsende Nukleotidkette. Damit entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge und unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Enden. Diese Fragmente können kapillarelektrophoretisch in einem *Sequencer* aufgetrennt werden.

Laserstrahlen regen hierbei die vier unterschiedlichen ddNTPs zur Fluoreszenz an. Das emittierte Licht der Fluoreszenzfarbstoffe besitzt jeweils eine charakteristische Wellenlänge und erlaubt die elektronische Ermittlung der gesuchten Basenabfolge. Diese kann dann abgespeichert, mit entsprechenden Programmen bearbeitet und ausgewertet werden.

Für die Sequenzier-Reaktion wurde das *BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* der Firma Applied Biosystems eingesetzt und der Reaktionsansatz auf Eis folgendermaßen zusammengestellt:

Tab. 4: Reaktionsansatz der Sequenzier-Reaktion

	Volumen [in µl]
dH ₂ O	6,15
<i>BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit</i>	0,5
AB Puffer 5X	2
F- o. R-Primer	0,25
PCR-Produkt	1,1
Gesamt	10

F-Primer, Vorwärts-Primer; R-Primer, Rückwärts-Primer

Im Rahmen der Primeretablierung war die Sequenzanalyse der Kontroll-DNA sowohl mit dem Vorwärts-, als auch mit dem Rückwärts-Primer durchgeführt worden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde für jedes Exon entweder der F- oder R-Primer für die Sequenzierungen des Patientenkollektivs ausgewählt.

Die Sequenzier-Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt, wobei folgendes Temperaturprofil verwendet wurde:

Tab. 5: Temperaturprofil der Sequenzier-Reaktion

Schritt der Sequenzier-PCR	Temperatur	Zeit	
Prä-Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	96°C	12 sec	26 Zyklen
<i>Annealing</i>	50°C	5 sec	
Elongation	60°C	4 min	
Abschließende Polymerisierungsphase	60°C	20 min	
Kühlen	4°C	unendlich	

Nach Abschluss des Programms wurden die Produkte 1:1 mit 10 µl Aqua bidest verdünnt. Als Nächstes wurden ungebundene markierte ddNTPs, die das Ergebnis der Sequenzierung verfälschen können, durch eine DNA-Aufreinigung entfernt. Dieser Schritt, sowie die nachfolgende Analyse im *Sequencer* wurden als kommerzielle Serviceleistung am Cologne Center for Genomics (CCG) vorgenommen. Nach Aufreinigung mit einer *DyeEx*-Säule entsprechend den Herstellerangaben von Qiagen wurde das Eluat in das Sequenziersystem *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* eingesetzt und die gesuchte Basenabfolge ermittelt. So war eine Untersuchung der Zielsequenz auf Mutationen hin möglich.

2.3.7 Auswertung der Sequenzen

Zur Mutationssuche wurden die erhaltenen abgespeicherten Sequenzen mit der *RefSeq*-Referenz-Sequenz, die zuvor für jedes Exon von der Homepage der *UCSC* abgeleitet worden war, mithilfe der Software *DNASTAR Lasergene SeqMan Pro* (Version 7.1) verglichen. Zudem wurden die Elektropherogramme mit dem Programm *Chromas Lite Version 2.0* Conor McCarthy visualisiert und bearbeitet. In optimaler Darstellung konnten dann sowohl Start- und Stopp-Codon, als auch die Spleißstellen aller 23 Exons markiert werden und eine nochmalige Mutationssuche durch eine visuelle Inspektion erfolgen. Gefundene Sequenzvarianten wurden mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des NCBI

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_blastByOrg.cgi) daraufhin untersucht, ob sie bereits bekannten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) entsprechen.

3 Ergebnisse

3.1 Die genomische Struktur des *CHD1L*-Gens

Die genomische Struktur des zu untersuchenden Gens *CHD1L* wurde mithilfe des Genome Browser der UCSC ermittelt. Durch Online Software Biotoools konnte eine gemeinsame Darstellung der genomischen DNA-Sequenz und der prädierten Aminosäuresequenz erreicht werden (Vergleiche Abschnitt 2.3.2). Die codierende Region besteht aus 23 Exons. Das Start- und das Stoppcodon, sowie die Splice Sites aller 23 Exons wurden ermittelt und markiert. In der gemeinsamen Darstellung der Exon-, Intron- und Aminosäurestruktur wurden F- und R-Primer ausgewählt. Dies ist in Abbildung 5 beispielhaft für Exon 2 dargestellt.

```

1   tcaggtacaatgacaggctactttggggctttgaatataaagggtgaataagtctactca 60
   agtccattgttactgtccgatgaaacccccgaaacttatatttccacttatcagatgagt
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
61   aaaagtagtttggagtcagcagatgttagatatccataactcctcagcaaaagatacg 120
   ttttcacaaaccttcagtcgtctacaaatctataggtattgaggagtcgttttctatgc
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
121  tccagtgaggtttatgtgaatttaggctgtgttcctcattcaactcttagaac 180
   aggtcactccaaatcccaatacacttaaataccgacacaaggagtaagtttgagaatcttg
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
181  attgcctctgcatgtactgaaatgtctgctcttcggatttgctgtatTTTTTgtttctag 240
   taacggagacgtacatgactttacagacgagaagcctaaacgacataaaaaacaaagatc
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
241  ggattcacctacgctcttaccagctggagggagtaaactggctcgcccagcgttccatt 300
   cctaagtggtgagcagaatggcgcacctccctcatttgaccgagcgggtcggaaggtaa
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
   I H L R S Y Q L E G V N W L A Q R F H C
301  gtcagaatggctgtatcctgggagatgagatgggcctggggaagacctgccaggtgtgtt 360
   cagtcttaccgacataggaccctctactctaccggacccttctggacgggtccacacaa
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
   Q N G C I L G D E M G L G K T C Q
361  actatgcgacgagtagtctcaccgccactgcgatacttccttataactcattctggagc 420
   tgatacgctgctcatgacgagtgggcgtgacgctatgaaggaatattgagtaagacctcg
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
421  tgagagctctggagctaaaacaaagctcagtttcacaaatgtccctgggatccaggctaa 480
   actctcgagacctcgatTTTgtttcgagtcagagtgTTTtacagggacctaggtccgatt
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
481  ctggctcttgcaccgggaaagggccttccctgtacagtcttctctgctcagtcattgca 540
   gaccgagaacgtggccctttcccggaaggacatgtcagaagagacggagtcagtaacgt
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *
541  gttcccctactgactttattcagggccagcaaatgctacttgtcctttctttg 600
   caaggggatgactgaaataagtcccggcgtttacgatgaacaggaaagaaac
       ^ * ^ * ^ * ^ * ^ * ^ *

```

Abb. 5 Genomische Struktur des *CHD1L*-Gens um Exon 2 herum mit Aminosäuresequenz.

Die Splice Sites sind in rot markiert und die Sequenzen des ausgewählten Primerpaares gelb hinterlegt.

3.2 Auswahl und Etablierung der entworfenen Primerpaare

3.2.1 Auswahl der Primerpaare

Anhand der genomischen Struktur wurden nach dem in Abschnitt 2.3.3.1 genannten Kriterien für alle 23 Exons von *CHD1L* Primerpaare entworfen. Die Länge der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurde auf 21 Basenpaare festgelegt. Anhand des Human BLAT Search der UCSC konnten die Sequenzen der ausgewählten Primer auf ihre Einzigartigkeit innerhalb des humanen Genoms sowie auf das Vorliegen eventueller annotierter SNPs überprüft werden. Die jeweilige Sequenz des ausgewählten Primers sowie das Ergebnis des Human BLAT Search sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Sequenzen und Ergebnisse des Human BLAT Search der ausgewählten Primerpaare zur Durchführung von PCR und Sequenzierung der 23 Exons des *CHD1L*-Gens

Exon und Primer	Sequenz 5'-3'	BLAT
<i>CHD1L</i> -1F	gctccgctccggatatcttgg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex1
<i>CHD1L</i> -1R	cacggcaggagcgaaggaagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex1
<i>CHD1L</i> -2F	atacgtccagtgaggttagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 2
<i>CHD1L</i> -2R	gcaagagccagttagcctgg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 2
<i>CHD1L</i> -3F	ccctgatatgcggaagtccg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 3
<i>CHD1L</i> -3R	ggaataaacttactaattacg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 3
<i>CHD1L</i> -3F_neu	gctctacgaatggattactcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 3
<i>CHD1L</i> -3R_neu	gtctacactacactctatcagc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 3
<i>CHD1L</i> -4F	acataggaactcgctctgagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 4
<i>CHD1L</i> -4R	aatctgatgaaggtagactcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 4
<i>CHD1L</i> -5F	agacagtgtgtgccactgacc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 5
<i>CHD1L</i> -5R	gtagaggactgtaaacacagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 5
<i>CHD1L</i> -6F	ggtggcatttgaatagaagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 6
<i>CHD1L</i> -6R	ggacagctgtacatgtgtggg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 6
<i>CHD1L</i> -7F	agctagtttcagcttcaacc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 7
<i>CHD1L</i> -7R	taatatcagcggctgtctcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 7
<i>CHD1L</i> -8F	ttgagtgttctcgttcttgg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 8

<i>CHD1L</i> -8R	taagatgctctgccacagtcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 8
<i>CHD1L</i> -9F	atacaattcagtgaaattgg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 9
<i>CHD1L</i> -9R	atgaatatatgagttaatacc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 9
<i>CHD1L</i> -9F_neu	aggttagtataggttcaaagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 9
<i>CHD1L</i> -9R_neu	agccagaagggatattaccgg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 9
<i>CHD1L</i> -10F	gtgtaattggtgtaagcagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 10
<i>CHD1L</i> -10R	agtcacagagaaggcagaacc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 10
<i>CHD1L</i> -11F	aggcagtctataaatcatacg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 11
<i>CHD1L</i> -11R	gttctgaataatggttctcacc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 11
<i>CHD1L</i> -12F	ctgtgcctgtatatggaagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 12
<i>CHD1L</i> -12R	acattcaatagtaacctcacc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 12
<i>CHD1L</i> -13F	ggtccattgaaggatgaagc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 13
<i>CHD1L</i> -13R	gagtcaatagcacagatgagc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 13
<i>CHD1L</i> -14F	cgagttctctctaacaagtgc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 14
<i>CHD1L</i> -14R	aaggaacaaatgtgtagctgg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 14
<i>CHD1L</i> -15F	ctgcctgttcattagagaagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 15
<i>CHD1L</i> -15R	agcaagtcttaacagtgtgc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 15
<i>CHD1L</i> -16F	cacattcttcagtgtcagtgg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 16
<i>CHD1L</i> -16R	taattataataacatttcagc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 16
<i>CHD1L</i> -16F_neu	ttccttcatatggacttagcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 16
<i>CHD1L</i> -16R_neu	ttatttctgacaaatcatcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 16
<i>CHD1L</i> -17F	atgcagggtgtgtggagatgc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 17
<i>CHD1L</i> -17R	attctgttaccaataggaacc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 17
<i>CHD1L</i> -18F	tgtagtcaggaagcagttagc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 18
<i>CHD1L</i> -18R	aatgattctggaatatctcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 18
<i>CHD1L</i> -19F	aagtccaacctgtgatattcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 19
<i>CHD1L</i> -19R	tttatgacagaattcagttcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 19
<i>CHD1L</i> -20F	cagctaagaggttgactgagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 20

<i>CHD1L</i> -20R	tcagcctccagaactataagg	14 Ergebnisse, 3 auf Chromosom 1
<i>CHD1L</i> -21F	tgctgttcaggcatagcatcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 21
<i>CHD1L</i> -21R	ggctatatgactacaagacgg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 21
<i>CHD1L</i> -22F	tgtatttcagaactgttagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 22
<i>CHD1L</i> -22R	ttctttgtctcactgaagagg	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 22
<i>CHD1L</i> -23F	atatcgtgagagaattaaagc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 23
<i>CHD1L</i> -23R	aaagagacaatttctgaggcc	Nur eine Sequenz, eindeutig für <i>CHD1L</i> , Ex 23

3.2.2 Etablierung der Amplifikations- und Sequenzier-PCR mit den entworfenen Primerpaaren an Kontroll-DNA

Die PCR wurde bei allen Primerpaaren zunächst an Kontroll-DNA mit dem aus folgenden Schritten bestehenden Programm *TwoStep 60* im Thermocycler durchgeführt: Prädenaturierung, 15 Zyklen aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation bei einer *Annealing*-Temperatur von 60°C und 20 Zyklen Denaturierung, *Annealing* und Elongation bei einer *Annealing*-Temperatur von 58°C sowie einer abschließenden Polymerisierungsphase. Bei der folgenden Agarosegelelektrophorese konnten diese Bedingungen bei den zunächst ausgewählten Primern für die Exons 3, 9, 16 und 18 nicht angenommen werden, da keine Bande sichtbar war und damit keine Amplifikation stattgefunden hatte. Für die Vervielfältigung der restlichen Exons konnten die ausgewählten Primerpaare und das Temperaturprofil *TwoStep 60* angenommen werden.

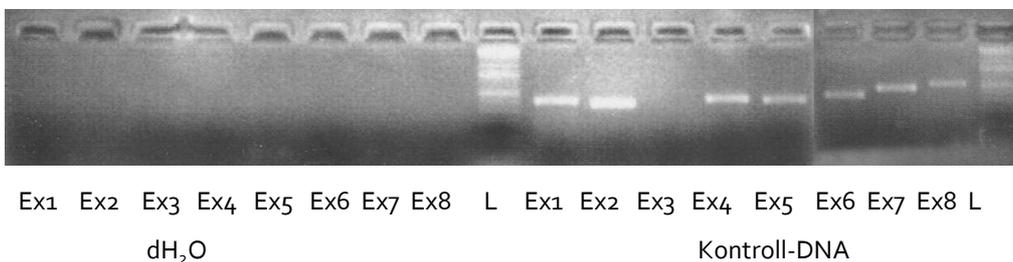


Abb. 6 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifikation von *CHD1L* Exon 1-8 an Kontroll-DNA, *TwoStep 60*.

Für Exon 3 zeigte sich keine Bande bei PCR an Kontroll-DNA, womit keine Amplifikation der Zielsequenz stattgefunden hatte. Die ausgewählten Primer für Exon 3 konnten unter den gewählten Bedingungen nicht eingesetzt werden. Die Negativkontrolle mit dH₂O wies keine Verunreinigung auf. L, 2-log DNA-Standard.

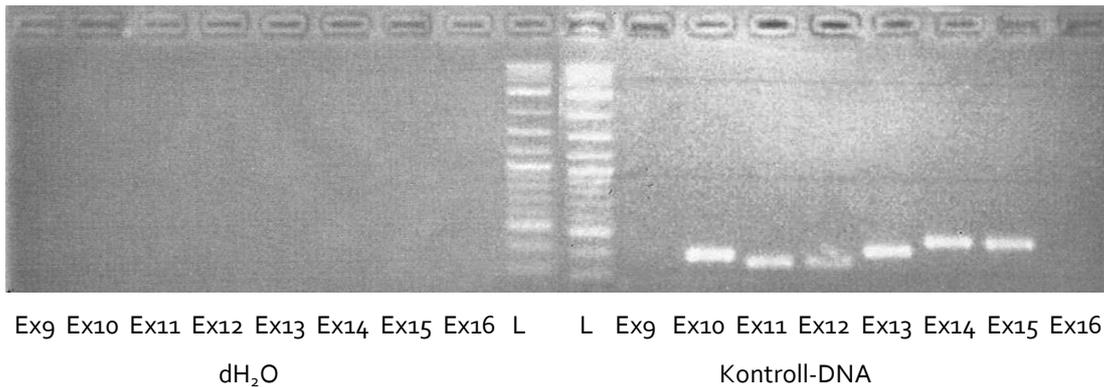


Abb. 7 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifikation von *CHD1L* Exon 9-16 an Kontroll-DNA, *TwoStep 60*.

Für Exon 9 und Exon 16 zeigte sich keine Bande bei Einsatz der Kontroll-DNA, womit keine Amplifikation der Zielsequenz stattgefunden hatte. Die ausgewählten Primer für Exon 9 und Exon 16 konnten unter den gewählten Bedingungen nicht eingesetzt werden. Die Negativkontrolle dH₂O weist keine Verunreinigung auf. L, 2-log DNA-Standard.

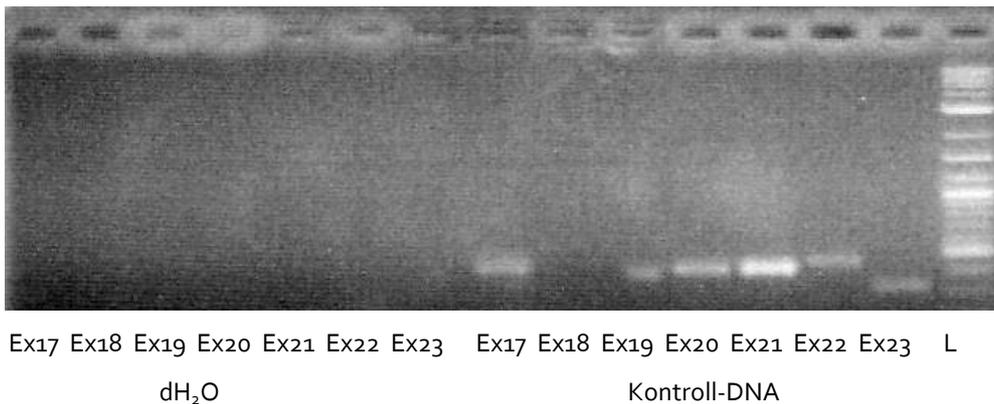


Abb.8 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifikation von *CHD1L* Exon 17-23 an Kontroll-DNA, *TwoStep 60*.

Für Exon 18 zeigte sich keine Bande bei Einsatz der Kontroll-DNA, womit keine Amplifikation der Zielsequenz stattgefunden hatte. Die ausgewählten Primer für Exon 18 konnten unter den gewählten Bedingungen nicht eingesetzt werden. Die Negativkontrolle dH₂O weist keine Verunreinigung auf. L, 2-log DNA-Standard.

Die PCR für die Exons 3, 9, 16 und 18 wurde zunächst unter Umstellung auf das Temperaturprofil *TwoStep 58*, also einer niedrigen *Annealing*-Temperatur von 58°C in den 15 ersten Zyklen und einer Erniedrigung der *Annealing*-Temperatur um 2°C in den 20 folgenden Zyklen, wiederholt. Für Exon 18 war diese Modifikation erfolgreich, da sich nun ein Produkt in der Gelelektrophorese zeigte.

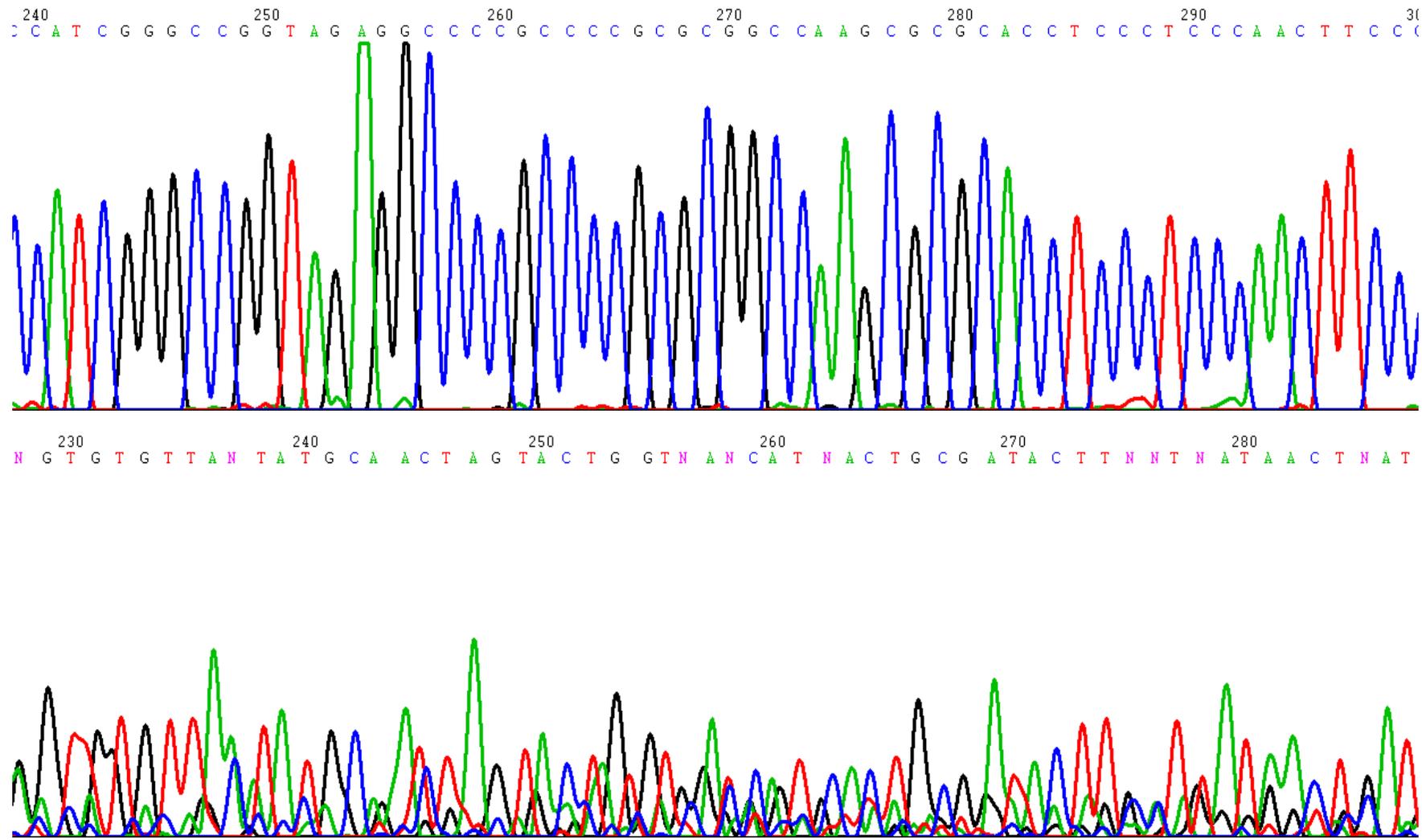


Abb. 10 Ausschnitt der mit R-Primer (oben) und F-Primer (unten) generierten Elektropherogramme von *CHD1L*, Exon 1 an Kontroll-DNA, unter Einsatz des Vorwärts (F) - und Rückwärts-Primers (R).

Aufgrund der deutlich besseren Auswertbarkeit des Elektropherogramms wird zur Sequenzanalyse des Patientenkollektivs der R-Primer eingesetzt. Tabelle 7 fasst für jedes Exon das geeignete PCR-Temperaturprofil sowie den ausgewählten Primer zusammen.

Tab. 7: Geeignete PCR-Temperaturprofile und Primer zur Sequenzanalyse des jeweiligen Exons.

Exon	PCR-Temperaturprofil	Sequenzier-Primer
1	<i>TwoStep 60</i>	R
2	<i>TwoStep 60</i>	F und R
3	<i>TwoStep 60</i>	F und R
4	<i>TwoStep 60</i>	F und R
5	<i>TwoStep 60</i>	F und R
6	<i>TwoStep 60</i>	F und R
7	<i>TwoStep 60</i>	R
8	<i>TwoStep 60</i>	F und R
9	<i>TwoStep 60</i>	R
10	<i>TwoStep 60</i>	F und R
11	<i>TwoStep 60</i>	F und R
12	<i>TwoStep 60</i>	F und R
13	<i>TwoStep 60</i>	F
14	<i>TwoStep 60</i>	F
15	<i>TwoStep 60</i>	F und R
16	<i>TwoStep 58</i>	F
17	<i>TwoStep 60</i>	R
18	<i>TwoStep 58</i>	F
19	<i>TwoStep 60</i>	F und R
20	<i>TwoStep 60</i>	F und R
21	<i>TwoStep 60</i>	F und R
22	<i>TwoStep 60/ TwoStep 58</i>	R
23	<i>TwoStep 60/ TwoStep 58</i>	F und R

F, Vorwärts-Primer; R, Rückwärtsprimer

3.3 Molekulargenetische Sequenzanalyse des Patientenkollektivs

Insgesamt wurde bei 85 Patienten mit CAKUT-Phänotyp eine Sequenzanalyse des *CHD1L*-Gens durchgeführt. Zunächst erfolgte die Untersuchung der gesamten kodierenden Region einschließlich der Exon-Intron-Grenzen sowie der 5' und 3'UTR des *CHD1L*-Gens bei 61 Patienten, bei denen eine oder mehrere Fehlbildungen aus dem CAKUT-Spektrum diagnostiziert worden waren. Es konnten drei heterozygote Missense-Varianten bei drei unterschiedlichen Patienten detektiert werden. Die bislang nicht beschriebenen Varianten liegen in Exon 18, Exon 19 und Exon 21, und kodieren für Aminosäuren innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der C-terminal lokalisierten Makrodomäne des CHD1L-Proteins.

3.3.1 Die detektierten heterozygoten Missense-Varianten des *CHD1L*-Gens

Bei Patient 1 wurde ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Position 2098 in Exon 18 von *CHD1L*, kurz vor Beginn der Makrodomäne von *CHD1L*, gefunden. In der Aminosäuresequenz wurde dadurch Glycin (Gly, kodiert durch GGG), eine unpolare Aminosäure durch Arginin (Arg, kodiert durch AGG), einer geladenen, basischen Aminosäure ersetzt (c.2098G>A; p.Gly700Arg). Diese Missense-Variante konnte in 124 Blutspenderkontrollen (248 Kontrollchromosomen) nicht identifiziert werden.

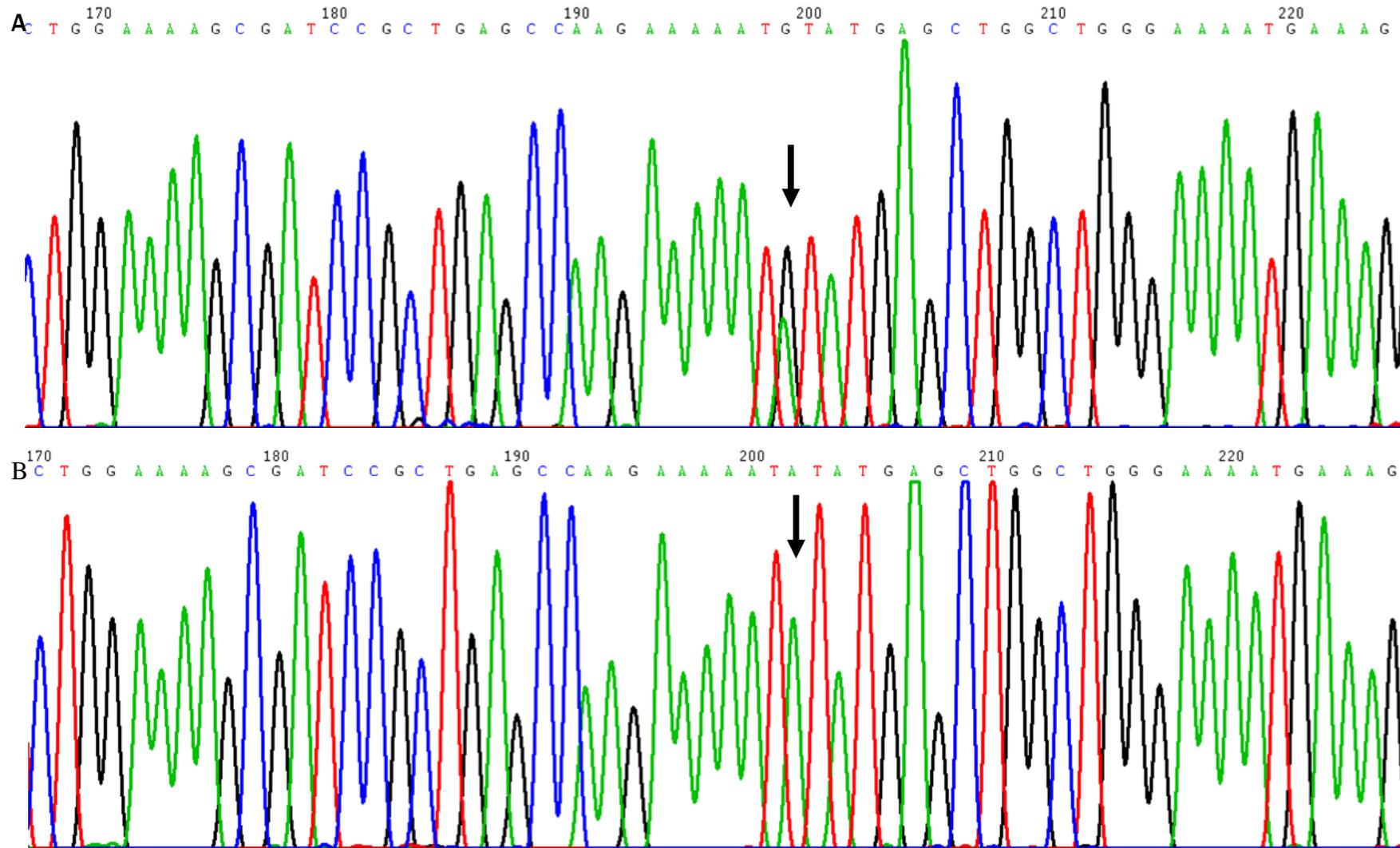


Abb. 11 Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 18 des *CHD1L*-Gens.

(A) Patient 1 weist kurz vor der Makrodomäne die heterozygote Variante c.2098G>A; p.Gly700Arg auf. (B) Wildtyp-Sequenz.

Der Pfeil kennzeichnet die betroffene Position.

Patient 2 wies einen heterozygoten Basenaustausch von Adenin zu Guanin an Position 2295 in Exon 19 innerhalb der Makrodomäne auf. Hierdurch fand ein Aminosäureaustausch von Isoleucin (Ile, kodiert durch ATA), einer unpolaren aliphatischen Aminosäure, zu Methionin (Met, kodiert durch ATG), einer unpolaren, schwefelhaltigen Aminosäure statt (c.2295A>G; p.Ile765Met). Bei einer von 121 untersuchten Kontrollpersonen (242 Kontrollchromosomen) wurde dieser heterozygote Basenaustausch ebenfalls gefunden.

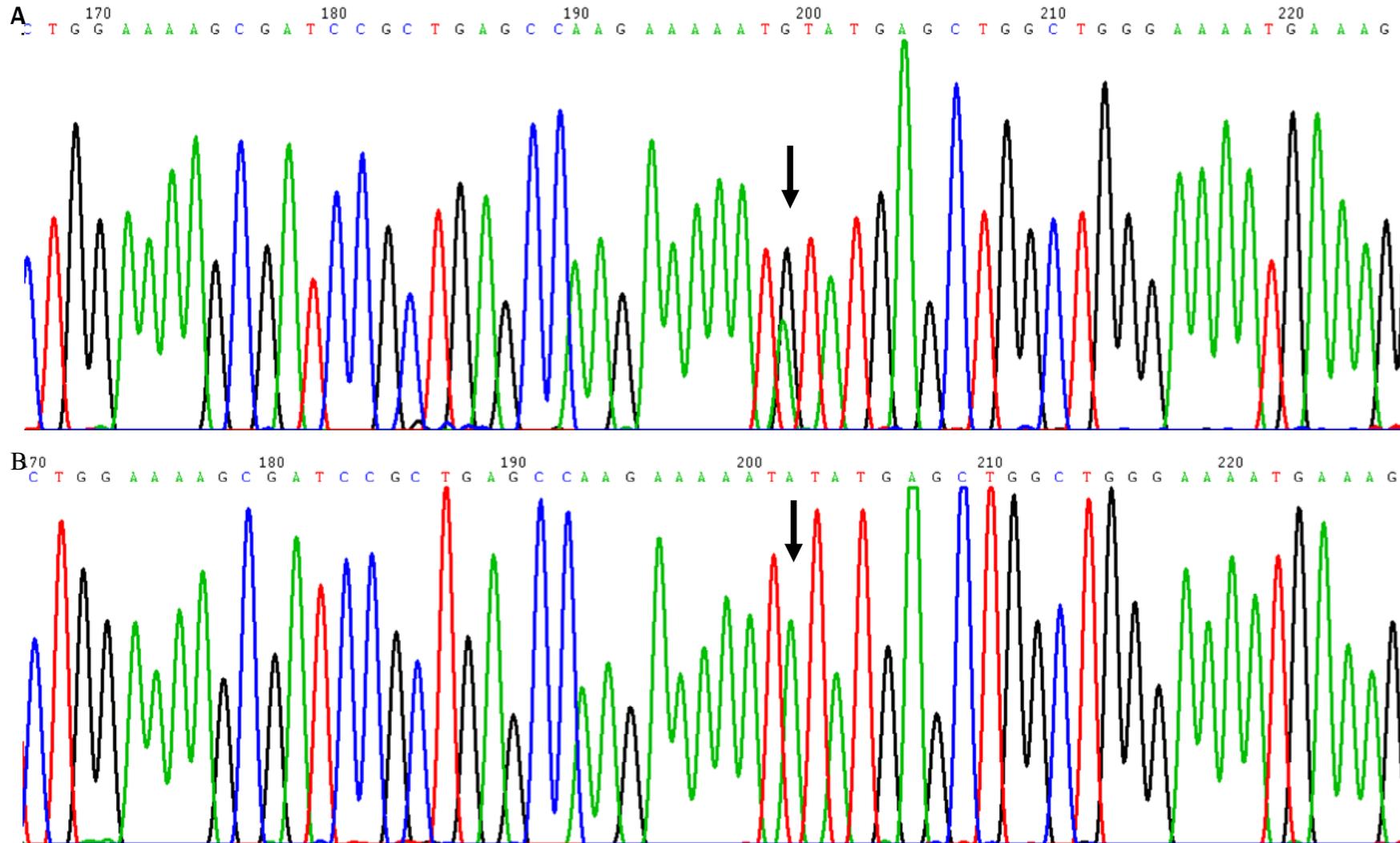


Abb. 12 Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 19 des *CHD1L*-Gens.

(A) Patient 2 weist innerhalb der Makrodomäne die heterozygote Variante c.2295A>G; p.Ile765Met auf. (B) Wildtyp-Sequenz.

Der Pfeil kennzeichnet die betroffene Position.

Der bei Patient 3 vorliegende Austausch von Adenin zu Guanin an der Nukleotidposition 2479 in Exon 21 führt dazu, dass auf Proteinebene in der Makrodomäne Isoleucin (Ile, kodiert durch ATA) durch Valin (Val, kodiert durch GTA) ersetzt wird (c.2479A>G; p.Ile827Val). Sowohl Isoleucin als auch Valin gehören zur Gruppe der unpolaren, aliphatischen Aminosäuren. In der Untersuchung der DNA von 105 Kontrollpersonen (210 Kontroll-Chromosomen) war diese Variante nicht nachweisbar.

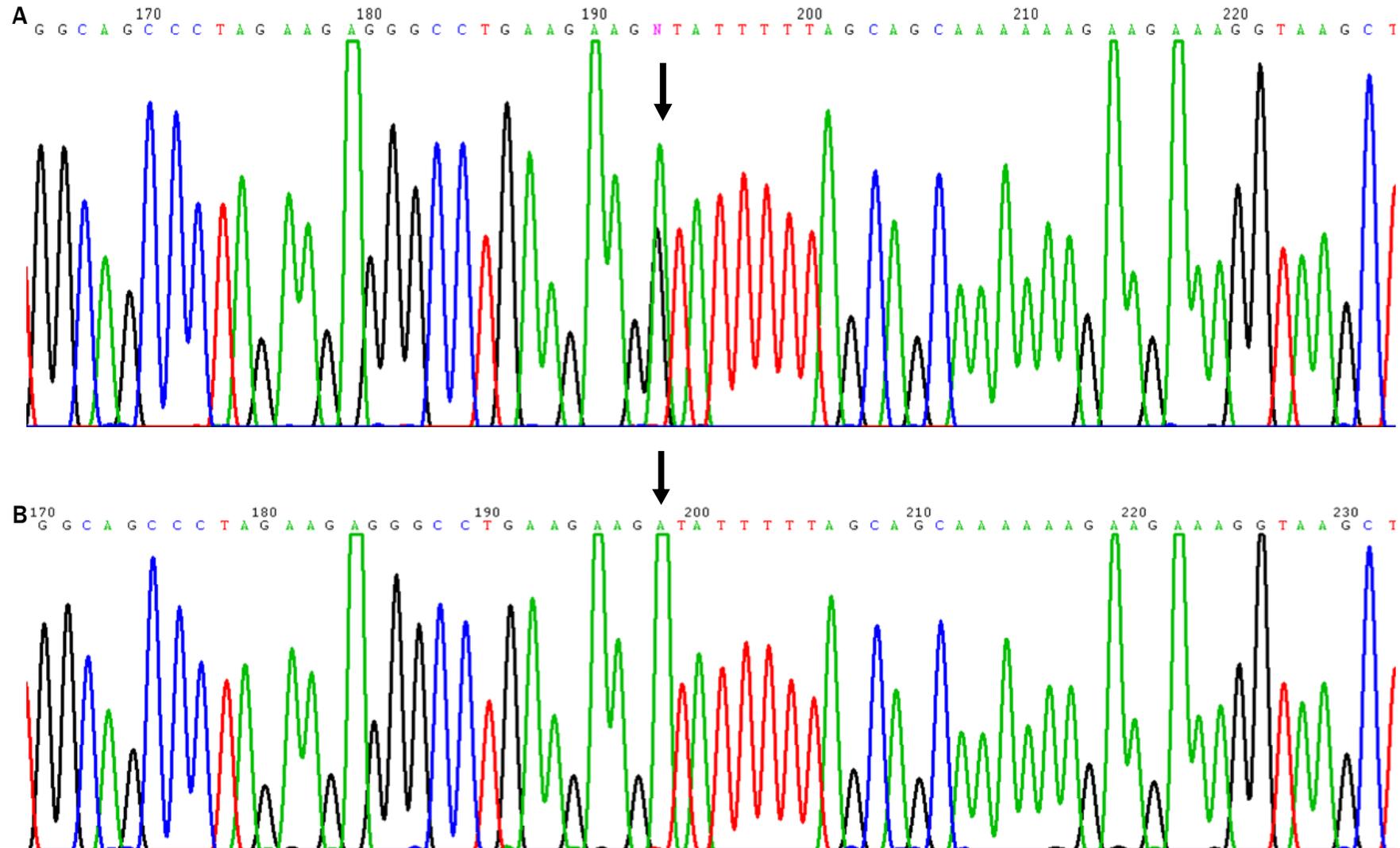


Abb. 13 Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 21 des *CHD1L*-Gens.

(A) Patient 3 weist innerhalb der Makrodomäne die heterozygote Missense-Variante c.2479A>G; p.Ile827Val auf. (B) Wildtyp-Sequenz. Der Pfeil kennzeichnet die betroffene Position.

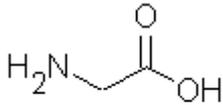
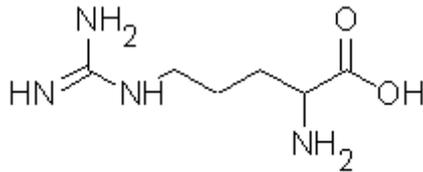
Patient 1, Exon 18

Position c.2098, p.700 (unmittelbar vor der Makrodomäne)

Gly→ Arg (Glycin zu Arginin)

Unpolare Aminosäure zu geladener, basischer Aminosäure

248 Kontroll-Chromosomen, ohne Nachweis dieser Missense-Variante

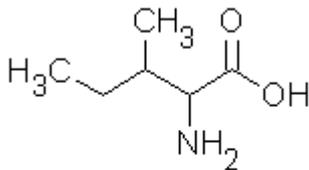
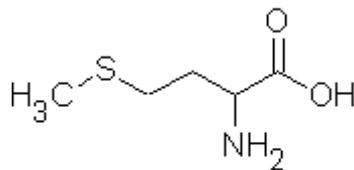
**Glycin (Gly)****Arginin (Arg)****Patient 2, Exon 19**

Position c.2295, p.765 (innerhalb der Makrodomäne)

Ile→ Met (Isoleucin zu Methionin)

Unpolare, aliphatische Aminosäure zu unpolarer, schwefelhaltiger Aminosäure

In einer von 242 Kontroll-Chromosomen Nachweis dieser Missense-Variante

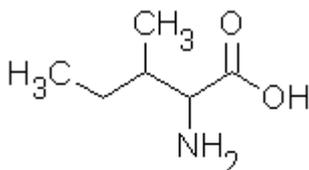
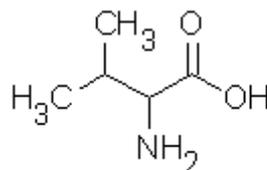
**Isoleucin (Ile)****Methionin (Met)****Patient 3, Exon 21**

Position c.2479, p.827 (innerhalb der Makrodomäne)

Ile→ Val (Isoleucin zu Valin)

Unpolare, aliphatische Aminosäure zu unpolarer, aliphatischer Aminosäure

210 Kontroll-Chromosomen, ohne Nachweis dieser Missense-Variante

**Isoleucin (Ile)****Valin (Val)****Abb. 14** Detektierte Missense-Varianten in *CHD1L* mit Darstellung des jeweiligen Aminosäureaustauschs.

3.3.2 Fallberichte der Patienten mit detektierter Missense-Variante im *CHD1L*-Gen und Familienuntersuchungen

Patient 1, bei dem eine Missense-Mutation in Exon 18 des *CHD1L*-Gens detektiert werden konnte (Abbildung 15), ist das erste Kind gesunder und nicht konsanguiner Eltern. Die Familienanamnese bezüglich Anomalien der Niere oder ableitenden Harnwege ist unauffällig. Im pränatalen Ultraschall wurden bei dem Jungen keine Anomalien festgestellt. Bei der Geburt lagen das Gewicht von 3750 g und die Körpergröße von 50 cm im Normbereich. Es zeigten sich keine Dysmorphiezeichen. Mit 4 Monaten wurde der Patient in der Kinderklinik der Universität Bern, Schweiz erstmalig wegen eines fieberhaften Harnwegsinfektes vorstellig. Einen Monat später wurde im Rahmen der weiteren Ursachenabklärung durch eine Nierenultraschalluntersuchung eine Hypoplasie der rechten Niere und mittels Miktionszystourethrogramm (MCU) ein vesikoureteraler Reflux (VUR) Grad III-IV rechts und Grad II links diagnostiziert. Unter der daraufhin angesetzten Antibiotikaprophylaxe (Cotrimoxazol 1mg/kg Körpergewicht), die der Junge bis zu seinem dritten Lebensjahr erhielt, traten keine weiteren Harnwegsinfekte auf. Im Alter von 3 Jahren wurde zur Beurteilung von Nierenfunktion und Parenchymschäden bei Vesikoureteralem Reflux eine Szintigraphie mit ^{99m}Tc-DMSA (Dimercapto-Succinsäure) durchgeführt. Hier zeigte sich eine vergleichbare Funktion von linker und rechter Niere sowie beidseitig eine Narbenbildung an den oberen Nierenpolen. Bei einem erneuten Nierenultraschall mit 6 Jahren wurde das Volumen der hypoplastischen Niere mit 34 ml (< 3. Perzentile) bestimmt und eine kompensatorische Hypertrophie der linken Niere mit einem Volumen von 100 ml (> 97. Perzentile) diagnostiziert. Die Urinuntersuchung zeigten keine Auffälligkeiten, insbesondere wurde keine Leukosurie, Erythrozyturie, Glukosurie oder Proteinurie nachgewiesen. Eine Hypertonie bestand nicht. Der Patient zeigte eine normale psychomotorische und körperliche Entwicklung.

In den während der Schwangerschaft durchgeführten Nierenultraschalluntersuchungen wurden bei der Mutter keinerlei Auffälligkeiten gefunden. Eine sonographische Untersuchung des Vaters sowie eine Sequenzanalyse der Eltern waren aufgrund fehlenden Einverständnisses nicht durchführbar (n.d.) (Abbildung 15).

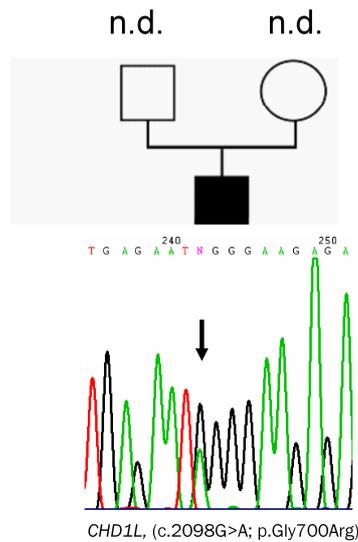


Abb. 15 Stammbaum Patient 1.

Bei Patient 1, der eine Hypoplasie der rechten Niere, eine kompensatorische Hypertrophie der linken Niere sowie einen VUR beidseits (rechts Grad III-IV, links Grad II) aufweist, wurde eine heterozygote Missense-Variante in Exon 18 von *CHD1L* identifiziert. Die Eltern standen für Sequenzanalysen nicht zur Verfügung. Bei beiden Elternteilen war kein CAKUT-Phänotyp bekannt.

Bei Patient 2 wurde eine Missense-Variante in Exon 19 des *CHD1L*-Gens nachgewiesen (Abbildung 16). Er wurde nach einer komplikationslosen Schwangerschaft im Kosovo als Sohn gesunder und nicht verwandter Eltern geboren. Im ersten Lebensjahr erkrankte der Patient mehrmals an fieberhaften Harnwegsinfektionen. Die daraufhin durchgeführte diagnostische Abklärung ergab das Vorliegen bilateraler Hydronephrosen aufgrund obstruktiver Megaureteren, also einen schweren CAKUT-Phänotyp. Mit 18 Monaten wurde bei dem Jungen eine bilaterale perkutane Nephrostomie angelegt. Im weiteren Verlauf litt der Patient unter wiederkehrenden Harnwegsinfektionen, die ein Jahr später im Alter von zweieinhalb Jahren zur Nephrektomie links führten. Nach dem Umzug nach Deutschland wurde bei dem 5-jährigen Jungen auf der rechten Seite eine Ureterkutaneostomie durchgeführt. Diese angelegte Harnleiter-Haut-Fistel erlaubt eine inkontinente Harnableitung. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine fortgeschrittene chronische Niereninsuffizienz mit einer geschätzten glomerulären Filtrationsrate (GFR) von 23 ml/min/1,73 m² (Normwert GFR: 120 ml/min/1,73 m²), einer schweren renalen Osteodystrophie, einhergehend mit einer Rachitis, sowie einer

Wachstumsstörung des Kindes (Größe 14 cm < 3. Perzentile). Als Folge wiederholter und längerfristiger künstlicher Beatmung entwickelte der Patient zudem eine subglottische Stenose. Außerdem wurde bei dem Jungen ein einseitiger Kryptorchismus diagnostiziert. Durch die Ureterkutaneostomie konnte die Zahl weiterer Harnwegsinfekte reduziert und die Nierenfunktion zunächst aufrechterhalten werden. Mit 13 Jahren musste jedoch eine Dialysetherapie eingeleitet werden. Im Zuge der Nierentransplantation zum Ersatz der rechten Niere, die mit 16 Jahren durchgeführt wurde, entfernte man die rechte Niere samt vorliegendem Megaureter. Bei der anschließend durchgeführten Histologie zeigten sich im Lichtmikroskop nach HE-Färbung eine chronische Nephritis, eine Hydronephrose, eine Nierenatrophie und eine chronische Urethritis. Bei der letzten Wiedervorstellung des Patienten im Alter von 17 Jahren konnte die transplantierte Niere als gut funktionierend eingestuft werden.

In der Nierensonographie zeigten beide Elternteile eine normale Morphologie der Niere. Bei der Mutter des Patienten wurde die entsprechende Missense-Variante in Exon 19 ebenfalls identifiziert. Der Vater des Jungen wies an dieser Position keine Basensubstitution auf.

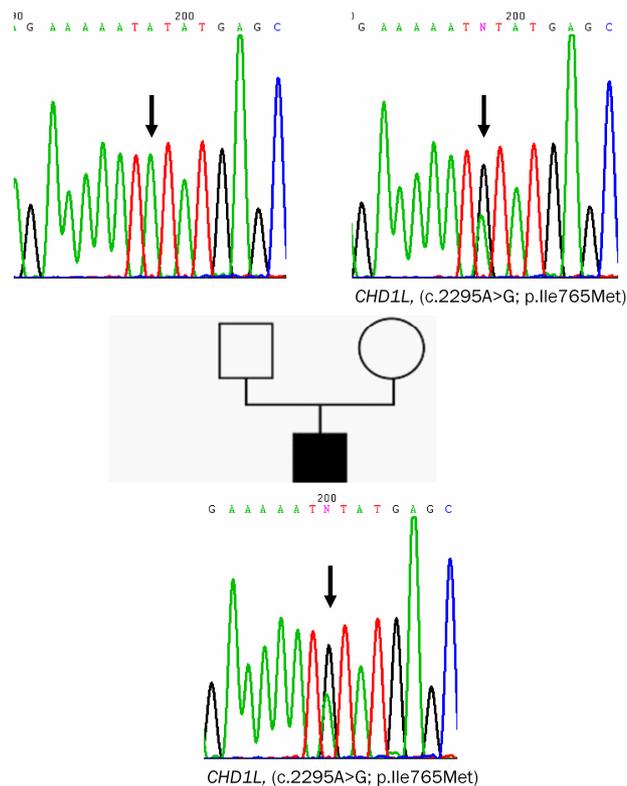


Abb. 16 Stammbaum Patient 2.

Bei Patient 2, bei dem eine bilaterale Hydronephrose aufgrund obstruktiver Megaureteren vorlag, wurde eine heterozygote Missense-Variante in Exon 19 des *CHD1L*-Gens (Pfeil) identifiziert. Diese war ebenfalls bei der Mutter, die im Ultraschall eine normale Nierenmorphologie aufwies, nachweisbar (Pfeil). Der Vater, bei dem der Nierensonographie ebenfalls normal war, zeigte an dieser Position eine Wildtypsequenz.

Patient 3 zeigt eine Missense-Variante in Exon 21 des *CHD1L*-Gens (Abbildung 17). Wegen einer schweren metabolischen Azidose und Niereninsuffizienz wurde der Junge drei Wochen nach seiner Geburt in der Klinik vorgestellt. Die Diagnose wurde aufgrund eines erhöhten Serum-Kreatininwert von 157 $\mu\text{mol/l}$ (Normwert Serum-Kreatinin: 22-55 $\mu\text{mol/l}$ für Kinder) und einer GFR von 17 ml/min/1,73 m^2 gestellt. In der durchgeführten Nierensonographie wurde eine bilaterale renale Hypodysplasie diagnostiziert. Mittels MCU zeigte sich kein vesikoureteraler Reflux, extrarenale Organmanifestationen waren nicht nachweisbar. Im Alter von 12 Monaten wurden mittels Zystoskopie im hinteren Teil der Harnröhre Urethralklappen detektiert, welche eine membranöse Stenose der Urethra zur Folge hatten. Daneben konnte der Befund einer Balkenblase als Folge der Abflussbehinderung erhoben werden. Die Urethralklappen in der Harnröhre wurden exzidiert. Im Verlauf der nächsten 8 Jahre war eine progrediente

Verschlechterung der Nierenfunktion bei einer GFR von 7 ml/min/1,73 m² zu erkennen, so dass schließlich im Alter von 9 Jahren die Peritonealdialyse als Nierenersatzverfahren eingesetzt werden musste. Mit 10 Jahren erhielt der Patient die Niere eines Lebendorganspenders. Das Transplantat war unmittelbar funktionstüchtig.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass der Vater des Patienten ebenfalls Träger dieser Missense-Variante ist. Bei der Sequenzanalyse der Mutter war diese Variante nicht nachweisbar (Abbildung 17.).

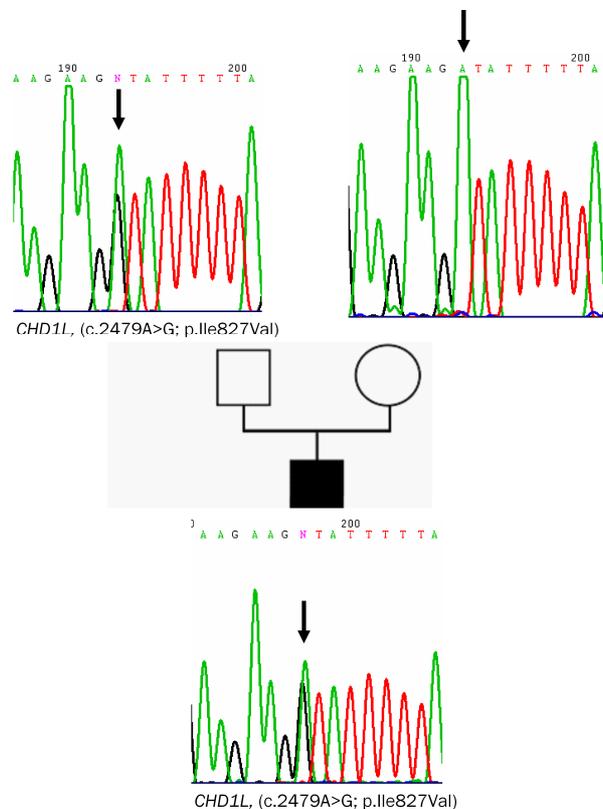


Abb. 17 Stammbaum Patient 3.

Patient 3, bei dem eine bilaterale renale Hypodysplasie aufgrund von Urethraklappen vorlag, wies eine heterozygote Missense-Variante in Exon 21 des *CHD1L*-Gens auf. Diese Variante war auch bei dem Vater nachweisbar, während die Mutter an dieser Position eine Wildtypsequenz hatte. Die Eltern standen für Ultraschalluntersuchungen der Niere nicht zur Verfügung.

3.3.3 Sequenzanalyse des *CHD1L*-Gens am erweiterten Patientenkollektiv

Die Exons 18, 19 und 21 von *CHD1L* sowie deren flankierende Intronbereiche wurden nach der Identifizierung von heterozygoten Missense-Varianten in diesen Exons bei weiteren CAKUT-Patienten analysiert, von denen nicht genügend DNA zur Analyse des gesamten Gens vorlag. Eine Sequenzanalyse von Exon 18 wurde an 24 zusätzlichen Patienten mit CAKUT-Phänotyp vorgenommen. Die DNA von 23 dieser Patienten konnte auch auf Mutationen in Exon 19 hin analysiert werden. 14 der Patienten konnten darüber hinaus auf einen Basenaustausch in Exon 21 hin untersucht werden. Hierbei wurde bei keinem der Patienten eine der vorher identifizierten heterozygoten Missense-Variante und auch keine andere Variante entdeckt.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die molekulargenetische Sequenzanalyse von *CHD1L* an 85 Patienten durchgeführt, die unterschiedliche CAKUT-Phänotypen aufwiesen. Es konnten drei unterschiedliche Punktmutationen des *CHD1L*-Gens bei je einem Patienten detektiert werden, die in Exon 18, 19 und 21 lokalisiert waren und alle einen Aminosäureaustausch zur Folge hatten (Missense-Variante). Aminosäuren werden aufgrund der Struktur ihrer Seitenketten und den sich daraus ergebenden chemischen Eigenschaften in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Die Aminosäureeigenschaften haben wiederum einen Einfluss auf die Struktur des Proteins. Ein konservativer Aminosäureaustausch bezeichnet einen Austausch von Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften. Polarität und Ladung werden hierbei nicht verändert und Folgen können unter Umständen ausbleiben, sind jedoch nicht ausgeschlossen. Beim nicht konservativen Aminosäureaustausch wird die ursprüngliche Aminosäure gegen eine Aminosäure ausgetauscht, die aufgrund ihrer Seitenkette divergierende chemische Eigenschaften besitzt. Daher kann es zu Auswirkungen auf Struktur und Funktion des Proteins bis hin zum Funktionsverlust kommen.

Kurz vor Beginn der Makrodomäne gelegen wird bei Patient 1 die unpolare Aminosäure Glycin durch die basische geladene Aminosäure Arginin ausgetauscht (c.2098G>A; p.Gly700Arg). Es handelt sich also um einen nicht konservativen Aminosäureaustausch, der Einfluss auf Struktur und Funktion des Proteins haben kann. Bei Patient 2 führt die Missense-Variante innerhalb der

Makrodomäne zum Austausch von Isoleucin zu Methionin, also einer unpolaren aliphatischen Aminosäure zu einer unpolaren schwefelhaltigen Aminosäure (c.2295A>G; p.Ile765Met). Patient 3 trägt eine Punktmutation in Exon 21. Diese führt zu einem innerhalb der Makrodomäne lokalisierten Austausch von Isoleucin zu Valin, beides unpolare aliphatische Aminosäuren (c.2479A>G; p.Ile827Val). Damit folgt aus den Punktmutationen in Exon 19 und Exon 21 ein konservativer Aminosäureaustausch. Auch für einige konservative Aminosäureersetzungen sind assoziierte Funktionseinschränkungen beschrieben worden, so dass ein Effekt auf Struktur und Funktion von CHD1L nicht auszuschließen ist. Komplexere Programme, die auf Grundlage aktueller wissenschaftlicher Ergebnisse arbeiten, erlauben eine exaktere Vorhersage zu Auswirkungen einer Mutation und dem konsekutiven Aminosäureaustausch. Dies ist zum Beispiel durch das Softwareprogramm *Polymorphism Phenotyping* (PolyPhen) möglich. Daher wurden die gefundenen Varianten mit Hilfe von PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html>) analysiert, das es erlaubt, eine Aussage über mögliche Auswirkungen eines Aminosäureaustausches auf die Struktur und Funktion humaner Proteine zu machen [Ramensky *et al.*, 2002]. Hierzu wird die Analyse nicht-synonymer SNPs (nsSNPs) herangezogen.

SNPs machen einen großen Anteil der genetischen Variabilität beim Menschen aus [Ramensky *et al.*, 2002; Sunyaev *et al.*, 2000; Sunyaev *et al.*, 2001]. Synonyme SNPs führen aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz, während die nsSNPs zu Veränderungen der Aminosäurestruktur führen [Sunyaev *et al.*, 2000]. Ein Hauptziel der Identifizierung von SNPs ist es, Risikokonstellationen für die Entstehung von humanen Phänotypen, vor allem von komplexen Erkrankungen des Menschen zu identifizieren [Sunyaev *et al.*, 2000; Sunyaev *et al.*, 2001; Ramensky *et al.*, 2002]. Bisher sind über 3 Millionen SNPs im menschlichen Genom identifiziert worden, von denen einige das Risiko für das Auftreten von z.B. Diabetes, Asthma, Lupus erythematodes, sowie psychiatrischer und kardiovaskulärer Erkrankungen modifizieren können. Beispielsweise konnte ein SNP an Position 1332 des *AGTR2*-Gens mit der CAKUT-Pathogenese assoziiert werden [Nishimura *et al.*, 1999; Yerkes *et al.*, 1998].

Die *Human Genome Variation Database* (HGVar; <http://www.gwascentral.org>) ist eine Datenbank, die relevante Informationen zu genetischen Varianten, insbesondere zu krank-

heitsassoziierten SNPs, zur Verfügung stellt. Auf Grundlage der Informationen dieser Datenbank ermöglicht PolyPhen durch die Analyse von 3D-Modellen der Proteine und der Konserviertheit in verschiedenen Spezies eine Aussage über den Einfluss des identifizierten nsSNPs auf Struktur, Stabilität und Funktionalität des Proteins [Ramensky *et al.*, 2002]. Die gefundenen Missense-Varianten in Exon 18 und Exon 19 konnten anhand des PolyPhen-Programms als wahrscheinlich oder möglicherweise schädigend eingestuft werden, während die Veränderung in Exon 21 als benigne eingestuft wurde.

Die untersuchten Patienten, bei denen eine heterozygote Missense-Variante identifiziert werden konnte, wiesen eine unilaterale renale Hypoplasie, eine bilaterale Ureterobstruktion mit Megaureteren und Hydronephrose, oder eine bilaterale renale Hypodysplasie mit vesikoureteralem Reflux und Urethralklappen als phänotypische Merkmale auf. Während der Patient mit dem unilateralen CAKUT-Phänotyp durch Hypertrophie und Funktionsübernahme durch die kontralaterale Niere eine normale Nierenfunktion vorweisen konnte, musste bei den beiden bilateral betroffenen Patienten im Alter von 9 bzw. 13 Jahren eine Nierenersatztherapie eingeleitet werden. Dies bedeutet, dass bei den Patienten mit bilateralem CAKUT trotz früher chirurgischer Therapie der Obstruktion, bei den einen Patienten durch bilaterale perkutane Nephrostomie mit 18 Monaten und Ureterkutaneostomie mit 5 Jahren und bei dem anderen Patienten durch Entfernung der Urethralklappen mit einem Jahr ein Progress des Nierenschadens nicht zu verhindern war, wie es bei anderen CAKUT-Patienten ebenfalls beobachtet werden konnte [Pope *et al.*, 1999]. Hieraus kann spekuliert werden, dass auch die identifizierten *CHD1L*-Varianten den Krankheitsverlauf beeinflussen

Die drei Träger der *CHD1L*-Varianten sind männlichen Geschlechts, womit sie zur Mehrzahl der an CAKUT erkrankten Patienten gehören [Avni *et al.*, 1992; Coret *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1977; Najmaldin *et al.*, 1990; Ring *et al.*, 1993; Risdon *et al.*, 1993]. X-chromosomal vererbte Mutationen zeigen eine stärkere phänotypische Ausprägung beim männlichen Geschlecht, da diese sich bei Männern in jeder Körperzelle manifestieren und bei Frauen bei normaler X-Inaktivierung nur in der Hälfte der Zellen. Gerade unilaterale Anomalien der Nieren und des Ureters werden oft durch X-chromosomale Mutationen, zum Beispiel in *AGTR2*, verursacht und treten generell häufiger beim männlichen Geschlecht auf [Stahl *et al.*, 2006]. Urethralklappen sind eine häufige CAKUT-Entität, die nur männliche Neugeborene betrifft.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass die in *CHD1L* identifizierten Missense-Varianten tatsächlich mit den CAKUT-Phänotypen der Patienten in Verbindung stehen, ist das Fehlen von zumindest zwei der Veränderungen in 248 bzw. 210 Kontrollchromosomen von Blutspendern, so dass von einer Frequenz von unter 1 % der gefundenen Varianten in der Normalbevölkerung ausgegangen werden kann. Die verbleibende Missense-Variante konnte in einer von 242 Kontrollchromosomen detektiert werden, wobei ein gering ausgeprägter oder kompensierter CAKUT-Phänotyp des betroffenen Blutspenders nicht auszuschließen ist.

Zwei der identifizierten Veränderungen des *CHD1L*-Gens waren auch bei jeweils einem Elternteil nachzuweisen, wobei bei einem der Elternteile ein unauffälliges Sonographieergebnis der Nieren vorlag, während eine sonographische und klinische Untersuchung des betroffenen Elternteils der anderen Familie nicht durchgeführt werden konnte. Eine Sequenzanalyse der Eltern des weiteren betroffenen Patienten war nicht möglich, so dass nicht zu eruieren war, ob es sich bei diesem um eine *de novo* Mutation im *CHD1L*-Gen handelte. Für die Interpretation dieser Ergebnisse ist von Bedeutung, dass bei familiären CAKUT unvollständige Penetranz und variable Expressivität [Limwongse *et al.*, 1999; Squiers *et al.*, 1987] beobachtet wurden. Das bedeutet, dass nicht alle Träger der Mutation erkranken und dass bei Vorliegen derselben Mutation der Grad der Ausprägung und die Art des Phänotyps variieren kann. Auch Veränderungen in anderen identifizierten Nierenentwicklungsgenen, die in der CAKUT-Entstehung eine Rolle spielen wie *PAX2*, *EYA1*, *SIX1* und *HNF1 β* , verursachen ein breites Spektrum an Malformationen mit unterschiedlichem Schweregrad bis hin zum Fehlen eines renalen Phänotyps [Bellanné-Chantelot *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006]. Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Phänotyp bei den untersuchten Eltern der Patienten mit *CHD1L*-Variante sein.

Daneben besteht die Hypothese, dass in einigen Fällen erst die Kumulation von Veränderungen mehrerer Gene zur Krankheitsentstehung führt, und ein CAKUT-Phänotyp im Sinne der Überschreitung eines Schwellenwerts zu sehen ist. Hierbei spielen *Modifier*, also weitere Nierenentwicklungsgene, die eine zusätzliche Punktmutation tragen und die klinische Variabilität innerhalb einer Familie beeinflussen, eine Rolle [Weber *et al.*, 2006]. Eine solche Oligogenie in der CAKUT-Pathogenese könnte das beobachtete phänotypische Verteilungsmuster innerhalb der von uns untersuchten Familien ebenfalls erklären. Außerdem

entgehen Minimalphänotypen teilweise den konventionellen radiologischen und klinischen Methoden Einige könnten durch eine Nierenbiopsie abgeklärt werden, jedoch bleibt diese bei fehlendem klinischen Bild aus. Bei der sonographischen Untersuchung der Eltern könnte das Vorliegen einer geringgradigen Anomalie ebenfalls übersehen worden sein. Diese Aspekte führen dazu, dass die Prävalenz der CAKUT vermutlich höher einzustufen ist, als die Zahl der Diagnosestellungen es vermuten lässt [Pope *et al.*, 1999]. Daher ist auch im Falle unserer beiden Patienten ein kausaler Zusammenhang zwischen der Missense-Variante in *CHD1L* und dem CAKUT-Phänotyp, trotz fehlendem *de novo* Auftreten und fehlendem renalen Phänotyp des die Variante tragenden Elternteils nicht auszuschließen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Punktmutationen in *CHD1L* waren der Ausgangspunkt dafür die Rolle von *CHD1L* in der Nephrogenese weiter zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurden Expressionsanalysen sowie funktionelle Untersuchungen zum Vergleich des Wildtyp-Proteins mit den abberanten Proteinen durchgeführt.

Zur näheren Untersuchung der Assoziation von *CHD1L* mit dem CAKUT-Phänotyp untersuchten wir die *CHD1L*-Expression im sich entwickelnden und adulten humanen Organismus. Hierfür wurden quantitative mRNA-Analysen von verschiedenen fetalen und adulten Geweben, unter anderem der Niere, durchgeführt (Abbildung 18). *CHD1L* wurde in allen untersuchten Geweben exprimiert. Im fetalen Gewebe konnte die höchste Expression von *CHD1L* im Gehirn beobachtet werden, gefolgt von der Expression in der Niere, dann absteigend der Muskeln, der Leber, des Thymus, der Lunge, des Herzens und der Milz. Im adulten Gewebe zeigten die Hoden die höchste *CHD1L* mRNA Expression. Eine im Vergleich hierzu um das Vierfache reduzierte Expression wurde im adulten Gehirn gemessen, gefolgt von der Expression des adulten Gewebes von Leber, Muskeln, Pankreas, Dünndarm, Ovarien, Niere, Kolon, Prostata, Plazenta, Herz und Lunge. Die geringste Expression von *CHD1L* wurde in der adulten Milz sowie den Leukozyten detektiert. Die mRNA Levels von *CHD1L* waren in der fetalen Niere viermal so hoch wie in der adulten Niere. Somit hatte die Niere unter allen untersuchten zusammengehörigen fetalen und adulten Geweben die höchste Ratio beim Vergleich der fetalen zur adulten Expression

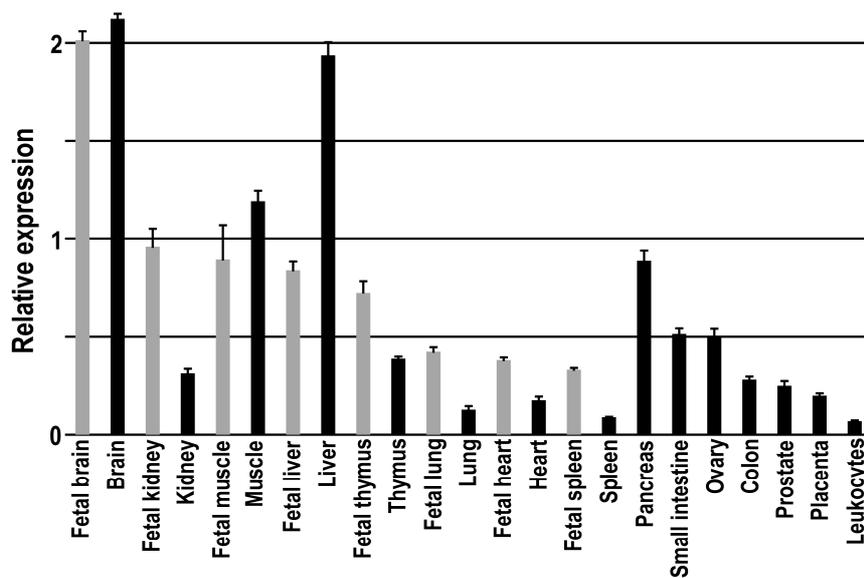


Abb. 18 mRNA Analyse verschiedener humaner fetaler und adulter Gewebe.

In allen untersuchten fetalen Geweben konnte eine *CHD1L*-Expression nachgewiesen werden. Die Niere hat nach dem Gehirn die zweithöchste *CHD1L*-Expression des fetalen Gewebes. In der fetalen Niere ist die Expression von *CHD1L* viermal so hoch wie in der adulten Niere, womit die Niere die höchste Ratio im Vergleich fetaler und adulter Gewebe aufweist. (*aus Brockschmidt et al, 2011*)

Eine immunhistochemische Untersuchung mittels *CHD1L*-spezifischer Antikörper an humanen embryonalen Nierenschnitten brachte Aufschluss über die Lokalisation der *CHD1L*-Expression während der Nierenentwicklung [Brockschmidt *et al.*, 2011]. Als erstes wurde *CHD1L* in der entstehenden Ureterknospe nachgewiesen, später zeigten auch die durch die Ureterknospe zur weiteren Differenzierung induzierten Zellen des metanephrogenen Mesenchyms eine Expression von *CHD1L*. Dagegen war der Proteinnachweis im losen undifferenzierten Mesenchym negativ. Die bisher identifizierten mit der CAKUT-Pathogenese assoziierten Gene zeichnen sich durch eine Expression im metanephrogenen Mesenchym, im Stroma, in den Angioblasten, in der Ureterknospe oder der Kloake aus [Constantini 2006; Dressler, 2009; Mendelsohn, 2009; Reidy und Rosenblum, 2009; Yossip *et al.*, 2009]. Der Nachweis der *CHD1L*-Expression in der Ureterknospe und im metanephrogenen Mesenchym spricht für eine Rolle von *CHD1L* in der Nierenentwicklung. In reiferen Strukturen der Nierenentwicklung ließ sich nur noch eine schwache *CHD1L*-Expression nachweisen.

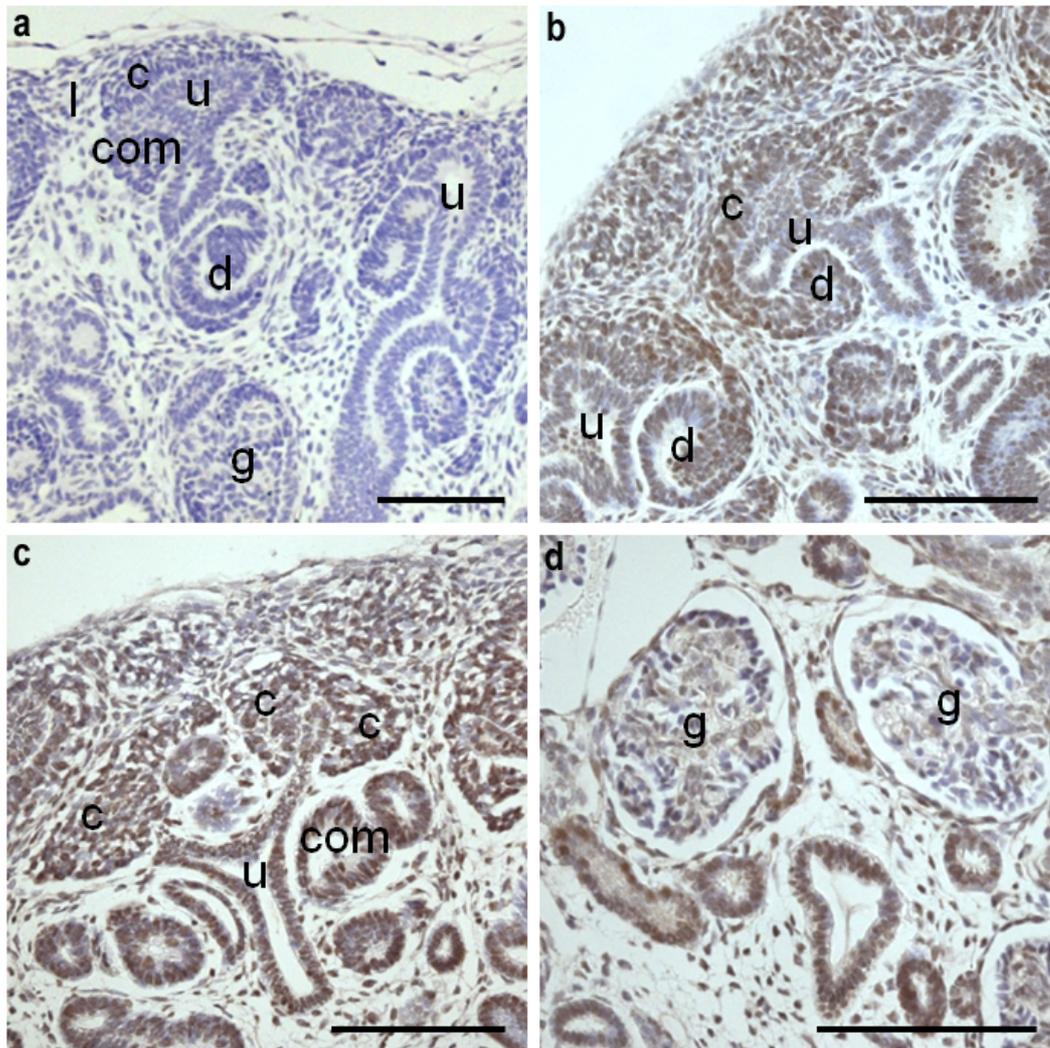


Abb. 19 Immunhistochemische Untersuchung der Lokalisation der *CHD1L*-Expression während der Nierenentwicklung von der siebten bis zur elften Woche an humanen embryonalen Nierenschnitten.

Positive immunhistochemische Signale stellen sich braun dar. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Anstelle des ersten Antiköpers wurde in den Negativkontrollen PBS eingesetzt. **a** zeigt eine Negativkontrolle (10 Wochen alte Niere), die kein Hintergrundsignal aufweist. Zu erkennen sind die sich entwickelnden Strukturen der Niere: Ureterknospe (u), loses Mesenchym (l), sowie das kondensierte Mesenchym (c), aus dem sich die späteren Nephrone formieren. Die entstehenden Nephrone durchlaufen die Stadien der Komma- und S-förmigen Körper (com), bis hin zu sich entwickelnden Glomeruli (d) und schließlich reife Glomeruli (g). **b** und **c** *CHD1L*-Färbung in der neunten bzw. elften Woche der Nephrogenese. Eine Braunfärbung und damit eine Expression von *CHD1L* findet sich in der Ureterknospe und vor allem dem kondensierten (metanephrogenen) Mesenchym, zwei wichtigen Komponenten der Nierenentwicklung. Kein Signal findet sich dagegen im losen Mesenchym. **d** In reifen Glomeruli zeigt sich keine nukleäre *CHD1L*-Expression. Die Skala entspricht 100 μm . (aus Brockschmidt et al., 2011).

Anhand des Autopsiematerials eines fünfjährigen Jungen mit normaler Nierenentwicklung konnte unter Einsatz der etablierten Tubulusmarker Megalin für das proximale Tubulussystem, Tamm-Horsfall Protein für die Henle-Schleife, sowie Aquaporin-2 für das Sammelrohrsystem gezeigt werden, dass *CHD1L* im gesamten Tubulussystem exprimiert wird, während die *CHD1L*-Expression in den Glomeruli nur gering ist. Eine *CHD1L*-Expression zeigte sich dabei vor allem im Zytoplasma und nur in sehr geringem Ausmaß im Zellkern des normalen Nierenparenchyms.

Im Vergleich dazu konnte in einer hydronephrotischen Niere ein divergierendes Expressionsmuster detektiert werden. Das Material wurde nach Nephrektomie im Zuge der Nierentransplantation von Patient 2 der vorliegenden Arbeit, der eine Variante in Exon 19 des *CHD1L*-Gens aufweist, im Alter von 16 Jahren gewonnen. Die Expression von *CHD1L* fand sich auch hier im gesamten Tubulussystem, aber war in der hydronephrotischen Niere im Vergleich zur gesunden Niere eher nukleär lokalisiert und insgesamt höher. Diese hohe nukleäre Expressionsrate, ist vergleichbar mit der in der fetalen Niere und lässt ein Fehlen der terminalen Nephrondifferenzierung bei CAKUT-Patienten vermuten. Auch im Urothel des Megaureters von Patient 2 zeigte sich analog zur fetalen Niere eine starke nukleäre Expression von *CHD1L*. Der Befund einer nukleären Expression passt zur Identifizierung von *CHD1L* als Chromatin-Remodeling-Enzym, das unter anderem das Nukleosomen-Sliding im Zellkern vereinfacht [Ahel *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009].

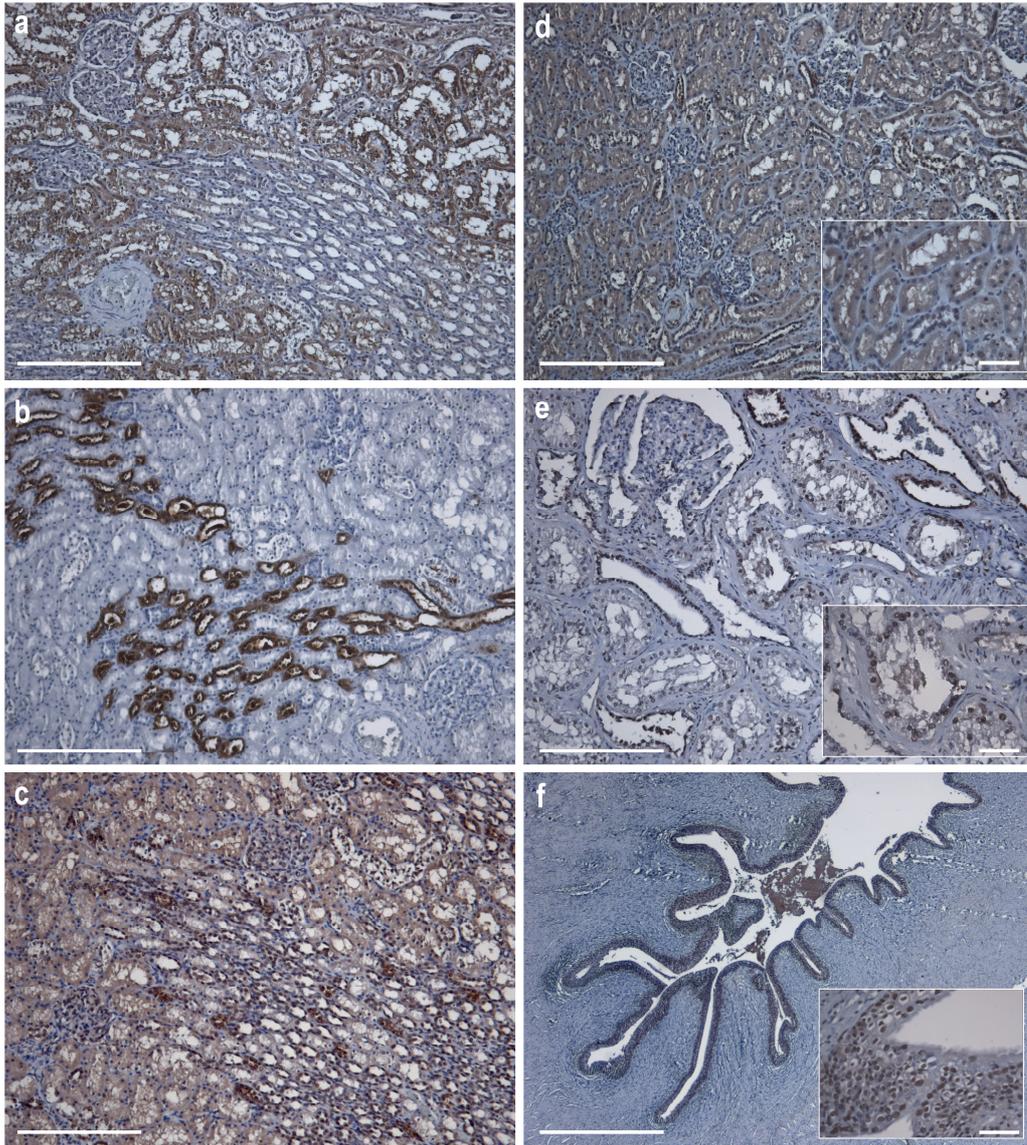


Abb. 20 Expression von CHD1L in der normalen und hydronephrotischen postnatalen Niere.

Darstellung **a** der proximalen Tubuli mittels Megalin-spezifischem Antikörper **b** der Henle-Schleife mittels Tamm-Horsfall Protein-spezifischem Antikörper, sowie **c** der Sammelrohre mittels Aquaporin-2-spezifischem Antikörper in der normalen postnatalen Niere. Die Schnitte **d-f** wurden mittels CHD1L-spezifischem Antikörper untersucht. **d** Normale Niere eines 5jährigen, mit *CHD1L*-Expression vor allem im Zytoplasma des gesamten Tubulussystems. **e** Hydronephrotische Niere und **f** Megaureter von Patient 2 der vorliegenden Arbeit der eine Missense-Variante in Exon 19 von *CHD1L* aufweist und mit 16 Jahren nephrektomiert wurde. Hier ist analog zur fetalen Niere die *CHD1L*-Expression vor allem nukleär lokalisiert, und scheint im Vergleich zur gesunden postnatalen Niere insgesamt höher zu sein.

Vergrößerung: **a-e**: 100 x (die Skala entspricht 200 μ m) **f**: 25 x (die Skala entspricht 1 mm), Vergrößerungs-ausschnitte in **d-f**: 400 x (die Skala entspricht 50 μ m). (aus Brockschmidt et al., 2011)

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Missense-Varianten in *CHD1L* haben alle drei einen Aminosäureaustausch in oder nahe der Makrodomäne des CHD1L-Proteins zur Folge (Abbildung 21).

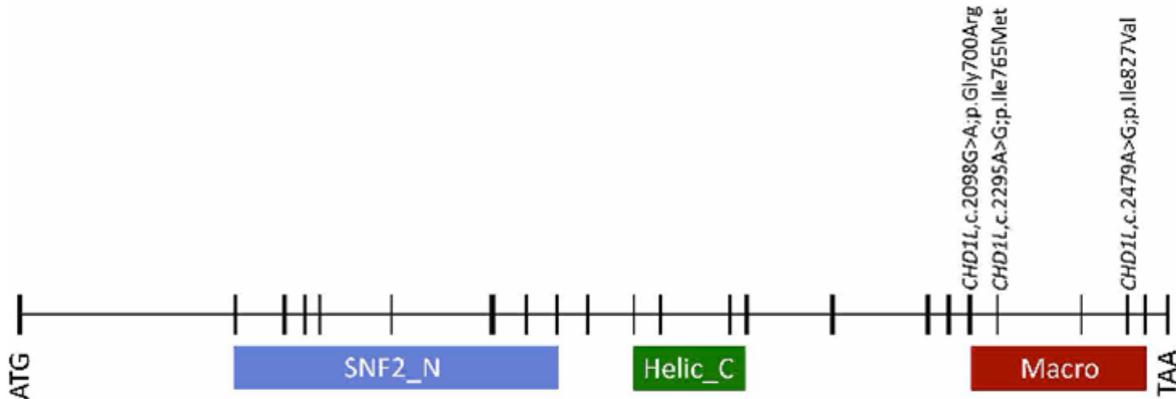


Abb. 21 Genomische Lokalisation der identifizierten Missense-Variante von *CHD1L*.

(aus Brockschmidt *et al.*, 2011)

Dies lässt vermuten, dass in Folge der detektierten Varianten die Funktion von CHD1L als Chromatin-Remodeling-Enzym eingeschränkt sein könnte, da eine intakte Makrodomäne für die Funktion der Helikase-Domäne, die am N-terminalen Ende von CHD1L lokalisiert ist und durch ATP-Hydrolyse Nukleosomen-Sliding ermöglicht, erforderlich ist [Gottschalk *et al.*, 2009]. Vor allem wird eine intakte Makrodomäne, die am C-terminalen Ende von CHD1L lokalisiert ist, für die PAR-abhängige Rekrutierung und Bindung am Ort eines DNA-Schadens sowie die chromatinassoziierte Interaktion mit dem Enzym PARP1 benötigt [Ahel *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009]. PARP1 bindet hochaffin an DNA-Einzelstrangbrüche, reguliert die Genexpression durch Bindung an eine Reihe von Promotorregionen [Krishnakumar *et al.*, 2008] und stimuliert beim Vorliegen von DNA die ATPase-Aktivität von CHD1L [Ahel *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009].

Um die Auswirkungen der drei identifizierten Veränderungen in *CHD1L*, Gly700Arg (Variante in Exon 18), Ile765Met (Variante in Exon 19) und Ile827Val (Variante in Exon 21) in Hinblick auf deren Interaktion mit PARP1 zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit c-myc-markierten Wildtyp-Konstrukten und abberanten *CHD1L*-Konstrukten transfiziert. Nach der Zelllyse wurde eine Immunopräzipitation mittels anti-c-myc-Antikörper konjugierter Agarosebeads und eine Proteintrennung durch Einsatz einer SDS-PAGE durchgeführt. Der Proteinnachweis konnte

abschließend mittels Western Blot erfolgen. Da durch die Immunopräzipitation Protein-Protein-Wechselwirkungen detektiert werden, konnte gezeigt werden, inwiefern die Interaktion zwischen PARP1 und CHD1L stattgefunden hat. Zum Nachweis von PARP1 wurde ein spezifischer PARP1-Antikörper eingesetzt, während Wildtyp und aberrantes CHD1L mit einem anti-c-myc-Antikörper nachgewiesen wurden. Die Western Blot Banden nach Immunopräzipitation zeigten nach visueller Inspektion dass die PARP1-Signale im Vergleich zu den c-myc-Signalen bei allen drei Varianten gegenüber dem Wildtyp erniedrigt waren. Die Ergebnisse des Western Blots konnten mit der NIH ImageJ Software quantifiziert werden. Hierzu wurden die Intensitäten der PARP1-Signale und die zugehörigen c-myc-Signale von Wildtyp und abberantem CHD1L bestimmt und das Verhältnis der beiden Signale wurde errechnet. Die Mittelwertberechnung aus drei unabhängigen Experimenten zeigte, dass die Interaktion zwischen PARP1 und der Variante Gly700Arg um das 1,9fache, zwischen PARP1 und der Variante Ile765Met um das 2,3fache und zwischen PARP1 und der Variante Ile827Val um das 2,2fache im Vergleich zu Wildtyp-CHD1L erniedrigt war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei den aberranten CHD1L-Proteinen, die aus den identifizierten Missense-Varianten resultieren, um hypofunktionelle Enzyme handelt.

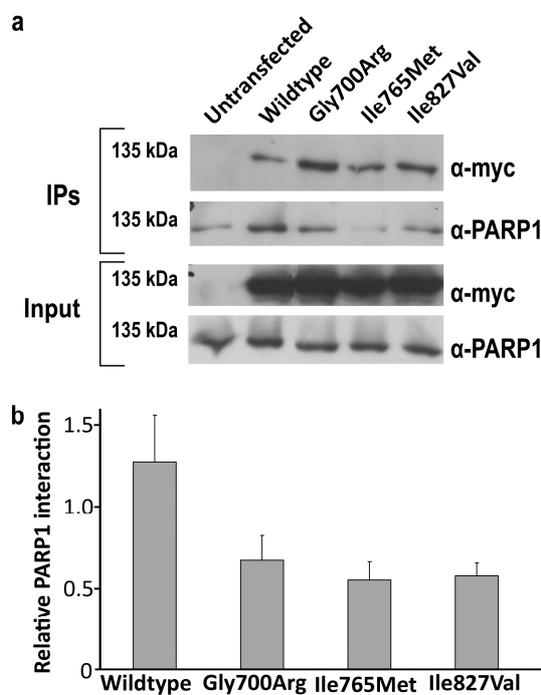


Abb. 22 Verminderung der Interaktion der abberanten CHD1L-Proteine mit PARP1.
(aus Brockschmidt et al, 2011)

Die verminderte Interaktion mit PARP₁ könnte die Chromatin-Remodeling-Funktion betreffen, wie es kürzlich für CHD₁L-Varianten gezeigt werden konnte, deren Makrodomäne deletiert war, beziehungsweise den Aminosäureaustausch Asp723Ala aufwies [Ahel *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009]. Dieser Aminosäureaustausch war interessanterweise zwischen den in dieser Arbeit identifizierten CHD₁L Abberationen Gly700Arg und Ile765Met lokalisiert. Die von Ahel *et al.*, 2009 und Gottschalk *et al.*, 2009 untersuchte Deletionsmutante der Makrodomäne, sowie die Mutante Asp723Ala innerhalb der Makrodomäne zeigten keine oder nur geringe Interaktion mit PAR und PARP₁. Daneben war die Rekrutierung zum Ort des DNA-Schadens bei der Asp723Ala Mutante stark herabgesetzt, was zumindest einen partiellen Funktionsverlust anzeigt [Ahel *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009]. Der Funktionsverlust der Makrodomäne hat auch einen Einfluss auf die ATPase Aktivität von CHD₁L, die zwar der Helikase-Domäne zugeschrieben werden kann, aber dennoch die Stimulation durch PARP₁ über eine intakte Makrodomäne zur Ausübung ihrer Funktion benötigt [Ahel *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009]. Die Beeinflussung der Chromatin-Struktur durch Chromatin-Remodeling-Enzyme ist essentiell für physiologische Differenzierungs- und Entwicklungsvorgänge, da Zeitpunkt und Lokalisationsmuster der Genexpression auf diese Weise reguliert werden [Chi *et al.*, 2004; de la Serna *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2008; Krangel *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2006]. Die identifizierten aberranten CHD₁L-Proteine könnten also für fehlerhafte Differenzierungs- und Entwicklungsvorgänge im tubulären und harnableitenden System der Niere und des Ureters, als Folge einer verminderten Funktion von CHD₁L in der Chromatinmodulierung, verantwortlich sein. Hierbei könnte eine gestörte Chromatin-Remodeling-Funktion eine Expressionsveränderung von wichtigen Faktoren der Nierenentwicklungen, wie zum Beispiel dem *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) bedingen. Dieser Wachstumsfaktor, der zur TGFβ- (*transforming growth factor beta*) Familie gehört [Lin *et al.* 1993], wird im metanephrogenen Mesenchym exprimiert und vermittelt das Signal zur Aussprossung der Ureterknospe am Wolff-Gang [Schuchardt *et al.*, 1996; Chi *et al.*, 2009] über den Transmembranrezeptor c-ret, der Tyrosinkinaseaktivität besitzt, und den *glycosyl-phosphatidylinositol-anchored co Rezeptor* Gfra 1-4 [Batourina *et al.*, 2001; Eng *et al.*, 1998; Sainio *et al.*, 1997; Takahashi M., 2001; Tang *et al.*, 2002], die am Ort der regelhaften Knospung lokalisiert sind. Außerdem wird durch die GDNF/gfra₁/c-ret-Achse die weitere

Differenzierung der Ureterknospe induziert [Stahl *et al.*, 2006]. Daneben könnten sich aberrante CHD1L-Proteine auch auf das Expressionsmuster von regulierenden Faktoren der GDNF/gfra1/c-ret-Achse, wie etwa PAX2, EYA1, SIX1 oder WNT11, auswirken. Als Folge der beschriebenen fehlerhaften Expressionsmuster dieser und anderer bekannter Nierenentwicklungsfaktoren könnte es zu einer gestörten Interaktion zwischen Ureterknospe und metanephrogenen Gewebe, zwei wichtigen Komponenten der Nierenentwicklung kommen, die einer renalen Hypodysplasie zu Grunde liegen kann [reviewed in Song und Yosypiv, 2010].

Ein Hinweis darauf, dass Mutationen in Chromatin-Remodeling-Enzymen in kausalem Zusammenhang mit Malformationen der Niere und der ableitenden Harnwege stehen können, liefert das mit CHD1L strukturverwandte ATP-hydrolysierende Chromatin-Remodeling-Enzym CHD7 [Flaus *et al.*, 2006]. Mutationen im *CHD7*-Gen liegen dem CHARGE-Syndrom zu Grunde, dessen phänotypische Ausprägung unter anderem Nierenanomalien, wie Hufeisennieren, Nierenagenesie, vesikoureteraler Reflux und Nierenzysten beinhaltet [Jongmans *et al.*, 2006; Lalani *et al.*, 2006; Vissers *et al.*, 2004]. Ein zweites mit CHD1L strukturverwandtes Enzym, das ebenfalls zur SNF2-Familie der ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Enzyme gehört, konnte in Tierversuchen mit komplexen renalen Phänotypen in Zusammenhang gebracht werden. Eine heterozygote Mutation in *CHD2* führte bei etwa 85 % der untersuchten Mäuse zu Glomerulopathie, Proteinurie und einer signifikant verminderten Nierenfunktion [Marfella *et al.*, 2006; Marfella *et al.*, 2008].

Zusammenfassend konnten durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse des *CHD1L*-Gens bei insgesamt 85 CAKUT-Patienten drei Missense-Varianten identifiziert werden, die *CHD1L* als mögliches mit der CAKUT-Pathogenese assoziiertes Kandidatengen identifizieren. Auf der Grundlage der gefundenen Missense-Varianten wurden mRNA-Spiegel quantitativ in unterschiedlichen humanen fetalen und adulten Geweben gemessen, sowie immunhistochemische Analysen an Nierenschnitten durchgeführt, wodurch die Annahme einer Rolle von CHD1L in der Nierenentwicklung bestärkt werden konnte. Außerdem dienten die identifizierten Varianten in *CHD1L* als Ausgangspunkt für funktionelle Analysen, die den Vergleich der Funktion des Wildtyp-Proteins mit der Funktion von aberran-

tem CHD1L erlaubten. Die Ergebnisse dieser Analysen lassen die Vermutung zu, dass das ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Enzym CHD1L an der Nephrogenese beteiligt ist.

Diese Annahme basiert auf folgenden Ergebnissen:

- (1) Die *CHD1L*-Expression in der fetalen Niere war die zweithöchste im Vergleich zu anderen fetalen Geweben, wobei das Expressionsverhältnis von fetaler zu adulter Niere mit 4:1 von allen untersuchten Geweben am höchsten war.
- (2) Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte für CHD1L vor allem eine nukleäre Lokalisation in der frühen Ureterknospe und dem sich differenzierenden metanephrogenen Mesenchym, wichtigen Strukturen der Nephrogenese, identifiziert werden. In der postnatalen Niere findet sich CHD1L im Zytoplasma aller Abschnitte des tubulären Systems.
- (3) Die Funktion von CHD1L als Chromatin-Remodeling-Enzym ist PARP1-abhängig, da durch dieses Enzym eine Stimulierung der ATPase-Aktivität erfolgt. Die drei detektierten heterozygoten Missense-Varianten haben einen Aminosäureaustausch innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Makrodomäne zur Folge, die für die Interaktion mit PAR und PARP1 benötigt wird. Durch Immunopräzipitation und Western Blot Analyse konnte eine verminderte Interaktion zwischen den gefundenen aberranten CHD1L-Proteinen und PARP1 nachgewiesen werden, so dass diese als hypofunktionelle Enzyme bezeichnet werden können.
- (4) Die Gewebeuntersuchung der hydronephrotischen Niere eines 16jährigen CAKUT-Patienten, bei dem im Rahmen dieser Arbeit eine hypofunktionelle Missense-Variante in Exon 19 von *CHD1L* mit Austausch von Isoleucin zu Methionin (c.2295A>G; p.Ile765Met) nachgewiesen werden konnte, zeigte eine stärkere nukleäre *CHD1L*-Expression in Tubuluszellen und Urothel der dysplastischen Niere und des Hydroureters. Dieses Expressionsmuster ähnelt dem der fetalen Niere und legt die Vermutung nahe, dass eine Mutation in *CHD1L* zu Störungen der terminalen Nephrondifferenzierung führen könnte.

Die Identifizierung von Missense-Varianten in *CHD1L* bei CAKUT-Patienten, die Charakterisierung CHD1L-Expression in der Niere, sowie die Hypofunktionalität der abberanten Proteine

liefern einen neuen Ansatzpunkt für das Verständnis der molekularen Ursachen der CAKUT-Pathogenese. Bei syndromalen Fällen liegt der CAKUT-Entstehung zwar häufig eine monogene Ursache zu Grunde, jedoch sind Mutationen dieser in isolierten CAKUT-Fällen nur in einem geringen Prozentsatz zu finden. Daher ist nicht auszuschließen, dass die identifizierten *CHD1L*-Varianten Teile eines oligogenen Geschehens sein könnten, dass der CAKUT-Pathogenese bei den hier untersuchten Patienten zu Grunde liegt.

5 Zusammenfassung

Unter dem Begriff der kongenitalen Anomalien der Niere und der ableitenden Harnwege (*congenital anomalies of the kidneys and urinary tract*, CAKUT) wird eine anatomisch sowie klinisch heterogene Gruppe von unterschiedlichen Malformationen der Niere, des ableitenden Harnsystems, der Blase und der Urethra zusammengefasst. In 10-15 % der Fälle liegen zusätzliche Fehlbildungen anderer Organsysteme vor, und eine Assoziation mit über 250 Syndromen ist bekannt. Obwohl von einer multifaktoriellen Pathogenese der CAKUT ausgegangen wird, vermutet man eine starke genetische Komponente bei der Entstehung dieser Fehlbildungen. Hinweise darauf ergeben sich aus einem möglichen familiären Auftreten, dem häufig kombinierten Vorliegen mehrerer CAKUT-Phänotypen bei einem Patienten, sowie der Progression der Erkrankung trotz frühzeitiger Therapie. Beim familiären Auftreten werden inkomplette Penetranz und variable Expressivität beobachtet. Für einige Nierenentwicklungsgene, wie *PAX2*, *EYA1*, *SIX1*, *HNF1 β* , konnte bereits eine Beteiligung an der CAKUT-Entstehung gezeigt werden. Jedoch bleiben die molekularen Ursachen der CAKUT größtenteils ungeklärt, was unter anderem die Identifizierung und Analyse neuer Kandidatengene der CAKUT-Pathogenese erforderlich macht.

CHD1L (*chromodomain helicase DNA binding protein 1-like*, Synonym: *ALC1*, *amplified in liver cancer 1*) konnte zuvor durch unsere Arbeitsgruppe als CAKUT-Kandidatengen identifiziert werden, weil eine Mikroduplikation eines syndromalen CAKUT-Patienten in 1q21 nachgewiesen wurde, die unter anderem das *CHD1L*-Gen enthielt. *CHD1L* ist ein ATP-abhängiges Chromatin-Remodeling-Enzym der SNF2-Familie. Mutationen im Gen des zu

CHD1L strukturverwandten Chromatin-Remodeling-Enzyms CHD7 sind mit dem CHARGE-Syndrom assoziiert, dessen klinisches Erscheinungsbild Nierenanomalien einschließt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Rolle von *CHD1L* als mögliches Nierenentwicklungsgen und Kandidatengen der CAKUT-Pathogenese eine Sequenzanalyse bei insgesamt 85 CAKUT-Patienten durchgeführt. Zuvor musste die genomische Struktur von *CHD1L* analysiert und Primerpaare für alle 23 Exons von *CHD1L* mussten entworfen und etabliert werden. Dann konnten drei heterozygote Missense-Varianten detektiert werden, von denen zwei nicht in über 200 Blutspenderkontrollchromosomen gefunden werden konnten. Alle drei Varianten führen zu einem Aminosäureaustausch innerhalb oder nahe der Makrodomäne, die für die Poly-ADP-Ribose (PAR)-abhängige Rekrutierung zum Ort eines DNA-Schadens, sowie für die Interaktion mit PAR-Polymerase 1(PARP1) verantwortlich ist. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Varianten lieferten den Ausgangspunkt für Expressionsanalysen in verschiedenen fetalen und adulten humanen Geweben und Nierenschnitten zur weiteren Untersuchung der Rolle von CHD1L in der Nephrogenese. Daneben diente die Identifizierung von Veränderungen in *CHD1L* bei CAKUT-Patienten als Grundlage für funktionelle Analysen, die einen Vergleich zwischen der Funktion des Wildtyp-Proteins mit der Funktion von aberranten CHD1L-Proteinen ermöglichten. Die Ergebnisse dieser weiterführenden Analysen ergaben, dass CHD1L an der Nephrogenese beteiligt sein könnte. Die als hypofunktionell eingestuften identifizierten Aberrationen des Chromatin-Remodeling-Enzyms können eine gestörte Differenzierung der Niere und des harnableitenden Systems zur Folge haben, die CAKUT zu Grunde liegen könnte. *CHD1L* kann damit als CAKUT-Kandidatengen eingestuft werden. Eine Mutationsanalyse bei weiteren CAKUT-Fällen und eine weitergehende Charakterisierung des CHD1L-Proteins in Hinblick auf die Nephrogenese können weitere Aufschlüsse über die Bedeutung von *CHD1L* in der Nierenentwicklung geben.

6 Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1 Die Budding-Hypothese	17
Abb. 2 Einfluss einer fehlerhaften Angiotensin-Rezeptor-Funktion auf die CAKUT-Entstehung	21
Abb. 3 Aussprossung der Ureterknospe.	24
Abb. 4 Schematische Darstellung des CHD1L-Proteins und dessen funktioneller Domänen.	26
Abb. 5 Genomische Struktur des <i>CHD1L</i> -Gens um Exon 2 herum mit Aminosäuresequenz.	45
Abb. 6 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifikation von <i>CHD1L</i> Exon 1-8 an Kontroll-DNA, <i>TwoStep 60</i> .	48
Abb. 7 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifikation von <i>CHD1L</i> Exon 9-16 an Kontroll-DNA, <i>TwoStep 60</i> .	49
Abb. 8 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifikation von <i>CHD1L</i> Exon 17-23 an Kontroll-DNA, <i>TwoStep 60</i> .	49
Abb. 9 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach Amplifikation von <i>CHD1L</i> Exon 3, Exon 9, Exon 16 und Exon 18 an Kontroll-DNA mit dem veränderten Temperaturprofil <i>TwoStep 60</i> .	50
Abb. 10 Ausschnitt der mit R-Primer (oben) und F-Primer (unten) generierten Elektropherogramme von <i>CHD1L</i> , Exon 1 an Kontroll-DNA, unter Einsatz des Vorwärts (F) - und Rückwärts-Primers (R). Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abb. 11 Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 18 des <i>CHD1L</i> -Gens. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abb. 12 Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 19 des <i>CHD1L</i> -Gens. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abb. 13 Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 21 des <i>CHD1L</i> -Gens. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abb. 14 Detektierte Missense-Varianten in <i>CHD1L</i> mit Darstellung des jeweiligen Aminosäureaustauschs.	59
Abb. 15 Stammbaum Patient 1.	61
Abb. 16 Stammbaum Patient 2.	63
Abb. 17 Stammbaum Patient 3.	64
Abb. 18 mRNA Analyse verschiedener humaner fetaler und adulter Gewebe.	70
Abb. 19 Immunhistochemische Untersuchung der Lokalisation der <i>CHD1L</i> -Expression während der Nierenentwicklung von der siebten bis zur elften Woche an humanen embryonalen Nierenschnitten.	71
Abb. 20 Expression von CHD1L in der normalen und hydronephrotischen postnatalen Niere.	73
Abb. 21 Genomische Lokalisation der identifizierten Missense-Variante von <i>CHD1L</i> .	74
Abb. 22 Verminderung der Interaktion der abberanten CHD1L-Proteine mit PARP1.	75

Tabellen

Tab. 1: PCR-Reaktionsansatz	38
Tab. 2: Temperatur-Profil der Programme <i>TwoStep 58</i> bzw. <i>TwoStep 60</i>	39
Tab. 3: Reaktionsansatz zur Aufreinigung der PCR-Produkte	41

Tab. 4: Reaktionsansatz der Sequenzier-Reaktion	42
Tab. 5: Temperaturprofil der Sequenzier-Reaktion	43
Tab. 6: Sequenzen und Ergebnisse des Human BLAT Search der ausgewählten Primerpaare zur Durchführung von PCR und Sequenzierung der 23 Exons des <i>CHD1L</i> -Gens	46
Tab. 7: Geeignete PCR-Temperaturprofile und Primer zur Sequenzanalyse des jeweiligen Exons.	52

Original Article

CHDIL: a new candidate gene for congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT)

Antje Brockschmidt^{1,*}, Boidinh Chung^{1,*}, Stefanie Weber², Dagmar-Christiane Fischer^{3,4}, Maria Kolatsi-Joannou⁵, Laura Christ¹, André Heimbach^{1,6}, Diamant Shtiza⁷, Günter Klaus⁸, Giacomo D. Simonetti⁹, Martin Konrad¹⁰, Paul Winyard⁵, Dieter Haffner³, Franz Schaefer² and Ruthild G. Weber^{1,6}

¹Institute of Human Genetics, Rheinische Friedrich-Wilhelms-University, Bonn, Germany, ²Division of Pediatric Nephrology, University Children's Hospital, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany, ³Department of Pediatric Kidney, Liver and Metabolic Diseases, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ⁴Department of Pediatrics, University Children's Hospital, Rostock, Germany, ⁵Institute of Child Health, University College London, London, UK, ⁶Department of Human Genetics, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ⁷Departamenti I Pediatrie Sherbimi I Nefrologjise, Qendra Spitalore Universitare 'Nene Tereza', Tirana, Albania, ⁸KfH-Pediatric Kidney Center, Marburg, Germany, ⁹Division of Pediatric Nephrology, University Children's Hospital, Bern, Switzerland and ¹⁰Department of General Pediatrics, University Children's Hospital, Münster, Germany

Correspondence and offprint requests to: Ruthild G. Weber; E-mail: ruthild.weber@ukb.uni-bonn.de

*Both authors contributed equally to this work.

In den gedruckten Ausgaben befindet sich der Artikel auf den Seiten 84-93

8. Literaturverzeichnis

Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* 1997; 15: 157–164

Ahel D, Horejsí Z, Wiechens N, Polo SE, Garcia-Wilson E, Ahel I, Flynn H, Skehel M, West SC, Jackson SP, Owen-Hughes T, Boulton SJ. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* 2009; 325: 1240-1243

Allen TD. Congenital ureteral strictures. *J Urol* 1970; 104: 196–204

Atiyeh B, Husmann D, Baum M. Contralateral renal abnormalities in multicystic-dysplastic kidney disease. *J Pediatr* 1992; 121: 65–67

Avni EF, Gallety E, Rypens F, Hall M, Dedeire S, Schulman CC. A hypothesis for the higher incidence of vesico-ureteral reflux and primary megaureters in male babies. *Pediatr Radiol* 1992; 22: 1–4

Barnett JA, Stephens FD: The role of the lower segmental vessel in the aetiology of hydronephrosis. *Aust NZ J Surg* 1962; 31: 201–213

Batourina E, Gim S, Bello N, Shy M, Clagett-Dame M, Srinivas S, Costantini F, Mendelsohn C. Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* 2001;27: 74-78

Bellanné-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, Dubois-Laforgue D, Clauin S, Beaufile S, Wilhelm JM, Boitard C, Noël LH, Velho G, Timsit J. Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med* 2004; 140: 510-517

Bingham C, Bulman MP, Ellard S, Allen LI, Lipkin GW, Hoff WG, Woolf AS, Rizzoni G, Novelli G, Nicholls AJ, Hattersley AT. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 219–224

Bork P, Koonin EV. An expanding family of helicases within the 'DEAD/H' superfamily. *Nucleic Acids Res.*1993; 21: 751–752

Brockschmidt A, Chung B, Weber S, Fischer D-C, Kolatsi-Joannou M, Christ L, Heimbach A, Shtiza D, Klaus G, Simonetti GD, Konrad M, Winyard P, Haffner D, Schaefer F, Weber RG. *CHD1L*: a new candidate gene for congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT). *Nephrol Dial Transplant Epub* 2011

Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR. Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. *Development* 2001; 128: 4747–4756

Brown T, Mandell J, Lebowitz RL. Neonatal hydronephrosis in the era of sonography. *Am J Roentgenol* 1987; 148: 959-963

Bush KT, Sakurai H, Steer DL, Leonard MO, Sampogna RV, Meyer TN, Schwesinger C, Qiao J, Nigam SK. TGF- β superfamily members modulate growth, branching, shaping, and patterning of the ureteric bud. *Dev Biol* 2004; 266: 285-298

Chen L, Hu L, Chan TH, Tsao GS, Xie D, Huo KK, Fu L, Ma S, Zheng BJ, Guan XY. Chromodomain helicase/adenosine triphosphatase DNA binding protein 1-like (CHD1L) gene suppresses the nucleus-to-mitochondria translocation of nur77 to sustain hepatocellular carcinoma cell survival. *Hepatology*. 2009; 50:122-129

Chevalier RL. Perinatal obstructive nephropathy. *Semin Perinatol* 2004; 28:124–131

Chi T. A BAF-centered view of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 965–977

Chi X, Michos O, Shakya R, Riccio P, Enomoto H, Licht JD, Asai N, Takahashi M, Ohgami N, Kato M, Mendelsohn C, Costantini F. Ret-dependent cell rearrangements in the Wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis. *Dev Cell* 2009; 17:199–209

Corona DF, Siriaco G, Armstrong JA, Snarskaya N, McClymont SA, Scott MP, Tamkun JW. ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H₁ assembly in vivo. *PLoS Biol* 2007; 5: e232

Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation* 2006; 74: 402–421

Coret A, Morag B, Katz M, Lotan D, Heyman Z, Hertz M. The impact of fetal screening on indications for cystourethrography in infants. *Pediatr Radiol* 1994; 24: 516–518

Cullen-McEwen LA, Drago J, Bertram JF. Nephron endowment in glial cell line-derived neurotrophic factor (*GDNF*) heterozygous mice. *Kidney Int* 2001; 60: 31-36

Danemann A, Alton DJ. Radiographic manifestations of renal anomalies. *Radiol Clin North Am* 1991; 29: 351-363

de la Serna IL, Ohkawa Y, Imbalzano AN. Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 461–473

de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier GG. Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation. *J Biol Chem* 1986; 261: 7011-7017

Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 2007; 447: 951-958

Dressler GR. Advances in early kidney specification, development and patterning. *Development* 2009; 136: 3863–3874

Eng C, Myers SM, Kogon MD, Sanicola M, Hession C, Cate RL, Mulligan LM. Genomic structure and chromosomal localization of the human *GDNFR-alpha* gene. *Oncogene* 1998; 16: 597-601

Fang Y, Guan X, Guo Y, Sham J, Deng M, Liang Q, Li H, Zhang H, Zhou H, Trent J. Analysis of genetic alterations in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30: 254-260

Favor J, Sandulache R, Neuhäuser-Klaus A, Pretsch W, Chatterjee B, Senft E, Wurst W, Blanquet V, Grimes P, Spörle R, Schughart K. 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* 1996; 93: 13870–13875

Flanagan JF, Mi LZ, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, Minor W, Rastinejad F, Khorasanizadeh S. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 2005; 438: 1181-1185

Flaus A, Martin DM, Barton GJ, Owen-Hughes T. Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:2887–2905

Frechette A, Huletsky A, Aubin RJ, de Murcia G, Mandel P, Lord A, Grondin G, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation of chromatin: kinetics of relaxation and its effect on chromatin solubility. *Can J Biochem Cell Biol* 1985; 63: 764-773

Gottschalk AJ, Timinszky G, Kong SE, Jin J, Cai Y, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Ladurner AG, Conaway JW, Conaway RC. Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 13770-13774. Epub 2009

Gribouval O, Gonzales M, Neuhaus T, Aziza J, Bieth E, Laurent N, Bouton JM, Feuillet F, Makni S, Ben Amar H, Laube G, Delezoide AL, Bouvier R, Dijoud F, Ollagnon-Roman E, Roume J, Joubert M, Antignac C, Gubler MC. Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. *Nat Genet* 2005; 37: 964–968. Epub 2005

Guan XY, Fang Y, Sham JS, Kwong DL, Zhang Y, Liang Q, Li H, Zhou H, Trent JM. Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29: 110-116

Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 789-829

Henikoff S. Transcriptional activator components and poxvirus DNA-dependent ATPases comprise a single family. *Trends Biochem. Sci* 1993; 18: 291-292

Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580-1594

Hohenfellner M, Schultz-Lampel D, Lampel A, Steinbach F, Cramer BM, Thüroff JW. Tumor in the horseshoe kidney: clinical implications and review of embryogenesis. *J Urol* 1992; 147: 1098-1102

Ichikawa I, Kuwayama F, Pope JC 4th, Stephens FD, Miyazaki Y: Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. *Kidney Int* 2002; 61: 889-898

Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Hypertension and reduced exploratory behavior in mice lacking angiotensin II type 2 receptor. *Nature* 1995; 377: 748-750

Johnston JH, Evans JP, Glassberg KI, Shapiro SR. Pelvic hydronephrosis in children: A review of 219 personal cases. *J Urol* 1977; 117: 97-101

Jongmans MC, Admiraal RJ, van der Donk KP, Vissers LE, Baas AF, Kapusta L, van Hagen JM, Donnai D, de Ravel TJ, Veltman JA, Geurts van Kessel A, De Vries BB, Brunner HG, Hoefsloot LH, van Ravenswaaij CM. CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the *CHD7* gene. *J Med Genet* 2006; 43: 306-314

Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BLM, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I: Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. *Kidney Int* 1995; 47: 140-147

Karras GI, Kustatscher G, Buhecha HR, Allen MD, Pugieux C, Sait F, Bycroft M, Ladurner AG. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J* 2005; 24: 1911-1920

Ko M, Sohn DH, Chung H, Seong RH. Chromatin remodeling, development and disease. *Mutat Res* 2008; 647: 59-67. Epub 2008

Kochhar A, Orten DJ, Sorensen JL, Fischer SM, Cremers CW, Kimberling WJ, Smith RJ. SIX1 mutation screening in 247 branchio-oto-renal syndrome families: a recurrent missense mutation associated with BOR. *Hum Mutat* 2008; 29: 565

Krangel MS. T cell development: better living through chromatin. *Nat. Immunol* 2007; 8: 687–694

Krishnakumar R, Gamble MJ, Frizzell KM, Berrocal JG, Kininis M, Kraus WL. Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science* 2008; 319: 819-821

Kusano N, Shiraishi K, Kubo K, Oga A, Okita K, Sasaki K. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: their relationship to clinicopathological features. *Hepatology* 1999; 29: 1858-1862

Kuwayama F, Miyazaki Y, Ichikawa I. Embryogenesis of the congenital anomalies of the kidneys an urinary tract. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 45-47

Kwong D, Lam A, Guan X, Law S, Tai A, Wong J, Sham J. Chromosomal aberrations in esophageal squamous cell carcinoma among Chinese: gain of 12p predicts poor prognosis after surgery. *Hum Pathol* 2004; 35: 309-316

Lalani SR, Safiullah AM, Fernbach SD, Harutyunyan KG, Thaller C, Peterson LE, McPherson JD, Gibbs RA, White LD, Hefner M, Davenport SL, Graham JM, Bacino CA, Glass NL, Towbin JA, Craigen WJ, Neish SR, Lin AE, Belmont JW. Spectrum of *CHD7* mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 303-314

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13: 424-436

Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 2007; 128: 707-719

Limwongse C, Cassidy SB. Syndromes and malformations of the urinary tract. In: Avner ED, Harman WE, Niaudet P, eds. *Pediatric Nephrology*. Philadelphia, Baltimore, New York, London: Lippincott Raven, 2003: 93-121

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130-1132

Lindahl T, Satoh MS, Dianov G. Enzymes acting at strand interruptions in DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1995; 347: 57-62

Leduc Y, de Murcia G, Lamarre D, Poirier GG. Visualization of poly(ADP-ribose) synthetase associated with polynucleosomes by immunoelectron microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 885: 248-55

Ma NF, Hu L, Fung JM, Xie D, Zheng BJ, Chen L, Tang DJ, Fu L, Wu Z, Chen M, Fang Y, Guan XY. Isolation and Characterization of a Novel Oncogene, Amplified in Liver Cancer 1, within a Commonly Amplified Region at 1q21 in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2008; 47: 503-510

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

Maizels M, Simpson SB Jr: Primitive ducts of renal dysplasia induced by culturing ureteral buds denuded of condensed renal mesenchyme. *Science* 1983; 219: 509-510

Marchio A, Meddeb M, Pineau P, Danglot G, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18: 59-65

Marfella CG, Ohkawa Y, Coles AH, Garlick DS, Jones SN, Imbalzano AN. Mutation of the SNF2 family member *Chd2* affects mouse development and survival. *J Cell Physiol* 2006; 209: 162-171

Marfella CG, Henninger N, LeBlanc SE, Krishnan N, Garlick DS, Holzman LB, Imbalzano AN. A mutation in the mouse *Chd2* chromatin remodeling enzyme results in a complex renal phenotype. *Kidney Blood Press Res* 2008; 31: 421-432. Epub 2009

Mendelsohn C. Using mouse models to understand normal and abnormal urogenital tract development. *Organogenesis* 2009; 5: 306-314

Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988; 16: 1215

Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I. Bone morphogenic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J Clin Invest* 2000; 105: 863-873

Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Ichikawa I. Evidence that bone morphogenic protein 4 has multiple biological functions during kidney and urinary tract development. *Kidney Int* 2003; 63: 834-844

Miyazaki Y, Tsuchida S, Nishimura H, Pope JC 4th, Harris RC, McKanna JM, Inagami T, Hogan BL, Fogo A, Ichikawa I. Angiotensin induces the urinary peristaltic machinery during the perinatal period. *J Clin Invest* 1998; 102: 1489-1497

Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990; 48: 579-582

Murken J, Grimm T, Hollinski-Feder E. Aufbau des Genoms und Weitergabe der genetischen Information. In: Muken J, Grimm T, Holinski-Feder E, eds. Taschenlehrbuch Humangenetik. Stuttgart: Thieme, 2006: 4-10

Najmaldin A, Burge DM, Atwell JD: Reflux nephropathy secondary to intrauterine vesicoureteric reflux. *J Pediatr Surg* 1990; 25: 387–390

Nakanishi K, Yoshikawa N. Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidneys an urinary tract (CAKUT). *Pediatr Int* 2003; 45: 610-616

Niimura F, Kon V, Ichikawa I. The renin-angiotensin system in the development of the congenital anomalies of the kidneys an urinary tract. *Curr Opin Pediatr* 2006; 18:161–166

Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, Miyazaki Y, Ma J, Hunley TE, Yoshida H, Ichiki T, Threadgill D, Phillips JA 3rd, Hogan BM, Fogo A, Brock JW 3rd, Inagami T, Ichikawa I. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Mol Cell* 1999; 3:1–10

Noia G, Masini L, De Santis M, Caruso A. The impact of invasive procedures on prognostic, diagnostic and therapeutic aspects of urinary tract anomalies. In: Cataldi L, Fanos V, Simeoni U eds. Neonatal Nephrology in Progress. Lecce, Italy, Agora, 1996: 67-84

Oshima K, Miyazaki Y, Brock JW 3rd, Adams MC, Ichikawa I, Pope JC 4th. Angiotensin type II receptor expression and ureteral budding. *J Urol* 2001; 166:1848-1852

Osley MA, Tsukuda T, Nickoloff JA. ATP-dependent chromatin remodeling factors and DNA damage repair. *Mutat. Res* 2007; 618: 65-80. Epub 2007

Passerge E. Molekulare Grundlagen. In: Jürgen Wirth ed. Taschenatlas Humangenetik. Stuttgart: Thieme, 2008: 16-22

Peters CA, Carr MC, Lais A, Retik AB, Mandell J. The response of the fetal kidney to obstruction. *J Urol* 1992; 148: 503–509

Piscione TD, Rosenblum ND. The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights. *Differentiation* 2002; 70: 227-246

Poirier GG, de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, Mandel P. Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79: 3423-3427

Pope JC 4th, Brock JW 3rd, Adams MC, Stephens FD, Ichikawa I. 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* 1999; 10: 2018-2028

- Pray-Grant MG**, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR 3rd, Grant PA. Chd1 chromodomain links histone H₃ methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 2005; 433: 434-438. Epub 2005
- Ramensky V**, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 2002 Sep 1; 30: 3894-3900
- Raatikainen-Ahokas A**, Hytönen M, Tenhunen A, Sainio K, Sariola H. BMP-4 affects the differentiation of metanephric mesenchyme and reveals an early anterior-posterior axis of the embryonic kidney. *Dev Dyn* 2000; 217: 146-158
- Reidy KJ**, Rosenblum ND. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol* 2009; 29:321-337
- Ring E**, Petritsch P, Riccabona M, Haim-Kuttig M, Vilits P, Rauchenwald M, Fueger G. Primary vesicoureteral reflux in infants with a dilated fetal urinary tract. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 523-525
- Risdon RA**, Yeung CK, Ransley PG: Reflux nephropathy in children submitted to unilateral nephrectomy: a clinicopathological study. *Clin Nephrol* 1993; 40: 308-314
- Robson WL**, Leung AKC, Rogers RC. Unilateral renal agenesis. *Adv Pediatr* 1995; 42: 575-592
- Rohen JW**, Lütjen-Drecoll E. Nierenentwicklung und Harnwege. In: Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. eds. *Funktionelle Embryologie*. Stuttgart: Schattauer, 2006: 107-110
- Roodhooft AM**, Birriholz JC, Holmes LB. Familial nature of congenital absence and severe dysgenesis of both kidneys. *N Engl J Med* 1984; 310: 1341-1345
- Ruano-Gil D**, Tejedo-Mateu A: Human embryo (12 mm) with mesohydronephrosis and ureterohydronephrosis. *Acta Anat (Basel)*. 1975; 93: 135-140
- Saha A**, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 437-447
- Sainio K**, Suvanto P, Davies J, Wartiovaara J, Wartiovaara K, Saarma M, Arumäe U, Meng X, Lindahl M, Pachnis V, Sariola H. Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development* 1997; 124: 4077-4087
- Sanger E**, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1977; 74: 5464-5467
- Sanyanusin P**, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, Dobyns WB, Eccles MR. Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 1995; 9: 358-364

- Sariola H, Saarma M** Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.* 2003; 116: 3855-3862
- Satoh MS**, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 1992; 356: 356-358
- Schuchardt A**, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor. *Nature* 1994; 367: 380-383
- Simon R**, Bürger H, Brinkschmidt C, Böcker W, Hertle L, Terpe HJ. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 1998; 185: 345-351
- Schutz S**, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. Early expression of all the components of the renin-angiotensin system in human development. *Am J Pathol* 1996; 149: 2067-2079
- Song R**, Yosypiv IV. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol.* 2011; 26: 353-364. Epub 2010
- Squiers EC**, Morden RS, Bernstein J. Renal multicystic dysplasia: an occasional manifestation of the hereditary renal adysplasia syndrom. *Am J Med Genet* 1987; 3:279-284
- Stephens FD**, Smith ED, Hutson JM: Renal hypoplasia and dysplasia in infants with posterior urethral valves. In: Stephens FD, Smith ED, Hutson JM, eds. *Congenital Anomalies of the Urinary and Genital Tracts*. Oxford: ISIS Medical Media, 1996: 341-345
- Stahl DA**, Koul HK, Chacko JK, Mingin GC. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): a current review of cell signaling processes in ureteral development. *J Pediatr Urol* 2006; 2:2-9. Epub 2005
- Sunyaev S**, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends Genet.* 2000; 16: 198-200
- Sunyaev S**, Ramensky V, Koch I, Lathe W 3rd, Kondrashov AS, Bork P. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 591-597
- Takahashi M**. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12: 361-373
- Tang MJ**, Cai Y, Tsai SJ, Wang YK, Dressler GR. Ureteric bud outgrowth in response to RET activation is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Dev Biol* 2002; 243: 128-136
- Tirkkonen M**, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 177-184

Ulfig N. Urogenitalsystem. In: Ulfig N. ed. *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Thieme, 2005: 117-122

Ulinski T, Lescure S, Beaufils S, Guignon V, Decramer S, Morin D, Clauin S, Deschênes G, Bouissou F, Bensman A, Bellanné-Chantelot C. Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (*TCF2*) mutations in a pediatric cohort. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:497-503. Epub 2005

Van Allen MI. Urinary tract. In: Stevenson RE, Hall JG Goodman RM, eds. *Human malformations and related anomalies*. New York: Oxford University Press, 1993; 11: 501-550

Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA, van Kessel AG. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 2004; 36: 955-7. Epub 2004

Weber S. Genetische Aspekte konnataler Uropathien. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2010; 158: 1209-1216

Weber S, Landwehr C, Renkert M, Hoischen A, Wühl E, Denecke J, Radlwimmer B, Haffner D, Schaefer F, Weber RG. Mapping candidate regions and genes for congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT) by array-based comparative genomic hybridization. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26: 136-43. Epub 2010

Weber S, Moriniere V, Knüppel T, Charbit M, Dusek J, Ghiggeri GM, Jankauskiené A, Mir S, Montini G, Peco-Antic A, Wühl E, Zurowska AM, Mehls O, Antignac C, Schaefer F, Salomon R. Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2864–2870

Wickramasinghe SF, Stephens FD. Paraureteral diverticulata: Associated renal morphology and embryogenesis. *Invest Urol.* 1977; 14: 381-385

Wingen AM, Fabian-Bach C, Schaefer F, Mehls O: Randomised multicentre study of a low-protein diet on the progression of chronic renal failure in children. European Study Group of Nutritional Treatment of Chronic Renal Failure in Childhood. *Lancet* 1997; 349: 1117–1123

Wong N, Lai P, Lee SW, Fan S, Pang E, Liew CT, Sheng Z, Lau JW, Johnson PJ. Assessment of genetic changes in hepatocellular carcinoma by comparative genomic hybridization analysis: relationship to disease stage, tumor size, and cirrhosis. *Am J Pathol* 1999; 154: 37-43

Woolf AS. A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformations. *Kidney Int* 2000; 58: 500-512

Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, Winyard PJ. Evolving Concepts in Human Renal Dysplasia. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 998-1007

Wühl E, Mehls O, Schaefer F; ESCAPE Trial Group. Antihypertensive and antiproteinuric efficacy of ramipril in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 2004; 66: 768–776

Yerkes E, Nishimura H, Miyazaki Y, Tsuchida S, Brock JW 3rd, Ichikawa I. Role of angiotensin in the congenital anomalies of the kidney and urinary tract in the mouse and the human. *Kidney Int* 1998; 67: 75–77

Yosypiv IV. Renin-angiotensin system-growth factor cross-talk: a novel mechanism for ureteric bud morphogenesis. *Pediatr Nephrol* 2009 ;24:1113-20. Epub 2008

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med Ruthild G. Weber für die Möglichkeit der Mitarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe und für das in mich gesetzte Vertrauen. Ich bin sehr dankbar für die zuverlässige, umfassende und konstruktive Unterstützung während des gesamten Verlaufs.

Herrn Prof. Dr. med Markus Nöthen danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit im Institut für Humangenetik der Universität Bonn.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Antje Brockschmidt für die kompetente und außergewöhnlich herzliche Betreuung bedanken. Sie stand mir unermüdlich zur Seite. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Sabrina Wolff, Frau Vera Riehmer und Frau Christina Landwehr, sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme Atmosphäre und die schöne Zusammenarbeit. Dank euch allen fiel mir das Arbeiten leicht.

Außerdem danke ich meiner Familie und Markus für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation, auch während des gesamten Studiums.