

Molekularbiologische Untersuchungen am PKD1-Gen der Katze



Eva Christina Kappe

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG

édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890

email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**Molekularbiologische Untersuchungen am
PKD1-Gen der Katze**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Eva Christina Kappe
Tierärztin aus Wipperfürth

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. R. Neiger

Tag der Disputation: 26.06.2008

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1	Nierenzysten bei der Katze	2
2.1.1	Das klinische Erscheinungsbild der PKD der Perserkatze	3
2.1.2	Das morphologische Erscheinungsbild der PKD	4
2.1.3	Die Vererbung der PKD bei der Perserkatze	4
2.1.4	Diagnose	5
2.1.4.1	Die Ultraschalluntersuchung	5
2.1.5	Züchterische Konsequenz der PKD	6
2.1.6	Prävalenz von Nierenzysten bei Perserkatzen.....	6
2.1.7	Zystogenese und möglicher Pathogenesemechanismus	7
2.1.8	Molekulare Ursache des Polyzystischen Syndroms der Perserkatze.....	8
2.2	Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) des Menschen.....	8
2.2.1	Das morphologische und klinische Erscheinungsbild der ADPKD	8
2.2.2	Die Genetik der ADPKD	9
2.2.3	Diagnose	10
2.2.3.1	Die Ultraschalluntersuchung	10
2.2.3.2	Die Kopplungsanalyse.....	11
2.2.4	Ursachen der großen Variabilität des ADPKD-Phänotyps	11
2.2.4.1	Lokalisation der Mutation	12
2.2.4.2	Phänotypische Unterschiede durch modifizierende Faktoren.....	12
2.2.4.3	Das Modell des Second Hit	13
2.2.5	Pathogenesemechanismus der Zystogenese	14
2.2.5.1	Pathologische Proliferation des Tubulusepithels.....	14
2.2.5.2	Sekretion.....	14
2.2.5.3	Veränderungen der extrazellulären Matrix in zystischem Gewebe	15
2.2.6	Das PKD1-Gen des Menschen.....	15
2.2.7	Pseudogene des PKD1-Gens.....	15
2.2.8	Mutationen des PKD1-Gens des Menschen.....	16
2.3	Das Protein Polyzystin 1.....	17
2.3.1	Interaktion von Polyzystin 1 und 2	20
2.3.2	Das Expressionsmuster von Polyzystin 1.....	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Probenmaterial	21
3.1.1	Herkunft der Proben.....	21
3.1.2	Datenerhebung	21
3.2	Immunhistologische Untersuchung.....	22
3.2.1	Nachweis des Von-Willebrand-Faktors	22
3.2.2	Nachweis von Zytokeratin	24
3.2.3	Auswertung der Immunhistologie.....	25
3.3	Isolierung und Aufreinigung von DNS	26
3.3.1	DNS-Isolierung aus Vollblut	26
3.3.2	DNS-Isolierung aus Gewebe.....	27
3.3.3	Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	28
3.3.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	28
3.3.5	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNS	29
3.3.6	Alkoholpräzipitation von DNS	29
3.3.7	Ergebniskontrolle der DNS-Isolierung.....	29
3.4	Konzentrationsmessung von DNS-Lösungen	29

3.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	29
3.4.2	Agarosegel mit Massenmarker.....	30
3.5	Primerkonstruktion.....	30
3.5.1	Verwendete Primer und Primerpaarkombinationen.....	31
3.6	Polymerasekettenreaktion.....	35
3.6.1	Etablierung von PCR-Systemen.....	35
3.6.2	PCR-Protokoll für die RFLP-Analyse.....	37
3.6.3	Cycler-Protokolle der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
3.6.4	Reamplifikation von Einzelbanden.....	38
3.7	Agarosegelelektrophorese.....	38
3.8	Untersuchung von Konformationsvarianten eines PCR-Fragmentes im Agarosegel.....	39
3.9	Klonierung.....	40
3.10	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse).....	41
3.10.1	Auswertung der RFLP-Analyse.....	41
3.11	Sequenzierungen.....	42
3.11.1	Auswertung von DNS-Sequenzen.....	42
3.12	Statistik.....	43
4	ERGEBNISSE.....	44
4.1	Immunhistologisches Ergebnis.....	44
4.2	Strukturvergleich der PKD1-Gene von Mensch und Hund.....	45
4.3	Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
4.3.1	PCR-System für die Amplifikation von Exon 4 bis 6.....	45
4.3.2	Untersuchung von Mehrfachbanden bei Amplifikaten aus dem Genabschnitt von Exon 4 bis 6.....	46
4.3.3	PCR-System für die Amplifikation von Exon 27 bis 30.....	48
4.3.4	PCR-System für die Amplifikation von Exon 36 bis 38.....	49
4.3.5	PCR-System für die Amplifikation von Exon 38 bis 40.....	50
4.3.6	Amplifikation der cDNS von Exon 29 bis 37.....	50
4.3.7	PCR-System für die Amplifikation von Exon 43 bis 46.....	50
4.3.8	PCR-System für die Amplifikation von Exon 46 des PKD1-Gens bis Exon 40 des TSC2-Gens.....	51
4.4	Klonierung.....	51
4.4.1	Klonierung von Exon 4 bis 6 des PKD1-Gens.....	51
4.4.2	Klonierung von Exon 27 bis 30 des PKD1-Gens.....	52
4.4.3	Klonierung von Exon 29 bis 37 aus PKD1-cDNS.....	52
4.4.4	Klonierung von Exon 43 bis 46 des PKD1-Gens.....	52
4.5	Ergebnisse der Sequenzierung.....	53
4.5.1	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten aus dem Genbereich von Exon 4 bis 6.....	53
4.5.2	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten aus dem Genbereich von Exon 27 bis 30.....	54
4.5.3	Sequenzierung klonierter cDNS aus dem Bereich von Exon 29 bis 37.....	55
4.5.4	Sequenzierung von PCR-Produkten aus dem Genbereich von Exon 36 bis 38.....	56
4.5.5	Sequenzierung von PCR-Produkten aus dem Genbereich von Exon 38 bis 40.....	56
4.5.6	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten aus dem Genbereich von Exon 43 bis 46.....	58
4.5.7	Sequenzierung von Exon 46 des PKD1-Gens bis Exon 40 des TSC2-Gens.....	59
4.6	Bestimmung der Splice Sites.....	59
4.6.1	Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 4 bis 6.....	59
4.6.2	Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 27 bis 30.....	60

4.6.3	Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 36 bis 38	61
4.6.4	Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 38 bis 40	61
4.6.5	Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 43 bis 46	61
4.6.6	Der Übergang des PKD1-Gens zum TSC2-Gen	62
4.6.7	Übersicht der Sequenzanalyse des PKD1-Gens	62
4.6.8	Der Klon cPKD29-37-2	63
4.7	Sequenzvarianten des felinen PKD1-Gens und mögliche Auswirkung auf das Protein	63
4.7.1	Sequenzvarianten von Exon 4 bis 6	64
4.7.2	Sequenzvarianten von Exon 27 bis 30	69
4.7.3	Sequenzvarianten von Exon 36 bis 38	71
4.7.4	Sequenzvarianten von Exon 38 bis 40	71
4.7.5	Sequenzvarianten von Exon 43 bis 46	78
4.7.6	Sequenzvarianten von Exon 43 des PKD1-Gens bis im Exon 40 des TSC2-Gens	82
4.7.7	Zusammenfassung der identifizierten Mutationen	86
4.8	Charakterisierung der Transversion im Exon 29	87
4.8.1	Die RFLP-Analyse als Screening-Methode	87
4.8.2	Klonierung der PCR-Produkte von Exon 27 bis 30 einer zystenpositiven Katze	88
4.8.3	Screening der Probanden mittels RFLP-Analyse	89
4.8.3.1	RFLP-Analyseergebnisse bei Perserkatzen	90
4.8.3.2	Ergebnisse der RFLP-Analyse von Katzen, die nicht der Rasse Perserkatze angehörten	91
4.8.4	Statistisch zu erwartende Anzahl homozygoter Merkmalsträgern	92
4.8.5	Altersverteilung in der Gruppe der mutationspositiven und -negativen Perserkatzen	92
4.9	Deletion aufgrund von Konformationsvarianten im Intron 4	93
4.9.1	Nachweis von PCR-Amplifikaten mit einer 139 bp-Deletion	94
4.9.2	Zwei alternative Splice Sites im Intron 4	96
4.9.3	Ursachen der variablen Konformation und Möglichkeiten zur Deletion	96
5	DISKUSSION	99
5.1	Strategie zur Identifizierung heterozygoter Sequenzvarianten	99
5.2	C>A-Transversion in Exon 29 des PKD1-Gens	100
5.2.1	Verwendung der RFLP-Analyse	100
5.2.2	Vorkommen der C>A-Transversion bei Perserkatzen	100
5.2.3	Vorkommen der C>A-Transversion bei Katzen, die nicht der Rasse Perserkatze angehören	102
5.3	Die homozygote Mutationen des PKD1-Gens ist ein Letalfaktor	103
5.4	Eignung eines Gentests für die Diagnose der PKD	104
5.5	Ist eine Einzelzyste für die Diagnose der PKD ausreichend?	106
5.6	Konformationsvarianten in Intron 4 als Ursache einer 139 bp-Deletion	107
5.7	Sequenzvarianten des PKD1-Gens	109
5.8	Transkription des PKD1-Gens im Katzenovar	111
6	ZUSAMMENFASSUNG	112
6.1	Summary	115
7	LITERATURVERZEICHNIS	117
8	ANHANG	130

8.1	Familienstammbäume	130
8.2	Tabellen	132
8.3	Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte.....	140
8.4	Lösungen und Puffer	144
8.4.1	DNS-Isolierung	144
8.4.2	Polymerasekettenreaktion	144
8.4.3	Gelelektrophorese	146
8.4.4	Klonierung	146
8.4.5	Immunhistologie	147
8.4.6	DNS-Größenmarker für die Gelelektrophorese	148
8.5	Sequenzierungsergebnisse.....	150
8.5.1	Klone.....	150
8.5.2	PCR-Produkte	157
8.5.2.1	Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 4 bis 6	157
8.5.2.2	Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 27 bis 30	159
8.5.2.3	Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 36 bis 38	163
8.5.2.4	Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 38 bis 40	166
8.5.2.5	Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 43 bis 46	174
8.5.2.6	Sequenzen ab Exon 46 des felines PKD1-Gens bis im Exon 40 des felines TSC2-Gens.....	178
8.6	Erkennungssequenzen von Splice Sites.....	182
8.7	Abgeleitete Aminosäuresequenzen	184
8.7.1	Abgeleitete Aminosäuresequenz von Exon 4 bis 6	184
8.7.2	Abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Bereich von Exon 27 bis 30.....	186
8.7.3	Abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Bereich von Exon 36 bis 38.....	187
8.7.4	Abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Bereich von Exon 38 bis 40.....	187
8.7.5	Abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Bereich von Exon 43 bis 46.....	188
8.7.6	Abgeleitete Aminosäuresequenz bis zum Stopcodon im Exon 46.....	189
8.7.7	Abgeleitete Aminosäuresequenz von Exon 40 des TSC2-Gens.....	189
8.8	Übersicht der Exons und Introns des PKD1-Gens der Perserkatze.....	190
8.9	Abkürzungen.....	191

1 EINLEITUNG

Das polyzystische Syndrom (PKD, Polycystic Kidney Disease) ist eine hereditäre Erkrankung. Bei der Perserkatze wird die PKD autosomal-dominant vererbt (Biller et al., 1996). Charakteristisch sind kongenitale Nierenzysten, wobei nur ein begrenzter Anteil der Nephro-ne zystisch verändert ist. Extrarenale Zystenmanifestationen finden sich in der Leber (Eaton et al., 1997). Das fortschreitende Wachstum der Zysten führt bei betroffenen Katzen im Alter von durchschnittlich sieben Jahren zur klinischen Manifestation einer chronischen Nierenin-suffizienz (Biller et al., 1996; Meyer-Lindenberg et al., 1998). Eine zuverlässige klinische Diagnose der PKD bei der Katze kann über ultrasonographische Verfahren ab einem Alter von 10 Monaten gestellt werden (Biller et al., 1996; Biller et al., 1998; Gerwing et al., 1999). Studien über die Prävalenz der PKD in den Perserkatzenpopulationen in verschiedenen Län- dern der Welt ergaben, dass bis zu 50 % der untersuchten Tiere betroffen waren (Meyer-Lindenberg et al., 1998; Gerwing et al., 1999; Barrs et al., 2001; Beck und Lavelle, 2001; Cannon et al., 2001; Barthez et al., 2003).

Auf Grund der ausgedehnten Ähnlichkeit der PKD der Perserkatze in morphologischen, patho- genetischen und klinischen Merkmalen mit der Autosomal Dominanten Polyzystischen Nieren- erkrankung (ADPKD) des Menschen wird davon ausgegangen, dass es sich um analoge Er- krankungen handelt. Zwei der PKD-Gene des Menschen (PKD1 und PKD2) sind strukturell weitgehend aufgeklärt (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994; International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995; Hayashi et al., 1997). Bei etwa 85 % der ADPKD-betroffenen Familien fand man eine Kopplung zum PKD1-Gen auf Chromosom 16 (Reeders et al., 1985; Peral et al., 1993; Torra et al., 1998). Das PKD1-Gen der Katze liegt auf Chromosom E3 und wird von einem Mikrosatelliten (FCA 476) flankiert (Murphy et al., 2000). Kopplungsstudien belegen eine starke Assoziation zwischen dem PKD-Phänotyp und dem PKD1-Locus der Perserkatze (Grahn et al., 2004; Helmig, 2005; Young et al., 2005). Es wurde eine Punktmutation im Exon 29 des PKD1-Gens identifiziert, die in einer Stichprobe zystenpo- sitiver Perserkatzen und Perserkreuzungen der US-amerikanischen Katzenpopulation nachge- wiesen werden konnte (Lyons et al., 2004).

Aufbauend auf den vorliegenden Daten wurde eine Analyse des PKD1-Gens der Katze durchgeführt. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die bereits bekannte Mutation e- benfalls in der deutschen Katzenpopulation auftritt oder aber eine weitere krankheitsauslösen- de Mutation vorhanden ist, die über einen direkten oder indirekten Gentest nachweisbar wäre. Des Weiteren sollten andere möglicherweise zysteninduzierende Genstrukturen ausfindig gemacht und untersucht werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Nierenzysten bei der Katze

Zystische Nierenveränderungen können bei allen Haustieren und auch beim Menschen vorkommen. Formal werden die Nierenzysten von den Zystennieren unterschieden. Unter Nierenzysten versteht man einzelne bis mehrere, erbsen- bis walnußgroße, epithelausgekleidete, flüssigkeitsgefüllte Zysten im Nierengewebe (Weiss, 2007). Sind zahlreiche Zysten in einer Niere vorhanden, bezeichnet man diese als Zystenniere (Wiesner und Ribbeck, 2000). Zystennieren werden im Englischen als „Polycystic Kidney Disease“ (PKD) bezeichnet (Klingel, 1999). Im Deutschen findet man auch die Begriffe polyzystische Nierendegeneration und Polyzystisches Syndrom (Meyer-Lindenberg et al., 1998; Gerwing et al., 1999; Wiesner und Ribbeck, 2000). Sowohl in englischen als auch in deutschen medizinischen Lehrbüchern und Nachschlagewerken werden die Begriffe Nierenzyste, Zystenniere bzw. PKD uneinheitlich verwendet. Da auch die Nierenzysten multipel vorkommen können (Weiss, 2007; Herold, 2008), Nierenzysten und Zystennieren ein- oder beidseitig beobachtet werden (DiBartola und Rutgers, 1994; Kraft, 1996; Weiss, 2007; Herold, 2008) und beide Formen sowohl kongenital bzw. erblich auftreten als auch erworben werden können (DiBartola und Rutgers, 1994; Kraft, 1996; Klingel, 1999), ist eine exakte Einordnung der vorliegenden Nierenveränderung rein morphologisch schwierig. Einige Autoren sprechen mit der Abkürzung „PKD“ nur angeborene Veränderungen an (Maxie, 1992; Blood und Studdert, 1999; Herold, 2008).

In deutschsprachigen humanmedizinischen Lehrbüchern der inneren Medizin wird das Kürzel „PKD“ bei den definierten erblichen Krankheitsbildern ARPKD (autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung) und ADPKD (autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung) mit bekannten Mutationsorten (Chromosom 6 bzw. 16 und 4) verwendet. Damit werden diese Erkrankungen von erworbenen Nierenzysten (z. B. zystische Karzinome, Zystenentwicklung bei chronischen Nierenerkrankungen, Hämodialyse) und weiteren angeborenen zystischen Nierenerkrankungen (zystische Dysplasie, Markschwammnieren) deutlich abgegrenzt (Klingel, 1999; Herold, 2008). In englischsprachigen veterinärmedizinischen Texten findet man eine ähnliche Einteilung. Hier wird die Bezeichnung ADPKD für autosomal dominant vererbte Nierenzysten verwendet, wie sie bei Perserkatzen und Bullterriern vorkommen. ARPKD werden die autosomal rezessiv vererbten Nierenzysten der West Highland White Terrier und Cairn Terrier genannt (Maxie, 1992).

In dieser Arbeit wird der Begriff „PKD“ für erbliche Nierenzysten verwendet.

Nierenzysten können prinzipiell bei allen Katzerassen vorkommen, sie sind jedoch bei Perserkatzen am häufigsten. Bei dieser Rasse tritt die PKD familiär gehäuft auf und wird autosomal dominant mit unterschiedlicher Expressivität vererbt (DiBartola und Rutgers, 1994; Gerwing et al., 1999; Herzog, 2001).

Stebbins beschreibt erstmals polyzystische Nieren bei einer adulten 10-jährigen Perserkatze. Das Tier zeigte kurz vor dem Tod Niereninsuffizienz und vergrößerte Nieren mit multiplen flüssigkeitsgefüllten, unterschiedlich großen Zysten in Mark und Rinde. Auch die Leber war von multiplen Zysten durchsetzt. Der Autor sah hierin bereits Parallelen zur adulten Form der PKD des Menschen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren bei Katzenwelpen lediglich juvenile Formen der PKD mit schwammartigen Zystennieren und frühem letalem Verlauf bekannt (Stebbins, 1989).

Einzelne Nierenzysten kommen bei Katzen ebenfalls vor, wenn auch nur sehr selten. In einer Reihenuntersuchung von 503 Perser- und Exotic Shorthair-Katzen mittels Ultraschall wies nur eine Katze eine singuläre Nierenzyste mit unverändertem umliegendem Nierenparenchym auf. Das entspricht 0,2 % der untersuchten Perser- und Exotic Shorthair-Katzen und 0,7 % der Zysten-träger (Gerwing et al., 1999). Bei Hauskatzen, die keine Perserrassekatzen sind, kamen Zystennieren zu 0,5 % (3 von 1527) vor. Die Hälfte der Tiere mit uni- oder bilateralen Einzelzysten wies gleichzeitig ein hochgradig verändertes Parenchym im Ultraschallbild auf. Hier wurden erworbene Zysten vermutet (Gerwing et al., 1999). In einer anderen Arbeit wurden bei zehn von 57 zystenpositiven Perserkatzen singuläre Zysten in einer oder in beiden Nieren beschrieben. Die Einzelzysten wurden hier allerdings als Zufallsbefund gewertet und nicht dem Komplex der polyzystischen Nierendegeneration zugerechnet (Meyer-Lindenberg et al., 1998).

2.1.1 Das klinische Erscheinungsbild der PKD der Perserkatze

Die Klinik variiert abhängig von der Ausprägung der Nierenzysten. Solange noch mehr als 25 % der Nephrone arbeiten, kann die Nierenfunktion ungestört sein (Schwendenwein, 1993). Durch fortschreitendes Wachstum der Nierenzysten leiden betroffene Tiere meistens ab dem mittleren Lebensabschnitt an chronischer Niereninsuffizienz. Bei Einsetzen klinischer Symptome sind die Tiere durchschnittlich sieben Jahre alt (Billier et al., 1996). Andere Autoren beobachteten schon bei Katzen im Alter von vier bis sieben Jahren gehäuft erhöhte Harnstoff- und Kreatininwerte. Bei Tieren mit solitärer ein- oder beidseitiger Nierenzyste können in der Regel weder klinisch noch labordiagnostisch Hinweise für eine Nephropathie gefunden werden (Meyer-Lindenberg et al., 1998).

Bei der Palpation des Abdomens können die Nieren normal erscheinen oder größere Zysten im Rindbereich palpiert werden. Bei einigen Tieren ist dies schmerzhaft, was auf die oft gleichzeitig vorliegende Nephritis zurück geführt wird (Lulich et al., 1995).

Die Prognose ist insgesamt als ungünstig zu bezeichnen. In der Studie von Meyer-Lindenberg (1998) waren nach durchschnittlich 15 Monaten nach Diagnosestellung über die Hälfte der betroffenen Katzen ($n = 57$) aufgrund der Niereninsuffizienz verstorben oder euthanasiert worden. Bei den meisten überlebenden Tieren kam es innerhalb dieses Zeitraumes zu einem Fortschreiten der Nephropathie. Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung lag bei durchschnittlich 6,6 Jahren, wobei die jüngste Katze ein Jahr und die älteste sechzehn Jahre alt war.

2.1.2 Das morphologische Erscheinungsbild der PKD

Bei Perserkatzen mit PKD fanden sich pro Niere eine bis über 200 Zysten in Rinde und Mark, deren Durchmesser von unter einem bis etwa achtzig Millimetern variierte (Biller et al., 1996; Meyer-Lindenberg et al., 1998). Diese Variationsbreite entspricht den Beobachtungen bei der ADPKD des Menschen und spiegelt die individuell variable Penetranz dieses Erbdefektes wider. Katzen unter sechs Monaten weisen kleinere Zysten auf, wobei die Gesamtzahl der Zysten eines Individuums mit steigendem Alter nicht zunimmt (Eaton et al., 1997).

Die Zysten werden von flachem oder kubischem Epithel begrenzt. In Nachbarschaft einiger Zysten finden sich interstitielle Fibrose, nicht-eitrige interstitielle Nephritis oder Kompression gesunden Parenchyms mit Tubulusdegeneration (Biller et al., 1996; Eaton et al., 1997).

Nierenzysten enthalten klare bis gelbliche Flüssigkeit, oft auch Fibrin oder Blut. Das relative Nierengewicht liegt nur bei älteren Tieren mit entsprechend stark ausgeprägten Zystennieren über den Werten gesunder Vergleichstiere (Eaton et al., 1997).

Zusätzliche eher seltene extrarenale Veränderungen sind Leberzysten, Leberzirrhose, hypertrophe Kardiomyopathie des linken Ventrikels, dilatative Kardiomyopathie und Hydrozephalus. Im Vergleich zur ADPKD des Menschen, bei der bis zu 75 % der Patienten neben Zystennieren auch Leberzysten aufweisen, sind sie bei der Katze im Zusammenhang mit Zystennieren ein relativ seltener Befund. Häufigkeiten werden mit 2,2 % bis 7,4 % angegeben (Eaton et al., 1997; Meyer-Lindenberg et al., 1998; Gerwing et al., 1999). Gallengangsfibrose und –hyperplasie sind dagegen häufige Befunde. Vereinzelt wurden bei Katzen Zysten in anderen Organen wie Pankreas und Ovar gesehen. Diese traten jedoch nicht in Kombination mit Nierenzysten auf. Nur bei jeweils 0,2 % der untersuchten Perserkatzen und Katzen anderer Rassen fanden sich multiple Leberzysten, ohne dass parallel Nierenzysten vorlagen (Gerwing et al., 1999).

2.1.3 Die Vererbung der PKD bei der Perserkatze

Die Beschreibung der PKD bei einer Perserkatzenfamilie ergab erstmals Hinweise auf den autosomal-dominanten Erbgang der PKD bei Perserkatzen. Die Tatsache, dass mehr als 50 % des Nachwuchses Nierenzysten aufwies und innerhalb der Familie sowohl männliche als auch weibliche Tiere betroffen waren, ließen eine Erbkrankheit mit autosomal-dominanter Vererbung vermuten (Biller et al., 1990; Biller et al., 1996). Von einer familiären Häufung der PKD bei Perserkatzen wurde auch von anderen Autoren berichtet (Meyer-Lindenberg et al., 1998).

Untersuchungen an einer Katzenpopulation, die durch Anpaarung von Perserkatzen mit und ohne Nierenzysten sowie zystenfreien Kurzhaarkatzen als Elterngeneration etabliert worden war, bestätigten die Vermutung des autosomal-dominanten Erbgangs (Biller et al., 1996).

Weiterhin segregiert die PKD nicht mit den Merkmalen „Langhaarigkeit“ und „Brachycephalie“ der typischen Perserkatze, da einige der zystenpositiven Nachkommen aus Verpaarungen von Perserkatzen mit Kurzhaarkatzen diese Merkmale nicht aufwies (Biller et al., 1996).

Der Phänotyp einer dominant vererbten Erkrankung kann sowohl bei homo- als auch heterozygoten Merkmalsträgern beobachtet werden. Im Falle der PKD des Menschen und auch der Katze deutet jedoch vieles darauf hin, dass homozygote Merkmalsträger nicht auffällig werden, da sie bereits zu einem noch unbekanntem Zeitpunkt während der Gravidität sterben. Hierfür sprechen zum Beispiel die Untersuchungen an einem Mausmodell der ADPKD mit einer transgenen Mauslinie. Das Transgen enthält eine Mutation im Exon 34 des PKD1-Gens. Homozygote Merkmalsträger sterben perinatal mit massiv vergrößerten Nieren, Pankreaszysten und Lungenhypoplasie, während heterozygote Tiere zu diesem Zeitpunkt noch phänotypisch unauffällig sind (Lu et al., 1997). Auch die Daten der Dissertation von S. Helmig (2005) sprechen für einen autosomal dominanten Erbgang des Polyzystischen Syndroms der Perserkatze mit Letalität der homozygoten Merkmalsträger (Helmig, 2005).

2.1.4 Diagnose

2.1.4.1 Die Ultraschalluntersuchung

Für die Diagnose von Nierenzysten bei Katzen ist die Ultraschalluntersuchung das Mittel der Wahl. In der Satzung des ersten Deutschen Edelkatzen Züchterverbandes ist die PKD eines der Merkmale, das bei Perserkatzen zum Zuchtausschluss des betroffenen Tieres führt. Als Untersuchungsmethode wird der Ultraschall empfohlen (DEKZV, 2004). Hierzu ist ein qualitativ hochwertiges Gerät, ein Schallkopf von mindestens 7,5 MHz und große Erfahrung des Untersuchers bei der ultrasonographischen Beurteilung von Katzenieren notwendig. Im Ultraschallbild der Nieren stellen sich Zysten als echofreie bis echoarme, kugelförmige, ovale oder unregelmäßig geformte Gebilde variabler Größe dar. Die Zystenwand ist flach, scharf begrenzt und bedingt eine distale Schallverstärkung. Unter optimalen Bedingungen können Zysten ab einem Millimeter Durchmesser identifiziert werden (Biller et al., 1996; Meyer-Lindenberg et al., 1998; Gerwing et al., 1999; Reichle et al., 2002).

2.1.4.1.1 Sensitivität und Spezifität der Ultraschalluntersuchung

Durch Sektion und histopathologische Untersuchung von Versuchstieren mit ultrasonographisch nachgewiesenen Nierenzysten konnten die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung überprüft werden. Zysten im Nierenparenchym sind frühestens bei sieben Wochen und spätestens bei 44 Wochen alten Tieren nachweisbar. Je älter die Katzen zum Zeitpunkt der Ultraschalluntersuchung sind, desto genauer ist das Ergebnis der Untersuchung. Die Sensitivität der Ultraschalluntersuchung in Bezug auf den histopathologischen Nachweis von Zysten bei Katzen unter 16 Wochen beträgt 75 % und die Spezifität 100 %. Bei über 16 Wochen alten Tieren liegen die Sensitivität bei 91 % und die Spezifität bei 100 %. Durch die allmähliche Vergrößerung der Zysten steigt die Diagnosesicherheit im Laufe der Zeit. Unter der Voraussetzung, dass ein erfahrener Untersucher mit einem hochauflösenden Gerät die Nieren im Hinblick auf Nieren-

zysten untersucht, ist der Ultraschallbefund bei Katzen im Alter von zehn Monaten zu 98 % sicher (Biller et al., 1996; Biller et al., 1998; Gerwing et al., 1999).

2.1.4.1.2 Diagnosestellung „PKD“ durch die Ultraschalluntersuchung

Schwierigkeiten bereitet die Frage, ab wie vielen ultrasonographisch nachgewiesenen Nierenzysten von einer „Polycystic“ Kidney Disease gesprochen werden kann. Einige Autoren verwendeten den Begriff PKD bei der Perserkatze, wenn im Ultraschallbild in einer Niere multiple Zysten oder aber in beiden Nieren mindestens eine Zyste vorhanden waren (Lyons et al., 2004). Anderen Autoren fiel die Diagnose leicht, da alle untersuchten Tiere multiple Zysten in den Nieren und zum Teil auch in der Leber aufwiesen (Stebbins, 1989; Biller et al., 1990; Biller et al., 1996).

Bei Ultraschalluntersuchungen von Perserkatzen vor dem Zuchteinsatz lautet die Diagnose „PKD“, sobald eine einzige Zyste in einer der beiden Nieren nachgewiesen wird (Gerwing et al., 1999; Barthez et al., 2003). Nierenzysten sind bei Jungtieren in der Regel mikroskopisch klein angelegt, nehmen im Laufe der Zeit aber an Größe zu. Erst ab einem Millimeter Durchmesser sind sie im Ultraschallbild darstellbar. Somit besteht vor allem bei Jungtieren die Gefahr, dass aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens des Ultraschallgerätes nur eine singuläre Nierenzyste nachweisbar ist, aber weitere, vorerst nicht detektierbare Zysten vorhanden sein können. Dieser recht strenge Maßstab wird aufgrund des autosomal-dominanten Erbgangs der PKD bei Perserkatzen und dem Bestreben, möglichst alle Merkmalsträger aus Zuchtbeständen zu entfernen, angelegt (Gerwing et al., 1999; Herzog, 2001). Unterstützt wird diese Ansicht durch die Beobachtung, dass auch Katzen die nur eine Zyste in einer Niere aufwiesen, zystenpositive Nachkommen hatten (Biller, 2000).

2.1.5 Züchterische Konsequenz der PKD

Katzen mit Nierenzysten (bereits eine ist ausreichend!) dürfen in Deutschland nicht zur Zucht eingesetzt werden. Die Zucht mit Merkmalsträgern kann als Verstoß gegen § 11b TschG gewertet werden, weshalb die Sonographie bei Zuchttieren zwingend gefordert wird (Herzog, 2001; DEKZV, 2004).

2.1.6 Prävalenz von Nierenzysten bei Perserkatzen

Untersuchungen über die Prävalenz des Polyzystischen Syndroms bei Perserkatzen wurden in unterschiedlichen Erdteilen durchgeführt.

Im Patientengut der Klinik für Kleintiere, Abteilung Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen fanden sich 1983-1992 8,6 % zystenpositive Perserkatzen (n = 7). Die Anzahl PKD-betroffener Tiere stieg über 19,4 % (n = 34) in den Jahren zwischen 1993-1997 auf 43,3 % (n = 107) in den Jahren von 1998 bis 1999 (Gerwing et al., 1999). Diese Angaben stimmen ungefähr mit den Untersuchungsergebnissen der Tierärztlichen Hochschule Hannover überein.

Hier bestanden bei 29,7 % (n = 57) der in den Jahren von 1994 bis 1996 untersuchten Perserkatzen Nierenzysten (Meyer-Lindenberg et al., 1998).

In Frankreich wurden in den Jahren von 2000 bis 2002 bei 42,8 % der Perserkatzen (n = 92) und 39,1 % (n = 25) der Exotic Shorthair-Katzen Nierenzysten festgestellt (Barthez et al., 2003).

In Großbritannien lag im Jahre 2001 die Prävalenz für Nierenzysten bei Perserkatzen sogar bei 49,2 % (n = 65) (Cannon et al., 2001).

Veröffentlichungen aus Australien zufolge lag die Prävalenz von Nierenzysten bei Perserkatzen in Brisbane bei 42 % (n = 70), in Sydney und in Melbourne bei jeweils 45 % (n = 37 bzw. n = 113). Katzen der Rassen Exotic Shorthair, die in Sydney untersucht wurden, waren sogar zu 50 % (n = 14) betroffen. Auch zwei von vierzehn ultrasonographisch untersuchten Burmillakatzen (14 %) zeigten Nierenzysten (Barrs et al., 2001; Beck und Lavelle, 2001; Barthez et al., 2003).

2.1.7 Zystogenese und möglicher Pathogenesemechanismus

Nierenzysten werden von flachem bis kubischem, einschichtigem Epithel ausgekleidet. Hierbei ist die Zellform unabhängig von der Größe der Zyste. Das Epithel einiger Zysten zeigt Eigenschaften proximaler oder distaler Nephronabschnitte. Es gelingt nicht, jede Zyste eindeutig einem bestimmten Nephronsegment durch Nachweis eines Bürstensaumes, apikaler Vakuolisierung oder Canaliculi oder anhand des Lektinbindungsvermögens zuzuordnen. Der Aufbau der basolateralen Zellmembran ist weniger komplex als bei Membranen gesunder Tubuluszellen. Aus diesen Gründen wird angenommen, dass eine Zyste in verschiedenen Nephronsegmenten entstehen kann, das Epithel aber durch Dedifferenzierung während der Zystogenese typische Eigenschaften des ursprünglichen Epithels verliert (Eaton et al., 1997).

Die Basalmembran des Zystenepithels zeigt keinen Unterschied zu den Basalmembranen normaler Epithelien im Nephron. In diesem Punkt unterscheiden sich feline Nierenzysten von den Zysten humaner ADPKD-Patienten. Bei Letzteren sind die Basalmembranen oft verdickt oder laminiert (Eaton et al., 1997).

Bei Zystennieren des Menschen werden verschiedene pathogenetische Mechanismen der Zystenentstehung wie gesteigerte Proliferation des Tubulusepithels und reverse Polarität der Epithelzelle diskutiert. Gelegentlich finden sich auch bei der Perserkatze knotige, in das Zystenlumen hineinragende Epithelproliferationen. Eine gesteigerte Proliferationsrate und DNS-Synthese wird vornehmlich bei jungen Katzen gesehen. Die Beobachtungen deuten auch bei der Katze auf die Beteiligung gesteigerter Epithelproliferation in frühen Phasen der Zystogenese hin (Eaton et al., 1997).

Bei humanen ADPKD-Patienten findet man einen Verlust der Zellpolarität durch Translokation der Na/K-ATPase von der basolateralen Seite der Zellmembran zur luminalen Seite. Der immer noch funktionierende Transporter führt zu einem reversen Flüssigkeitsstrom und damit zum Wachstum der Zyste. Bei der Katze ist die Translokation der Na/K-ATPase unvollständig. Sie

findet sich in der Membran sowohl basolateral und luminal als auch intrazytoplasmatisch. Aus diesem Grund scheint die Translokation des Enzyms kein essentieller Faktor in der Zystenentstehung zu sein (Eaton et al., 1997).

2.1.8 Molekulare Ursache des Polyzystischen Syndroms der Perserkatze

Durch Kopplungsanalysen wurde bei der Perserkatze das PKD1-Gen auf Chromosom E3 als Kandidatengen identifiziert (Grahn et al., 2004; Lyons et al., 2004; Helmig, 2005; Young et al., 2005). In einer Studie konnte eine C>A-Transversion im Exon 29 des PKD1-Gens identifiziert werden. Diese Punktmutation führt zu einem zusätzlichen Stopcodon, was zu einem vorzeitigen Abbruch der Aminosäurenkette führt. Diesem Protein fehlen etwa 25 % des C-terminalen Endes. Homozygote Träger der Mutation traten nicht auf. Dies unterstützt die Vermutung, dass die homozygot vererbte Mutation zum embryonalen Tod führt. Das feline PKD1-Gen wurde aus einem Bac-Klon (GenBank accession no. AC145332.26) isoliert und bis auf Exon 1 und Intron 4 sequenziert (Lyons et al., 2004).

Im Gegensatz zum PKD1-Gen des Menschen lassen sich mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei der Katze keine Duplikate des PKD1-Gens auf Chromosom 3 oder einem anderen Chromosom nachweisen. Auch die PKD1-Homologe von Hund und Maus sind sogenannte Single Copy Genes. In den beim Menschen duplizierten Bereichen des PKD1-Gens fanden sich bei Katzen bisher keine Sequenzvarianten. Daher ist das Vorliegen von PKD1-Pseudogenen bei der Katze nicht zu erwarten (Lyons et al., 2004).

2.2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD)

des Menschen

Die ADPKD, Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ist eine der häufigsten Erbkrankheiten. Die Inzidenz liegt bei etwa 1,38 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Unter Berücksichtigung der erst in der Obduktion diagnostizierten Läsionen und der unentdeckt gebliebenen Fälle wird eine Inzidenz von 2,06 angenommen (Iglesias et al., 1983). Bei acht bis zehn Prozent der Patienten mit chronischem Nierenversagen im Endstadium ist die ADPKD Ursache der Erkrankung (Gabow, 1993).

2.2.1 Das morphologische und klinische Erscheinungsbild der ADPKD

Die charakteristische Veränderung der ADPKD sind die Nierenzysten, die verteilt zwischen völlig unveränderten Nephronen liegen. Sie entwickeln sich in unterschiedlichen Abschnitten des Nephrons (proximale und distale Tubuli, Henle'sche Schleife und Sammelgänge, auch Glomerulumzysten wurden in Einzelfällen nachgewiesen). Einige Zysten lassen sich jedoch

keinem bestimmten Tubulusabschnitt zuordnen, so dass Zysten vermutlich aus jedem Segment eines Nephrons entstehen können (Dalgaard, 1957; Baert, 1978; Faraggiana et al., 1985).

Nierenzysten variieren deutlich in Größe und Form von einigen Millimetern bis mehreren Zentimetern. Sie sind gefüllt mit klarer über wolkig-trüber bis hin zu schokoladenfarbener Flüssigkeit. Die daraus resultierende Renomegalie kann zu Nieren mit einer Länge von 40 cm und mehr als acht Kilogramm Gewicht führen (Gabow, 1993).

Mit zunehmender Zahl und Größe der Zysten stellen sich Funktionsstörungen der Niere ein. Eines der frühesten Symptome ist die Abnahme der Harnkonzentrierungsfähigkeit (Gabow et al., 1989).

Die Veränderungen sind progressiv und führen über kurz oder lang, in der Regel aber erst im mittleren bis hohem Erwachsenenalter, zur Niereninsuffizienz. Verschiedene Studien errechneten Überlebenskurven von Patienten bis zum Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz. Nur fünf Prozent der Patienten unter 40 Jahren leiden demnach bereits an Nierenversagen. In der Altersklasse der 50-jährigen Patienten steigt ihr Anteil auf 29 %, bei den etwa 60-jährigen sind es 53 % und sogar 87 % bei 70-jährigen (Milutinovic et al., 1984; Gabow et al., 1992).

Leberzysten gehören mit einer Prävalenz von knapp 30 % hinter den Nierenzysten zur häufigsten Manifestation der ADPKD (Milutinovic et al., 1980; Gabow et al., 1990). Die Zusammensetzung der Zystenflüssigkeit, v.a. der Gehalt an IgA, spricht für die Entwicklung der Leberzysten aus Gallengängen (Patterson et al., 1982; Everson et al., 1990). Die Ausprägung der Leberveränderungen wird durch Faktoren wie Alter, Geschlecht, zurückliegende Schwangerschaften, Schwere der Nierenläsionen und Funktionalität der Nieren beeinflusst. Die Anzahl der Leberzysten steigt mit dem Alter (Milutinovic et al., 1980; Gabow et al., 1990). Leberzysten sind allerdings eine relativ harmlose Veränderung ohne Einschränkung der Leberfunktion oder portalen Hochdruck (Milutinovic et al., 1980).

Weiterhin sind Defekte der Herzklappen, Hypertrophe Kardiomyopathien und Darmdivertikel bei ADPKD-Patienten im Gegensatz zu Kontrollpersonen ein häufiger Befund (Hossack et al., 1988; Scheff et al., 1989; Chapman et al., 1997).

2.2.2 Die Genetik der ADPKD

Die Untersuchungen von Dalgaard (1957) deckten den autosomal-dominanten Erbgang der ADPKD auf.

Das erste Kandidatengen wurde am sogenannten APCKD-Locus (Adult Polycystic Kidney Disease) eng gekoppelt mit dem Alpha-Globin-Locus auf Chromosom 16 lokalisiert (Reeders et al., 1985). Genauere Analysen grenzten seine Lage auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 in 5'-Richtung vom Alpha-Globin-Locus in der Region 16p13-p12 ein (Watson et al., 1987).

Nach Untersuchungen, die vorerst keine genetische Heterogenität aufdecken konnten (Reeders et al., 1986), häuften sich dann aber Berichte über fehlende Kopplung mit dem Alpha-Globin-Cluster und der Erkrankung. Daher musste eine ursächliche Mutation an weiteren Genorten in Betracht gezogen werden (Kimberling et al., 1988; Romeo et al., 1988; Kumar et al., 1991). In

der Literatur ist im Anschluss an diese Berichte zunehmend und schließlich durchgehend die Bezeichnung „PKD1-Locus“ oder „PKD1-Gen“ für den ADPKD-Locus auf Chromosom 16 zu finden. Ein zweites Kandidatengen wurde auf Chromosom 4 lokalisiert (Kimberling et al., 1993; Peters et al., 1993). Angaben zur Häufigkeit der Kopplung der ADPKD mit den Kandidatengen sind vor allem in Untersuchungen der spanischen Population zu finden. Bei etwa 85 % der ADPKD-betroffenen Familien fand man eine Kopplung zum PKD1-Gen auf Chromosom 16 (Reeders et al., 1985; Peral et al., 1993; Torra et al., 1998). Im überwiegenden Teil der nicht-PKD1-assoziierten Erkrankungen, bis zu 15 %, wurde eine Kopplung zum PKD2-Gen, lokalisiert auf Chromosom 4, gefunden (Kimberling et al., 1993; Torra et al., 1998). Produkte dieser beiden Gene sind die Proteine Polyzystin 1 und 2. Nur bei einem geringen Anteil der betroffenen Familien ist die Erkrankung weder mit dem PKD1- noch dem PKD2-Gen gekoppelt, so dass noch mindestens ein weiterer Locus vermutet werden kann (Verani und Silva, 1988; Gabow, 1990; de Almeida et al., 1995). Entsprechend der Lokalisation der Mutation wird von ADPKD1, -2 oder -3 bzw. ADPKD Typ 1, 2 oder 3 gesprochen. Alternativ werden bei allen Typen zuweilen die Bezeichnungen PKD und APKD (Adult Polycystic Kidney Disease) verwendet (Demetriou et al.; 2000).

2.2.3 Diagnose

2.2.3.1 Die Ultraschalluntersuchung

Das am häufigsten verwendete Diagnostikverfahren der ADPKD ist die Ultraschalluntersuchung. Daneben wird die Computer- und die Magnet-Resonanz-Tomographie eingesetzt. Der Ultraschall wird aufgrund der hohen Sensitivität, der einfachen Durchführbarkeit und der relativ geringen Kosten bevorzugt (Gabow, 1993). Unklare Befunde können durch MRT und CT geklärt werden, wobei die Urographie bei den medullären Zystennierenerkrankungen dem CT überlegen ist (Klingel, 1999). Generell gilt, dass die Befunde bildgebender Verfahren allein keinen sicheren Rückschluss auf die Ätiologie der zystischen Veränderungen zulassen. Diagnosekriterien der ADPKD sind neben der altersabhängigen Bewertung des Untersuchungsbefundes die positive Familienanamnese (Klingel, 1999).

Die Prävalenz von einzelnen Nierenzysten steigt sowohl bei Mutationsträgern als auch in der Gesamtbevölkerung mit dem Alter an (Parfrey et al., 1990; Gabow, 1993; Demetriou et al., 2000). Die Wahrscheinlichkeit für einen falsch-negativen Befund bei Personen unter 10 Jahren aus einer ADPKD-Familie liegt bei 37 %. Mit zunehmendem Alter steigt die Diagnosesicherheit bis eine falsch-negative Diagnose bei Personen über 30 Jahren mit entsprechendem Risiko sehr unwahrscheinlich wird (Bear et al., 1992). Ravine untersuchte die Diagnosesicherheit des Ultraschalls über Kopplungsanalysen bei PKD1-Familien und empfahl bei Patienten mit ADPKD-Familiengeschichte die in Tabelle 2-1 angegebenen Diagnosekriterien (Ravine et al., 1994).

Tabelle 2-1: Kriterien eines Ultraschallbefundes für Personen mit ADPKD1-Risiko

Alter in Jahren	Anzahl der Zysten
< 30	Mindestens zwei unilaterale Zysten oder zwei Zysten in einer Niere
30-59	Mindestens zwei Zysten in jeder Niere oder insgesamt mind. fünf Zysten
> 60	Mindestens vier Zysten in jeder Niere oder mind. acht bilaterale Zysten

Tabelle modifiziert nach Klingel, 1999; Ravine et al., 1994

Demetriou et al. (2000) empfehlen Risikopatienten mit einer Mutation des PKD2-Gens in der Familie die Ultraschalluntersuchung nur bedingt als Diagnoseverfahren, da bei Kindern unter 14 Jahren die Diagnosesicherheit nicht ausreichend ist. Bei Erwachsenen über 30 Jahren ist bei Fehlen von Nierenzysten ein Ausschluss der PKD bereits zu 100 % möglich. Allerdings wird durch Auftreten von mehreren Zysten anderer Ursache in 3,9 % der Fälle eine ADPKD vorge-täuscht. Die Autoren verwenden altersabhängig die in Tabelle 2-2 angegebenen Kriterien.

Tabelle 2-2: Kriterien eines Ultraschallbefundes für Personen mit ADPKD2-Risiko:

Alter in Jahren	Anzahl der Zysten
5-14	Mindestens eine Zyste
15-19	Mindestens zwei unilaterale Zysten oder zwei Zysten in einer Niere
20-29	Mindestens drei Zysten mit bilateralem Auftreten
30-59	Mindestens zwei Zysten in jeder Niere
> 60	Mindestens vier Zysten in jeder Niere

Tabelle modifiziert nach Demetriou et al., 2000

2.2.3.2 Die Kopplungsanalyse

Eine Reihe von Autoren beschreiben Kopplungsanalysen mit hoch polymorphen Mikrosatelliten und RFLP-Markern, die das Auffinden vieler, mit dem PKD-Phänotyp verknüpfter Haplotypen möglich machen. Verschiedene Autoren halten die Kopplungsanalyse für ein sehr geeignetes Routineverfahren (Harris et al., 1991; Peral et al., 1994; Rossetti et al., 2001). Aufgrund der Vielzahl bekannter und unbekannter Mutationen müssen für jede Familie ein spezifisches Muster der polymorphen Marker ermittelt und möglichst alle Familienmitglieder dahingehend untersucht werden. Daher gehört sie nach Klingel (1999) nicht zum Repertoire der tatsächlich angewandten Routinediagnostik. Für den PKD1-Locus sind dreizehn Marker beschrieben worden (NCBI-Entrez-Gene-PKD1, 2006).

2.2.4 Ursachen der großen Variabilität des ADPKD-Phänotyps

Eine interessante Eigenheit der ADPKD ist die ausgeprägte inter- und intrafamiliäre phänotypische Variabilität der Erkrankung in Bezug auf das Alter bei Einsetzen von Symptomen und die Anzahl von Nierenzysten. Zur Erklärung gibt es verschiedene Ansätze.

2.2.4.1 Lokalisation der Mutation

Großen Einfluss auf den Phänotyp der ADPKD hat die Lokalisation der Mutation. Interfamiliäre Variabilität lässt sich zum Beispiel mit Mutationen in unterschiedlichen Kandidatengenen oder mit Defekten in verschiedenen Domänen eines Gens begründen (Qian und Watnick, 1999; Koptides und Deltas, 2000).

Bei der ADPKD1 führen Mutationen auf dem PKD1-Gen im Alter von durchschnittlich 53 bis 56 Jahren zum Terminalstadium der Niereninsuffizienz. Einzelne Autoren sehen hierbei einen Geschlechtsunterschied, der bei Frauen zu einem mildereren Krankheitsverlauf führt (Gretz et al., 1989; Parfrey et al., 1990; Hateboer et al., 1999b; Rossetti et al., 2002; Paterson et al., 2005). Es gibt auch Anzeichen für Genetic Imprinting. Stammt das betroffene Allel von der Mutter, setzt die terminale Niereninsuffizienz früher ein (Bear et al., 1992).

ADPKD2-Patienten haben eine Mutation des PKD2-Gens und zeigen einen etwas mildereren Krankheitsverlauf. Das durchschnittliche Alter, in dem die betroffenen Personen an Niereninsuffizienz im Endstadium leiden, liegt insgesamt höher als beim Typ 1 der ADPKD. In diesem Fall ist allerdings ein deutlicher Geschlechtsunterschied zu beobachten. Frauen erreichen die Phase der Niereninsuffizienz und das Terminalstadium der Niereninsuffizienz im Alter von durchschnittlich 72,5 bzw. 76 Jahren, Männer dagegen schon mit 63,7 bzw. 68,1 Jahren. Auch wird Bluthochdruck bei ADPKD2-Patienten weniger häufig diagnostiziert.

Eine große Bedeutung scheint auch die Lokalisation der Mutation innerhalb des PKD1-Gen zu haben. Ausgehend von der Genmitte in Höhe von Exon 19 sind Mutationen in der 5'-Region mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert als Mutationen in der 3'-Region. Hierbei ist die Art der Mutation jedoch irrelevant. Demzufolge scheint die Synthese zumindest teilweise funktionsfähiger Proteine möglich zu sein (Hateboer et al., 1999a; Hateboer et al., 2000; Rossetti et al., 2002).

2.2.4.2 Phänotypische Unterschiede durch modifizierende Faktoren

Unterschiede zwischen Familienmitgliedern mit ein und derselben Keimbahnmutation sind dagegen weniger leicht verständlich. Es gibt deutliche Altersunterschiede bei Einsetzen der ersten Symptome, Art der ersten Symptome, Alter bei Einsetzen der Niereninsuffizienz im Endstadium, Serumkreatininkonzentrationen und Nierengröße (Milutinovic et al., 1992; Hateboer et al., 2000; Rossetti et al., 2002). Möglicherweise besitzen Zellen die Fähigkeit, Alternativwege der Signaltransduktion zu nutzen, um den Effekt der Mutation zu kompensieren. Auch könnten genetische modifizierende Faktoren, die Umgebung und der Stoffwechsellzustand der Zelle sowie viele Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Qian und Watnick, 1999; Koptides und Deltas, 2000; Rossetti et al., 2002). Untersuchungen an Mausmodellen ergaben bereits Hinweise auf mehrere Genorte, auf denen den PKD-Phänotyp modifizierende Faktoren lokalisiert sind (Jakoubova et al., 1995; Woo et al., 1997; Guay-Woodford et al., 2000). Ein Kandidatengen aus

einem dieser Bereiche ist das Gen D1Mit17, dessen Produkt RGS7 ein Regulator der G-Protein gekoppelten Signalkette ist, die an Polyzystin 1 bindet (Guay-Woodford et al., 2000).

2.2.4.3 Das Modell des Second Hit

Eine große Bedeutung besitzt das so genannte Second-Hit-Modell, das erstmals von Knudson (1971) im Zusammenhang mit der Entstehung des Retinoblastoms des Menschen beschrieben wurde. Das Modell besagt, dass der Tumor aufgrund von zwei Mutationsereignissen entsteht. Bei der dominant vererbten Form dieses Tumors wird die erste Mutation über die Keimbahn vererbt. Der Anlageträger entwickelt jedoch erst einen Tumor, wenn eine somatische Mutation hinzukommt. Durchschnittlich werden drei Tumoren pro Individuum beobachtet. Dies erklärt, warum bei Mutationsträgern sowohl kein Tumor als auch multiple, sowohl unilaterale als auch bilaterale Retinoblastome diagnostiziert werden (Knudson, 1971). Verschiedene Studien führen den Second Hit auch bei der ADPKD als wichtigen Schritt der Zystogenese an. Zunächst ist das Vorhandensein einer ererbten Mutation des PKD1-Gens notwendig. Sie ist jedoch noch nicht ausreichend, um die Wirkung des Genprodukts aufzuheben und zu einer gestörten Nierenentwicklung zu führen. Hierzu ist eine weitere, somatische Mutation des zweiten Allels erforderlich. Die PKD ist also eine Erkrankung mit phänotypisch dominanter Vererbung, der auf zellulärer Ebene zunächst eine rezessive Veränderung zugrunde liegt.

Untersuchungen mit Hilfe von X-Chromosom-Inaktivierungs-Assays an Epithelzellen, die aus einzelnen Zysten isoliert wurden, zeigten die Monoklonalität der Zysten. Von 76 Nierenzysten, die von acht weiblichen ADPKD-Patienten stammten, waren 82 % (n = 62) monoklonal (Qian et al., 1996). In einigen dieser Zellpopulationen lässt sich der Second Hit als erworbener Verlust des ursprünglichen Wildtypallels darstellen. Dieses Phänomen wird als Loss of Heterozygosity (LOH) bezeichnet. Zum Nachweis wurden Zysten überprüft, deren Spender aufgrund von Blutuntersuchungen bekanntermaßen heterozygot für den verwendeten intragenischen PKD1-Mikrosatelliten waren. 17 % der 46 präparierten Zysten waren jedoch hemizygot, das heißt, es war nur ein Allel nachweisbar. Kopplungsanalysen zeigten, dass das Wildtypallel im zystischen Gewebe nicht mehr darstellbar war (Qian et al., 1996). Auch weitere Forschungsgruppen konnten bei vier von siebzehn beziehungsweise fünf von 21 isolierten Zysten den LOH nachweisen. Die erworbene Inaktivierung des Wildtypallels kann durch Mutationen in Form von Nonsense und Missense Mutationen erfolgen (Brasier und Henske, 1997; Koptides et al., 1998). LOH konnte sowohl in Epithelien von Leberzysten bei ADPKD1-Patienten, als auch in Nierenzysten von Patienten mit Mutationen des PKD2-Gens gezeigt werden (Watnick et al., 1998; Koptides et al., 1999; Pei et al., 1999). Die zweite somatische Mutation ist damit der limitierende Faktor. Ihre Häufigkeit und Lokalisation bestimmt die Anzahl von Organzysten und das Auftreten weiterer PKD-assoziiierter Veränderungen (Watnick et al., 2000).

In einer Untersuchung ergaben sich Hinweise auf den sogenannten trans-heterozygoten Funktionsverlust der Genprodukte der PKD-Gene. Man fand unabhängige somatische Mutationen des PKD1-Gens in Zystenepithelien von Personen, die einen ererbten Defekt des PKD2-Gens hat-

ten. Hieraus könnte eine Unterbrechung der Signalkette, in die beide Proteine involviert sind, resultieren (Watnick et al., 2000).

2.2.5 Pathogenesemechanismus der Zystogenese

In allen Abschnitten des Nephrons können sich Zysten entwickeln. Das die Zysten auskleidende Epithel entspricht in 7 % dem Epithel der Sammelgänge, in jeweils etwa 2 % den proximalen Tubuli oder den Glomerula. Der Großteil der Zystenepithelien (84 %) ist allerdings wenig differenziert und kaum einem bestimmten Nephronabschnitt zuzuordnen (Grantham et al., 1987).

Anhand von Tiermodellen der ADPKD, Zellkulturen mit MDCK-Linien und kultivierten Epithelzellen humaner Nierenzysten wurde dargestellt, dass Veränderungen des Zellwachstums, der Flüssigkeitssekretion und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix eine Rolle in der Zystogenese spielen (Gabow, 1993).

2.2.5.1 Pathologische Proliferation des Tubulusepithels

Bei ADPKD-Patienten sind Proliferationen des die Zysten auskleidenden Epithels in Form von hyperplastischen Polypen, kleinen Adenomen oder auch einzelnen Adenokarzinomen ein relativ häufiger Befund (Gregoire et al., 1987). Bei Betrachtungen der einzelnen Zysten fanden sich Epithelproliferationen bei etwa 5 % der Zysten (Grantham et al., 1987).

In normalen Nierenzellen bildet das Produkt des PKD1-Gens Polyzystin 1 mit E-Cadherin und Cateninen einen Komplex in der Zellmembran. Dieser Komplex spielt eine Rolle in der Zelladhäsion, -proliferation und -polarität (Huan und Van Adelsberg, 1999), ist aber zumindest in primären Zellkulturen von ADPKD-Patienten zerstört (Roitbak et al., 2004). Im Hinblick auf das Polyzystin 1 wurde in vitro gezeigt, dass sein C-Terminus unter cAMP-Stimulation starken Einfluss auf eine abnorme Zellproliferation hat (Sutters et al., 2001).

Auch der EGF-Rezeptor (Epidermal Growth Factor-Rezeptor) und sein Ligand TGF- α (Transforming Growth Factor- α) werden in Zellen zystischer Nieren stärker exprimiert als in gesunden Nieren (Klingel et al., 1992). Im Zystenepithel findet man neben den normalen, in der basolateralen Zellmembran lokalisierten Rezeptoren zusätzliche funktional aktive EGF-Rezeptoren in der apikalen Seite. Eine autokrine Schleife, bei der die zystenumgebenden Epithelzellen EGF (Epidermal Growth Factor) synthetisieren und apikal in die Zystenflüssigkeit sezernieren, unterstützt das Wachstum der Zysten (Wilson et al., 1993; Du und Wilson, 1995). Zudem reagieren Zystenepithelzellen in Zellkultur hyperproliferativ auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie EGF, dagegen ist ihre Antwort auf proliferationsinhibitorische Faktoren wie TGF- β vermindert (Wilson, 1991).

2.2.5.2 Sekretion

Ein potentieller Mechanismus des Zystenwachstums ist eine gesteigerte Flüssigkeitssekretion in das Zystenlumen (Ye und Grantham, 1993). Eine Ursache ist die abnorme Lokalisation der

Na⁺/K⁺-ATPase. Im Gegensatz zu normalen Tubuluszellen befindet sie sich nicht nur in der basolateralen Seite der Zellmembran sondern auch apikal. Sie zeigt eine gesteigerte sekretorische Aktivität und zudem einen reversen Transport von basal nach apikal in das Zystenlumen hinein (Wilson et al., 1991). Die apikale Expression des Transporters ist im Tiermodell ein normales vorübergehendes Ereignis während der Tubulogenese. Im Zystenepithel persistiert sie jedoch, was auf den relativ undifferenzierten Zustand dieses Epithels schließen lässt (Avner et al., 1992).

2.2.5.3 Veränderungen der extrazellulären Matrix in zystischem Gewebe

Im Zystenepithel findet sich eine verdickte Basalmembran, die Laminin, Fibronectin, Typ IV-Kollagen und Heparansulfatproteoglykane enthält. Zudem produzieren die Zellen in Kultur extrazelluläre Proteine, die normalerweise von Nierenepithelzellen nicht gebildet werden (Granot et al., 1990; Wilson et al., 1992). Im Interstitium ist Typ I-Kollagen vorhanden. Bestandteile und Zusammensetzung der Basalmembran scheinen das exzessive Wachstum der Zystenepithelien zu unterstützen (Wilson et al., 1992).

2.2.6 Das PKD1-Gen des Menschen

Das humane PKD1-Gen befindet sich auf Chromosom 16p13.3. Es liegt in direkter Nachbarschaft zum weiter proximal gelegenen TSC2-Locus in Tail-to-Tail-Orientierung und ist eng mit dem α -Globin-Locus sowie mit dem PGP-Marker (Phosphoglycolatphosphatase) gekoppelt (Watson et al., 1987; Germino et al., 1992; European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Die gesamte Region von 750 kb ist außerordentlich reich an CpG-Dinukleotiden (Harris et al., 1990; Germino et al., 1992).

Das PKD1-Gen erstreckt sich über 52 kb. Es enthält 46 Exons mit einem offenen Leseraster von 12.912 bp. Sein Transkript wird mit einer Länge von 14,1 bis 14,5 kb angegeben (Hughes et al., 1995; International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). Im Gegensatz zu den in der Literatur angegebenen 46 Exons wurden in der Sequenzdatenbank der NCBI (National Center for Biotechnology Information) für das humane PKD1-Gen allerdings 50 Exons beschrieben (NCBI-Nucleotide, Accession Nr. AC005600).

2.2.7 Pseudogene des PKD1-Gens

Ein großer Teil des PKD1-Gens liegt als Duplikat im humanen Genom vor. Sechs Pseudogene sind auf Chromosom 16p beschrieben worden (NCBI-Entre-Gene-PKD1, 2006). Die Ähnlichkeit zum PKD1-Gen liegt bei etwa 95-97 % (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994; Hughes et al., 1995; Bogdanova et al., 2001).

Proximal des PKD1-Gens sind mindestens drei homologe Sequenzen mit transkriptionaler Aktivität lokalisiert (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994; International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995; Loftus et al., 1999). Die Sequenz von zwei der homo-

logen Genorte (HG1 und HG2) weicht in zwei Prozent von der Sequenz des PKD1-Gens ab. Sie sind bedeutend kürzer als das PKD1-Gen. HG1 enthält die PKD1-Sequenz bis Exon 33, es finden sich jedoch zwei große Deletionen hinter Exon 1 und im Bereich von Exon 15 bis 16. Die Sequenz von HG 2 entspricht bis auf das fehlende Exon 1 dem PKD1-Gen bis Exon 33 (Loftus et al., 1999). Diese DNA-Abschnitte werden transkribiert (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994; Bogdanova et al., 2001), eine Translation findet, zumindest in der Modellzelllinie T98G, jedoch nicht statt. Das Fehlen eines optimalen Startcodons verhindert die Bindung der mRNA an die Ribosomenuntereinheiten und damit die Translation. Daher handelt es sich bei diesen Abschnitten um Pseudogene (Bogdanova et al., 2001). Die Existenz dieser homologen Genorte bzw. Pseudogene spricht für die Instabilität dieser Region auf Chromosom 16 (Loftus et al., 1999).

2.2.8 Mutationen des PKD1-Gens des Menschen

Im PKD1-Gen wurde eine Vielzahl von Mutationen ausfindig gemacht. Viele davon treten nur in einzelnen Familien auf. Die ersten gefundenen Mutationen waren eine das Gen unterbrechende Chromosomentranslokation, zwei Deletionen und ein Spleißdefekt (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994).

Eine Studie aus dem Jahr 2001 (Rossetti et al.) untersuchte die gesamte kodierende Region des PKD1-Gens auf das Vorhandensein potentiell krankheitsauslösender Mutationen. Insgesamt wurden 69 Mutationen und 32 Polymorphismen ausfindig gemacht. Sie verteilen sich auf das gesamte Gen ohne deutliche Hot Spots. Lediglich im Gebiet zwischen Exon 15 und 18 befindet sich auf einer Länge von 1 kb eine höhere Mutationsdichte. Mutationen kommen ebenfalls nicht häufiger im Genbereich zwischen Exon 1 und 33 vor, welcher in mehreren homologen Genen dupliziert ist. Stattdessen gibt es nahezu doppelt so viele Mutationen in der 3'-Hälfte des Gens als in der 5'-Hälfte. Nur drei der Mutationen finden sich ebenfalls in homologen Genen, was gegen Genkonversion als besonders häufige Ursache der hohen Mutationsrate dieses Gens spricht. Die häufigsten Mutationen stellen Nonsensmutationen mit 32 % dar, gefolgt von Insertionen bzw. Deletionen mit 29,6 %. Mutationen an Spleißstellen wurden mit einer Häufigkeit von 6,2 % beobachtet. Die Autoren errechneten eine hohe Mutationsrate des PKD1-Gens von $1,8 \times 10^{-5}$ pro Generation. Zudem müssen eine Reihe der gefundenen Mutationen erst in den letzten Generationen der untersuchten Familien aufgetreten sein. Dies lässt einerseits eine ansteigende Häufigkeit der Erkrankung in einer Population vermuten, was aber andererseits durch einen Selektionsdruck auf mutierte Allele unterdrückt wird. Die Selektion erfolgt beispielsweise durch verminderte Reproduktionsfähigkeit und früheren Tod vor oder während der Reproduktionsphase (Rossetti et al., 2001).

2.3 Das Protein Polyzystin 1

Das PKD1-Gen codiert für das Glykoprotein Polyzystin 1. Dieses besitzt eine extrazelluläre N-terminale Region, multiple transmembranöse Domänen und einen cytoplasmatischen C-Terminus. Es besteht aus 4.304 Aminosäuren und einem geschätzten Gewicht von 462 kDa (Hughes et al., 1995; International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995).

Polyzystin 1 ist ein multifunktionales Protein, wobei längst nicht alle Funktionen vollständig geklärt sind. Vielmehr gibt es eine Vielzahl von Hinweisen und Modellen, die die Wirkungsweise der Polyzystine (Polyzystin 1 und 2) erklären sollen. Die Aufgaben von Polyzystin 1 liegen in der Reifung von Epithelzellen und in der Aufrechterhaltung der renalen epithelialen Differenzierung. Es spielt eine Rolle in der Organisation der Nephronstruktur in frühen fetalen Lebensphasen und ist an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt (Ward et al., 1996; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997). Polyzystin 1 ist Teil desmosomaler Strukturen von Epithelzellen (Xu et al., 2001; Bukanov et al., 2002). Hier bildet Polyzystin 1 mit den Zelladhäsionsmolekülen E-Cadherin und α -, β - sowie γ -Catenin einen Multiproteinkomplex. Dabei ist E-Cadherin maßgeblich an der Regulation von Proliferation und Zellpolarisierung des Epithels beteiligt. Die Modulation dieser Prozesse erfolgt über die zytoplasmatischen Catenine und Verbindung zum Zytoskelett. Über das Zytoskelett, insbesondere über α -Ankyrin und Spektrin, ist die Na^+/K^+ -ATPase mit diesem Komplex verbunden (Huan und Van Adelsberg, 1999). Die zytoplasmatische C-terminale Region von Polyzystin 1 stabilisiert zum einen das lösliche β -Catenin (Kim et al., 1999). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Polyzystin 1, zumindest in Zellkulturen von caninen Zellen, über eine Coiled-Coil-Domäne des C-Terminus mit Intermediärfilamenten (Desmin, Zytokeratin K8 und K18 sowie Vimentin) interagiert (Xu et al., 2001).

Die Expression des humanen PKD1-Gens in MDCK-Kulturen verlangsamt das Wachstum der Zellen und schützt sie vor Apoptose. Solche Zellen können spontan sich verzweigende Tubuli formen, während nicht PKD1-exprimierende Zellen einfache Zysten bilden (Boletta et al., 2000).

Sequenzanalysen enthüllten die mosaikartige Struktur des Proteins aus verschiedenartigen Domänen (Abb. 2-3). Es beginnt mit einer Sequenz von 23 Aminosäuren, die einem Signalpeptid gleicht und von einer Spaltstelle gefolgt wird. Gleich im Anschluss finden sich zwei leucinreiche Repeats (Leucine-Rich Repeats, LRR), die von zwei zysteinreichen Regionen flankiert werden. LRRs finden sich bei Proteinen, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligten. Proteine mit nur wenigen LRRs (wie das Polyzystin 1) bilden zusammen mit weiteren Proteinen eine hufeisenförmige Formation zur Bindung von RNase A. Auch sollen die LRRs des Polyzystin 1 die Bindung an Kollagen I, Fibronectin und Laminin modulieren. Es gibt Hinweise auf eine proliferationshemmende Wirkung der LRRs im Zusammenhang mit der Bindung an Laminin. Diese Motive könnten Einfluss auf einige PKD-typische Veränderungen haben, wie die Fehllokalisation von Membranproteinen und Veränderungen der extrazellulären Matrix (Burn et al.,

1995; Hughes et al., 1995; International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995; Malhas et al., 2002; NCBI-Entrez-Gene-PKD1, 2006). Flankierende zysteinreiche Repeats definieren eine Untergruppe extrazellulärer Proteine mit der Fähigkeit, Signale in das Zytoplasma weiterzuleiten (Babich et al., 2004).

Es schließt sich die WSC-Domäne an. Ihr Name WSC (cell-wall integrity and stress-response component) leitet sich von ihrer Funktion als Sensor oder Rezeptor in der Stressantwort und dem Erhalt der Zellwandintegrität ab (Lodder et al., 1999; NCBI-Entrez-Gene-PKD1, 2006).

Die Aminosäuren 418-531 stellen eine Region mit Ähnlichkeiten zu Lektinen vom C-Typ (kalziumabhängig) dar. Diese Domänen sind in der extrazellulären Bindung von Kohlenhydratresten involviert. Auch die Bindung an Kollagen I, II und IV wurde *in vivo* beobachtet. Diese Strukturen sollen u. a. der Integration glykosylierter Proteine und der Zelladhäsion dienen (International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995; Weston et al., 2001; NCBI-Entrez-Gene-PKD1, 2006).

Exon 10 kodiert ein Low Density Lipoprotein A (LDL-A)-Modul, eine zysteinreiche Domäne von etwa 40 Aminosäuren. In LDL-Rezeptoren und anderen Proteinen dient dieses Modul aufgrund seiner hydrophoben Natur als Ligandenbindungsstelle (International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995).

Weiterhin finden sich insgesamt vierzehn, vorher nicht charakterisierte, immunglobulinähnliche Domänen: die sogenannten PKD-Domänen. Sie bestehen aus jeweils etwa 80 Aminosäuren (International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). Der extrazelluläre Abschnitt des Polyzystins ist stark dehnbar. Erklärt wird diese Dehnfähigkeit damit, dass sich die PKD-Domänen mechanisch entfalten lassen und anschließend ihre ursprüngliche Form wieder einnehmen. Diese belastungsinduzierten Reaktionen könnten bedeutsam für die Zellelastizität und die Regulation der Signaltransduktion sein (Qian et al., 2005). Versuche an Zellkulturen demonstrierten die Rolle der PKD-Domänen in der Vermittlung der Zell-Zell-Adhäsion von Nierenepithelzellen (Streets et al., 2003).

Im Anschluss an die PKD-Domänen liegen die „Receptor for Egg Jelly“-Domänen (REJ) und die Domäne einer Proteolysestelle G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, kurz GPS genannt (Moy et al., 1996; Ponting et al., 1999; NCBI-Entrez-Gene-PKD1, 2006).

Die Aminosäuren 3.118 bis 3.234 bilden die PLAT/LH2-Domäne. Sie ist vermutlich an der Interaktionen zwischen Lipiden oder membrangebundenen Proteinen beteiligt (NCBI-Entrez-Gene-PKD1, 2006).

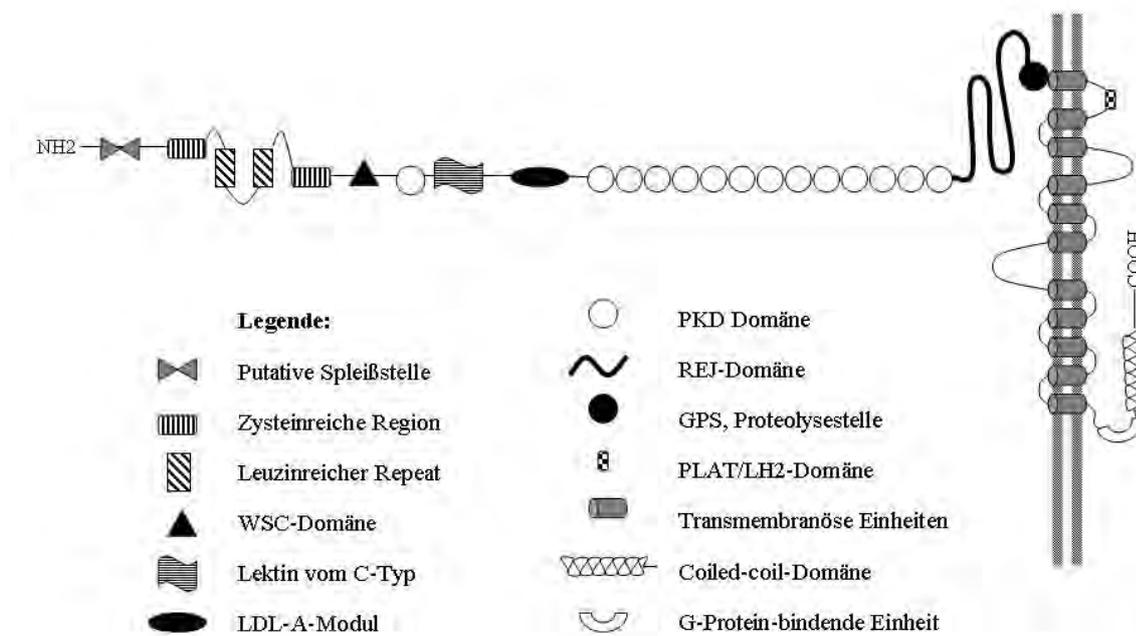
Schließlich befinden sich zwischen Position 3.986 und 4.040 hydrophobe Regionen, bei denen es sich um elf transmembranöse Abschnitte handelt (International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995; Nims et al., 2003).

Eine wichtige Rolle für die Zellproliferation und renale Tubulogenese übernimmt Polyzystin 1 als G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Das C-terminale Ende von Polyzystin 1 enthält eine heterotrimere G-Protein-bindende und -aktivierende Sequenz. Vermittelt über G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten werden Proteinkinase C, die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und der Transkriptionsfaktor AP1 aktiviert (Parnell et al., 1998; Parnell et al., 2002; Arnould et al., 1998). Poly-

Polyzystin 1 wirkt als Aktivator von G-Proteinen des $G_{i/o}$ -Typs modulierend auf die Aktivität von Ca^{2+} - und K^+ -Kanälen. Dabei wird es selbst wieder von Polyzystin 2 reguliert (Delmas et al., 2002). Über einen Anstieg der zyttoplasmatischen Kalziumspiegel und Aktivierung der Protein-kinase Ca soll Polyzystin 1 die Zellproliferation steigern (Manzati et al., 2005). Ein Polyzystin 1-vermittelter Anstieg des intrazellulären Kalziums aktiviert den Calcineurin/NFAT-Weg. NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) wandert nach Dephosphorylierung durch Calcineurin in den Kern, um dort, häufig als NFAT/AP1-Komplex, Einfluss auf die Genregulation zu nehmen. Auf diese Weise werden Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellanpassung gesteuert (Puri et al., 2004). Wichtige Elemente in diesem Zusammenhang sind außerdem die REJ- und die GPS-Domäne. An der Proteolysestelle GPS erfolgt unter Einfluss der REJ eine Spaltung des Proteins. Der größte Teil des N-Terminus bleibt mit der Zellmembran verknüpft, während ein kleiner Teil sezerniert wird. Mutationen im Bereich der REJ oder der GPS behindern die Spaltung, wodurch auch in diesen Fällen die Signaltransduktion durch Polyzystin 1 nachhaltig beeinträchtigt wird (Qian et al., 2002). Über eine coiled-coil-Domäne im cytoplasmatischen C-Terminus interagiert Polyzystin 1 mit Homodimeren von Polyzystin 2 (Qian et al., 1997; Tsioukas et al., 1997).

Auch konnte die Aktivierung von Chloridkanälen unter der Einwirkung des zyttoplasmatischen Endes gezeigt werden. Dieser Nachweis ist insofern interessant, da das Zystenwachstum unter anderem auf einer aktiven Cl^- -Sekretion beruht (Chernova et al., 2005).

Abbildung 2-1: Struktur des Proteins Polyzystin 1 mit extrazellulärer N-terminaler Region, multiplen transmembranösen Domänen und cytoplasmatischem C-Terminus



Modifiziert nach dem International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995

2.3.1 Interaktion von Polyzystin 1 und 2

Die Funktion von Polyzystin 1 und seine stabile Expression sind stark mit dem Polyzystin 2, dem Produkt des PKD2-Gens, verknüpft. Es konnte gezeigt werden, dass natürlich vorkommende pathogene Mutationen diese Verknüpfung verhindern (Qian et al., 1997). Als Einheit produzieren die Polyzystine kalziumpermeable, nicht selektive Kationenkanäle. Polyzystin 2 wird auch in Abwesenheit von Polyzystin 1 exprimiert, ist aber nur in dessen Anwesenheit in der Zellmembran lokalisiert (Hanaoka et al., 2000). Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulation. Polyzystin 1 aktiviert den Zellzyklusregulator p21 (waf1) über den JAK-STAT-Signalweg, wodurch die Zellen in der G0/G1-Phase sistieren. Polyzystin 2 ist hier ein wichtiger Co-Faktor. Dies kann erklären, warum Mutationen eines der beiden Gene zum PKD-Phänotyp führen (Bhunja et al., 2002).

2.3.2 Das Expressionsmuster von Polyzystin 1

Eine Expression des PKD1-Gens findet in vielen Geweben statt. Unterschiedliche Mengen mRNA fanden sich nicht nur in Niere und Leber sondern auch im Thymus, Duodenum, Herz, Tonsille, Milz, Schilddrüse, Nebenniere, Lunge und Hoden. Der höchste Gehalt, drei mal höher als in der Niere, wurde im zerebralen Kortex nachgewiesen. Den geringsten Gehalt wies der Thymus auf. Bemerkenswert ist hierbei, dass auch der Gehalt an mRNA in polyzystisch veränderten Gewebe von Niere und Leber zweimal höher lag als in unveränderten Geweben (Ward et al., 1996).

Das Protein Polyzystin 1 konnte in Epithelien der klassischen Manifestationsorgane der ADPKD (Nieren, Leber, daneben auch Kolon, Pankreas, Herzklappen und zerebrale Gefäße) beobachtet werden. Der Nachweis gelang aber auch in nicht-epithelialen Zellen. Aufgabe vieler dieser Gewebe ist die Sekretion oder der Transport von Molekülen. Andere sind mechanischer Belastung ausgesetzt, was die Expression vieler Adhäsionsmoleküle erforderlich macht. Obwohl mRNA in Tonsillen, Milz und Schilddrüse gefunden wurde, ließ sich das Protein in diesen Organen nicht darstellen (Peters et al., 1999).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

3.1.1 Herkunft der Proben

Zur Verfügung standen Blut- und Organproben von insgesamt 166 Katzen und einem Hund (Anhang, Tab. 8-1). Es handelte sich um 153 Perserkatzen und sechs Katzen der Rasse Exotic Shorthair. Daneben kamen vier Europäisch-Kurzhaar-Katzen (EKH), ein Fundtier, bei dem die Einkreuzung einer Perserkatze aufgrund der Felllänge von der Einsenderin lediglich vermutet wurde, eine Mischlingskatze unbekannter Abstammung sowie eine Katze der Rasse Russisch Blau zum Einsatz.

130 Probanden (124 Perserkatzen und sechs Exotic Shorthair-Katzen) und zwei Proben Nierengewebe euthanasierter Perserkatzen entstammten dem Patientengut der Klinik für Kleintiere, Abteilung Chirurgie der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Hier wurden die Katzen mittels Ultraschall auf das Polyzystische Syndrom untersucht. Im Anschluss an die Untersuchung folgte die Entnahme einer Blutprobe, die bis zur Weiterverarbeitung in EDTA-Monovetten bei -20 °C gelagert wurde.

34 Katzen entstammten dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie. Ihnen wurden für die DNS-Gewinnung Proben des Knochenmarks, der Nieren oder der Leber entnommen, die bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20 °C lagerten. Ein Teil der DNS-Proben wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Suntz, Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Zusätzlich stand cDNS aus dem Ovar einer Europäisch Kurzhaarkatze zur Verfügung. Diese Probe wurde im Rahmen der Dissertation von Frau Löhberg-Grüne am Institut für Veterinär-Pathologie bearbeitet und freundlicherweise bereitgestellt.

3.1.2 Datenerhebung

Soweit verfügbar wurden folgende Daten der Probanden aufgenommen: Herkunft der Probe, Katzenrasse, Diagnose der Ultraschalluntersuchung oder der Sektion, Geschlecht und Alter. Jede Probe wurde mit einem Kürzel versehen. Bei Blutproben, die von der Klinik für Kleintiere stammten, erfolgte die DNS-Isolierung am Institut für Veterinär-Pathologie. Von den 130 Patienten der Klinik für Kleintiere wurden 67 Perserkatzen als zystenpositiv und 57 Perserkatzen als zystennegativ beurteilt. Unter den Exotic Shorthair-Katzen waren jeweils drei positiv und negativ bewertete Tiere. Probanden wurden als zystenpositiv und damit als potentielle Merkmalsträger einer PKD-auslösenden Mutation betrachtet, sobald eine einzige Zyste in einer der beiden Nieren im Ultraschallbild feststellbar war.

Bei 42 dieser Katzen standen Stammbäume zur Verfügung, aus denen die Familienverhältnisse von vier Perserkatzenfamilien ermittelt werden konnten. Die Familien wurden mit den Buchstaben A bis D gekennzeichnet. Familie A umfasste elf, Familie B siebzehn, Familie C dreizehn und Familie D vier Mitglieder. Drei Tiere (D2064, D2076 und D2086) gehören sowohl der Familie B als auch der Familie C an (Anhang, 8-1). Die Proben mit den dazugehörigen Daten entsprechen dem in den Untersuchungen von Dr. Simone Helmig im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für Veterinär-Pathologie (Helmig, 2005) verwendeten Material. Die DNS-Probe des Hundes D2533 wurde aus anderen Gründen zu Untersuchungszwecken eingesandt und in einigen Fällen als PCR-Positivkontrolle verwendet.

Angaben über die Sektionstiere entstammten den jeweiligen Untersuchungsanträgen. Gegebenenfalls wurden nachträglich Informationen telefonisch erfragt. Die Sektion der Tierkörper erfolgte im diagnostischen Routineablauf in der Sektionshalle des Institutes für Veterinär-Pathologie. Die Erhebung der pathologisch-anatomischen Diagnosen nahmen der diensthabende Sekant und der zuständige Diagnostikleiter vor. Ergebnisse pathologisch-anatomischer und histologischer Untersuchungen wurden den Sektionstagebüchern des Institutes für Veterinär-Pathologie entnommen.

3.2 Immunhistologische Untersuchung

Für die immunhistologische Untersuchung kam formalinfixiertes und paraffineingebettetes Nierengewebe zur Anwendung. 3 µm dicke Gewebeschnitte (Mikrotom HM 335E, Microm GmbH, Walldorf) wurden auf SuperFrost®/Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Ein Antikörper gegen Zytokeratin wurde für den Nachweis von Epithelzellen verwendet, welche die Zystenwand auskleiden. Ein Antikörper gegen den Von-Willebrand-Faktor markierte dagegen Gefäßendothel.

3.2.1 Nachweis des Von-Willebrand-Faktors

Für diese Untersuchung kam der polyklonale Antikörper „Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor“, Dako Cytomation (Glostrup, Denmark), zur Anwendung (frühere Bezeichnung des Von-Willebrand-Faktors: Factor VIII-related antigen). Laut Hersteller reagiert dieser Antikörper mit Von-Willebrand-Faktor in Endothelzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe, wobei auch bei anderen Spezies Kreuzreaktionen zu beobachten sind.

Folgende Vorgehensweise wurde gewählt:

1. Entparaffinieren der Schnitte:
 - a) Xylol-Ersatz Roti-Histol® 3 x 3 Minuten
 - b) Isopropanol 2 x 3 Minuten
 - c) 96 % Ethanol 3 Minuten
 - d) 80 % Ethanol 3 Minuten
2. Vorbehandlung mit Protease (bakterielle Protease Typ XXIV, Sigma, Deisenhofen):
 - a) NaCl-PBS, pH 7,4 bei 37 °C im Brutschrank 5 Minuten
 - b) Inkubation bei 37 °C mit 0,05 % Protease gelöst in NaCl-PBS 5 Minuten
 - c) Eiskaltes TBS zum Abstoppen der Reaktion 3 x 5 Minuten
3. Aufsetzen der Objektträger auf Coverplates™ (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einsetzen in deren Halterung.
4. Blocken mit 100 µl TBS mit 20 % Schweineserum bei Raumtemperatur: 10 Minuten
5. Inkubation mit dem Primärantikörper:
 - a) Ansetzen der Puffer mit dem Primärantikörper bzw. mit Kontrollkaninchenserum für die Negativkontrolle (Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) jeweils in TBS mit 20 % Schweineserum in einer Verdünnung von 1:1.000
 - b) Auftragen von jeweils 100 µl pro Objektträger
 - c) Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht (14 bis 18 Stunden)
6. Waschen in TBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
7. Inkubation mit dem Sekundärantikörper:
 - a) 9 µl biotinylated Anti -Rabbit IgG (H+L) made in goat (Vector Laboratories Inc., Burlingame) in 1 ml TBS mit 20 % Schweineserum lösen
 - b) Inkubation bei Raumtemperatur 30 Minuten
8. Waschen in TBS: 3 x 5 Minuten
9. Inkubation mit dem ABC-AP-Komplex (Vectastain® ABC-AP Kit Vector Laboratories Inc., Burlingame):
 - a) 9 µl Lösung A und 9 µl Lösung B des Kits in 1 ml TBS-Puffer lösen
 - b) Inkubation bei Raumtemperatur 30 Minuten
10. Waschen in TBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
11. Entwicklung mit Neufuchsin:
 - a) 43,75 ml TBS
15,6 ml Propandiol
mit 1 N NaOH auf pH 9,75 einstellen
25 mg Levamisol darin lösen
 - b) 12,5 mg Natriumnitrit in 313 µl A. bidest lösen

- c) 31,2 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat in 375 µl DMF lösen
- d) In das gelöste Natriumnitrit 125 µl Neufuchsin geben und mind. 1 Minute reagieren lassen
- e) Zuerst Lösung aus d) und dann Lösung aus c) in Puffer aus a) geben
- f) pH-Wert mit 1N HCl auf 8,75 einstellen
- g) Lösung sofort über die zu färbenden Schnitte filtrieren
- h) Inkubation unter mikroskopischer Kontrolle max. 25 Minuten
- i) Waschen in TBS 2 x 5 Minuten
- j) Waschen in A. bidest.
- k) Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (Tissue Tek®, Modell 4765, Vogel GmbH, Giessen).

3.2.2 Nachweis von Zytokeratin

Verwendet wurde der monoklonale Antikörper aus der Maus „Keratin Pan Ab-3 (Klon Lu-5)“ der Firma Lab Vision/NeoMarkers, Fremont, USA.

Es wurde die PAP-Methode nach folgender Vorgehensweise angewandt. Der Antikörper reagiert laut Hersteller mit Zellen der Epidermis, mit Plattenepithel innerer Organe, mit hyperproliferativen Keratinozyten und Zellen einfacher Epithelien.

1. Entparaffinieren der Schnitte:
 - a) Xylol-Ersatz Roti-Histol® 3 x 3 Minuten
 - b) Isopropanol 2 x 3 Minuten
 - c) 96 % Ethanol 3 Minuten
 - d) 80 % Ethanol 3 Minuten
2. Hemmung der endogenen Peroxidase:
 - a) Methanol (reinst) mit 0,5 % frisch zugesetztem H₂O₂ (Perhydrol® 30 % H₂O₂ p.a.; 7210, E. Merck, Darmstadt) 30 Minuten
 - b) Schnitte in TBS waschen 5 Minuten
3. Vorbehandlung mit Protease (bakterielle Protease Typ XXIV, Sigma):
 - a) NaCl-PBS, pH 7,4 bei 37 °C im Brutschrank 5 Minuten
 - b) Inkubation bei 37 °C mit 0,05 % Protease gelöst in NaCl-PBS 5 Minuten
 - c) Eiskaltes TBS zum Abstoppen der Reaktion 3 x 5 Minuten
4. Aufsetzen der Objektträger auf Coverplates™ (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einsetzen in deren Halterung.
5. Blocken mit 100 µl TBS mit 10 % Rattenserum bei Raumtemperatur: 10 Minuten
6. Inkubation mit dem Primärantikörper:
 - a) Ansetzen der Puffer mit dem Primärantikörper bzw. mit dem Kontrollantikörper T1 (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-Thymus-

- Lymphozyten gerichteter Antikörper, (Hirschberger, 1987) für die Negativkontrollschnitte jeweils in TBS in einer Verdünnung von 1:20
- b) Auftragen von jeweils 100 µl pro Objektträger
 - c) Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht (14 bis 18 Stunden)
8. Waschen in TBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
 9. Inkubation mit dem Sekundärantikörper:
 - a) Ratte Anti-Maus IgG (H+L) (Dianova GmbH, Hamburg) 1:100 in 1 ml TBS
 - b) Inkubation bei Raumtemperatur 30 Minuten
 10. Waschen in TBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
 11. Auftragen von Maus-PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase von der Maus, Dianova GmbH, Hamburg); 1:500 in TBS; Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur: 30 Minuten
 12. Waschen in TBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
 13. Inkubation der Schnitte in einer 0,05 %igen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung (DAB, Fluka Feinchemikalien GmbH) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1) mit 0,01 % H₂O₂: 10 Minuten
 14. Waschen in TBS-Puffer: 3 x 5 Minuten
 15. Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxilin (Papanicolaou 1b, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) 1:10 in A. dest.: 10 Sekunden
 16. Bläuen der Schnitte in Leitungswasser: 5 Minuten
 17. Waschen in A. dest.: 1 Minute
 18. Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe:
 - a) 50 % Ethanol 3 Minuten
 - b) 70 % Ethanol 3 Minuten
 - c) 80 % Ethanol 3 Minuten
 - d) 96 % Ethanol 3 Minuten
 - e) Isopropanol 6 Minuten
 - f) Xylol-Ersatz Roti-Histol® 6 Minuten
 - g) Xylol 3-5 Minuten
 19. Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten (Tissue Tek®, Modell 4765, Vogel GmbH, Giessen).

3.2.3 Auswertung der Immunhistologie

Als positives immunhistologisches Ergebnis galt ein in der Schnittebene liegendes dunkelbraunes bzw. rotes feinkörniges, deutlich zellassoziertes Präzipitat, das im jeweiligen Negativ-Kontrollschnitt nicht nachweisbar war.

3.3 Isolierung und Aufreinigung von DNS

3.3.1 DNS-Isolierung aus Vollblut

Verwendet wurde das Puregene[®] DNA Purification Kit der Firma Gentra (Gentra Systems, Minneapolis, USA) nach einem für Katzenblut modifizierten Protokoll:

1. Zellyse:

300 µl EDTA-behandeltes Blut (ersatzweise auch heparinisiertes Blut), 300 µl PBS und 900 µl RBC Lysis Solution in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß geben und invertieren. 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Zwischendurch mehrmals schwenken.

Zentrifugation bei 13.000-16.000 x g für 20 Sekunden.

Überstand bis auf 10-20 µl absaugen und verwerfen.

Vorsichtig vortexen, um verbliebene Leukozyten zu resuspendieren.

Noch einmal 450 µl RBC Lysis Solution und 300 µl PBS pH 7,4 hinzufügen und schwenken.

Inkubation bei Raumtemperatur für weitere 10 Minuten.

Zentrifugation bei 13.000-16.000 x g für 20 Sekunden.

Überstand bis auf 10-20 µl absaugen und verwerfen.

Vorsichtig vortexen, um Leukozyten zu resuspendieren.

300 µl Cell Lysis Solution dazu geben und mit der Pipette vorsichtig mischen bis eine homogene Suspension entsteht.

Inkubation bei Raumtemperatur für etwa 1-5 Stunden bis die Lösung klar ist.

Optional: Falls sich Klumpen gebildet haben, kann die Inkubation bei 37 °C durchgeführt werden.

2. RNase-Behandlung:

1,5 µl RNase A-Lösung in die Suspension geben, 25x schwenken.

Inkubation bei 37 °C für 20 min. Anschließend auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

3. Proteinpräzipitation:

100 µl Proteinpräzipitationslösung in die Suspension geben.

20 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit vortexen.

Zentrifugation bei 13.000-16.000 x g für 3 Minuten. Das Pellet sollte fest und dunkelbraun sein. Ist es zu locker, Reaktionsgefäß 5 Minuten auf Eis stellen und Zentrifugation wiederholen.

Überstand absaugen und in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß geben.

4. DNS-Präzipitation:

300 µl Isopropanol zum Überstand geben, mischen durch 50-maliges Schwenken.

Zentrifugation bei 13.000-16.000 x g für 1 Minute.

Überstand absaugen und verwerfen.

5. Waschen:

Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol überschichten und mehrmals vorsichtig schwenken.

Zentrifugation bei 13.000-16.000 x g für 1 Minute.

Ethanol absaugen und Pellet 15 Minuten bei Raumtemperatur trocknen lassen.

6. DNS-Hydratation:

50 µl DNS Hydration Solution auf das Pellet geben.

Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur oder im Wasserbad bei 65 °C für eine Stunde.

7. Lagerung bei 4 °C oder Lagerung über längere Zeit bei -20 °C oder -80 °C.

3.3.2 DNS-Isolierung aus Gewebe

Für die DNS-Extraktion wurde auf -20 °C gekühltes Leber- oder Nierengewebe am Gefrier-
mikrotom (2700- Frigocut; Reichert- Jung/ Lahntechnik GmbH, Wetzlar) mit autoklavierten
Messern in 20 µm dünne Schnitte gehobelt. Die Späne wurden in mit flüssigem Stickstoff vor-
gekühlten 1,5 ml Mikrozentrifugengefäßen (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) ge-
sammelt und mit Hilfe kräftiger kurzer Schläge auf das Probengefäß pulverisiert und bis zu ih-
rer Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die Extraktion erfolgte mit dem Puregene® DNA-Purification Kit (Gentra Systems, Minneapo-
lis, USA) nach einer Modifikation des Protokolls für Gewebe.

Protokoll für eine Gewebemenge bis 50 mg:

1. Zellyse:

Zugabe von 300 µl Cell Lysis Solution.

Homogenisieren durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

Inkubation des Lysats für 1 Stunde bei 65 °C, das Gefäß dabei mehrmals wenden.

Bei Vorhandensein größerer Gewebestücke 3 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) hinzu-
geben. Reaktionsgefäß 25x wenden, Inkubation bei 55 °C für mindestens drei Stunden o-
der über Nacht.

2. RNase-Behandlung:

Zugabe von 1,5 µl RNase A Solution (4 mg/ml), mischen durch 25 maliges Wenden.

Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad.

3. Proteinfällung:

Auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Zugabe von 100 µl Protein Precipitation Solution.

20 Sekunden heftig vortexen.

Bei 16.000 x g 3 Minuten zentrifugieren.

Falls das Proteinpellet nicht sichtbar ist, noch einmal vortexen, die Probe 5 Minuten auf
Eis inkubieren und die Zentrifugation wiederholen.

4. DNS-Präzipitation:

Den Überstand in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen mit 300 µl 100 %igem Isopropa-
nol überführen und durch 50-maliges Wenden des Mikrozentrifugenröhrchens mischen.

Bei 16.000 x g 1 Minute zentrifugieren und den Überstand verwerfen. Ist der erwartete DNS-Gehalt gering, ist die Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 5 Minuten möglich. 300 µl 70 %iges Ethanol zugeben und durch vorsichtiges 20-maliges Wenden des Mikro-zentrifugenröhrchens das Pellet waschen.

Bei 16.000 g 1 Minute zentrifugieren und Überstand absaugen.

Das Pellet bei Raumtemperatur 10 bis 15 Minuten lufttrocknen lassen.

5. DNS-Hydratation:

Zugabe von 25-100 µl DNS Hydration Solution..

Rehydrieren bei Raumtemperatur über Nacht oder durch Inkubation für eine Stunde bei 65 °C.

6. Lagerung der DNS bei -20 °C oder zur alsbaldigen Verwendung bei 2-8 °C.

3.3.3 Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Auch unter stringenten PCR-Bedingungen ist eine Bindung der Primer an DNS mit geringerer Identität zum Primer nicht auszuschließen. Daher ist der Ansatz einer PCR-Reaktion ein DNS-Gemisch aus dem erwünschten, voraussichtlich spezifischen Produkt, einer Reihe von Nebenprodukten und den verwendeten Primern. Um den Anteil an unerwünschten Produkten und Primern so gering wie möglich zu halten, wurden Einzelbanden nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel isoliert. Dies war insbesondere für nachfolgende Reaktionen wie die Sequenzierung von PCR-Produkten oder für die Klonierung von Bedeutung.

Zu diesem Zweck wurde das *PCR clean-up Gel extraction NucleoSpinExtractII*-Kit entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

Die Bedingungen der Gelelektrophorese richteten sich nach dem Elektrophoreseprotokoll des jeweiligen PCR-Produkts. Prinzipiell wurde 0,5x TBE-Puffer sowohl als Laufpuffer als auch zur Herstellung der Agarosegele (Seakem[®] LE Agarose, Cambrex Bioscience Rockland Maine) verwendet. Auf einem mit 70 %igem Ethanol gereinigten UV-Durchleuchtungstisch (UV-Transilluminator, 312 nm, Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich) wurde die entsprechende DNS-Bande mit Hilfe eines sterilen Skalpells aus dem Gel geschnitten und in einem sauberen 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß abgewogen. Abweichend vom Protokoll wurde für die Elution des PCR-Produktes, insbesondere wenn das PCR-Produkt sequenziert werden sollte, 40 µl DEPC-behandeltes A. bidest. anstelle des Elutionspuffers verwendet.

3.3.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur direkten Reinigung von PCR-Produkten aus dem PCR-Ansatz wurde das *PCR clean-up Gel extraction NucleoSpinExtractII*-Kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Abweichend vom Protokoll wurde für die Elution DEPC-behandeltes A. bidest. anstelle des mitgelieferten Elutionspuffers verwendet.

3.3.5 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNS

Hierzu diente das NucleoSpin® Plasmid-Aufreinigungs-kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 52313 Düren). Entsprechend den Herstelleranweisungen wurden Plasmide aus E. coli-Bakterien präpariert.

3.3.6 Alkoholpräzipitation von DNS

Diese Methode diente der Reinigung oder Konzentrierung von DNS-Lösungen.

1. Zum vorhandenen Volumen das 2,5fache Volumen 96 %igen Ethanols (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) hinzufügen und mischen.
2. Inkubation für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei -20 °C
3. 30 Minuten in einer Tischzentrifuge bei höchstmöglicher Geschwindigkeit (Hettich-Zentrifuge bei 12.500 x g) zentrifugieren.
4. Überstand absaugen.
5. Pellet durch Zugabe von 500 µl 70 %igen Ethanol waschen.
6. Fünfminütiges Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge bei höchster Geschwindigkeit (Hettich-Zentrifuge bei 12.500 x g).
7. Überstand absaugen.
8. Pellet zehn Minuten bei Raumtemperatur trocknen.
9. DNS mit A. bidest. oder einfachem Tris-Puffer (pH 7,4) resuspendieren.

3.3.7 Ergebniskontrolle der DNS-Isolierung

Die Prüfung der Qualität der Isolate, das heißt der DNS-Konzentration der Probe, der durchschnittlichen Fragmentgröße von genomischer DNS bzw. der Grad der Degradierung sowie der Verbleib unerwünschter PCR-Produkte nach Gelextraktion, erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung in 1-2 %igen Agarosegelen.

3.4 Konzentrationsmessung von DNS-Lösungen

3.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von isolierter genomischer DNS, Plasmid-DNS und Primerverdünnungen erfolgte mittels UV-Absorptionsspektroskopie in einer Verdünnung von 1:1000 durch Bestimmung des Verhältnisses der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm mit einer Backgroundkorrektur bei 320 nm (UV-1202® Spektrophotometer, Shimadzu Corporation, Japan).

Die Konzentration von Oligonukleotiden wurden mit dem Gerät Genequant II (Pharmacia Biotech/ LKB Biochrom Ltd., Cambridge, UK) gemessen.

Für weiterführende Arbeiten (insbesondere PCR) wurden die Proben genomischer DNS in 1:10-Verdünnungen mit DEPC-gereinigtem A. bidest oder 1x-Tris-Puffer, pH 7 verwendet. Die Konzentration dieser Aliquots lag zwischen 15 und 50 ng/µl.

3.4.2 Agarosegel mit Massenmarker

Die Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe von Massenmarkern nach einem Gelelektrophoreselauf entsprechend den Laufbedingungen des jeweiligen PCR-Produktes. Zum Einsatz kamen die MassRuler™ DNA Ladder, Mix, ready-to-use, #SM0403 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), verwendbar für PCR-Fragmente zwischen 80 und 10.000 Basenpaaren, und die SimplyLoad™ Quant Ladder (Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ), verwendbar bei DNS-Fragmenten zwischen 100 und 1.000 Basenpaaren.

Der DNS-Gehalt eines bekannten Probenvolumens im Vergleich mit den Banden des Massenmarkers wurde nach Augenmaß oder computergestützt mit Hilfe des Kodak Gel Documentation System Version 1.0 (Eastman Kodak Inc., USA) abgeschätzt.

3.5 Primerkonstruktion

Die feline PKD1-Sequenz war erst gegen Ende der praktischen Arbeit in Form der publizierten Sequenz eines Klones verfügbar (NCBI-nucleotide, AC145332.48) und konnte nicht für ein Primerdesign verwendet werden.

Stattdessen basierte die Konstruktion der PKD1-Primersysteme auf der entsprechenden PKD1-Sequenz des Hundes, daneben auch auf der des Menschen und der Maus. Im Verlauf der Arbeit kamen feline Sequenzen aus eigenen Sequenzierungen zum Einsatz. Die Gensequenz des Hundes entstammt der Veröffentlichung von Dackowski et al. (2002) Accession-Nr. AF483210. Die entsprechende Sequenz des Menschen und der Maus wurde den NCBI-Datensätzen (NCBI-Nucleotide, Accession-Nr. L39891; NCBI-Nucleotide-murine-PKD1, AF271381) entnommen. Zusätzlich wurde die Sequenz des humanen TSC2-Gens verwendet (NCBI-nucleotide-human-TSC2). Wie in der Literaturübersicht bereits erwähnt, sind für das canine PKD1-Gen 46 Exons beschrieben, für das humane Gen jedoch 50. Aufgrund der vermuteten höheren Ähnlichkeit zwischen der caninen und der felines Sequenz, orientierten sich die Namen der Primer am caninen PKD1-Gen.

Es wurden Sequenzabschnitte des caninen Gens zur Primerauswahl verwendet, deren codierende Bereiche weitgehend mit denen des humanen Gens übereinstimmten. Im Folgenden beziehen sich auch die Angaben eines Exons in der felines PKD1-Sequenz auf die Bezeichnungen der caninen PKD1-Strukturen.

Die Buchstaben „F“ und „R“ in den Primernamen kennzeichnen ihre Funktion als Vorwärts- oder Rückwärtsprimer.

Am 3'-Ende des PKD1-Gens wurde nach Primerpaaren im Bereich von Exon 4 bis Exon 6 gesucht. Am 5'-Ende des Gens wurden Primerpaare im Bereich von Exon 27 bis über das Ende des PKD1-Gens in das TSC2-Gen hinein ausgewählt.

Die canine TSC2-Sequenz stand für das Primerdesign nicht direkt zur Verfügung. Im Klon mit der Sequenz des caninen PKD1-Gens (Accession Nr. AF483210) sind hinter dem 3'-Ende von Exon 46 noch rund 1,7 kb Sequenz zu finden. In dieser Region wurde nach einer zum Exon 40 des humanen TSC2-Gens homologen Sequenz gesucht. Tatsächlich findet sich hier eine homologe Sequenz mit 76,6 % Ähnlichkeit in 171 bp. Diese Stelle der caninen Sequenz wurde zur Auswahl des Primers TSC-R verwendet.

Nach Möglichkeit sollten die Primer folgende Kriterien erfüllen:

- Primerlänge von 18-24 Nukleotiden
- Gehalt an Guanin- und Cytosinnukleotiden von etwa 50-60 % (aufgrund des hohen GC-Gehaltes des PKD1-Gens nicht immer möglich.)
- GC-Reichtum am 3'-Ende, um die Bindung an das Template zu optimieren
- Direkte Wiederholungen einzelner Nukleotide sollte vermieden werden oder zumindest eine Anzahl von drei gleichen Nukleotiden nicht überschreiten
- Nach Möglichkeit ein Guaninnukleotid am 5'-Ende, damit die Wahrscheinlichkeit der Adeninsubstitution an das PCR-Produkt durch die Taq-Polymerase erhöht wird
- Keine Inverted Repeats von mehr als vier Nukleotiden innerhalb eines Primers, um Sekundärstrukturen („Haarnadel“) zu vermeiden
- Primer sollten insbesondere am 3'-Ende nicht komplementär sein, um die Bildung von Primerdimeren zu unterbinden
- Die Schmelztemperatur eines Primers sollte maximal 3 °C von der seines Partners abweichen
- Das PCR-Produkt sollte nach Möglichkeit eine Länge von 1.500 Basenpaaren nicht überschreiten.

Die Computerprogramme OLIGO 4.0 (Primer Analysis Software, Microsoft) und DNASIS (Hitachi software engineering co.) dienten zur Auswahl geeigneter Primer. Die Sequenz eines potentiellen Primers wurde mit der Sequenz des murinen und humanen PKD1-Gens verglichen und nur diejenigen mit starker Ähnlichkeit, insbesondere am 3'-Ende, bestellt. Oligonukleotide wurde bei der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, bestellt und nach Herstellerangaben in 1x-Tris-Puffer pH 7 gelöst. Die Gebrauchslösung hatte eine Konzentration von 10 pmol/l.

3.5.1 Verwendete Primer und Primerpaarkombinationen

Die im Folgenden in Tabelle 3-1 und 3-2 aufgeführten Primer erwiesen sich für die Amplifikation des felines PKD1-Gens als geeignet. Eine Reihe von Primern war auch für Sequenzierungsreaktionen verwendbar.

Tabelle 3-1: Liste der verwendeten Primer

Primername	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)	T _m (°C) (Hersteller-angabe)	GC-Anteil (%)	Position im PKD1-Gen	Sequenz-ursprung	Bemerkung
fPKD4-6_1f	acctgagcggaaaccggttga	22	64,0	59,1	Exon 4 Nukleotid (nt) 3-24	Hund	Vorwärtsprimer
fPKD4-6_2f	tctcagaaacctgagcggaaac	24	62,7	50	Intron 3 nt 238-245 bis Exon 4 nt 1-16	Hund	Vorwärtsprimer
fPKD4-6_1r	tgggaccitgggagaccaggaa	22	64,0	59,1	Exon 6 nt 162-183	Hund	Rückwärtsprimer
fPKD4-6_2r	atggcggactgtccaccat	20	61,4	60	Exon 6 nt 135-154	Hund	Rückwärtsprimer
4-6/ZR	gagggtctcactcactgagtagccg	23	64,2	56,5	Exon 5 nt 568-590	Katze	Rückwärtsprimer, Sequenzierprimer
4-6/DF	gtggtagtatggctgaatgt	21	57,9	47,6	Exon 3 nt 168-170 bis Intron 4 nt 1-18	Katze	Vorwärtsprimer
4-6/DR	tcacctggacagagcagaca	20	59,4	55,0	Intron 4 nt 347-362 bis Exon 5 nt 1-4	Katze	Rückwärtsprimer
Sequ4for	ggctgtgtgagtatgg	17	55,2	58,8	Exon 4 nt 162-170 bis Intron 4 nt 1-10	Katze	Vorwärtsprimer
cPKD27F	gtggcatcatgctgtacg	19	58,8	57,9	Exon 27 nt 15-33	Hund	Vorwärtsprimer, Sequenzierprimer
cPKD28F	gtagagaaggagggtgctggc	20	61,4	60,0	Exon 28 nt 120-139	Hund	Vorwärtsprimer
cPKD30R1	gtagacgggatagacgaccac	21	61,8	57,1	Exon 30 nt 68-88	Hund	Rückwärtsprimer, Sequenzierprimer
cPKD30R2	gaaaacagatgaccaggttag	22	60,3	50,0	Exon 30 nt 85-106	Hund	Rückwärtsprimer, kein Sequenzierprimer

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite. Legende am Ende der Tabelle.

Tabelle 3-1: Liste der verwendeten Primer (Fortsetzung)

Primername	Sequenz (5' → 3')	Länge (nt)	T _m (°C) (Hersteller-angabe)	GC-Anteil (%)	Position im PKD1-Gen	Sequenzursprung	Bemerkung
cPKD36F	ctcctctcaagcagctccag	20	61,4	60,0	Exon 36 nt 147-166	Hund	Vorwärtsprimer, Sequenzierprimer
cPKD38R	gattggcactctgtaagcggtag	22	62,1	54,6	Exon 38 nt 78-99	Hund	Rückwärtsprimer, Sequenzierprimer
fPKD38F	gtatacatgctctctctgctgg	22	60,3	50,0	Exon 38 nt 12-33	Katze	Vorwärtsprimer, Sequenzierprimer
cPKD40R	taggtctggcgcagagtagg	20	61,4	60,0	Exon 40 nt 124-143	Hund	Rückwärtsprimer, Sequenzierprimer
fPKD29FE	gccaatgctgtgtggtacgg	20	61,4	60,0	Exon 29 nt 168-187	Katze	Vorwärtsprimer, Sequenzierprimer
fPKD36R3	gctcactcacaggggtcacag	21	63,7	61,9	Exon 37 nt 83-103	Katze	Rückwärtsprimer, Sequenzierprimer, Name entspricht nicht der Position
fPKD43-46.1f	gctgctcttcgcgctgtactt	21	61,8	57,1	Exon 43 nt 9-29	Hund	Vorwärtsprimer, Sequenzierprimer
fPKD43-46.1r	gagtcggtcgaactgggtcag	21	63,7	61,9	Exon 46 nt 223-243	Hund	Rückwärtsprimer, Sequenzierprimer
fPKD43-46.2r	gtgctgctgggggtggacctt	20	63,5	65,0	Exon 46 nt 445-464	Hund	Rückwärtsprimer
TSC-for	acaaagtccggfttgaagg	19	54,5	47,4	Exon 46 nt 8-26	Hund	Vorwärtsprimer, Sequenzierprimer
TSC-rev	gaagcccactacaccaacc	19	58,8	57,9	TSC2-Gen Exon 40 nt 10-28	Hund	Rückwärtsprimer, Sequenzierprimer

Legende: nt, Nukleotide; T_m, Schmelztemperatur; GC-Anteil, Gehalt an Guanin- und Cytosinbasen

Tabelle 3-2: Verwendete Primerpaarkombinationen

Primerpaar	Produktlänge	Annealing-Temperatur	Verwendetes PCR-System	Bemerkung
fPKD4-6_1f fPKD4-6_1r	1.475 bp	59,0 °C	FailSafe (FS) Puffer D	
fPKD4-6_1f fPKD4-6_2r	1.450 bp	59,0 °C	FS Puffer E	
fPKD4-6_2f fPKD4-6_1r	1.485 bp	59,0 °C	FS Puffer E	
4-6/DF 4-6/DR	370 bp	58,5 °C	FS Puffer D	230 bp im Falle einer Deletion
cPKD27F cPKD30R2	884 bp	61,0 °C	FS Puffer H	FS Puffer D bis H mgl., H verwendet
cPKD27F cPKD30R1	867 bp	61,0 °C	FS Puffer D bis H	
cPKD36F cPKD38R	794 bp	59,2 °C	FS Puffer G	zweite Bande bei ca. 600 bp, mglw. durch Mehrfachbindung des Vorwärtsprimers
fPKD29FE fPKD36R3	1.029 bp cDNA!	62,2 °C	FS Puffer A	Überschneidung mit dem Amplifikat aus dem Bereich von Exon 29-30 in 150 bp und Exon 36-37 in 162 bp
fPKD38F cPKD40R	1.220 bp	64,6 °C	FS Puffer H oder G	Überschneidung mit dem Amplifikat aus dem Bereich von Exon 36-38 in 90 bp
fPKD43-46.1f fPKD43-46.1r	1.233 bp	68,2 °C	FS Puffer G	Überschneidung mit dem Amplifikat aus TSC-F x TSC-R in 236 bp
fPKD43-46.1f fPKD43-46.2r	1.439 bp	68,2 °C	FS Puffer G	Überschneidung in 442 bp mit dem Amplifikat aus TSC-F x TSC-R
TSC-F TSC-R	ca. 1.800 bp	62,2 °C	FS Puffer G	

Legende: bp, Basenpaare

3.6 Polymerasekettenreaktion

Es wurde das FailSafe™ PCR System bzw. das FailSafe™ PCR PreMix Selection-Kit (Epicentre, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Für RFLP-Analysen kam die BioTherm™ DNA Polymerase (Natutec GmbH, Frankfurt) in Verbindung mit dem PCR-Reaktionspuffer Y (Peq-lab Biotechnologie GmbH, Erlangen) zum Einsatz.

Das Ansetzen und die Verteilung des Mastermixes auf die erforderliche Anzahl PCR-Reaktionsgefäße erfolgten an einem UV-licht-desinfizierten Arbeitsplatz mit UV-Licht-desinfizierten Pipetten und Racks für die Reaktionsgefäße. Alle Lösungen wurden während der Prozedur auf Eis gelagert.

In einem separaten Laborraum wurde die DNS-Lösung pipettiert. In einem weiteren separaten Raum lief die PCR im Thermocycler, MultiCycler PTC 200™, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., USA) ab.

3.6.1 Etablierung von PCR-Systemen

Das FailSafe™ PCR PreMix Selection-Kit (Epicentre, Madison, Wisconsin, USA) enthält ein Set von zwölf zweifach konzentrierten Puffern (Puffer A bis L) mit jeweils unterschiedlicher Zusammensetzung. Sie unterscheiden sich in der Konzentration von MgCl₂ (3-7 mM) und dem PCR-Enhancer Betaine (0- bis 8-fach). Laut Hersteller sind sie für die Amplifikation von DNS-Templates mit verschiedenen, unter Umständen problematischen Eigenschaften (GC-Reichtum, viele Sekundärstrukturen, Amplifikation langer PCR-Produkte) geeignet. Die Puffer I bis L ergaben in Vorversuchen keine sichtbaren Amplifikate. Daher wurden neue Primerpaare nur mit den Puffern A bis H getestet. Aus diesen wurde der Puffer mit starker Amplifikation des voraussichtlich spezifischen PCR-Produktes bei gleichzeitig geringer Amplifikation unspezifischer Produkte ausgewählt. Anschließend wurde das FailSafe™ PCR-System verwendet. Es unterscheidet sich nur darin, dass es eine größere Menge Enzym mit einer größeren Menge eines der zwölf möglichen Puffer enthält.

Der FailSafe™ Enzyme Mix besteht aus 2,5 U/μl einer thermostabilen Polymerasemischung, deren genaue Zusammensetzung nicht bekannt gegeben wird. Sie enthält aber Enzyme mit 3'→5'-Proofreading-Aktivität für eine hohe Lesegenauigkeit. Es werden sowohl Produkte mit glatten Enden als auch mit Adenin-Überhang synthetisiert, so dass die Amplifikate für die Klonierung nach der TA-Klonierungsstrategie geeignet sind.

Das Herstellerprotokoll beider Kits ist für Reaktionsansätze von 50 μl ausgelegt. Das Protokoll wurde für Reaktionsansätze von 12 μl modifiziert. Bei Bedarf größerer Mengen PCR-Produkt wurde die Anzahl der Ansätze entsprechend erhöht. Zusätzlich wurde ein Pipettierverlust von 2 % hinzugerechnet.

Als erste Positivkontrolle der PCR-Reaktion mit den zu testenden Primerpaaren, die auf Grundlage der caninen PKD1-Sequenz ausgesucht worden waren, diente genomische DNS eines Hundes (D2533).

Tabelle 3-3: Reaktionsansatz zur Auswahl eines geeigneten Puffers („Pufferreihe“) mit dem FailSafe™ PCR PreMix Selection-Kit**A: Mastermix**

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz	Mastermix für 8 Ansätze	Endkonzentration
A. bidest.	-	4,125 µl	33,0 µl	-
Vorwärtsprimer	10 pmol/µl	0,625 µl	5,0 µl	0,52 pmol/µl
Rückwärtsprimer	10 pmol/µl	0,625 µl	5,0 µl	0,52 pmol/µl
FailSafe™ Enzyme Mix	2,5 U/µl	0,125 µl	1,0 µl	0,208 U/µl

B: Pro Ansatz zu pipettierende Volumina:

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz	Endkonzentration
Mastermix	s.o.	5,5 µl	s.o.
Puffer-Prämix A-H	2x	6,0 µl	1x
Test-DNS „Ni-“ oder D2533 (Hund)	20 ng/µl	0,5 µl	~1,7 ng/µl

Endvolumen: 12,0 µl

Tabelle 3-4: Reaktionsansatz des FailSafe™ PCR-Systems**A: PCR-Mastermix eines etablierten PCR-Systems**

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz	Endkonzentration im 12 µl-Ansatz
A. bidest.	-	4,125 µl	-
Puffer-Prämix	2x	6,0 µl	1x
Vorwärtsprimer	10 pmol/µl	0,625 µl	0,52 pmol/µl
Rückwärtsprimer	10 pmol/µl	0,625 µl	0,52 pmol/µl
FailSafe™ Enzyme Mix	2,5 U/µl	0,125 µl	0,208 U/µl

B: Pro Ansatz zu pipettierende Volumina:

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz	Endkonzentration im 12 µl-Ansatz
Mastermix	s.o.	11,5 µl	s.o.
DNS-Probe	15-50 ng/µl	0,5 µl	1,25-4,17 ng/µl

Endvolumen: 12,0 µl

Abweichend von diesem Protokoll wurde für PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar TSC-F und TSC-R 1,0 µl DNA-Lösung und dementsprechend 3,625 µl Wasser pro Ansatz verwendet.

3.6.2 PCR-Protokoll für die RFLP-Analyse

Amplifikate des PCR-Systems mit den Primer cPKD27F und cPKD30R2 wurden in einer RFLP-Analyse eingesetzt. Hierzu wurden PCR-Ansätze von je 25 μl Volumen verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit der BioTherm™ TAQ-DNA Polymerase und dem PCR-Reaktionspuffer Y. In den Mastermix wurde ein Pipettierverlust von 0,25 % eingerechnet.

Tabelle 3-5: Reaktionsansatz der RFLP-Analyse

A: PCR-Protokoll des Mastermix für einen 25 μl -Ansatz

Komponente	Hersteller	Konzentration	Volumen pro Ansatz	Endkonzentration
A. bidest.	-	-	18,0 μl	-
PCR-Puffer Y	Peqlab	10x	2,6 μl	1x
dNTP-Mix	Peqlab	40 mM	0,5 μl	1,7 mM
Primer cPKD27F	MWG	10 pmol/ μl	1,3 μl	0,52 pmol/ μl
Primer cPKD30R2	MWG	10 pmol/ μl	1,3 μl	0,52 pmol/ μl
BioTherm™ TAQ-DNA Polymerase	Natutec	5 U/ μl	0,3 μl	0.06 U/ μl

B: Pro Ansatz zu pipettierende Volumina:

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz	Endkonzentration im 12 μl -Ansatz
Mastermix	s.o.	24,0 μl	s.o.
DNS-Probe	15-50 ng/ μl	1,0 μl	2,5-8,34 ng/ μl

Endvolumen: 25,0 μl

3.6.3 Cycler-Protokolle der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Reaktionen liefen im Thermocycler MultiCycler PTC 200™ (PeltierThermal Cycler MJ Research, Inc., USA) ab. Bis auf die PCR-Reaktion mit dem Primerpaar 4-6/DF und 4-6/DR liefen die Reaktionen mit dem gleichen PCR-Protokoll ab (Tab. 3-6 und Tab. 3-7). Lediglich die Annealing-Temperatur wurde dem jeweiligen Primerpaar angepasst.

Tabelle 3-6: Cycler-Programm

Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 sec	40x
Annealing	siehe Primerpaar	45 sec	
Elongation	72 °C	2 min	1x
Finale Elongation	72 °C	5-8 min	
Kühlung	4 °C	∞	1x

Tabelle 3-7: Cycler-Programm der PCR mit dem Primerpaar 4-6/DF und 4-6/DR:

Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 sec	40x
Annealing	58,5 °C	45 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5-8 min	1x
Kühlung	4 °C	∞	1x

3.6.4 Reamplifikation von Einzelbanden

Um gezielt einzelne PCR-Amplifikate zu untersuchen, wurden PCR-Produkte in einer Agarosegelelektrophorese von drei Stunden Laufzeit aufgetrennt. Das Gel wurde auf einem mit 70 %igem Ethanol gereinigten UV-Durchleuchtungstisch (UV-Transilluminator, 312 nm, Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich) platziert und die Bande mit dem gewünschten Amplifikat unter Sichtkontrolle mit einer sterilen Skalpellklinge sauber ausgeschnitten. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde das Gelblöckchen mit 10-20 ml RNase- und DNase-freiem Wasser benetzt und 10 Minuten in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (Hettich-Zentrifuge, 12.500 x g) zentrifugiert. Dies führte zum Übertritt von DNS aus dem Agarosegel ins Wasser. Die gelösten PCR-Produkte dienten direkt im Anschluss als Template für eine Reamplifikation. Verdünnung der DNS-Lösung war nicht notwendig.

3.7 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNS-Fragmenten und Plasmid-DNS diente die Horizontalgelelektrophorese mit Agarosegelen. Die Wahl der Agarosekonzentration orientierte sich an den in Tabelle 3-8 empfohlenen Werten.

Tabelle 3-8: Einstellung der Agarosekonzentration in Abhängigkeit von der Amplifikatlänge

Agarosekonzentration (% w/v)	Kettenlänge der linearen, doppelsträngigen DNS-Fragmente (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tabelle: Dechert (2002)

Es wurde Seakem[®] LE-Agarose (Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ) verwendet. Für Fragmente von 1 bis 1,5 kb war eine Agarosekonzentration von 1 % und für Fragmente unter 1 kb eine Konzentration von 2 % ausreichend. Die erforderliche Menge Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben mit der entsprechenden Menge 0,5-fachem TBE-Puffer versetzt und in einem Mikrowellengerät (Privileg, Quelle) auf niedriger Stufe (Stufe 2) innerhalb von 3-5 Minuten aufgelöst. Die auf etwa 50-60 °C abgekühlte flüssige Agarose wurde mit Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml versetzt und blasenfrei in den Gelschlitten gegossen. Die zu untersuchende Probe wurde mit farbstoffhaltigem Ladepuffer im Verhältnis 6:1 gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur späteren Beurteilung der Amplifikatlänge wurden DNS-Massenmarker und DNS-Größenmarker eingesetzt. Die verwendeten Marker sind im Anhang, Kapitel 8.4.6. aufgelistet.

Bei einer gewünschten elektrischen Feldstärke von 5-10 V/cm wurden die DNS-Fragmente in Elektrophoresekammern (PHERO-Stab. 500 Electrophoresis Powersupply, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen) aufgetrennt. 0,5-facher TBE-Puffer diente als Laufpuffer.

Auf dem UV-Transilluminator mit 254 nm Wellenlänge (Bachofer GmbH, Reutlingen) wurden die DNS-Fragmente visualisiert und mit dem Kodak Digital Science™ DC120 Version 1.0-Dokumentationssystem (Eastman Kodak Inc., USA) dokumentiert.

3.8 Untersuchung von Konformationsvarianten eines PCR-Fragmentes im Agarosegel

Bei diesem Versuchsaufbau dienten Plasmide des Klons 4-6/4, beschrieben in Kapitel 4.4.1, als Template. Das Insert der Plasmide wurde mit dem Primerpaar fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r amplifiziert. Die Amplifikate in 72 µl PCR-Produkt wurden mit einer Laufzeit von 2,5 Stunden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es fanden sich zwei deutliche von einander abgrenzbare Banden von 1.480 bp und 1.300 bp, die gut isolierbar waren. Die Extraktion der isolierten Banden erfolgte wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben und mit anschließender Elution der DNS in 27 µl DEPC-behandeltem Wasser. Durch Versetzen der Eluate mit jeweils 3 µl PCR-Reaktionspuffer Y (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) entsprach der pH-Wert der DNS-Lösungen dem eines PCR-Ansatzes. Beide Eluate wurden auf zwei Aliquots von je 15 µl aufgeteilt. Während der Lagerung des einen Aliquots im Kühlschrank wurde das jeweils zweite Aliquot ohne Zusatz weiterer PCR-Komponenten im Thermocycler den Temperaturbedingungen eines PCR-Laufs ausgesetzt. Das Cyclerprogramm entspricht den Angaben in Tabelle 3-6. Abweichend wurden jedoch nur drei Zyklen durchgeführt.

Die wärmebehandelten Proben wurden anschließend auf Eis gelagert. Es wurde jeweils das gesamte Volumen der wärmebehandelten und unbehandelten Aliquots auf ein 1,5 %iges Agarosegel geladen. Neben einem geeigneten Größenmarker wurden 4 µl des ursprünglichen PCR-Produktes aufgetragen und in einer 1,5-stündigen Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.9 Klonierung

Zur Verwendung kamen verschiedene kommerziell erhältliche Klonierungskits. Die enthaltenen Plasmide und Stämme chemisch kompetenter E.coli-Bakterien wurden entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben verwendet. Alle Kits waren für ein Blue White Screening geeignet.

Die verwendeten Agarplatten wurden mit Luria-Bertani-Agar (LB-Agar) und Ampicillin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einer Konzentration von 100 µg/ml hergestellt und bis zu ihrer weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Kurz vor ihrem Einsatz wurden sie mit X-Gal-Stocklösung und, falls notwendig, mit 40 µl IPTG-Stocklösung imprägniert.

Verwendete kommerzielle Klonierungsreagenzien:

- TOPO TA Cloning® -Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- pSTBlueTM-1 AccepTorTM Vector Kit (Novagen, Madison, WI, USA)
- Qiagen® PCR Cloning Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- Library Efficiency DH5α-Zellen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Gut abgrenzbare, weiße Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen gelben Pipettenspitze berührt („gepickt“). Die Suspension der an der Spitze haftenden Klone erfolgte mit 20 µl DEPC-behandeltem A. bidest. in einem 100 µl-PCR-Reaktionsgefäß. Direkt im Anschluss wurden 10 µl dieser Suspension in ein Reagenzglas oder eine 100 ml-Glasflasche mit 5-20 ml Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium) zur Vermehrung überführt. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte für 12-15 Stunden bei 37 °C unter langsamem Schütteln im Brutschrank. Die verbliebene Suspension war nach zehnmütiger Inkubation bei mindestens 95 °C zum Abtöten der Bakterien und Freisetzen der Plasmide für ein Colony-Screening mittels PCR verwendbar. Für das Colony-Screening wurde das PCR-Protokoll des jeweiligen Inserts mit den entsprechenden Primern angewendet (Kapitel 3.6). Der M13-Primer erwies sich für ein Screening, vermutlich aufgrund des hohen GC-Gehaltes der PKD1-Inserte, als nicht geeignet. Als Positivkontrolle diente das schon für die Klonierung verwendete PCR-Produkt. Die Auswertung der Colony-PCR erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Fragmente in einem geeigneten Agarosegel. Hierbei wurden Plasmide als Insert-tragend beurteilt, wenn die Position der Bande der Größe des verwendeten PCR-Produktes entsprach.

850 µl Flüssigkultur der in LB-Flüssigmedium angezüchteten Klone wurden mit 150 µl Glycerin versetzt und in 1 ml-Reaktionsgefäßen als GVO gekennzeichnet bei -80 °C gelagert.

3.10 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse

(RFLP-Analyse)

Zur RFLP-Analyse diente ein PCR-Amplifikat des PKD1-Gens von Exon 27 bis 30 von 884 Basenpaaren (bp). Verwendet wurden dazu die Primer cPKD27F und cPKD30R2. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wurde mit einem Aliquot der Probe von 5 µl eine Gelelektrophorese mit einem 1 %-igen Agarosegel gefahren. In die nachfolgende Restriktionsreaktion wurden bei guter PCR-Amplifikation 8,0 µl der Probe eingesetzt. Bei schwacher oder aber sehr guter Amplifikation wurde entsprechend mehr oder weniger PCR-Produkt eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym Mly1 (New England BioLabs® GmbH, Frankfurt) inkubiert. Der Verdau der Proben erfolgte im Thermocycler bei 37 °C für 1 Stunde und 20 Minuten mit anschließender Inaktivierung des Restriktionsenzym durch Erhitzen auf 65 °C für 20 Minuten.

Die Auswertung der Restriktionsfragmente erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 2 %-igen Agarosegel. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und photographiert. Alle Proben wurden doppelt mit zwei unabhängig voneinander durchgeführten Polymerasekettenreaktionen und anschließender RFLP-Analyse untersucht.

Tabelle 3-9: Mastermix für den Verdau mit dem Restriktionsenzym Mly1

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz	Endkonzentration
DEPC-beh. A. bidest.	-	9,6 µl	-
NEBuffer 4	10x	2,0 µl	1x
Mly1	10.000 U/ml	0,2 µl	0,1 U/µl
BSA	10 mg/ml	0,2 µl	0,2 mg/µl
Mastermix	12,0 µl		
PCR-Produkt	8,0 µl		
Endvolumen	20,0 µl		

3.10.1 Auswertung der RFLP-Analyse

Fragmente des Wildtypallels wiesen eine Schnittstelle für das Enzym im Intron 27 auf und wurden in Fragmente von 676 bp und 208 bp geschnitten. Diese sowohl im Wildtypallel als auch im mutierten Allel vorkommende Schnittstelle diente als interne Positivkontrolle der Reaktion. Die nachzuweisende Mutation resultierte in einer weiteren Schnittstelle, so dass das mutierte Allel in Fragmente von 408 bp, 268 bp und 208 bp Länge geschnitten wurde.

3.11 Sequenzierungen

Sequenzierungsreaktionen wurden bei der Firma GATC Biotech, Konstanz in Auftrag gegeben. Die zu sequenzierenden DNS-Proben wurden in sterilem A. bidest. eluiert. Entsprechend der geforderten Template-Voraussetzungen des Unternehmens waren bei PCR-Produkten eine Konzentration von mindestens 20 ng/ μ l und bei Plasmiden eine Konzentration von mindestens 0,3 μ g/ μ l einzustellen. Zur Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die in DEPC-behandeltem Wasser gelösten PCR-Primer mit einer Konzentration von 10 pmol/l verwendet. Das Volumen der Proben und Primer betrug jeweils mindestens 30 μ l. Bestellt wurde die Sequenzierungsleistung Run24 supreme, mit hoher Lesequalität über eine Länge von mehreren hundert Basenpaaren. Sie enthielt eine Qualitätskontrolle der eingeschickten Proben und eine Wiederholung der Sequenzierung unter geänderten Reaktionsbedingungen, sollte die Sequenzqualität nicht den Anforderungen entsprechen. Die Sequenzierung der Templates erfolgte von beiden Seiten.

3.11.1 Auswertung von DNS-Sequenzen

Das Datenmaterial der Sequenzierung wurde von der Firma GATC in Form von Textdateien und Grafikdateien im abi-Format geliefert.

Diese wurden computerunterstützt mit folgender Software bearbeitet und analysiert:

- **Mutation Surveyor™ DNA Variant Analysis Software demo version 2.61 und V3.0 SoftGenetics® LLC (State College, PA 16803, USA).** Dieses Programm diente der Analyse direktonaler und bidirektonaler Sequenzdaten zur Detektion heterozygoter und homozygoter Mutationen, Deletionen, Insertionen und Duplikationen auf Grundlage von Sequenzspuren im abi-Format. Das Programm benötigt eine Vergleichssequenz als Textdatei im seq-Format oder die graphische Darstellung der Sequenz als Datei im abi-Format. Hierzu dienten Sequenzen aus dem eigenen Material. Im Übergangsbereich des PKD1-Gens zum TSC2-Gen wurde die Sequenz eines publizierten Klones mit einem Teil des felinen PKD1-Gens (NCBI-nucleotide, AC145332.48) verwendet. Die vom Analyseprogramm Mutation Surveyor™ gefundenen Sequenzabweichungen wurden überprüft. War die Qualität der Sequenz einer Probe an der entsprechenden Stelle zu schlecht, um eine sichere Aussage über tatsächliche Sequenzvariationen zu treffen, wurde die vorgeschlagene Mutation nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der Analyse wurden als Tabelle im xls-Format und als Textdatei mit Zusammenstellung der Vergleich- und Probensequenzen archiviert.
- **Chromas TraceViewer, Version 1,45 (Griffith University, Southport, Queensland, Australien).** Mit diesem Programm wurden zusätzlich zum Programm Mutation Surveyor™ Sequenzspuren überprüft und mit den Textdokumenten verglichen. Nicht auswertbare Abschnitte am Anfang und Ende der Sequenz wurden daraufhin aus den Textdokumenten entfernt. Heterozygote Mutationen stellten sich in sequenzierten

PCR-Produkten als Doppelpeaks dar. In gut auswertbaren Abschnitten wurde nach diesen Doppelpeaks gesucht.

- **DNASIS, Hitachi software engineering co.** Dieses Programm diente der Analyse und Bearbeitung von DNS-Textdateien. Dies geschah vor allem im Hinblick auf die Ähnlichkeit der DNS-Sequenzen untereinander, das Auffinden von Restriktionsstellen und funktionaler Genbereiche (Splice Sites, Branch Sites, Stop- und Startcodons), der Berechnung der Leseraster inklusive der entsprechenden Aminosäuresequenzen sowie die Konvertierung bekannter Sequenzen zur komplementären und reversen Basenabfolge. Außerdem wurde die bekannte Intron- und Exonsequenz der PKD1-Gene von Mensch und Hund auf Ähnlichkeit mit den Sequenzen aus dem PKD1-Gen der Perserkatze überprüft, um Splice Sites zu verifizieren.
- Mit dem online verfügbaren Programm **BLASTn** konnten Sequenzen auf Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen untersucht werden.
- **PROSIS, Hitachi software engineering co., LTD. 1984, 1990.** Dieses Programm wurde zur Analyse von Aminosäuresequenzen verwendet. Vor allem war es nützlich, um abgeleitete Aminosäuresequenzen der Katze auf Ähnlichkeit zu den PKD1-Genprodukten von Mensch und Hund zu überprüfen.
- **http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html.** Dieses online frei verfügbare Programm wurde verwendet, um mögliche Splice Sites ausfindig zu machen. Es analysierte Sequenzen auf Erkennungssequenzen von Donor und Acceptor Splice Sites und gab ihre Wahrscheinlichkeit mit einem Score zwischen 0,4 und 1 an. Die Erkennungssequenz einer Donor Site war 15 Basen lang und enthielt die letzten sieben Basen des 3'-Endes eines Exons und die ersten acht Basen des 5'-Endes des darauf folgenden Introns. Die Erkennungssequenz einer Acceptor Site war 41 Basen lang, wobei die ersten 21 Basen zum 3'-Ende des Introns und die folgenden 20 Basen zum 5'-Ende des nächsten Exons gehörten. Zusätzlich war die Start- und Endposition der Erkennungssequenz in der Vergleichsequenz angegeben.

3.12 Statistik

Bei der statistischen Auswertung der RFLP-Analyse kam der Chi-Quadrat-Test zur Anwendung (Hartl, 1980).

4 ERGEBNISSE

4.1 Immunhistologisches Ergebnis

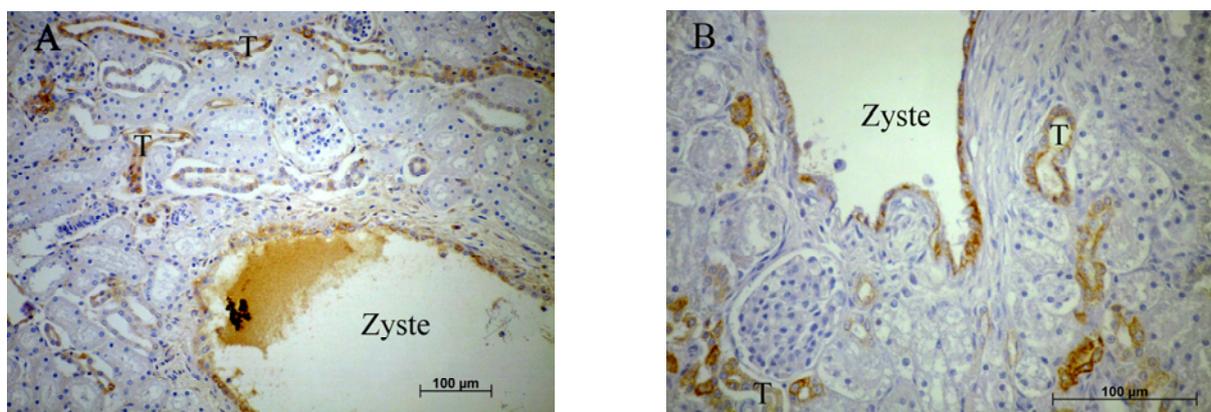
Um die Diagnose zystenpositiv oder -negativ stellen zu können, war bei zwei Tieren eine immunhistologische Untersuchung notwendig. Hierbei handelte es sich um eine sieben Wochen alte Perserkatze (S2203/02) und eine vierzehn Wochen alte Europäisch Kurzhaarkatze (S1132/06). Bei beiden Tieren waren histologisch einzelne Hohlräume mit einem Durchmesser von etwa einem Millimeter in der Nierenrinde zu sehen. Differentialdiagnostisch kamen Zysten oder aber physiologisch vorkommende, im Querschnitt getroffene Gefäße in Frage.

Zum Nachweis von epithelausgekleideten Zysten diente der immunhistologische Nachweis von Zytokeratin. Ein Antikörper gegen den Von-Willebrand-Faktor markierte dagegen Gefäßendothel.

In der vorliegenden Schnittebene war bei der Katze S1132/06 eine Zyste mit zytokeratinpositivem Epithel nachweisbar. Der Hohlraum war negativ für den Von-Willebrand-Faktor. Weitere zwei Hohlräume im Epithel stellten sich als Gefäßanschnitte mit Von-Willebrand-Faktor-positivem Endothel heraus. Bei Proband S2203/02 war in der immunhistologisch untersuchten Schnittebene der Niere ein Hohlraum im Rindenparenchym beurteilbar. Die Auskleidung dieses Hohlraumes war deutlich zytokeratinpositiv jedoch negativ für den Von-Willebrand-Faktor.

Bei beiden Tieren führte der Nachweis von mindestens einer Zyste zur Einordnung in die Gruppe der zystenpositiven Tiere (Abb. 4-1).

Abbildung 4-1: Immunhistologischer Nachweis von Zytokeratin im Epithel von Zystenwänden.



Die Auskleidung der Zystenwände und der Nierentubuli (T) ist bei beiden Tieren deutlich zytokeratinpositiv. Balken = 50 µm.

A: Nierengewebe des Probanden S1132/06

B: Nierengewebe des Probanden S2203/03.

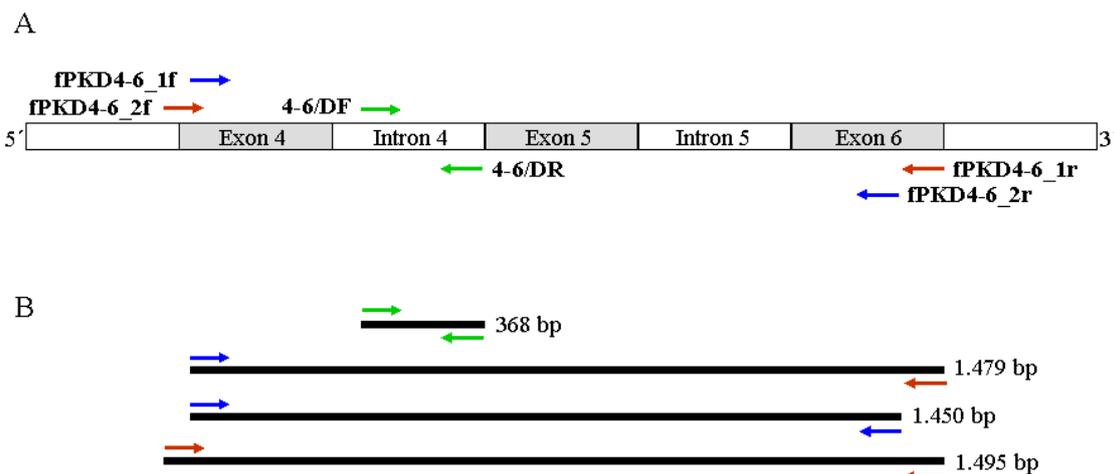
4.2 Strukturvergleich der PKD1-Gene von Mensch und Hund

Die DNS-Sequenz des caninen PKD1-Gens ist bis auf die Exon 1 enthaltende Region bekannt. Es wurden 46 Exons beschrieben (Dackowski et al., 2002; NCBI-Nucleotide, Accession Nr. AF483210). In der Literatur postulierte man auch für das humane PKD1-Gen 46 Exons (Hughes et al., 1995; International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). Allerdings wurden in der Sequenzdatenbank der NCBI (National Center for Biotechnology Information) für das humane PKD1-Gen 50 Exons beschrieben (NCBI-Nucleotide, Accession Nr. AC005600). Ein Unterschied von zwei Exons ergab sich dadurch, dass die Genabschnitte, die den humanen Exons 2 und 19 entsprachen, in der caninen PKD1-Sequenz nicht als kodierende Bereiche angesehen wurden. Eine Differenz von weiteren zwei Exons entstand durch die Zusammenfassung der den humanen Exons 16 bis 18 entsprechenden Sequenzabschnitte inklusive der Introns zu Exon 15 in der caninen DNS-Sequenz. Die Identität im kodierenden Bereich lag zwischen 73,1 % im Exon 24 (Mensch) bzw. 20 (Hund) und 92,7 % im Exon 43 (Mensch) bzw. 38 (Hund). Eine Tabelle mit den entsprechenden Daten findet sich im Anhang Kapitel 8.8.7.

4.3 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.1 PCR-System für die Amplifikation von Exon 4 bis 6

Abbildung 4-2: PCR-Amplifikation von Exon 4 bis 6



A: Schematische Darstellung des Genbereichs von Exon 4 bis 6, die Pfeile markieren die Position der Primer

B: Darstellung der Amplifikate der vier verwendeten Primerkombinationen

Für den Genabschnitt von Exon 4 bis 6 lieferten die folgenden Primerpaare zufriedenstellende PCR-Ergebnisse. Das Primerpaar fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r ergab aus feliner genomischer DNS Amplifikate von 1.479 bp. Amplifikate von Reaktionen mit den Primern fPKD4-6_1f und

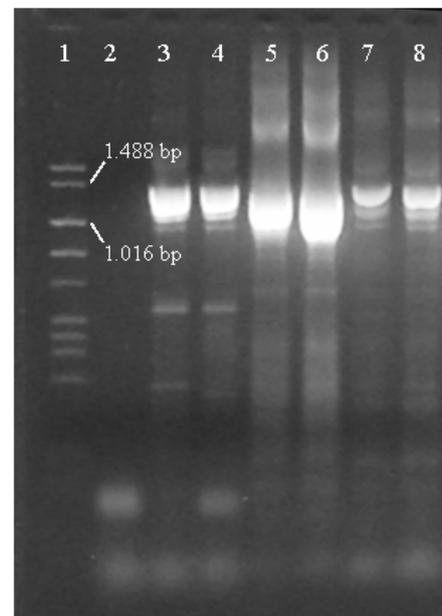
fPKD4-6_2r hatten eine Länge von 1.450 bp. Als drittes Primerpaar kamen die Primer fPKD4-6_2f und fPKD4-6_1r zum Einsatz. Amplifikate dieser Reaktion hatten eine Länge von 1.495 bp. Das vierte, für die Amplifikation von Intron 4 verwendete Primerpaar 4-6/DF und 4-6/DR flankiert DNS-Fragmente von 370 bp Länge. Diese Primerpaare waren in verschiedenen Kombinationen für nested und seminested PCRs verwendbar, so dass die Spezifität und/oder die Stärke der Amplifikation gesteigert werden konnte.

4.3.2 Untersuchung von Mehrfachbanden bei Amplifikaten aus dem Genabschnitt von Exon 4 bis 6

Amplifikate, die aus Reaktionen mit den verschiedenen Kombinationen der Primer fPKD4-6_1f, fPKD4-6_2f, fPKD4-6_1r und fPKD4-6_2r stammten, zeigten nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte eine deutliche Bande der erwarteten Länge (Kapitel 4.3.1).

Abbildung 4-3: PCR mit dem Primerpaar fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r unter Einsatz verschiedener Templates; 1,5 %iges Agarosegel

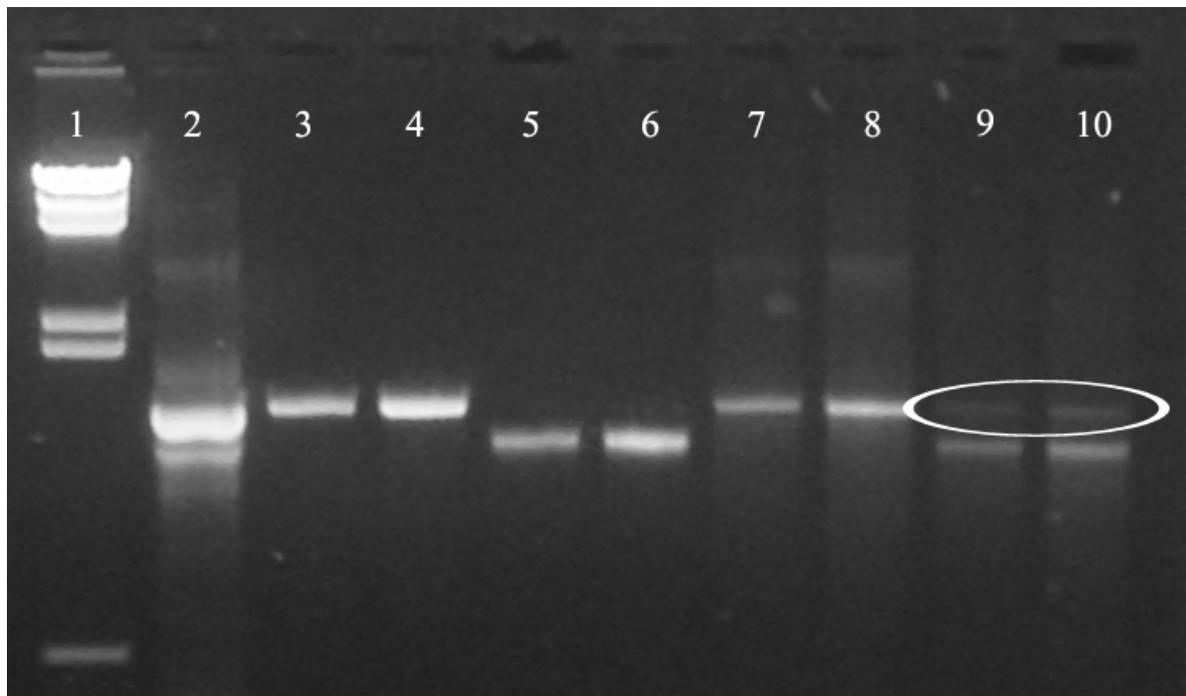
1. DNS-Leiter MF, 5 μ l
2. Nullkontrolle, 12 μ l
3. genomische DNS der Probe D2632
4. genomische DNS der Probe D2582
- 5.-8.: Plasmid-DNS des Klons 4-6/4:
 5. 1 ng DNS/12 μ l PCR-Ansatz, 4 μ l PCR-Produkt/Slot
 6. 1 ng DNS/12 μ l PCR-Ansatz, 8 μ l PCR-Produkt/Slot
 7. 0,1 ng DNS/12 μ l PCR-Ansatz, 4 μ l PCR-Produkt/Slot
 8. 0,1 ng DNS/12 μ l PCR-Ansatz, 8 μ l PCR-Produkt/Slot



Regelmäßig zeigte sich jedoch eine Doppelbande in Höhe von geschätzten 1.480 bp und 1.300 bp. In Einzelfällen fand sich eine zusätzliche dritte Bande von etwa 1.050 bp. Als mögliche Ursache kam ein unspezifisches Annealing der Primer in Frage. Das Auftreten mehrerer Banden ließ sich jedoch weder durch Modifikation der PCR-Bedingungen noch mit der Strategie der nested oder seminested PCR zur Steigerung der Spezifität der Reaktion beeinflussen. Beim Menschen sind Pseudogene des PKD1-Gens bekannt, wohingegen das PKD1-Gen des Hundes ein Single Copy Gene ist (Dackowski et al., 2002). Das Vorliegen von PKD1-Pseudogenen ist auch bei der Katze nicht zu erwarten (Lyons et al., 2004). Dennoch wurde die Amplifikation eines oder mehrerer Pseudogene in Betracht gezogen. Der Größenunterschied ließe sich in diesem Fall mit einer größeren Deletion erklären. Die beschriebenen Banden waren allerdings unabhängig vom verwendeten Template zu beobachten. Hierunter befanden sich neben genomischer DNS verschiedener Probanden auch Plasmide mit einem PKD1-spezifischem In-

sert aus dieser Region (Klon 4-6/4). Daher ließ sich unspezifisches Annealen der Primer und die Amplifikation verschiedener Genorte bzw. Pseudogene weitgehend ausschließen (Abb. 4-3). Schließlich wurden Amplifikate von 1.480 bp und 1.300 bp aus einer Reaktion mit den Primern fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r aus dem Gel isoliert und mit den gleichen Primern reamplifiziert. Unabhängig vom verwendeten Isolat traten in beiden Reaktionen neben einer prominenten Bande von etwa 1.480 bp zwei weitere kürzere Banden auf. Vorausgesetzt, dass die Banden ohne Kontamination isoliert werden konnten, schließt auch dieser Versuchsaufbau die Amplifikation verschiedener DNS-Fragmente aus.

Abbildung 4-4: Unterschiedliches Laufverhalten von Amplifikaten der Primer fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r nach Temperaturbehandlung im 1,5 %igen Agarosegel



1. DNS-Leiter λ Hind-III, 5 μ l
2. natives PCR-Produkt, 4 μ l
3. Isolierte Bande von 1.480 bp, 4 μ l
4. Isolierte Bande von 1.480 bp, 8 μ l
5. Isolierte Bande von 1.300 bp, 4 μ l
6. Isolierte Bande von 1.300 bp, 8 μ l
7. Isolierte Bande von 1.480 bp nach Temperaturbehandlung, 4 μ l
8. Isolierte Bande von 1.480 bp nach Temperaturbehandlung, 8 μ l
9. Isolierte Bande von 1.300 bp nach Temperaturbehandlung, 4 μ l
10. Isolierte Bande von 1.300 bp nach Temperaturbehandlung, 8 μ l

Deshalb waren als Ursache Konformationsvarianten der PCR-Produkte zu vermuten, die in der Agarosegelelektrophorese unterschiedliche Laufeigenschaften besaßen und aus diesem Grund das Bild einer Doppel- oder sogar Dreifachbande erzeugten. Zum Nachweis dieses Phänomens dienten im Agarosegel aufgetrennte Amplifikate des Klones 4-6/4 aus einer Reaktion mit den

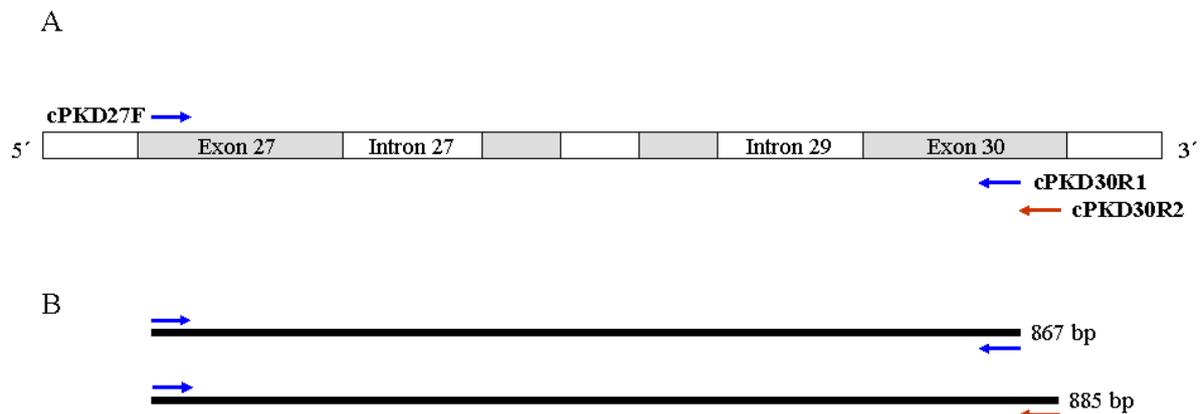
Primern fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r. Der Versuchsaufbau ist in Kapitel 3.8 beschrieben. In der anschließend unverzüglich durchgeführten Agarosegelelektrophorese fand sich im erhitzten Aliquot der 1.300 bp-Bande eine weitere deutliche Bande von etwa 1.440 bp (Abb. 4-4).

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass DNS-Fragmente aus dem Genabschnitt von Exon 4 bis sechs unter Temperatureinfluß während einer PCR bestehende Konformationen innerhalb der Sequenz lösen und neue annehmen. Konformationsvarianten der Amplifikate des Genabschnitts von Exon 4 bis 6 mit unterschiedlichen Laufeigenschaften könnten also die Ursache der beobachteten Doppel- und möglicherweise auch der Dreifachbanden sein.

4.3.3 PCR-System für die Amplifikation von Exon 27 bis 30

Im Genbereich von Exon 27 bis 30 waren die Primerkombinationen cPKD27F und cPKD30R1 sowie cPKD27F und cPKD30R2 zur Amplifikation aus feliner genomischer DNS geeignet. Sie ließen sich im Agarosegel als distinkte Bande mit einer Länge von 867 bp bzw. 884 bp darstellen (Abb. 4-5). In der Regel wurde das Primerpaar cPKD27F und cPKD30R2 verwendet, da die Amplifikate etwas länger waren und der Ertrag dieser Amplifikation höher ausfiel. Zur direkten Sequenzierung von PCR-Produkten erwies sich der Primer cPKD30R2 allerdings als ungeeignet. Stattdessen wurde der Primer cPKD30R1 verwendet.

Abbildung 4-5: PCR-Amplifikation von Exon 27 bis 30



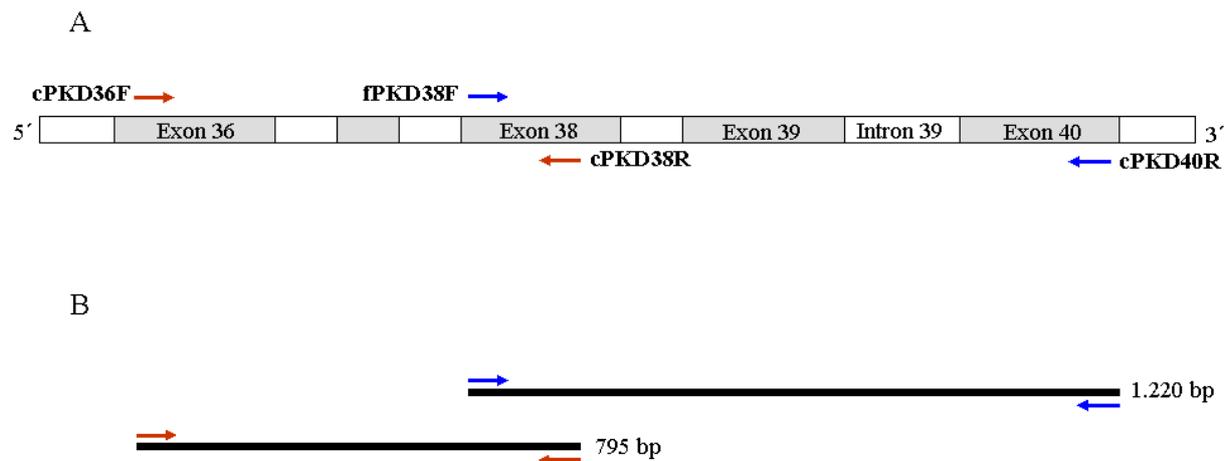
A: Schematische Darstellung des Genbereichs von Exon 27 bis 30, die Pfeile markieren die Position der Primer

B: Darstellung der Amplifikate der zwei Primerkombinationen

4.3.4 PCR-System für die Amplifikation von Exon 36 bis 38

Für den Genabschnitt von Exon 36 bis 38 lieferte das Primerpaar cPKD36F und cPKD38R ein als deutliche Bande im Agarosegel darstellbares PCR-Produkt von 795 bp Länge. Allerdings findet man auch nach Modifikationen der PCR-Bedingungen, die unspezifische Amplifikate minimieren sollen, sowohl bei Einsatz feliner als auch caniner genomischer DNS zusätzlich ein schwächeres, aber dennoch deutliches Amplifikat von etwa 600 bp Länge.

Abbildung 4-6: Schematische Darstellung der Primerpaare cPKD36F und cPKD38R sowie fPKD38F und cPKD40R



A: Die Pfeile markieren die Position der Primer im felinen PKD1-Gen.

B: Darstellung der Amplifikate der zwei Primerpaare.

Die Primer wurden auf Grundlage der bekannten caninen PKD1-Sequenz hergestellt. Bei der Amplifikation aus genomischer caniner DNS ist eine Produktlänge von 801 bp zu erwarten. Damit kommt das Amplifikat von 795 bp dieser Erwartung sehr nahe. Zudem ist die Amplifikation dieses Fragments bedeutend stärker als die des Fragments von 600 bp Länge. Zur Kontrolle wurden PCR-Ansätze angefertigt, welche nur den Vorwärts- oder den Rückwärtsprimer enthielten, aber ansonsten dem Protokoll entsprachen. Als Template diente feline genomische DNS. Nach Ablauf der Reaktion und gelelektrophoretischer Auftrennung zeigte der Ansatz, der nur den Primer cPKD36F enthielt, zwei schwache Banden, von denen die obere auf gleicher Höhe mit dem 600er Fragment der vollständigen Ansätze liegt. Es war anzunehmen, dass es sich bei dem 600 bp langen PCR-Produkt um ein unspezifisches Amplifikat handelte, welches allein mit dem Primer cPKD36F amplifiziert wurde (Abb. 4-7). Die Sequenzierung des PCR-Produkts von 800 bp bestätigte, dass es sich um ein PKD1-spezifisches Amplifikat handelte. Vor weiterführenden Versuchen wie der Klonierung und Sequenzierung wurde diese Bande sauber aus dem Agarosegel isoliert.

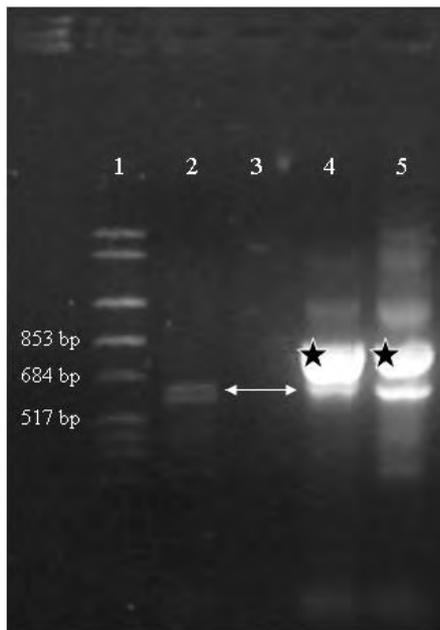


Abbildung 4-7: PCR-Amplifikation von Exon 36 bis 38
1 %iges Agarosegel, 8µl PCR-Ansatz pro Slot. Die PKD1-spezifische Bande ist etwa 800 bp lang (Stern).

1. DNS-Leiter MF, 5 µl
2. Der Ansatz enthält nur den Primer cPKD36F. Er amplifiziert aus feliner genomischer DNS eine Doppelbande von etwa 600 bp.
3. Der Ansatz enthält nur den Primer cPKD38R; es sind keine Amplifikate nachweisbar.
4. Ansatz mit beiden Primern und caniner genomischer DNS. Die Bande von 600 bp wird wahrscheinlich allein durch den Vorwärtsprimer amplifiziert (Pfeil).
5. Vollständiger Ansatz mit beiden Primern und feliner genomischer DNS. Die Doppelbande wird wahrscheinlich auch hier ausschließlich mit dem Vorwärtsprimer amplifiziert

4.3.5 PCR-System für die Amplifikation von Exon 38 bis 40

Im Genabschnitt von Exon 38 bis 40 wurden die Primer fPKD38F und cPKD40R verwendet. Dieses Primerpaar ergab mit feliner genomischer DNS ein Amplifikat von 1.220 bp (Abb. 4-6).

4.3.6 Amplifikation der cDNS von Exon 29 bis 37

Um die „Lücke“ in der felinen Sequenz zwischen Exon 30 und 36 zu schließen, wurden Primer aus den felinen Exons 29 und 37 hergestellt. Die Amplifikation eines 1.029 bp langen Amplifikates gelang aus cDNS, die aus dem Ovar einer Hauskatze extrahiert worden war. Ein Amplifikat aus genomischer DNS hätte eine geschätzte Länge von 3.720 bp. Die PCR-Amplifikation eines so langen Fragmentes war nicht möglich. Abweichend von der Bezeichnung des Rückwärtsprimers flankieren die verwendeten Primer fPKD29FE und fPKD36R3 einen Abschnitt von Exon 29 bis Exon 37.

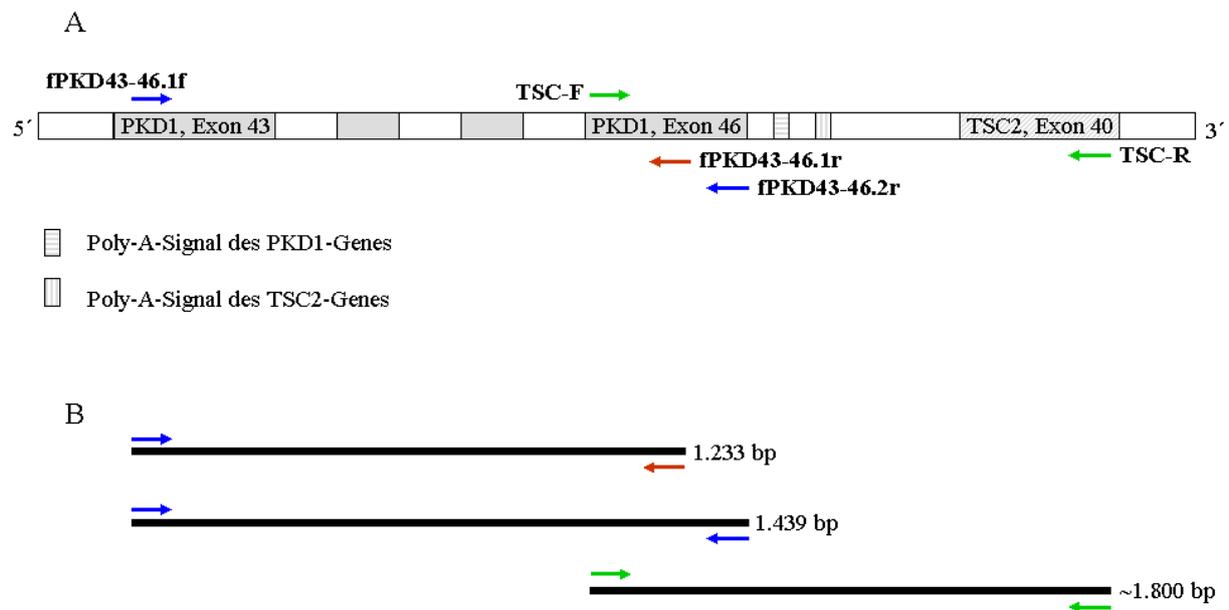
4.3.7 PCR-System für die Amplifikation von Exon 43 bis 46

Im Bereich von Exon 43 bis 46 konnten mit Hilfe der Primerpaare fPKD43-46_1f und fPKD43-46_1r sowie fPKD43-46_1f und fPKD43-46_2r Amplifikate von 1.233 bp bzw. 1.439 bp synthetisiert werden. Zum Teil ergaben Reaktionen mit dem Primerpaar fPKD43-46_1f und fPKD43-46_2r zu schwache Amplifikate für weiterführende Versuche. In solchen Fällen wurden Aliquots dieser PCR-Ansätze in einer seminested PCR mit dem Primerpaar fPKD43-46_1f und fPKD43-46_1r eingesetzt (Abb. 4-8).

4.3.8 PCR-System für die Amplifikation von Exon 46 des PKD1-Gens bis Exon 40 des TSC2-Gens

Das humane und canine PKD1-Gen liegt in Tail-to-Tail-Orientierung zum TSC2-Gen. In der Annahme, dass dies auch bei der Katze der Fall ist, wurde ein PCR-System, basierend auf der PKD1- und TSC2-Sequenz des Hundes, hergestellt. Die Primer flankieren einen Großteil von Exon 46 des PKD1-Gens, Exon 40 des TSC2-Gens und die dazwischen liegende nicht kodierende Region. Mit feliner genomischer DNS als Template wurden Amplifikate von etwa 1,8 kb generiert (Abb. 4-8). Sie erwiesen sich nach Sequenzierung und Vergleich mit den entsprechenden humanen und caninen Sequenzen als PKD1- bzw. TSC2-spezifisch.

Abbildung 4-8: Schematische Darstellung der PCR-Systeme von Exon 43 des PKD1-Gens bis Exon 40 des in Tail-to-Tail-Orientierung liegenden TSC2-Gens.



A: Die Pfeile markieren die Position der Primer im PKD1- und TSC2-Gen.

B: Darstellung der drei Amplifikate.

4.4 Klonierung

4.4.1 Klonierung von Exon 4 bis 6 des PKD1-Gens

Aus dem PKD1-Bereich von Exon 4 bis 6 wurden mit den Primern fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r synthetisierte Amplifikate kloniert. Spender war das zystenegative Tier D2594. PCR-Produkte wurden mit dem Plasmid pCRII ligiert und die *E. coli*-Bakterien TOP10 One Shot®

Cells transformiert. Ein Klon mit der Kennzeichnung „4-6/4“ wurde für die Sequenzierung ausgewählt.

Drei weitere Klone enthielten DNS eines zystenfreien Tieres. Sie stammten aus einer nested PCR mit den Primern fPKD4-6_2f und fPKD4-6_1r als primärem Primerpaar und der im Anschluss daran durchgeführten Reaktion mit den Primern fPKD4-6_1f und fPKD4-6_2r. Die gelelektrophoretische Erfolgskontrolle dieser Amplifikation zeigte eine Doppelbande von geschätzten 1.480 bp und 1.300 bp. Die PCR-Produkte wurden mit dem Plasmidvektor pDrive cloning vector ligiert und QIAGEN EZ Competent Cells transformiert. Es konnten die Klone „Ninieg 4-6-E8“ und „Ninieg 4-6-E12“ mit einer Insertlänge von 1.300 bp identifiziert werden. Nur ein Klon, „Ninieg 4-6-E9“, enthielt ein Insert von etwa 1.480 bp Länge.

4.4.2 Klonierung von Exon 27 bis 30 des PKD1-Gens

PCR-Produkte aus dem Bereich des PKD1-Gens zwischen Exon 27 und 30 einer sonographisch zystenpositiven Katze (D2531) wurden mit dem Plasmid pSTBlue™-1AccepTor Vector (Novagen®) als Vektor ligiert und in *E. coli*-Bakterien (DH5 α -Zellen™, Library Efficiency™, Invitrogen™) kloniert. Neun Klone, Klon CA 1 und 2 sowie Klon CA 4 bis 10, enthielten das gewünschte PKD1-Insert. Diese Klonierung diente insbesondere der genaueren Charakterisierung der im Exon 29 beschriebenen C>A-Transversion im eigenen Probenmaterial. Alle Klone wurden mit der in Kapitel 4.8.1 beschriebenen RFLP-Analyse charakterisiert. Hierdurch konnte das Insert des Klons CA1 als Kopie des mutierten Allels und das Insert des Klons CA9 als Kopie des Wildtypallels identifiziert werden. Beide Klone wurden mit den plasmidspezifischen Primern M13F und M13R sequenziert.

4.4.3 Klonierung von Exon 29 bis 37 aus PKD1-cDNS

Aus dem Ovar einer Hauskatze isolierte cDNS wurde mit den Primern fPKD29FE und fPKD36R3 amplifiziert und anschließend mit dem Plasmid pSTBlue™-1AccepTor Vector, Novagen® ligiert. Mit diesem Plasmid wurden NovaBlue Giga Singles, chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien, transformiert. Klon „cPKD29-37-2“ wurde sequenziert.

4.4.4 Klonierung von Exon 43 bis 46 des PKD1-Gens

Amplifikate des Spendertieres D2580 aus der seminested PCR mit den Primern fPKD43-46.1f und fPKD43-46.2r und den Primern fPKD43-46.1f und fPKD43-46.1r als zweites Primerpaar wurden mit dem Vektorplasmid pCR®2.1-TOPO® ligiert und TOP10F' One Shot® Cells transformiert. Schließlich wurde ein Klon mit der Bezeichnung „Klon 3+“ isoliert und ein Abschnitt des Insertes von 445 Basen sequenziert.

4.5 Ergebnisse der Sequenzierung

Aufgrund der Annahme, dass Tiere mit dem PKD-Phänotyp Träger einer heterozygoten Mutation sein müssen, wurden bevorzugt PCR-Produkte sequenziert. Während der Polymerasekettenreaktion müsste die Wahrscheinlichkeit der Amplifikation für beide Allele gleich groß sein. Das bedeutet, dass im Gemisch der PCR-Produkte Amplifikate beider Allele ungefähr in gleicher Menge vorliegen sollten. Unterschiede in der Nukleotidsequenz sind an der graphischen Darstellung des Sequenzierungsergebnisses, den Sequenzspuren, ablesbar. Heterozygote Nukleotidsubstitutionen, Deletionen oder Insertionen zeigen sich als Doppelpeaks in der Sequenzspur. Das Programm Mutation Surveyor™ ist in der Lage, diese Veränderungen zu erkennen und zu charakterisieren. Die im Folgenden angegebenen Sequenzlängen von PCR-Produkten beziehen sich auf die Länge der Sequenzen, die von Mutation Surveyor™ ausgewertet werden konnten.

Die vollständigen Sequenzen der jeweiligen Reaktionen befinden sich in Kapitel 8.5 des Anhangs.

4.5.1 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

aus dem Genbereich von Exon 4 bis 6

Der Klon 4-6/4 mit dem Insert des Spendertieres D2594 wurde mit den Primern M13 FP und M13 RP sequenziert. Die Sequenzlängen aus diesen Reaktionen betragen 560 und 452 Basen, womit das gesamte Insert dieses Klonen nicht durchgängig sequenzierbar war.

Das Insert des Klonen Nineg 4-6-E8 wurde mit den plasmidspezifischen Primern M13 FP und M13 RP sowie dem insertspezifischen Primer 4-6/ZR und 4-6/ZF sequenziert. Nach diesen drei Reaktionen war das gesamte Insert des Klonen Nineg 4-6-E8 von 1.311 Basen bekannt.

Klon Nineg 4-6-E12 wurde mit den Primern M13 FP und dem Primer M13 RP sequenziert. Die gesamte Sequenz dieses Inserts von 1.311 Basen war auswertbar.

Der Klon Nineg 4-6-E9 zeigte im Colony Screening mit insertspezifischen Primern ein Amplifikat von etwa 1.480 bp. Er wurde mit den plasmidspezifischen Primern M13 FP und RP sequenziert. Die Reaktionen ergaben 574 und 777 Basen auswertbare Sequenz, wobei das gesamte Insert dieses Klonen nicht durchgängig sequenziert werden konnte.

Die Inserte der vier Klone zeigten nach Analyse mit dem Programm BLASTn die höchste Übereinstimmung mit dem *canis familiaris* Polyzystin-1-Gen (AF482210.1).

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten wurden Amplifikate von zystenpositiven und -negativen Katzen verwendet, die mit dem Primerpaar fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r synthetisiert worden waren. Als Sequenzierprimer dienten die gleichen Primer. Die Sequenzierungsergebnisse waren jedoch in den meisten Fällen durch unsaubere Sequenzspuren mit sich überlagernden Peaks gekennzeichnet, so dass sie entweder gar nicht bewertet oder nur relativ kurze Sequenzabschnitte in die Untersuchung einbezogen werden konnten.

Mit dem gleichen Primerpaar hergestellte Amplifikate der Probanden D2582 und D2573 wurden mit speziell für die Sequenzierung hergestellten Primern Sequ4for und Sequ6rev bearbeitet. Doch auch die Ergebnisse dieser Reaktionen waren nicht überzeugend. Lediglich die 200 Basen lange Sequenz der Probe D2573 aus der Sequenzierung mit dem Primer Sequ4for ging in die Auswertung ein. Mit genomischer DNS der Probe D2573 wurde eine doppelte nested PCR mit den Primern fPKD4-6_2f und fPKD4-6_1r, fPKD4-6_1f und fPKD4-6_2r und schließlich 4-6/DF und 4-6/DR durchgeführt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung zeigten sich zwei deutliche Amplifikate von 240 und 370 Basen Länge. Die Kürzere ließ eine Deletion im Intron 4 erwarten. Daher wurde dieses Fragment isoliert und mit dem am Ende von Intron 4 liegenden Primer 4-6/DR sequenziert. 173 Basen dieser Sequenz waren auswertbar. Die in Tabelle 4-1 aufgelisteten Sequenzen stammen von zystennegativen Tieren. Die Lesbarkeit der Sequenzen zystenpositiver Tiere war für eine Auswertung nicht ausreichend.

Tabelle 4-1: Übersicht der Sequenzen von Exon 4 bis 6

Probe	Sequenzierprimer	Sample file	Länge (bp)
D2577	fPKD4-6_1f	57-4-6.1F.abi	85
	fPKD4-6_1r	57-4-6.1R.abi	101
D2573	Sequ6rev	73-4-6-Sr.abi	200
	4-6/DR	240-DR.abi	312
D2594	M13-FP	D2594Klon4-6.4-M13-FP.abi	435
	M13 RP	D2594Klon4-6.4-M13-RP.abi	470
D2600	fPKD4-6_1f	00-4-6.1F.abi	248
	fPKD4-6_1r	00-4-6.1R.abi	416
D3143	M13-FP	KlonE12-M13-FP.abi	810
	M13 RP	KlonE12-M13-RP.abi	690
D3143	M13-FP	KlonE8-4-61300-M13-FP.abi	571
	M13 RP	KlonE8-4-61300-M13-RP.abi	548
	4-6/ZF	KlonE8-4-61300-ZF.abi	206
	4-6/ZR	KlonE8-4-61300-ZR.abi	682
D3143	M13-FP	KlonE9-M13-FP.abi	570
	M13 RP	KlonE9 M13 RP	777

4.5.2 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

aus dem Genbereich von Exon 27 bis 30

Das Insert des Klonen CA1 von 884 bp Länge war mit dem plasmidspezifischen Primern M13 FP und M13 RP vollständig sequenzierbar. Ebenso konnte das Insert des Klonen CA9 vollständig sequenziert werden. Diese Sequenzen zeigten in der BLASTn-Analyse Übereinstimmung mit *Felis catus* polycystic kidney disease 1-like gene (gi 57547696/gb/AY612847.1) und mit dem *Canis familiaris* polycystin-1-Gen (AF482210.1).

Der Vorwärtsprimer cPKD27F eignete sich sehr gut für die Sequenzierung. Der Rückwärtsprimer cPKD30R2 war allerdings als Sequenzierprimer nicht verwendbar. Stattdessen kam der Primer cPKD30R1 zum Einsatz. Sequenziert wurden PCR-Amplifikate von sieben Katzen. Bei den zwei zystennegativen Tieren handelte es sich um die Probanden D2573 und D2582. Bei den fünf zystenpositiven Tieren handelte es sich um die Probanden D2004, D2577, D2590, D2631 und D3142. Eine Übersicht der eingesetzten Proben, der verwendeten Sequenzierprimer und der Sequenzlängen gibt Tabelle 4-2. Bis auf die Probe D3142 konnten alle Produkte durchgehend sequenziert werden. Ursache der schlechten Sequenzierbarkeit dieser Probe mit dem Rückwärtsprimer ist eine heterozygote Deletion von elf Basen im Intron 29 (Kapitel 4.7.2).

Tabelle 4-2: Übersicht der Sequenzen von Exon 27 bis 30

Probe	Befund	Sequenzierprimer	Sample file	Länge (bp)
D2573	zystennegativ	cPKD27F	73-27-27F.abi	626
		cPKD30R1	73-27-30R1.abi	552
D2582	zystennegativ	cPKD27F	82-27-P27.abi	390
		cPKD30R1	82-27-P30.abi	199
		cPKD27F	82B-P27.abi	592
		cPKD30R1	82B-P30.abi	449
D2004	zystenpositiv	cPKD27F	04-27F.abi	581
		cPKD30R1	04-31R1.abi	546
D2590	zystenpositiv	cPKD27F	WdhD2590-27F.abi	709
		cPKD30R1	WdhD2590-30R1.abi	713
D2631	zystenpositiv	cPKD27F	WdhD2631-27F.abi	714
		cPKD30R1	WdhD2631-30R1.abi	566
D2577	zystenpositiv	cPKD27F	2577-27F.abi	710
		cPKD27F	77-27-P27.abi	223
		cPKD30R1	2577-31R1.abi	719
D3142	zystenpositiv	cPKD27F	N+-27F.abi	588
		cPKD30R1	27N+-31R1.abi	77
		cPKD30R1	GATC1N+31R1.abi	108
		cPKD30R1	GATC2N+31R1.abi	108

4.5.3 Sequenzierung klonierter cDNS aus dem Bereich von Exon 29 bis 37

Die Sequenzierung des Klons cPKD29-37-2 erfolgte mit den plasmidspezifischen Primern M13 FP und M13 RP. Die Reaktion mit M13 FP ergab 556 Basen gut auswertbare Insertsequenz. Mit dem Primer M13 RP konnten 651 Basen des Inserts sequenziert werden. Damit lag die Insertsequenz von 1.029 bp vollständig vor. Sie zeigte nach Computeranalyse mit BLASTn Übereinstimmung mit der mRNA des caninen PKD1-Gens.

4.5.4 Sequenzierung von PCR-Produkten aus dem Genbereich

von Exon 36 bis 38

Die 795 Basen langen PCR-Produkte aus dem Bereich von Exon 36 bis 38 des PKD1-Gens wurden mit den Primern cPKD36F und cPKD38R sowohl amplifiziert als auch sequenziert. Hierbei handelt es sich um die zystennegativen Tier D2573 und D2582 sowie die zystenpositiven Tiere D2004, D2577 und D3142. Mit diesen beiden Primern gelang die durchgängige Sequenzierung jeder Probe.

Tabelle 4-3: Übersicht der Sequenzen von Exon 36 bis 38

Probe	Befund	Sequenzierprimer	Sample file	Länge (bp)
D2573	zystennegativ	cPKD36F	36-73-36F.abi	680
		cPKD38R	36-73-38R.abi	684
D2582	zystennegativ	cPKD36F	36-82-36F.abi	687
		cPKD38R	36-82-38R.abi	720
D2004	zystenpositiv	cPKD36F	36-04-F.abi	621
		cPKD38R	36-04-38-R2.abi	701
D2577	zystenpositiv	cPKD36F	36-77-F.abi	547
		cPKD36F	GATC1-77-36F.abi	547
		cPKD38R	36-77-R.abi	477
		cPKD38R	GATC1-77-38R.abi	357
D3142	zystenpositiv	cPKD36F	36-N+-F.abi	665
		cPKD38R	36-N+-R.abi	582

4.5.5 Sequenzierung von PCR-Produkten aus dem Genbereich

von Exon 38 bis 40

Die Sequenzierung von PCR-Produkten aus dem Bereich von Exon 38 bis 40 des felines PKD1-Gens erfolgte mit den Primern fPKD38F und cPKD40R. Der Primer fPKD38F lag 68 bp stromaufwärts von Primer cPKD38R. Daher war es möglich, den Abschnitt des felines PKD1-Gens von Exon 36 bis 40 durchgehend zu sequenzieren.

Auch für diesen Abschnitt waren die Sequenzen der zwei zystennegativen Probanden D2573 und D2583 sowie der zystenpositiven Probanden D2004, D2577 und D3142 analysierbar. Die PCR-Amplifikate von D2573, D2583 und D2004 wurden durchgängig sequenziert. Bei Amplifikaten der Proben D3142 und D2577 führten zwei bzw. drei heterozygote Deletionen zu einer rasch abnehmenden Sequenzqualität und damit nur relativ kurzen Sequenzierungsergebnissen (Kapitel 4.7.4). Zusätzlich wurden die Elterntiere der Familien A und B sequenziert. Bis auf die PCR-Produkte der Proben D1989 und D2039 konnten diese Proben durchgängig sequenziert

werden. Auch bei diesen zwei Proben nahm die Lesbarkeit der abi-Traces aufgrund zweier heterozygoter Deletionen frühzeitig ab.

Tabelle 4-4: Übersicht der Sequenzen von Exon 38 bis 40

Probe	Befund	Sequenzierprimer	Sample file	Länge (bp)
D2573	zystennegativ	fPKD38F	73-38-38F.abi	707
		cPKD40R	73-38-40R.abi	638
D2582	zystennegativ	fPKD38F	82-38F.abi	724
		cPKD40R	82-40R.abi	712
D2004	zystenpositiv	fPKD38F	3804-38F.abi	725
		cPKD40R	3804-40R.abi	637
D2577	zystenpositiv	fPKD38F	77-38F.abi	474
		cPKD40R	77-40R.abi	226
D3142	zystenpositiv	fPKD38F	N+38-38F.abi	474
		cPKD40R	N+38-40R.abi	418
		fPKD38F	GATC1-N+38-38F.abi	469
		cPKD40R	GATC1-N+38-40R.abi	418
D1989	zystenpositiv	fPKD38F	89-38F.abi	711
		cPKD40R	89-40R.abi	474
D2042	zystenpositiv	fPKD38F	42-38F.abi	731
		cPKD40R	42-40R.abi	680
D2050	zystenpositiv	fPKD38F	50-38F.abi	730
		cPKD40R	50-40R.abi	709
D2055	zystenpositiv	fPKD38F	55-38F.abi	729
		cPKD40R	55-40R.abi	708
D2057	zystennegativ	fPKD38F	57-38F.abi	729
		cPKD40R	57-40R.abi	710
D2064	zystennegativ	fPKD38F	64-38F.abi	730
		cPKD40R	64-40R.abi	717
D2076	zystennegativ	fPKD38F	76-38F.abi	723
		cPKD40R	76-40R.abi	712
D2086	zystennegativ	fPKD38F	86-38F.abi	721
		cPKD40R	86-40R.abi	711

4.5.6 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

aus dem Genbereich von Exon 43 bis 46

PCR-Produkte aus dem Genabschnitt von Exon 43 bis 46 wurden sowohl kloniert und sequenziert als auch direkt sequenziert.

Der Klon 3+ mit dem Insert der Probe D2580 wurde mit dem plasmidspezifischen Primer M13 FP sequenziert. Beginnend mit dem PCR-Primer fPKD43-46-1f konnten 445 Basen des Inserts sequenziert werden. Diese Sequenz zeigte Übereinstimmung von 93 % mit dem *Canis familiaris* polycystin-1-Gen (AF482210.1).

Es wurden PCR-Produkte von sieben Tieren sequenziert. Bei den Proben handelt es sich um DNS der zystennegativen Probanden D2573, D2583 und D3143 sowie der zystenpositiven Tiere D2004, D2577, D2580 und D3142. Alle Proben wurden aus beiden Richtungen sequenziert. Die PCR-Produkte von D2573, D2582, D2577, D2580, D3142 und D3143 waren durchgängig sequenzierbar. Die Sequenzierung der Probe D2004 ergab keine durchgängige Sequenzinformation. Eine Übersicht dieser Sequenzen findet sich in Tabelle 4-5.

Tabelle 4-5: Übersicht der Sequenzen von Exon 43 bis 46

Probe	Befund	Sequenzierprimer	Sample file	Länge (bp)
D2004	zystenpositiv	fPKD43-46.1f	4-43-43F.abi	705
		fPKD43-46.1r	4-43-46R.abi	333
		fPKD43-46.1f	GATC1-4-43-43F.abi	528
		fPKD43-46.1r	GATC1-4-43-46R.abi	333
D2573	zystennegativ	fPKD43-46.1f	D73-P43F.abi	714
		fPKD43-46.1r	D73-P46R.abi	555
D2577	zystenpositiv	fPKD43-46.1f	7-43-43F.abi	644
		fPKD43-46.1r	7-43-46R.abi	722
D2580	zystenpositiv	fPKD43-46.1f	2.x80-43F.abi	602
		fPKD43-46.1r	2.x80-46R.abi	654
D2582	zystennegativ	fPKD43-46.1f	D82-P43F.abi	708
		fPKD43-46.1r	D82-P46R.abi	558
D3143	zystennegativ	fPKD43-46.1r	Ni-43-46.1R.abi	600
		fPKD43-46.1r	Ni-43-46.1R.abi	723
D3142	zystenpositiv	fPKD43-46.1f	GATC1-N+43-43F.abi	477
		fPKD43-46.1f	N+43-43F.abi	710
		fPKD43-46.1r	N+43-46R.abi	611

4.5.7 Sequenzierung von Exon 46 des PKD1-Gens bis Exon 40 des TSC2-Gens

Die zystennegativen Probanden D2573, D2582 und D2598 sowie die zystenpositiven Probanden D3142, D2004 und D2577 wurden zunächst mit den PCR-Primern TSC-for und TSC-rev amplifiziert und anschließend mit den gleichen Primer sequenziert (Tabelle 4-6). Keines der etwa 1.800 bp langen Amplifikate war durchgängig sequenzierbar.

Tabelle 4-6: Übersicht der Sequenzen aus dem Genabschnitt von Exon 46 des PKD1-Gens bis Exon 40 des TSC2-Gens

Probe	Befund	Primer	Sample file	Länge (bp)
D2573	zystennegativ	TSC-for	73-TSC-F.abi	594
		TSC-rev	73-TSC-R.abi	636
D2582	zystennegativ	TSC-for	82-TSC-F.abi	557
		TSC-rev	82-TSC-R.abi	583
D2598	zystennegativ	TSC-for	98-TSC-F.abi	486
		TSC-for	98-TSC-F2.abi	387
		TSC-rev	98-TSC-R.abi	278
D2004	zystenpositiv	TSC-for	TSC04-TSCF.abi	706
		TSC-rev	TSC04-TSCR.abi	500
		TSC-rev	GATC1-TSC04-TSCR.abi	451
D2577	zystenpositiv	TSC-for	TSC77-TSCF.abi	728
		TSC-rev	TSC77-TSCR.abi	187
		TSC-rev	GATC1-TSC77-TSCR.abi	208
D3142	zystenpositiv	TSC-for	N+TSC-TSCF.abi	308
		TSC-rev	N+TSC-TSCR.abi	275

4.6 Bestimmung der Splice Sites

Um die Positionen der Splice Sites zu bestimmen, errechnete das Programm Fruitfly Erkennungssequenzen von Donor und Acceptor Splice Sites innerhalb der Sequenzen des felines PKD1-Gens. Außerdem wurde unterstützt durch das Programm DNASIS die bekannte Intron- und Exonsequenzen der PKD1-Gene von Mensch und Hund mit den Sequenzen aus dem PKD1-Gen der Perserkatze verglichen. Als Kontrolle diente die aus der vermutlich kodierenden Region ermittelte Aminosäuresequenz, welche ebenfalls auf Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz des humanen und caninen Polyzystin 1 untersucht wurde. Die ermittelten Splice Sites finden sich im Anhang Kapitel 8.6.

4.6.1 Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 4 bis 6

Aus dem Genabschnitt von Exon 4 bis 6 wurde die „Consensussequenz 4-6“ analysiert. Der überwiegende Teil dieser Sequenz geht auf den Klon E8 zurück, nur Intron 4 stammt aus dem

Klon 4-6/4. Sie ist insgesamt 1.479 Basen lang. Hierbei war zu berücksichtigen, dass der Genbereich von Exon 4 bis 6 des Hundes homolog zu Exon 5 bis 7 des PKD1-Gens des Menschen ist.

Die Erkennungssequenz einer Acceptor Splice Site wurde an Position 510 bis 550 mit der Schnittstelle an Position 530/531 berechnet. Diese Position markiert exakt das 5'-Ende (also den Beginn) des caninen Exon 5. Das Homolog des 5'-Endes des humanen Exon 6 liegt jedoch in der felines Sequenz, beginnend mit Position 822, weiter stromabwärts und entspricht einer weiteren errechneten Acceptor Splice Site an Position 801 bis 841. Diese von einander abweichenden Ergebnisse weisen auf eine mögliche alternative Splice Site zwischen Intron 4 und Exon 5 hin.

Es schließen sich Intron 5 und Exon 6 mit einer Acceptor Splice Site an Position 1.296/1.297 an. An dieser Stelle schlug Fruitfly jedoch keine Erkennungssequenz vor. Diese Splice Site wurde durch Sequenzvergleich festgelegt.

Damit haben mit den Primern fPKD4-6_1f und fPKD4-6_1r amplifizierte PCR-Produkte eine Länge von 1.479 bp. Sie enthalten mit 168 bp nahezu das gesamte Exon 4. Zwischen Intron 4 und Exon 5 könnte es eine alternative Acceptor Splice Site geben. Wird die erste Splice Site genutzt, wäre Intron 4 362 bp und Exon 5 672 bp lang. Wird die zweite Splice Site verwendet, wäre Intron 4 653 bp und Exon 5 381 bp lang. Es folgte Intron 5 mit 94 bp und mit 183 bp das fast vollständige Exon 6.

Die Sequenz der abgeleiteten codierenden Region ergibt sowohl mit der Acceptor Splice Site von Exon 5 an Position 530/531 als auch an Position 821/822 einen korrekten Leserahmen. Die Untersuchung der Aminosäuresequenz des Polyzystin 1 von Hund und Mensch ergab, dass beim Hund tatsächlich die erste Acceptor Splice Site im Intron 4 und beim Menschen die zweite genutzt wird. Würde auch bei der Katze die erste Splice Site verwendet werden, hätte die Aminosäuresequenz dieses Abschnittes im Vergleich zum caninen Polyzystin 1 eine Ähnlichkeit von 87,0 % und zum humanen Polyzystin 1 eine Ähnlichkeit von nur 76,6 %. Anders wäre es bei Verwendung der alternativen zweiten Acceptor Splice Site stromabwärts: Zum Hund läge eine Ähnlichkeit von 80,1 % und zum Menschen von 82,7 % vor. Die Aminosäuresequenzen sind im Anhang (Kapitel 8.7) zu finden. Aufgrund der relativ hohen Sequenzhomologie von 87,0 % zwischen der Aminosäuresequenz von Hund und Katze in dieser Region wird im Folgenden die erste Splice Site (Position 530/531) zwischen Intron 4 und Exon 5 als funktionell angenommen.

4.6.2 Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 27 bis 30

Im Hinblick auf Splice Sites wurde das 884 bp lange Insert des Klonen CA9 untersucht. Der Bereich von Exon 27 bis 30 im caninen PKD1-Gen entspricht beim Menschen dem Abschnitt von Exon 31 bis 34. Der Sequenzvergleich mit dem caninen Exon 27 und dem entsprechenden humanen Exon 31 sowie dem folgenden Intron machen eine Donor Splice Site zwischen Position 157 und 158 der Sequenz wahrscheinlich. Das Programm Fruitfly findet in dieser Region jedoch keine Splice Site. Dennoch wurde diese Position als Exon-Intron-Grenze angenommen.

Die abgeleitete kodierende Region ergibt einen durchgehenden Leserahmen mit einer Sequenz von 206 Aminosäuren. Sie zeigt zur Sequenz des caninen Polyzystins 1 eine Ähnlichkeit von 93,7 % und zum humanen Polyzystin 1 eine Ähnlichkeit von 88,3 %.

4.6.3 Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 36 bis 38

Das PCR-Produkt der Probe D2582 konnte mit 750 Basen fast vollständig sequenziert werden und diente hier zur Analyse der Splice Sites. An seinem 3'-Ende fehlten lediglich die letzten acht Basen des Primers cPKD38R. Vom Vorwärtsprimer bis zum Beginn der bekannten Sequenz fehlten 37 Basen, was durch Sequenzvergleich mit der caninen Sequenz ermittelt wurde. Daher musste das gesamte PCR-Produkt eine Länge von 795 Basen besitzen.

Die abgeleitete kodierende Sequenz ergab einen durchgehenden Leserahmen mit einer Sequenz von 101 Aminosäuren. Die Ähnlichkeit zum homologen Abschnitt des Polyzystin 1 des Hundes lag bei 97,0 % und zum Polyzystin 1 des Menschen bei 94,1 %.

4.6.4 Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 38 bis 40

Für die Analyse der PCR-Produkte aus dem Genbereich von Exon 38 bis Exon 40 fand die Sequenz des PCR-Produktes der Probe D2582 Verwendung.

Die Acceptor Splice Site von Exon 39 befand sich aufgrund des Sequenzvergleichs an Position 711/712. Interessanterweise erkannte Fruitfly hier eine Donor Splice Site anstelle einer Acceptor Splice Site.

Diese abgeleitete kodierende Region ergab einen durchgehenden Leserahmen, deren Aminosäuresequenz homolog zum Polyzystin 1 von Mensch und Hund war. Die relativ geringe Ähnlichkeit von 76,2 % zum Hund und 81,1 % zum Menschen ergab sich dadurch, dass die durch Exon 40 kodierte Sequenz im Gegensatz zu der von Exon 38 und 39 kodierten Sequenz nur stellenweise mit dem caninen und humanen Polyzystin übereinstimmte. Es wurden weitere von Fruitfly angebotenen Splice Sites überprüft, die jedoch keinen durchgehenden Leserahmen ergaben.

4.6.5 Exon-Intron-Struktur des PKD1-Gens von Exon 43 bis 46

Zur Analyse des Genabschnitts von Exon 43 bis 46 wurde die Sequenz der Probe D2580 verwendet. Es wurde zum einen direkt als PCR-Produkt sequenziert und zum anderen als Insert des Klonen 3+, beginnend mit dem Primer fPKD43-46.1f sequenziert. In der aus diesen Reaktionen zusammengestellten Sequenz von 1.175 Basen Länge konnten Splice Sites errechnet werden. Die abgeleitete kodierende Region ergab einen durchgehenden korrekten Leserahmen. Die daraus resultierende Aminosäuresequenz hat zum caninen Polyzystin 1 eine Ähnlichkeit von 93,6 % und zum humanen Polyzystin 1 eine Ähnlichkeit von 84,6 %.

4.6.6 Der Übergang des PKD1-Gens zum TSC2-Gen

Der Übergang zwischen dem feline PKD1-Gen und dem vermuteten TSC2-Gen wurde mit dem Primerpaar TSC-F und TSC-R amplifiziert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte von etwa 1.800 bp erfolgte mit den gleichen Primern, war aber aufgrund der Länge nicht durchgängig möglich. Die Sequenzierung der Probe D2004 mit dem Primer TSC-F erzielte mit 733 Basen Sequenzinformation das beste Ergebnis, so dass diese Sequenz für die Überprüfung der kodierenden Region geeignet war. Verglichen mit Exon 46 des Hundes bzw. Exon 50 des Menschen befand sich die Donor Splice Site dieses Exons an Position 395 der Vergleichsequenz. Fruitfly schlug eine Donor Splice Site jedoch erst weit stromabwärts vor. Die Überprüfung der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab einen durchgehenden Leserahmen, der mit einem Stopcodon (TAG) von Position 393 bis 395 endete. Die daraus ablesbare Aminosäuresequenz war sowohl zum humanen als auch zum caninen PKD1-Gen homolog mit einer Ähnlichkeit von 73,8 bzw. 82,6 %. Damit konnte das 3'-Ende des feline PKD1-Gens entsprechend zum humanen und caninen Homolog bestätigt werden. Ein mögliches Polyadenylierungssignal (TTTATT) wurde in dieser Sequenz weiter stromabwärts gefunden.

Da der Primer TSC-F stromaufwärts des Primers fPKD43-46.1r lokalisiert war, konnte die gesamte Sequenz von Exon 46 einschließlich der Homologie zum caninen und humanen PKD1-Gen ermittelt werden.

Für die Analyse des 3'-Endes der PCR-Produkte wurde das mit dem Rückwärtsprimer TSC-R sequenzierte Amplifikat der Probe D2573 verwendet. Es ist bekannt, dass das TSC2-Gen beim Menschen in Tail-to-Tail-Orientierung zum PKD1-Gen liegt. Der Homologievergleich zwischen der feline Sequenz und Exon 40 des humanen TSC2-Gens wies auf das 3'-Ende des Exons an Position 108 hin. Die Überprüfung der Aminosäuresequenz dieser abgeleiteten kodierenden Region ergab einen durchgehenden Leserahmen, der mit einem Stopcodon von Position 106 bis 108 endete. Die daraus resultierende Aminosäuresequenz war zur Sequenz des humanen TSC2-Genprodukts Tuberin homolog und besaß eine Ähnlichkeit von 73,5 %.

Damit war mit dieser PCR sowohl das 3'-Ende des PKD1-Gens als auch das 3'-Ende eines zum TSC2-Gen homologen Gens amplifizierbar. Dieses Homolog lag zudem in Tail-to-Tail-Orientierung zum feline PKD1-Gen. Ein Polyadenylierungssignal fand sich an Position 222 bis 227 (TTTATT).

4.6.7 Übersicht der Sequenzanalyse des PKD1-Gens

Insgesamt lagen 6.401 Basen Sequenzinformation des PKD1-Gens einschließlich eines Abschnittes der PKD1-mRNS der Katze vor.

Einige Sequenzen wurden an das National Center for Biotechnology Information übermittelt. Die Sequenz des Klonen CA9 mit Exon 27 bis 30 ist unter der Accession-Nummern EU443853 verfügbar. Der Sequenzabschnitt von Exon 36 bis Exon 46 der Probe D2582 wurde unter der Accession-Nummer EU443854 zusammengefasst. Die Sequenz der PKD1-mRNS von Exon 29

bis 37 hat die Accession-Nummer EU555285 erhalten. Exon 40 des putativen felines TSC2-Gens findet sich unter der Accession-Nummer EU443852.

4.138 Basen wurden Exons und 2.263 Basen Introns zugeordnet. Die Ähnlichkeit zwischen dem PKD1-Gen von Hund und Katze lag im Bereich der Exons zwischen 71,0 % im Exon 40 und 96,8 % im Exon 27. Im Vergleich der Gene von Katze und Mensch war die Ähnlichkeit im Exon 40 mit 72,2 % am geringsten. Die größte Ähnlichkeit fand sich mit 91,2 % im Exon 39.

Im Intronbereich lag die Ähnlichkeit im Intron 45 mit 95,8 % zwischen Katze und Hund sowie mit 88,4 % zwischen Katze und Mensch am höchsten. Intron 38 besaß mit 56,2 % die geringste Ähnlichkeit bei Vergleich von Katze und Hund. Intron 4 wies mit 46,7 % die geringste Ähnlichkeit zwischen Katze und Mensch auf.

Zusätzlich wurde der Gehalt an Cytosin- und Guaninbasen (G/C-Gehalt) der einzelnen Genabschnitte berechnet. In den kodierenden Regionen der Exons wurde ein sehr hoher G/C-Gehalt ermittelt. Er lag bei durchschnittlich 67 %. Im Exon 32 fand sich mit 38,8 % der geringste Wert. Exon 43 wies mit 75,6 % den höchsten G/C-Gehalt auf. In den Introns war der G/C-Gehalt mit durchschnittlich 72,5 % sogar noch höher. Er reichte von 60,0 % im Intron 39 bis 81,1 % im Intron 43.

4.6.8 Der Klon cPKD29-37-2

Das 1.029 bp lange Insert des Klones cPKD29-37-2 wurde vollständig sequenziert. Dieser Klon enthielt mittels PCR amplifizierte Fragmente von mRNS, die aus dem Ovar einer Hauskatze isoliert worden war. Durch Homologievergleich konnten die ersten 44 Basen des Inserts Exon 29 des PKD1-Gens zugeordnet werden. Es folgten das 127 Basen lange Exon 30, das 117 Basen lange Exon 31 sowie Exon 32 und 33 mit 49 bzw. 173 Basen. Exon 34, 35 und 36 hatten eine Länge von 94, 119 und 203 Basen. Diese Sequenz endet mit den ersten 103 Basen von Exon 37.

4.7 Sequenzvarianten des felines PKD1-Gens und mögliche Auswirkung auf das Protein

Die Beurteilung der Konsequenz einer Mutation auf das Genprodukt hing von der Lage der Mutation in einem Exon oder Intron ab. Die Mutation wurde als Sequenzvariante ohne funktionelle Auswirkung betrachtet, wenn es sich um eine Sequenzabweichung in einem Intron handelte, die keine Splice Site veränderte. Mutationen mit Splice Site-Beeinflussung wurden als potentielle Auslöser einer Proteinveränderung betrachtet. Unter den Sequenzvarianten im Exon gibt es stille, konservative, Missense und Nonsense Mutationen sowie Leseraster-Mutationen/Frame Shift Mutation (Knippers, 2001). Um eine stille Mutation handelte es sich, wenn ein Basenaustausch nur zu einem synonymen Codon und daher zu keinem Aminosäureaustausch führte. Als konservative Mutationen wurden solche betrachtet, die zwar für eine an-

dere Aminosäure kodierten, sich in Ladung und Polarität aber nicht wesentlich von der ursprünglichen Aminosäure unterschieden. Die Funktion des Proteins muss hierdurch nicht beeinflusst werden, es sei denn, der Austausch findet im aktiven Zentrum des Proteins statt. Missense Mutationen führen zum Austausch von Aminosäuren, die sich in Ladung und/oder Polarität unterscheiden. Die Folgen einer Aminosäuresubstitution hängen immer von der Art der Aminosäuren und ihrer Lage im Protein ab. Bei konservativen und Missense Mutationen wäre eine Konsequenz für das Genprodukt also möglich, wenn auch allein aufgrund der Basen- und Aminosäuresequenz nicht überprüfbar. Nonsense Mutationen sind durch die Synthese unvollständiger Proteine gekennzeichnet, da durch den Nukleotidaustausch das Sinn-Codon in ein Stopcodon umgewandelt wird. Die Auswirkung auf die Proteinfunktion wäre also gravierend und könnte bis zum vollständigen Funktionsverlust führen (Knippers, 2001).

Die Sequenzen wurden im Wesentlichen mit Hilfe des Programms Mutation Surveyor™ analysiert. Tabelle 4-7 und Tabelle 4-8 mit Übersichten der identifizierten Mutationen entstammen den „Mutation Reports“ dieses Programms.

4.7.1 Sequenzvarianten von Exon 4 bis 6

Aus dem Genbereich von Exon 4 bis 6 wurden die in Kapitel 4.5.1 aufgelisteten Sequenzen untersucht. Insgesamt fanden sich in diesem Abschnitt 14 Mutationen. Allein in den Klonen der Probe D3143 waren bereits zwölf von vierzehn Mutationen identifizierbar. Eine dieser Mutationen war eine Deletion von 139 Basen, die in Klon „Nineg 4-6-E8“, „-E12“ und auch in der Sequenz „240DR“ der Probe D2573 bestand. Diese Deletion wird in Kapitel 4.9 genauer behandelt.

Klon „Nineg 4-6-E8“ entsprach an allen übrigen Positionen der Vergleichsequenz. Klon „Nineg 4-6-E9“ wies acht Mutationen auf (Nr. 1, 2, 4, 7, 8, 11, 13 und 14), die sich in allen anderen Sequenzen einschließlich der beiden anderen Klone der Probe D3143 nicht fanden. In Klon „Nineg 4-6-E12“ wurden zwei Mutationen gefunden (Nr. 3 und 12), die es in den anderen Sequenzen nicht gab. Nur die Mutation 5 tauchte in Klon „Nineg 4-6-E9“ und „-E12“ auf.

Die Verteilung der Mutationen erweckte den Eindruck, dass es sich hier um drei verschiedene Allele handelte. Da die Inserte jedoch aus einer Probe stammten, ist das zunächst einmal nicht möglich, es sei denn, eines dieser „Allele“ wurde aus einem Pseudogen des PKD1-Gens amplifiziert. Das Vorliegen eines Pseudogens ist bei der Katze jedoch nicht zu erwarten (Lyons et al., 2004). Lässt man Mutation 5 außer Acht, da sie nicht wie ein gewöhnliches Allel reproduzierbar war (Kapitel 4.9), entspricht Klon „Nineg 4-6-E8“ der Vergleichsequenz. Daher wurde vermutet, dass es sich bei dieser Sequenz um ein tatsächliches Allel handelte. Die Klone „Nineg 4-6-E9“ und „-E12“ wiesen beide Mutation 10 auf. Daher wurde eine Sequenz, die diese Variante aufwies, als zweites Allel betrachtet. Mutation 1-4, 7, 8 und 11-14 kommen nur in einem Klon vor und können keinem Allel mit Sicherheit zugeordnet werden. Möglicherweise handelte es sich hier um Polymeraselesefehler und damit Artefakte. Dies war insbesondere für die Mutation 11 in Klon „Nineg 4-6-E12“ anzunehmen. Diese Deletion befand sich im Exon 5 und wür-

de zur Verschiebung des Leserasters und damit einem nicht funktionalen Protein mit Ausbildung von Nierenzysten führen. Der Spender der Probe D3143 besaß jedoch keinen PKD-Phänotyp. Klon „4-6/4“ fiel mit einer Mutation im Intron 4 auf. Auch hier war sowohl ein Polymeraselesefehler als auch das Vorliegen eines weiteren Allels möglich. Aufgrund der schlechten Sequenzierbarkeit von PCR-Produkten aus diesem Genabschnitt konnten Sequenzen von PCR-Produkten der Probanden D2594 und D3143 nicht zum Vergleich herangezogen werden. Lediglich ein heterozygot vorkommender Einzelbasenaustausch (Mutation Nr. 6) im Intron 4 der Probe D2600 war mit Sicherheit als Sequenzvariante identifizierbar.

Letztendlich konnte also in diesem Genabschnitt Mutation 6 und Mutation 10, die eine Transversion und eine Transition im Intron 4 darstellen, als natürlich vorkommende Sequenzvarianten im PKD1-Gen der Perserkatzen interpretiert werden. Der von Exon 4 bis 6 kodierte Teil des Proteins wurde mit dem humanen Polyzystin 1 verglichen. Die ersten rund 50 Aminosäuren gehörten zu einer der leuzinreichen Wiederholungen (LRR) des Polyzystin 1. Es folgte eine Aminosäuresequenz, die auch in Hefezellen gefunden wurde und dort eine Rolle in der Stressantwort und Integrität spielen soll, der WSC-Domäne. Die letzten N-terminalen 40 Aminosäuren des abgeleiteten felines Proteins aus diesem Abschnitt waren homolog zu einem Bereich, der Lektinen vom C-Typ gleicht (NCBI-Protein, Accession EAW85554). Da in der vorliegenden Untersuchung aber keine Mutationen angesprochen werden konnten, die die Aminosäuresequenz veränderten, bleiben diese funktionellen Proteinabschnitte wahrscheinlich unbeeinflusst.

Tabelle 4-7: Übersicht der Sequenzvarianten im Genbereich von Exon 4 bis 6

Vergleichsequenz: „Consensus 4-6“

Probe	Sample File	Start	End	Size	Mut#	Mutation 1 Exon 4	Mutation 2 Exon 4	Mutation 3 Intron 4	Mutation 4 Intron 4	Mutation 5 Intron 4
D2577	57-4-6.1F.abi	284	368	85	0					
	57-4-6.1R.abi	1338	1438	101	0					
D2573	73-4-6-Sr.abi	1105	1304	200	0					n.a.
D2573	240-DR.abi	166	477	312	1					247_385del139bp
D2594	D2594Klon4-6.4-M13-FP.abi	1	435	435	1					
	D2594Klon4-6.4-M13-RP.abi	1003	1472	470	0			n.a.		
D2600	00-4-6.1F.abi	123	370	248	1					
	00-4-6.1R.abi	998	1413	416	0					
D3143	KlonE12-M13-FP.abi	6	815	810	3		186T>C			247_385del139bp
	KlonE12-M13-RP.abi	757	1446	690	1		n.a.	n.a.		n.a.
D3143	KlonE8-4-61300-M13-FP.abi	6	576	571	1					247_385del139bp
	KlonE8-4-61300-M13-RP.abi	899	1446	548	0		n.a.	n.a.		n.a.
	KlonE8-4-61300-ZF.abi	461	666	206	0		n.a.	n.a.		n.a.
	KlonE8-4-61300-ZR.abi	392	1073	682	0		n.a.	n.a.		n.a.
D3143	KlonE9-M13-FP.abi	1	576	570	6	29T>C	46T>C		202T>C	
	KlonE9 M13 RP	673	1450	777	3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Legende und Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Tabelle 4-7 (Fortsetzung)

Probe	Mutation 6	Mutation 7	Mutation 8	Mutation 9	Mutation 10	Mutation 11	Mutation 12	Mutation 13	Mutation 14
D2577	Intron 4	Intron 4	Intron 4	Intron 4	Intron 4	Exon 5 (Hd), Intron 4 (Msch)	Exon 5	Exon 5	Exon 6
D2573									
D2573									
D2594				388delG n.a.					
D2600	304G>GC n.a.								
D3143	n.a.	n.a.			445A>G n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
D3143	n.a.	n.a.			n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
D3143	n.a.	n.a.			n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
D3143	359G>A n.a.	377_382del6bp n.a.			445A>G n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
D3143						751delC	942T>C	1355C>T	

Legende: Mut#, Anzahl der in dieser Sequenz gefundenen Mutationen; n.a., nicht analysierbarer Sequenzabschnitt; Zahl, Position der gefundenen Mutation in der Vergleichsequenz; T>C, Beispiel eines homozygoten Basenaustausches; del, Deletion; Hd, Hund; Msch, Mensch

Tabelle 4-8: Interpretation der Mutationen im Exon 4 bis 6 des PKD1-Gens

Mutation	Lage	Art der Mutation	Erläuterung/Konsequenz
1	Exon 4	Transition T>C	Stille Mutation, Synonyme kodieren Asparaginsäure (Polymeraselesefehler?)
2	Exon 4	Transition T>C	Konservative Mutation, Austausch von Leuzin mit Prolin, beide neutral, unpolar (Polymeraselesefehler?)
3	Intron 4	Transition T>C	Keine (Polymeraselesefehler?)
4	Intron 4	Transition T>C	Keine (Polymeraselesefehler?)
5	Intron 4	Deletion von 139 Basen	angenommene alternative Splice Site wäre nicht vorhanden
6	Intron 4	Transversion G>C	Keine
7	Intron 4	Transition G>A	Keine (Polymeraselesefehler?)
8	Intron 4	Deletion von sechs Basen	Keine (Polymeraselesefehler?)
9	Intron 4	Deletion einer Base	Keine (Polymeraselesefehler?)
10	Intron 4	Transition A>G	Keine
11	Exon 5 (Hd), Intron 4 (Misch)	Deletion einer Base	Nonsense Mutation, Leserasterverschiebung (Polymeraselesefehler?)
12	Exon 5	Transversion T>G	Stille Mutation an dritter Position des Triplets, Synonyme kodieren beide Serin
13	Exon 5	Transition T>C	Konservative Mutation, Austausch von Valin mit Alanin, beide neutral, unpolar (Polymeraselesefehler?)
14	Exon 6	Transition C>T	Stille Mutation, Synonyme kodieren beide Tyrosin (Polymeraselesefehler?)

4.7.2 Sequenzvarianten von Exon 27 bis 30

Aus dem Genabschnitt des PKD1-Gens von Exon 27 bis 30 wurden die in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Sequenzen analysiert. Es handelte sich um Amplifikate von zwei zystennegativen und fünf zystenpositiven Tieren. Es fanden sich insgesamt vier Mutationen. Die in dieser Arbeit wichtigste Mutation betrifft Base 142 im Exon 29. In Bezug auf die verwendete Vergleichsequenz der Probe D2573 ist sie als C>A-Transversion an Position 548 zu finden. Das mutierte Allel wird durch die Base Adenin charakterisiert, wodurch in der Aminosäuresequenz statt des Cystein-kodierenden Triplets TGC das Stopcodon TGA generiert wird. Diese Mutation hat also vermutlich einen frühzeitigen Kettenabbruch zu Folge. Im Protein Polyzystin 1 liegt die Mutation hinter der PLAT/LH2-Domäne und vor den elf transmembranösen Domänen. Der transmembranöse und intrazytoplasmatischen Teil des Proteins würde also aller Wahrscheinlichkeit nicht mehr translatiert. Drei von vier zystenpositiven Tieren waren heterozygot für die C>A-Transversion. Die vierte zystenpositive Katze D2577 besaß diese Mutation jedoch nicht. Ein Screening der zur Verfügung stehenden Probanden im Hinblick auf diese Mutation wurde mit einer RFLP-Analyse durchgeführt (Kapitel 4.8).

Die beiden zystennegativen Tiere D2582 und D2573 wiesen beide heterozygot eine Missense Mutation im Exon 27 auf. Das entsprechende Triplett ist im humanen Polyzystin 1-Homolog Bestandteil der PLAT/LH2- Domäne. Ein Einfluss der Missense Mutation mit Austausch von Tryptophan gegen Arginin auf die Proteinkonformation und -funktion wäre denkbar. Da es sich jedoch um zystennegative Tiere handelt, besteht kein Zusammenhang mit der PKD.

Außerdem fand sich bei zwei der vier zystenpositiven Tiere ein heterozygoter Einzelbasenaustausch im Intron 28 und bei einer zystenpositiven Katze eine heterozygote Deletion im Intron 29. Diese Mutationen hatten aller Wahrscheinlichkeit nach aber keine Auswirkungen auf das Protein. Eine Übersicht der Mutationen im Genabschnitt von Exon 27 bis 30 geben die Tabelle 4-9 und Tabelle 4-10.

Tabelle 4-9: Übersicht der Mutationen im Genabschnitt von Exon 27 bis 30

Die Ergebnisse der Tiere mit PKD-Phänotyp sind grau unterlegt.

Vergleichsequenz: D2573-27-30 der Probe D2573

Probe	Sample File	Start	End	Size	Mut#	Mutation 1 Exon 27	Mutation 2 Intron 28	Mutation 3 Exon 29	Mutation 4 Intron 29
D2573	73-27-27F.abi	1	630	630	1	82T>AT			
	73-27-30R1.abi	195	728	551	0	n.a.			
D2582	82-27-P27.abi	16	404	390	1	82T>AT			
	82-27-P30.abi	527	727	199	0	n.a.			
	82B-P27.abi	6	596	592	1	82T>AT			
	82B-P30.abi	296	729	449	0	n.a.			
D2004	04-27F.abi	6	586	581	1			548C>AC	
	04-31R1.abi	200	744	546	1			548C>AC	
D2577	2777-27F.abi	6	715	710	1		373A>AG		
	77-27-P27.abi	33	255	223	0	n.a.			
	2777-31R1.abi	29	747	719	1		373A>AG		
D2590	WdhD2590-27F.abi	6	714	708	1			548C>AC	
	WdhD2590-30R1.abi	33	745	713	1			548C>AC	
D2631	WdhD2631-27F.abi	6	719	714	1			548C>AC	
	WdhD2631-30R1.abi	181	747	566	2	n.a.		548C>AC	
D3142	N+-27F.abi	6	593	1-F	2		373A>AG	548C>AC	n.a.
	27N+-31R1.abi	669	745	2-R	0		n.a.	n.a.	n.a.
	GATC1N+31R1.abi	638	745	2-R	1		n.a.	n.a.	626_636het_delGCCCCAGGGGG
	GATC2N+31R1.abi	638	745	2-R	1		n.a.	n.a.	626_636het_delGCCCCAGGGGG

Legende: Mut#, Anzahl der in dieser Sequenz gefundenen Mutationen; n.a., nicht analysierbarer Sequenzabschnitt; Zahl, Position der gefundenen Mutation in der Vergleichsequenz; T>C, Beispiel eines homozygoten Basenaustausches; C>AT, Beispiel eines heterozygoten Basenaustausches; het, heterozygote Mutation; del, Deletion

Tabelle 4-10: Interpretation der Mutationen im Exon 27 bis 30 des PKD1-Gens

Mutation	Lage	Art der Mutation	Erläuterung/Konsequenz
1	Exon 27	Transversion T>A	Missense Mutation, an erster Position des Triplets; TGG>AGG; Austausch von Tryptophan mit Arginin (neutral, unpolar > basisch, polar)
2	Intron 28	Transition A>G	Keine
3	Exon 29	Transversion C>A	Nonsense Mutation, an dritter Position des Triplets, TGC>TGA, statt Cystein wird ein Stopcodon kodiert, vorzeitiger Kettenabbruch, Truncated protein
4	Intron 29	Deletion von elf Basen	Keine

4.7.3 Sequenzvarianten von Exon 36 bis 38

Der Genabschnitt von Exon 36 bis 38 wurde anhand der in Kapitel 4.5.3 beschriebenen Sequenzen von drei zystenpositiven und zwei zystennegativen Probanden untersucht. Die Vergleichsequenz des Programms Mutation Surveyor™ stammt aus den Sequenzen der zystennegativen Probe D2582. In der Probe D2573 fanden sich keine heterozygoten Stellen. Ebenso war die Probe des zystenpositiven Tieres D2004 in diesem Bereich vollständig homozygot und entsprach exakt der Vergleichsequenz. In den übrigen drei Proben fanden sich insgesamt fünf Transitionen. Vier davon liegen in Introns und eine im Exon 37. Keine dieser Mutationen verändert das angenommene Genprodukt. Alle fünf Mutationen traten heterozygot in den Sequenzen der zystenpositiven Tieres D2577 und D3142 auf. Eine der fünf Mutationen, Mutation 2, liegt ebenfalls heterozygot in Probe D2582 vor. Die Basenkombination T/T/A/T/A an den entsprechenden Positionen scheint also das Wildtypallel zu sein, welches bei allen Tieren beobachtet werden kann. Homozygot findet man es sowohl bei zystenpositiven als auch –negativen Perserkatzen. Zwei der drei untersuchten zystenpositiven Tiere besitzen zusätzlich das Allel C/C/G/C/G. Ein drittes Allel (T/C/A/T/A) wurde bei der zystennegativen Katze D2582 beobachtet. Alle gefundenen Mutationen sind in Tabelle 4-11 und Tabelle 4-12 wiedergegeben.

4.7.4 Sequenzvarianten von Exon 38 bis 40

Für die Analyse der PCR-Produkte aus dem Genbereich von Exon 38 bis Exon 40 diente die Sequenz der Probe D2582 als Vergleichsequenz. Acht der untersuchten 16 Katzen waren zystenpositiv und acht zystennegativ. Die Sequenzen von elf Katzen inklusive der Vergleichsequenz des Probanden D2582 waren in dem untersuchten Abschnitt völlig identisch und homozygot. 15 identifizierte Mutationen konzentrierten sich auf die übrigen fünf Probanden. Hierunter befanden sich die zystennegativen Probanden D2573 und D2039 mit zwei und fünf Mutationen sowie die zystenpositiven Tiere D2577 und D3142 mit jeweils acht und D1989 mit fünf

Mutationen. In den Exons gab es vier Transversionen und eine Transition. Hierbei handelt es sich um zwei stille Mutationen, eine konservative Mutation sowie drei Missense Mutationen. Sie befinden sich alle im intrazytoplasmatischen Teil des Polyzystin 1. In der Literatur gibt es keine detaillierten Angaben über intrazytoplasmatische Domänen mit definierter Funktion. Daher kann keine weitere Aussage über mögliche Auswirkungen der Mutationen getroffen werden.

In den Introns wurden eine Transversion, vier Transitionen, vier Deletionen und eine Insertion identifiziert. Eine Deletion von zwölf Basen im Intron 39 führte zur Änderung der Erkennungssequenz einer möglichen alternativen Acceptor Splice Site. Würde diese Splice Site allerdings verwendet, entstünde kein durchgehender Leserahmen. Zudem wäre das folgende Intron sehr kurz und enthielte keine für den Splice-Vorgang notwendige Branch Site (Erkennungssequenz YNCNRAY). Diese Splice Site ist daher aller Wahrscheinlichkeit nach nicht funktional und die Deletion hat keinerlei Einfluss auf das Genprodukt.

Die Mutationen sind in Tabelle 4-13 und Tabelle 4-14 aufgelistet.

Tabelle 4-11: Übersicht der Mutationen im Genabschnitt von Exon 36 bis 38

Die Ergebnisse der Tiere mit PKD-Phänotyp sind grau unterlegt.

Vergleichsequenz: "36-38ref_F_Synthesis" der Probe D2582

Probe	Sample File	Start	End	Size	Mut#	Mutation 1 Exon 37	Mutation 2 Intron 37	Mutation 3 Intron 37	Mutation 4 Intron 37	Mutation 5 Intron 37
D2573	36-73-36F.abi	49	728	680	0					
	36-73-38R.abi	46	729	684	0					
D2582	36-82-36F.abi	42	768	687	1		332T>CT			
	36-82-38R.abi	9	729	720	1		332T>CT			
D2004	36-04-F.abi	109	729	621	0					
	36-04-38-R2.abi	42	742	701	0					
D2577	36-77-F.abi	36	582	547	5	300T>CT	332T>CT	390A>AG	426T>CT	484A>AG
	36-77-R.abi	253	729	477	3	300T>CT	n.a.	390A>AG	n.a.	484A>AG
	GATC1-77-36F.abi	36	582	547	5	300T>CT	332T>CT	390A>AG	426T>CT	484A>AG
	GATC1-77-38R.abi	360	716	357	1	n.a.	n.a.	390A>AG	n.a.	n.a.
D3142	36-N+-F.abi	44	708	665	5	300T>CT	332T>CT	390A>AG	426T>CT	484A>AG
	36-N+-R.abi	148	729	582	5	300T>CT	332T>CT	390A>AG	426T>CT	484A>AG

Legende: Mut#, Anzahl der in dieser Sequenz gefundenen Mutationen; n.a., nicht analysierbarer Sequenzabschnitt; Zahl, Position der gefundenen Mutation in der Vergleichsequenz; T>CT, Beispiel eines heterozygoten Basenaustausches; het, heterozygote Mutation; del, Deletion

Tabelle 4-12: Interpretation der Mutationen im Exon 36 bis 38

Mutation	Lage	Art der Mutation	Erläuterung/Konsequenz
1	Exon 37	Transition T>C	Stille Mutation, an dritter Position des Triplets, Synonyme CAT und CAC kodieren beide Histidin
2	Intron 37	Transition T>C	Keine
3	Intron 37	Transition A>G	Keine
4	Intron 37	Transition T>C	Keine; die errechnete Erkennungssequenz einer wahrscheinlich nicht genutzten Splice Site wird geringfügig verändert
5	Intron 37	Transition A>G	Keine

Tabelle 4-13: Übersicht der Mutationen im Genabschnitt von Exon 38 bis 40.

Die Ergebnisse der Tiere mit PKD-Phänotyp sind grau unterlegt. Die Proben D1990, D2000, D2004, D2042, D2050, D2055, D2057, D2064, D2076 und D2086 waren im untersuchten Abschnitt völlig identisch und entsprechen der Vergleichsequenz. Sie sind nicht in die Tabelle enthalten. Vergleichsequenz: 82-38-40ref der Probe D2582

Probe	Sample File	Start	End	Size	Quality	Mut#	Mutation 1 Exon 38	Mutation 2 Exon 38	Mutation 3 Intron 38	Mutation 4 Intron 38
D2573	73-38-38F.abi	14	720	707	18	1				136_137insA
	73-38-40R.abi	428	1065	638	13	1				n.a.
D2582	82-38F.abi	6	729	724	40	0				
	82-40R.abi	397	1108	712	64	0				n.a.
D2577	77-38F.abi	6	479	474	45	7	73G>CG	134G>CG		
	77-40R.abi	883	1108	226	30	1	n.a.	n.a.		
D3142	N+38-38F.abi	6	479	474	52	5	55G>CG			
	N+38-40R.abi	699	1116	418	62	3	n.a.			
	GATC1-N+38-38F.abi	11	479	469	45	4				
	GATC1-N+38-40R.abi	699	1116	418	57	2				
D2039	39-38F.abi	13	479	467	41	4				
	39-40R.abi	883/	1108/	226/	41/	1				
D1989	89-38F.abi	6	479	474	46	4				
	89-40R.abi	883	1110	228	36	1				

Legende am Ende der Tabelle, Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Tabelle 4-13 (Fortsetzung)

Probe	Mutation 5		Mutation 6		Mutation 7		Mutation 8		Mutation 9		Mutation 10		Mutation 11	
	Mutation 38	Intron 38	Mutation 38	Intron 38	Mutation 38	Intron 38	Mutation 38	Intron 38	Mutation 38	Intron 38	Mutation 38	Intron 38	Mutation 38	Intron 38
D2573														
D 2582														
D 2577	264C>CT n.a.	270C>CT n.a.	274A>AG n.a.	304delC n.a.			483_485het_delATA n.a.							
D3142	264C>CT n.a.	270C>CT n.a.	452A>AG n.a.				483_486het_delATAA n.a.					695_698het_delTCTG n.a.		
D2039	264C>CT n.a.	270C>CT n.a.	274A>AG n.a.				483_486het_delATAA n.a.							
D1989	264C>CT n.a.	270C>CT n.a.	274A>AG n.a.				483_486het_delATAA n.a.							

Legende am Ende der Tabelle; Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Tabelle 4-13 (Fortsetzung)

Probe	Mutation 12 Exon 39	Mutation 13 Intron 39	Mutation 14 Exon 40	Mutation 15 Exon 40
D2573			n.a. 1042A>AT\$29	
D2582				
D 2577		n.a. 867_878het_de CCCAAAGAGACA		
D3142	n.a. 746C>CT n.a. 746C>CT			n.a. 1070C>CG
D2039			867_878het_de CCCAAAGAGACA	
D1989			867_878het_de CCCAAAGAGACA	

Legende: Mut#, Anzahl der in dieser Sequenz gefundenen Mutationen; n.a., nicht analysierbarer Sequenzabschnitt; Zahl, Position der gefundenen Mutation in der Vergleichsequenz; T>CT, Beispiel eines heterozygoten Basenaustausches; het, heterozygote Mutation; del, Deletion; ins, Insertion

Tabelle 4-14: Interpretation der Mutationen im Exon 38 bis 40

Mutation	Lage	Art der Mutation	Erläuterung/Konsequenz
1	Exon 38	Transversion G>C	Missense Mutation an erster Position des Triplets, GGC>CGC, Austausch von Glyzin (neutral, unpolar) zu Arginin (basisch, polar)
2	Exon 38	Transversion G>C	Konservative Mutation an erster Position des Triplets, GCC>CCC, Austausch von Alanin zu Prolin, beide neutral, unpolar
3	Intron 38	Transversion G>C	Keine
4	Intron 38	Insertion einer Base	Keine
5	Intron 38	Transition C>T	Keine
6	Intron 38	Transition C>T	Keine
7	Intron 38	Transition A>G	Keine
8	Intron 38	Deletion einer Base	Keine
9	Intron 38	Transition A>G	Keine
10	Intron 38	Deletion von drei bzw. 4 Basen	Keine
11	Intron 38	Deletion von vier Basen	Keine
12	Exon 39	Transition C>T	Stille Mutation an erster Position des Triplets, Synonyme CTG und TTG kodieren Leuzin
13	Intron 39	Deletion von zwölf Basen	Erkennungssequenz einer vermutlich ungenutzten Splice Site betroffen
14	Exon 40	Transversion A>T	Missense Mutation, an zweiter Position des Triplets, GAC>GTC, Austausch von Asparaginsäure (sauer, polar) zu Valin (neutral, unpolar)
15	Exon 40	Transversion C>G	Missense Mutation, an dritter Position des Triplets, TGC>TGG, Austausch von Cystein (neutral, polar) zu Tryptophan (neutral, unpolar)

4.7.5 Sequenzvarianten von Exon 43 bis 46

Im Genabschnitt von Exon 43 bis 46 fanden sich bei drei zystennegativen und vier zystenpositiven Perserkatzen insgesamt elf Mutationen, allesamt Einzelbasenaustausche.

In Exonregionen befanden sich ausschließlich Transitionen (Tabelle 4-16). Es handelte sich um sechs stille Mutationen (Nr. 1, 2, 4-6 und 11) und eine Missense Mutation (Nr. 10). Die Missense Mutation würde einen Aminosäureaustausch im intrazytoplasmatisch gelegenen Teil des Polyzystin 1 verursachen.

Vier Mutationen, eine Transition und drei Transversionen, lagen in Intronregionen. Keine dieser vier veränderte eine Splice Site.

Sieben Mutationen (Nr. 1, 3-6 und 12) fanden sich sowohl bei zystennegativen als auch -positiven Tieren. Die Mutationen 2 und 7-10 kamen dagegen ausschließlich bei zystenpositiven Tieren vor. Allerdings fanden sich die Mutationen 2, 7, 8 und 9 jeweils nur bei einer der vier zystenpositiven Katzen. Zudem handelte es sich um eine stille Mutationen und Mutationen im Intron 45, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Sequenzvariationen zu keiner Beeinflussung des Proteins führten. Mutation Nr. 11, eine Missense Mutation, bestand in zwei von den vier zystenpositiven Tieren. Ob sie eine Auswirkung auf den Phänotyp hatte, ist nicht feststellbar. Die beiden betroffenen Tiere zeigten beide multiple Nierenzysten. Doch auch die Katze D2577, die Mutation 10 nicht besaß, wies multiple Nierenzysten und zusätzlich sogar Leberzysten auf.

Die Mutationen dieses Abschnittes sind auch in Tabelle 4-15 und Tabelle 4-16 zu finden.

Tabelle 4-15: Übersicht der Mutationen im Genabschnitt von Exon 43 bis 46

Die Ergebnisse der Tiere mit PKD-Phänotyp sind grau unterlegt.

Vergleichssequenz: 82-43-46 der Probe D2582

Probe	Sample File	Start	End	Size	Mut#	Mutation 1 Exon 43	Mutation 2 Exon 43	Mutation 3 Intron 43	Mutation 4 Exon 45
D2573	D73-P43F.abi	6	719	714	2	17A>G		255C>T	
	D73-P46R.abi	568	1122	555	2	n.a.		n.a.	
D2582	D82-P43F.abi	9	717	708	0				
	D82-P46R.abi	564	1121	558	0				
D3143	PCR-Seq43-46-1f.abi	1	599	600				255C>CT	746T>CT
	Ni-43-46.1R.abi	397	1117	723				n.a.	746T>CT
D2004	4-43-43F.abi	19	723	705	1			255C>T	
	4-43-46R.abi	787	1119	333	3			n.a.	
	GATC1-4-43-43F.abi	19	546	528	1			255C>T	
	GATC1-4-43-46R.abi	787	1119	333	3			n.a.	
D2577	7-43-43F.abi	9	652	644	3	17A>AG	45C>CT	255C>CT	
	7-43-46R.abi	401	1122	722	0	n.a.	n.a.	n.a.	
D2580	2.x80-43F.abi	6	607	602	2	17A>G		255C>T	n.a.
	2.x80-46R.abi	428	1081	654	2	n.a.		n.a.	746T>CT
D3142	GATC1-N+43-43F.abi	9	485	477	1	17A>AG			
	N+43-43F.abi	6	715	710	2	17A>AG		255C>CT	
	N+43-46R.abi	512	1122	611	4	n.a.		n.a.	

Legende am Ende der Tabelle; Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Tabelle 4-15 (Fortsetzung)

Probe	Mutation 5 Exon 45	Mutation 6 Exon 45	Mutation 7 Intron 45	Mutation 8 Intron 45	Mutation 9 Intron 45	Mutation 10 Exon 46	Mutation 11 Exon 46
D2573	n.a. 794C>CT	n.a. 812C>CT					
D2582							
D3143	n.a. 794C>CT						
D2004			871G>GT n.a. 871G>GT		n.a. 897G>GT n.a. 897G>GT	n.a. 941C>CT n.a. 941C>CT	
D2577							
D2580	n.a. 794C>CT			n.a. 873A>AC			
D3142	n.a. 794C>CT	n.a. 812C>CT				n.a. 941C>CT n.a. 941C>CT	n.a. 979G>AG n.a. 979G>AG

Legende: Mut#, Anzahl der in dieser Sequenz gefundenen Mutationen; n.a., nicht analysierbarer Sequenzabschnitt; Zahl, Position der gefundenen Mutation in der Vergleichsequenz; A>G Beispiel eines homozygoten Basenaustausches; T>CT, Beispiel eines heterozygoten Basenaustausches

Tabelle 4-16: Interpretation der Mutationen im Exon 43 bis 46

Mutation	Lage	Art der Mutation	Erläuterung/Konsequenz
1	Exon 43	Transition A>G	Stille Mutation an Position 3 des Triplets, Synonyme GCA und GCG kodieren beide Alanin
2	Exon 43	Transition C>T	Stille Mutation an Position 1 des Triplets, Synonyme CTG und TTG kodieren beide Leuzin
3	Intron 43	Transition C>T	Keine
4	Exon 45	Transition T>C	Stille Mutation an Position 3 des Triplets, Synonyme CTT und CTC kodieren beide Leuzin
5	Exon 45	Transition C>T	Stille Mutation an Position 3 des Triplets, Synonyme TTC und TTT kodieren beide Phenylalanin
6	Exon 45	Transition C>T	Stille Mutation an Position 3 des Triplets, Synonyme CTC und CTT kodieren beide Leuzin
7	Intron 45	Transversion G>T	Keine
8	Intron 45	Transversion A>C	Keine
9	Intron 45	Transversion G>T	Keine
10	Exon 46	Transition C>T	Missense Mutation an Position 1 des Triplets, CAC/TAC, Austausch von Histidin (basisch, polar) gegen Tryptophan (neutral, polar)
11	Exon 46	Transition G>A	Stille Mutation an Position 3 des Triplets, Synonyme TCG und TCA kodieren beide Serin

4.7.6 Sequenzvarianten von Exon 43 des PKD1-Gens bis im Exon 40 des TSC2-Gens

PCR-Produkte der Primer TSC-F und TSC-R hatten eine Länge von etwa 1,8 kb. Eine durchgehende Sequenzierung war nicht möglich.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Sequenzlängen der Proben diente der entsprechende Bereich aus dem Klon felis catus clone rp86-207p24 (NCBI-Nucleotide, Accession Nr. AC145332.48) unbekannter Rasse als Vergleichsequenz. Hierdurch war gewährleistet, dass jede Probe in ihrer Gesamtlänge durch das Programm Mutation Surveyor™ untersucht werden konnte. Es wurden PCR-Produkte von sechs Tieren analysiert (s. Kapitel 4.5.7).

Mit dem Primer TSC-F konnte ein Abschnitt beginnend im Exon 46 des PKD1-Gens bis in die intergenische Region zwischen dem PKD1- und TSC2-Gens sequenziert werden. In diesem Abschnitt war keiner der untersuchten Probanden vollständig homozygot. Insgesamt fanden sich hier zwölf Mutationen. Sechs davon, eine Transversion und fünf Transitionen, lagen im Exon 46. Die ersten beiden Mutationen, eine Missense und eine stille Mutation, traten heterozygot nur in der Probe des zystennegativen Tieres D2598 auf. Die vier weiteren Mutationen im Exon 46 waren sowohl in zystenpositiven als auch –negativen Tieren vorhanden. Es handelte sich um drei stille und eine Missense Mutation.

Exon 46 kodiert das intrazytoplasmatisch gelegene N-terminale Ende des Polyzystin 1.

Vier der sechs intergenischen Mutationen fanden sich ebenfalls bei zystenpositiven und -negativen Tieren. Mutationen Nr. 9 bestand dagegen wiederum nur bei Proband D2598 und Mutation 12 nur bei einer der drei zystenpositiven Tiere.

Bei Vergleich der mit dem Primer TSC-R sequenzierten Sequenzen unterschieden sich die Proben nur an drei Positionen in der intergenischen Region. In den rund 110 bekannten Basen des TSC-2-Gens gab es keine Variation unter den Perserkatzen. Mutation 1 und 3 fanden sich nur bei Proband D3142 als heterozygot vorliegende Nukleotidsubstitutionen. Mutation Nr. 2 lag als ebenfalls heterozygoter Einzelbasenaustausch bei einer der zystennegativen Katzen und bei zwei der drei zystenpositiven Tieren vor. Insgesamt wurden im intergenischen Bereich sechs Transitionen und drei Transversionen identifiziert.

Tabelle 4-17: Interpretation der Mutationen von Exon 46 bis in die intergenische Region

Mutation	Lage	Art der Mutation	Erläuterung/Konsequenz
1	Exon 46	Transversion T>G	Missense Mutation an Position 3 des Triplets, AGT>AGG, Austausch Serin (neutral, unpolar) mit Arginin (basisch, polar)
2	Exon 46	Transition C>T	Stille Mutation an Position 1 des Triplets, Synonyme CTC und TTC kodieren beide Leuzin
3	Exon 46	Transition G>A	Stille Mutation an Position 3 des Triplets, Synonyme CAG und CAA kodieren beide Glutamin
4	Exon 46	Transition G>A	Stille Mutation an Position 3 des Triplets, Synonyme CAG und CAA kodieren beide Glutamin
5	Exon 46	Transition G>A	Missense Mutation an Position 1 des Triplets, GAC>AAC, Austausch von Aspartat (saurer, polar) mit Asparagin (neutral, polar)
6	Exon 46	Transition G>A	Stille Mutation an Position 3 des Triplets, Synonyme AAG und AAA kodieren beide Lysin
7	intergenisch	Transition G>A	Keine
8	intergenisch	Transition G>A	Keine
9	intergenisch	Transversion A>C	Keine
10	intergenisch	Transversion A>C	Keine
11	intergenisch	Transition C>T	Keine
12	intergenisch	Transversion G>C	Keine

Tabelle 4-18: Übersicht der Mutationen von Exon 46 bis in die intergenische Region zwischen PKD1- und TSC2-Gen

Die Ergebnisse der Tiere mit PKD-Phänotyp sind grau unterlegt.

Vergleichsequenz: Klon felis catus rp86-2o7p24

Probe	Sample File	Start	End	Size	Quality	Mut#	Mutation 1	Mutation 2	Mutation 3	Mutation 4
D2573	73-TSC-F.abi	138	731	594	6	4	n.a.	Exon 46	Exon 46	Exon 46
D2582	82-TSC-F.abi	101	657	557	11	4				325G>GA
D2598	98-TSC-F.abi	99	584	486	0	3	130T>TG	203C>CT		
	98-TSC-F2.abi	260	646	387	0	7	n.a.	n.a.	316G>GA	325G>GA
D2004	TSC04-TSCF.abi	101	806	706	30	9			316G>GA	325G>GA
D2577	TSC77-TSCF.abi	101	828	728	27	8			316G>GA	325G>GA
D3142	N+TSC-TSCF.abi	114	421	308	30	2				325G>GA

Tabelle 4-18 (Fortsetzung)

Probe	Mutation 5	Mutation 6	Mutation 7	Mutation 8	Mutation 9	Mutation 10	Mutation 11	Mutation 12
D2573	Exon 46	Exon 46	intergenisch	intergenisch	intergenisch	intergenisch	intergenisch	intergenisch
D2582		463G>GA	512G>GA	556G>GA	574A>C	574A>AC	578C>T	n.a.
D2598		463G>GA	512G>GA	556G>GA	574A>AC	574A>AC	578C>CT	n.a.
D2004	371G>GA	463G>GA	512G>GA	556G>GA	574A>AC	574A>C	578C>T	666G>C
D2577	371G>GA	463G>GA	512G>GA	556G>GA	574A>AC	574A>AC	578C>CT	666G>GC
D3142	371G>GA	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Legende: Mut#, Anzahl der in dieser Sequenz gefundenen Mutationen; n.a., nicht analysierbarer Sequenzabschnitt; Zahl, Position der gefundenen Mutation in der Vergleichsequenz; A>G Beispiel eines homozygoten Basenaustausches; T>CT, Beispiel eines heterozygoten Basenaustausches

Tabelle 4-19: Übersicht der Mutationen im Genabschnitt von Exon 40 des TSC2-Gens bis in die intergenische Region zwischen dem PKD1- und dem TSC2-Gen

Die Ergebnisse der Tiere mit PKD-Phänotyp sind grau unterlegt.
Referenzsequenz aus Klon felis catus clone rp86-2o7p24

Probe	Sample File	Start	End	Size	Quality	Mut#	Mutation 1	Mutation 2	Mutation 3
D2573	73-TSC-R.abi	93	727	635	38	1	intergenisch	intergenisch	intergenisch
D2582	82-TSC-R.abi	118	700	583	20	1		220C>T	220C>T
D2598	98-TSC-R.abi	93	370	278	0	1		220C>CT	
D2004	TSC04-TSCR.abi	98	597	500	55	1		220C>T	
	GATC1-TSC04-TSCR.abi	144	594	451	71	1		220C>T	
D2577	TSC77-TSCR.abi	158	344	187	65	1		220C>CT	
	GATC1-TSC77-TSCR.abi	158	365	208	50	1		220C>CT	
D3142	N+TSC-TSCR.abi	98	372	275	54	3	204G>GA	220C>CT	365A>AG
	GATC1-N+TSC-TSCR.abi	104	372	269	55	3	204G>GA	220C>CT	365A>AG

Tabelle 4-20: Interpretation der Mutationen von Exon 40 des TSC2-Gens bis in die intergenische Region

Mutation	Lage	Art der Mutation	Erläuterung/Konsequenz
1	intergenisch	Transition G>A	Keine
2	intergenisch	Transition C>T	Keine
3	intergenisch	Transition A>G	Keine

4.7.7 Zusammenfassung der identifizierten Mutationen

Von Exon 4 bis Exon 46 wurden abschnittsweise insgesamt 5.645 Basen des felines PKD1-Gens sequenziert. Hiervon gehörten 3.382 Basen den Exons und 2.262 Basen den Introns an. Im Exons fanden sich sieben Transversionen und vierzehn Transitionen. Deletionen und Insertionen gab es hier nicht. Das bedeutet, dass das PKD1-Gen sechs Mutationen pro Kilobase im Exonbereich aufwies. In Intronregionen fanden sich mit 22 Sequenzvarianten sogar rund zehn Mutationen pro Kilobase. Darunter fielen fünf Transversionen, elf Transitionen, fünf Deletionen und eine Insertion. Berücksichtigt man nur die Nukleotidsubstitutionen, findet man im Intron sieben Mutationen pro Kilobase. Transitionen kamen im Vergleich zu den Transversionen etwa doppelt so häufig vor. In den Exons überwogen mit 28,5 % die C>T-Transitionen gefolgt von den G>A-Transitionen mit 23,8 %. In den Introns wurden mit 37,5 % die A>G-Transitionen am häufigsten identifiziert. Die C>T-Transversionen standen mit 18,8 % an zweiter Stelle. Auf die gesamte untersuchte Region bezogen waren die C>T-Transitionen mit 24,3 % die häufigsten Mutationen. Es folgten die A>G-Transitionen (18,9 %) und die G>A-Transitionen (13,5 %).

Bei den Mutationen in einem Exon war bei zwölf Substitutionen die dritte Position des Triplets betroffen. In acht Fällen mutierte die erste Position und in nur einem Fall kam es zum Austausch der zweiten Base des Triplets. Es handelte sich hierbei um insgesamt zwölf stille und sieben Missense Mutationen sowie um eine konservative und eine Nonsense Mutation.

Aus dem Genabschnitt von Exon 4 bis 6 wurden in diese Berechnung nur die Mutationen sechs und zehn einbezogen. Die anderen hier gefundenen Varianten wurden nicht berücksichtigt, da hier Polymeraselesefehler nicht auszuschließen waren.

Tabelle 4-21: Häufigkeit (%) der Einzelbasensubstitutionen im PKD1-Gen

Basensubstitution		Exon	Σ	Intron	Σ	Insgesamt	Σ
Transition	C>T	28,5 (n=6)	66,7	18,8 (n=3)	68,8	24,3 (n=9)	67,6
	G>A	23,8 (n=5)		0 (n=0)		13,5 (n=5)	
	T>C	9,5 (n=2)		12,5 (n=2)		10,8 (n=4)	
	A>G	4,8 (n=1)		37,5 (n=6)		18,9 (n=7)	
Transversion	A>C	0 (n=0)	33,3	6,3 (n=1)	31,3	2,7 (n=1)	32,4
	T>G	4,8 (n=1)		0 (n=0)		2,7 (n=1)	
	G>T	0 (n=0)		12,5 (n=2)		5,4 (n=2)	
	C>A	4,8 (n=1)		0 (n=0)		2,7 (n=1)	
	A>T	4,8 (n=1)		0 (n=0)		2,7 (n=1)	
	T>A	4,8 (n=1)		0 (n=0)		2,7 (n=1)	
	G>C	9,5 (n=2)		12,5 (n=2)		10,8 (n=4)	
	C>G	4,8 (n=1)		0 (n=0)		2,7 (n=1)	
Σ		100 (n=21)		100 (n=16)		100 (n=37)	

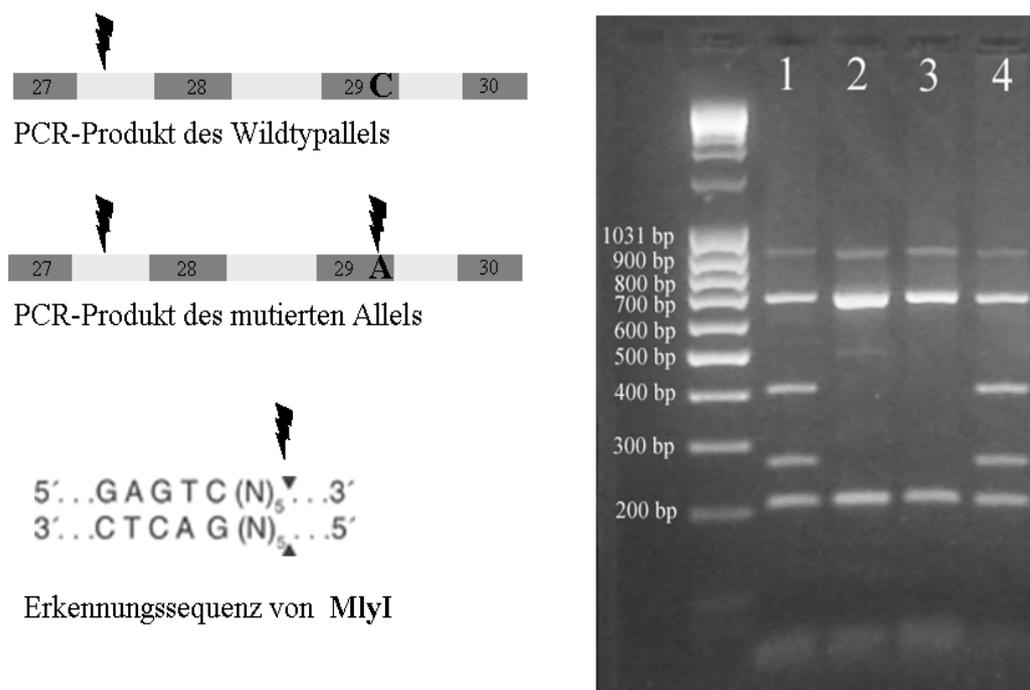
4.8 Charakterisierung der Transversion im Exon 29

Im Exon 29 des felines PKD1-Gens fiel eine heterozygote C>A-Transversion im Exon 29 bei drei von vier zystenpositiven Tieren auf. Es handelte sich um eine Nonsense Mutation bei der ein Allel die Base Cytosin der Vergleichsequenz zeigte und das zweite mutierte Allel durch die Base Adenin charakterisiert wurde. Zunächst war auffällig, dass diese wahrscheinlich zu einem frühzeitigen Kettenabbruch führende Mutation nur bei zystenpositiven Tieren auftrat.

4.8.1 Die RFLP-Analyse als Screening-Methode

Die Sequenz um die Mutationsstelle lautet „...GAGTC...“ und kann durch bestimmte Restriktionsenzyme, wie z.B. das Enzym MlyI, erkannt und geschnitten werden. Die Sequenz des Wildtypallels („...GCGTC...“) wird dagegen nicht erkannt und bleibt somit an dieser Stelle erhalten. Die Mutation kann auf diese Weise als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) dargestellt werden. So bot sich für ein Screening die RFLP-Analyse mit dem Restriktionsenzym MlyI an. Hierzu wurden Amplifikate von Exon 27 bis 30 mit 884 bp Länge mittels PCR synthetisiert

Abbildung 4-9: Agarosegel der RFLP-Analyse



Spur 2 und 3: Bandenmuster von zwei PKD-negativen Katzen mit dem homozygot vorkommenden Wildtypallel.

Spur 1 und 4: Bei PKD-positiven heterozygoten Tieren findet sich zusätzlich zum Wildtypallel das Bandenmuster des mutierten Allels.

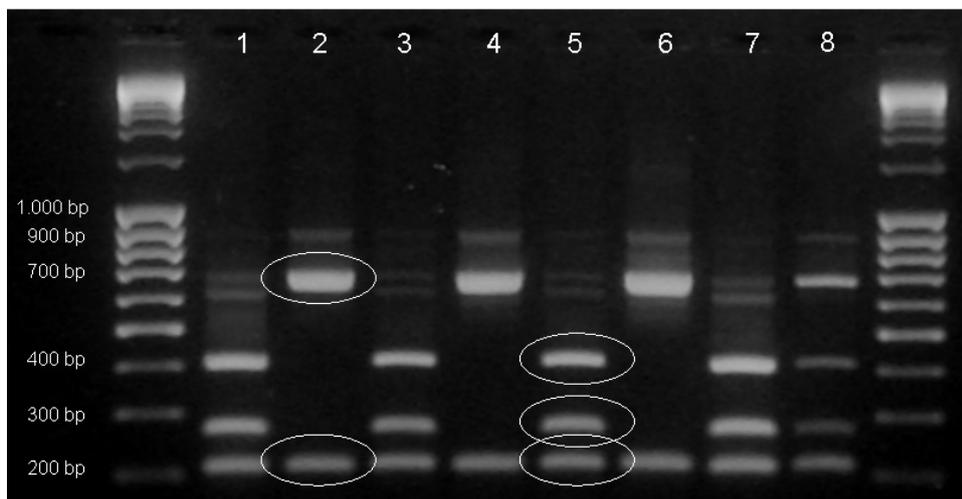
In allen Spuren befinden sich noch Reste des unverdauten PCR-Produktes von 884 bp Länge

Im Intron 27 befand sich sowohl im Wildtypallel als auch im mutierten Allel eine Erkennungssequenz des Restriktionsenzym Mly1, welche als interne Positivkontrolle der Reaktion diente. PCR-Amplifikate des Wildtypallels wurden in Fragmente von 676 bp und 208 bp geschnitten. Die gefundene Mutation resultierte in einer weiteren Schnittstelle, so dass PCR-Produkte aus dem mutierten Allel in Fragmente von 408 bp, 268 bp und 208 bp Länge geschnitten wurden. Häufig war noch eine weitere Bande von ca. 900 bp zu sehen. In dieser Bande befanden sich wahrscheinlich Reste unverdauter PCR-Produkte (Abb. 4-9)

4.8.2 Klonierung der PCR-Produkte von Exon 27 bis 30 einer zystenpositiven Katze

Mit dem Primerpaar cPKD27F und cPKD30R2 synthetisierte Amplifikate der zystenpositiven Katze D2631 wurden mit dem Plasmid pST Blue-1 ligiert und in DH5 α -Zellen kloniert. Neun Klone konnten mit einem PKD1-spezifischem Insert isoliert werden. Die Reamplifikate der Inserte wurden anschließend mit Hilfe der RFLP-Analyse untersucht. Vier Klone zeigten hier das erwartete Bandenmuster eines Allels mit C>A-Transversion (Abb. 4-10, Spur 5). Fünf Klone wiesen das bei einem Wildtypallel zu erwartende Bandenmuster auf (Abb. 4-10, Spur 2).

Abbildung 4-10: RFLP-Analyse der klonierten Allele



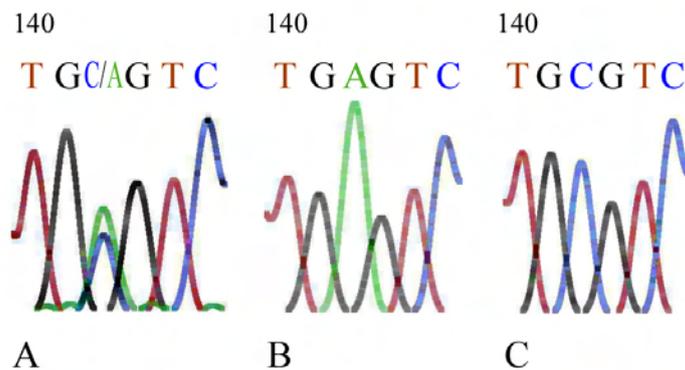
Spur 1, 3, 5 und 7 zeigen das Bandenmuster des Allels mit C>A-Transversion im Exon 29. Spur 2, 4 und 6 zeigen das Bandenmuster des Wildtypallels. In Spur 8 ist das Bandenmuster eines heterozygoten Tieres zu sehen.

Im Verdau der mutierten Allele sind zwei schwache Banden von etwa 700 und etwas mehr als 600 bp zu sehen. Möglicherweise enthalten sie unspezifische Amplifikate des Plasmids. In den Verdau der Wildtypallele wurden sie weitgehend verdeckt. Der Klon CA1 mit dem Bandenmus-

ter eines mutierten Allels und der Klon CA9 mit dem Bandenmuster des Wildtypallels wurden anschließend zur Verifizierung der Mutation sequenziert. Sie lag an Position 142 des Exon 29. Abbildung 4-11 zeigt Ausschnitte der Abi-Traces verschiedener Proben. Zunächst wird das sequenzierte PCR-Produkt eines an dieser Stelle homozygoten Tieres gezeigt. Hier findet sich ein deutlicher Doppelpeak, der durch das gleichzeitige Vorliegen der Basen Adenin und Cytosin erzeugt wird (A). Daneben ist die entsprechende Position des Klones CA1 mit dem mutierten Allel abgebildet. Hier liegt ausschließlich die Base Adenin vor (B). Es folgt die gleiche Position in Klon CA9 mit dem Wildtypallel. Dieses zeigt ausschließlich die Base Cytosin (C).

Dies zeigte, dass der Doppelpeak in direkt sequenzierten PCR-Produkten durch zwei verschiedene Allele entstand, die sich an dieser Stelle in einer Base (Cytosin oder Adenin) unterschieden. In der RFLP-Analyse von PCR-Produkten aus dem PKD1-Abschnitt von Exon 27 bis 30 hatten beide Allele sehr charakteristische Bandenmuster, die sich auch bei heterozygoten Tieren sehr gut unterscheiden ließen.

Abbildung 4-11: Ausschnitte der Sequenzspuren eines homozygoten Tieres mit C>A-Transversion an Position 142 im Exon 29



PCR-Produkt (A), Klon CA1 (B) und Klon CA9 (C).

Im sequenzierten Klon CA1 wurden außer der beschriebenen C>A-Transversion zwei Einzelbasenaustausche gefunden. Es handelte sich um eine T>G-Transversion an Position 338 und eine T>C-Transition an Position 646 der Vergleichsequenz. In den Sequenzen der direkt sequenzierten PCR-Produkte der Probe D2631 lagen diese Variationen jedoch nicht vor. Das ließ vermuten, dass Fragmente sequenziert wurden, die Polymeraselesefehler enthielten.

4.8.3 Screening der Probanden mittels RFLP-Analyse

Das Screening bezüglich der C>A-Transversion im Exon 29 wurde an allen zur Verfügung stehenden Katzen durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob die Mutation dem zystenpositiven oder – negativen Phänotyp zugeordnet werden und sie sowohl homo- als auch heterozygot vorliegen konnte.

4.8.3.1 RFLP-Analyseergebnisse bei Perserkatzen

Es wurden 153 Perserkatzen untersucht. Von diesen waren 77 Tiere zystenpositiv und 76 zysten-negativ. 42 der Perserkatzen waren Mitglieder der Familien A, B, C oder D.

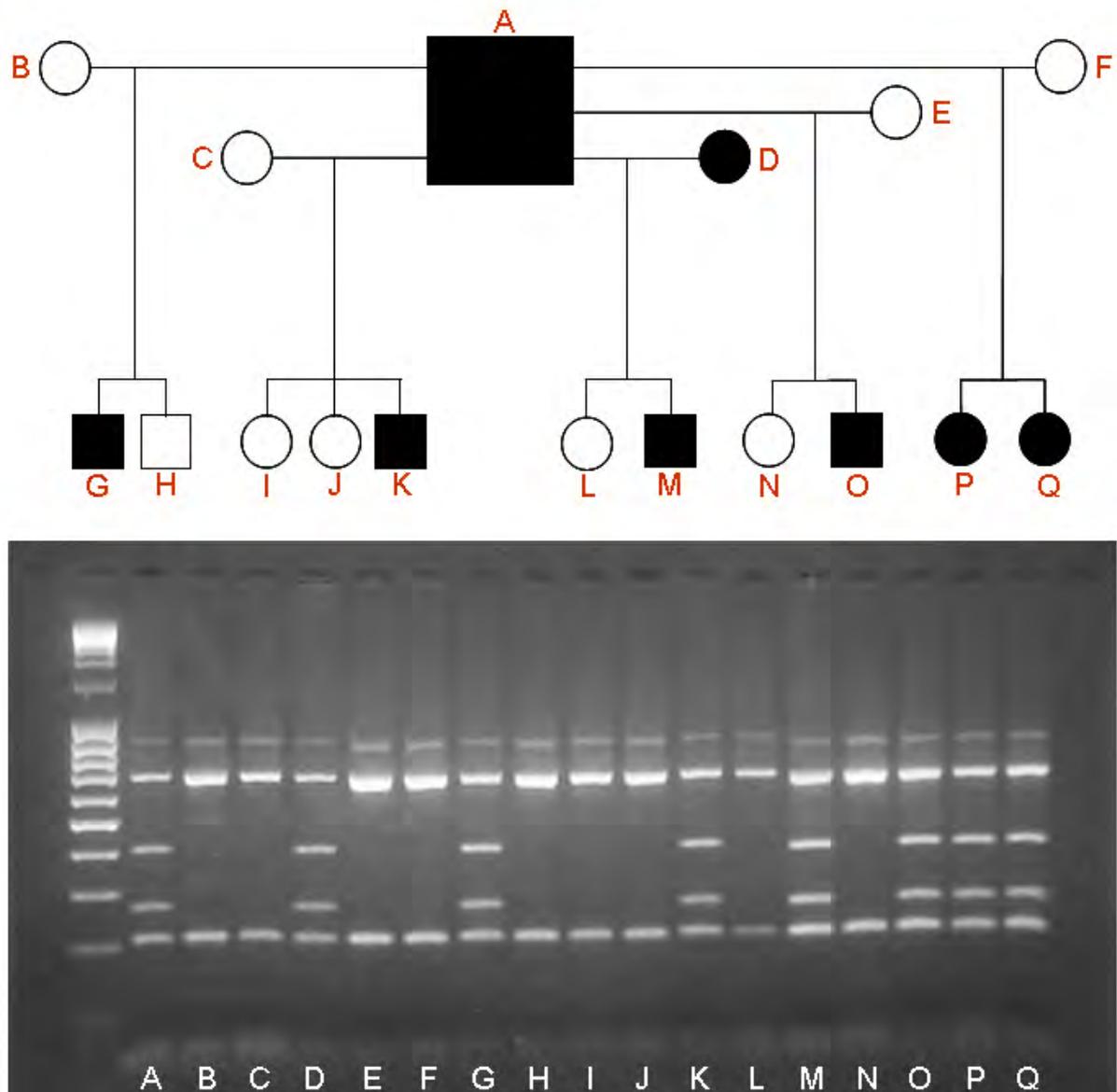
Keine der 76 Perserkatzen ohne Nierenzysten besaß die C>A-Transversion im Exon 29. Sie waren allesamt homozygot für das Wildtypallel. Unter ihnen war eine 20-jährige Katze (S1604/05), die zwar keine Nierenzysten dafür aber multiple Leberzysten besaß.

Ebenso konnte bei vier Perserkatzen, bei denen mindestens eine Nierenzyste diagnostiziert worden war, diese Mutation nicht nachgewiesen werden. Auch sie waren an dieser Stelle homozygot für das Wildtypallel. Unter diesen vier Tieren befanden sich zwei Tiere, die zum Zeitpunkt der Untersuchung lediglich eine einzelne sonographisch darstellbare Nierenzyste hatten. Eine dieser Katzen (D2040) hatte zusätzlich ein ultrasonographisch hochgradig verändertes Parenchym unbekannter Ursache. Die dritte Katze (S536/03) war acht Jahre alt und wies mehrere vereinzelt liegende Nierenzysten auf. Zusätzlich fand sich im Parenchym histologisch ein lymphoplasmazelluläres Infiltrat unter Beteiligung zahlreicher eosinophiler Granulozyten. Die vierte Katze war ein typischer PKD-Fall mit multiplen Nieren- und Leberzysten.

Bei den zystenpositiven Perserkatzen besaßen 73 von 77 das Bandenmuster des mutierten Allels. Das bedeutet, dass 95 % der zystenpositiven Perserkatzen Träger der Mutation waren. Jede dieser Katzen war an dieser Stelle heterozygot. Betrachtet man die gesamte Stichprobe, stimmte bei 97,4 % der untersuchten Perserkatzen der Ultraschallbefund, der zur Einteilung der Tiere in die Gruppe der zystennegativen oder -positiven Katzen führte, mit dem negativen bzw. positiven Ergebnis der RFLP-Analyse überein.

Bei allen Katzen, die einer der vier Familien zugeordnet werden konnten, stimmte das Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein von Zysten mit dem positiven bzw. negativen Nachweis der Mutation überein. Der Stammbaum der Familie B ist zusammen mit den entsprechenden Ergebnissen der RFLP-Analyse in Abbildung 4-12 dargestellt.

Abbildung 4-12: Stammbaum einer von der PKD betroffenen Perserkatzenfamilie.



Das Agarosegel zeigt die RFLP-Analyseergebnisse der Probanden. ○ = weiblich, keine Nierenzysten; □ = männlich, keine Nierenzysten; ● = weiblicher Merkmalsträger; ■ = männlicher Merkmalsträger

4.8.3.2 Ergebnisse der RFLP-Analyse von Katzen, die nicht

der Rasse Perserkatze angehörten

Außer den Perserkatzen wurden sechs Tiere der Rasse Exotic Shorthair, eine Katze der Rasse Russisch Blau, eine zystenpositive langhaarige Hauskatze, vier zystenpositive Europäisch Kurzhaarkatzen und eine Mischlingskatze mit unbekannter Rassenzugehörigkeit untersucht.

Bei Katzen der Rasse Exotic Shorthair waren drei Katzen zystenpositiv und drei zystennegativ. Die drei gesunden Tiere waren homozygot für das Wildtypallel und die drei zystenpositiven Tiere heterozygot für das mutierte Allel.

Die Katze der Rasse Russisch Blau besaß eine histologisch nachgewiesene Nierenzyste. Die C>A-Transversion im Exon 29 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die zystenpositive langhaarige Hauskatze war heterozygot für die untersuchte Mutation. Da es sich um ein Fundtier handelte, waren die Elterntiere nicht bekannt. Lediglich die Felllänge ließ eine Perserkatze unter den Vorfahren vermuten.

Es wurden vier zystenpositive Katzen getestet, die den Phänotyp der Europäisch Kurzhaarkatze aufwiesen. Drei hatten multiple Nierenzysten und eine besaß eine singuläre Nierenzyste. Nur eins der vier Tiere war jedoch Träger der untersuchten Mutation. Diese Katze zeigte multiple Zysten.

Bei der Mischlingskatze waren Teleangiektasien in der Leber, jedoch keine Zysten in Leber oder Nieren diagnostiziert worden. Für diese Veränderung konnte die C>A-Transversion nicht verantwortlich gemacht werden. Das Tier war homozygot für das Wildtypallel.

4.8.4 Statistisch zu erwartende Anzahl homozygoter Merkmalsträgern

Es wird angenommen, dass es sich bei der PKD der Perserkatze um eine autosomal-dominant vererbte Krankheit handelt. In der untersuchten Gruppe von Perserkatzen konnten 77 Tiere mit PKD-Phänotyp und 76 Tiere mit gesundem Phänotyp beobachtet werden. Bei einem autosomal-dominanten Erbgang sind die gesunden Tiere, in diesem Falle etwa die Hälfte der untersuchten Stichprobe, homozygot für das rezessive Wildtypallel. Unter den Tieren mit PKD-Phänotyp sind sowohl homozygote als auch heterozygote Merkmalsträger zu erwarten.

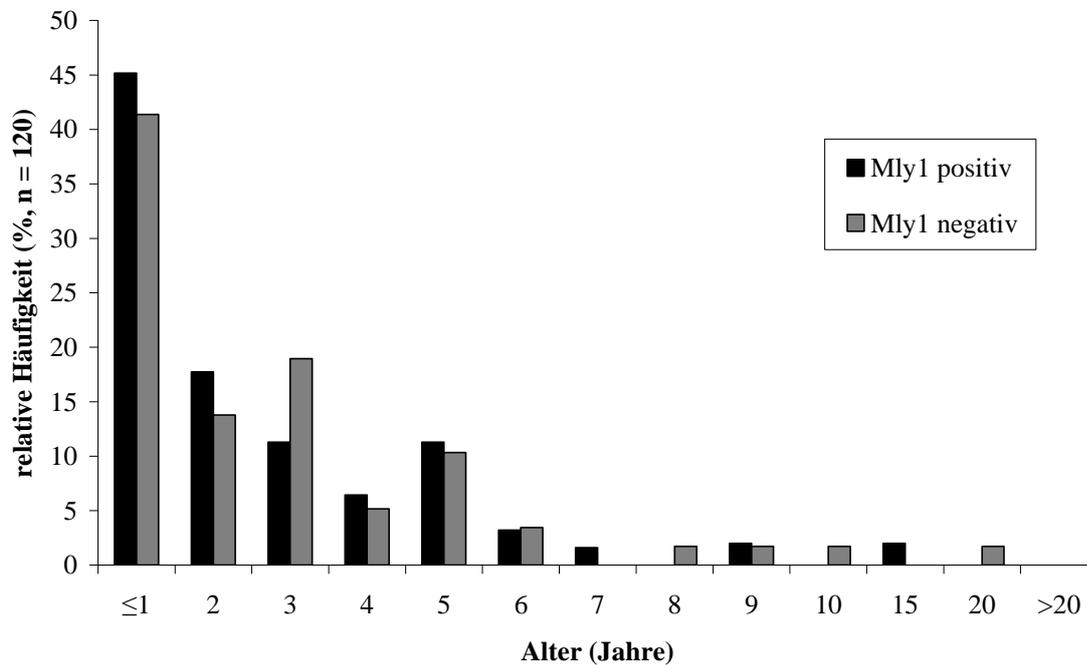
Nach der Hardy-Weinberg-Verteilung müssten unter den zystenpositiven Katzen der untersuchten Stichprobe rund 14 Tiere zu finden sein, die homozygot für das mutierte Allel sind. 52 Katzen sollten heterozygot sein.

In der RFLP-Analyse waren jedoch alle Träger der Mutation heterozygot für dieses Merkmal. Damit weicht die beobachtete Verteilung des C- und A-Allels im Exon 29 im Chi-Quadrat-Test signifikant von der Hardy-Weinberg-Verteilung ab (χ^2 , 1FG, $p < 0,001$).

4.8.5 Altersverteilung in der Gruppe der mutationspositiven und -negativen

Perserkatzen

Bei 120 Perserkatzen war das Alter zum Untersuchungszeitpunkt bekannt. Von diesen waren 62 in der RFLP-Analyse positiv und 58 negativ. Die jüngste der mutationspositiven Katzen war sieben Wochen und die älteste 12 Jahre alt. Das Alter der mutationsnegativen Katzen reichte von drei Monaten bis 20 Jahren. Ein Vergleich der Altersstruktur innerhalb der beiden Gruppen zeigt Abbildung 4-13.

Abbildung 4-13: Altersverteilung der untersuchten Perserkatzen

Legende: Mly1, für die RFLP-Analyse verwendetes Restriktionsenzym

In der Gruppe der mutationspositiven Tiere waren die meisten Katzen (45 %, $n = 28$) zum Zeitpunkt der Probenentnahme ein Jahr alt oder jünger. Ähnlich sah es bei den mutationsnegativen Tieren aus: 41 % ($n = 24$) der Katzen war ein Jahr alt oder jünger.

Bei Perserkatzen mit PKD wird ab einem Alter von durchschnittlich sieben Jahren mit dem Auftreten von Symptomen einer Niereninsuffizienz gerechnet. Unter den untersuchten mutationspositiven Perserkatzen waren 4 % ($n = 2$) älter als sieben Jahre. 7 % ($n = 4$) der mutationsnegativen Katzen waren älter als sieben Jahre.

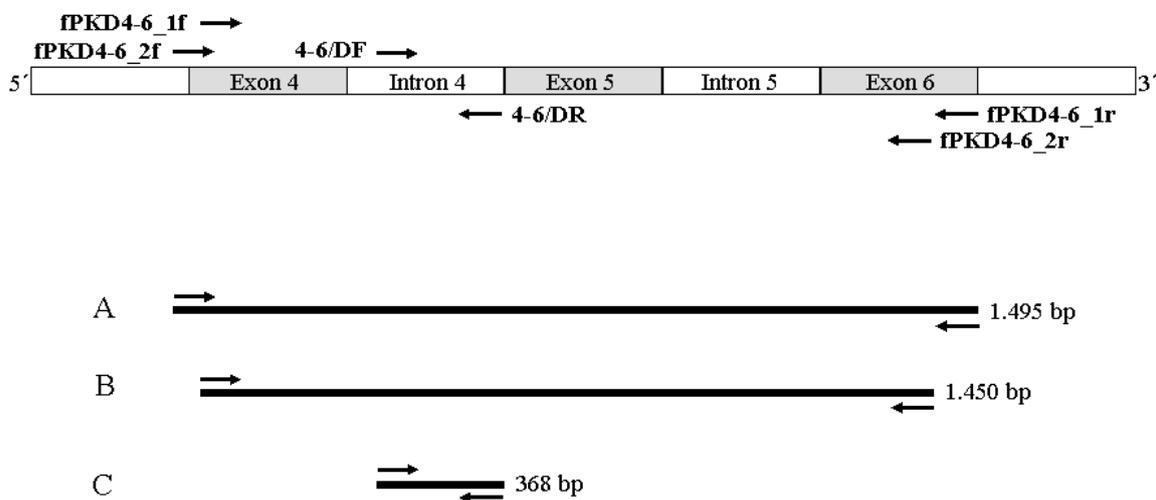
4.9 Deletion aufgrund von Konformationsvarianten im Intron 4

Bei Amplifikation von Exon 4 bis 6 des PKD1-Gens trat gehäuft eine Doppelbande von ca. 1.480 bp und ca. 1.300 bp auf. In Einzelfällen war eine dritte Bande von etwa 1.050 bp zu beobachten. Als Ursache konnten verschiedene Konformationen der PCR-Amplifikate angenommen werden (Kapitel 4.3.2).

4.9.1 Nachweis von PCR-Amplifikaten mit einer 139 bp-Deletion

Genomische DNS der Proben D2573, D2582 und D3143 dienten als Template einer nested PCR mit den Primerpaaren A und B (Abb. 4-14). Nach Klonierung von Amplifikaten der Probe D3143 konnten die Klone „Ninég 4-6-E8“ und „-E12“ isoliert werden, die im Intron 4 eine Deletion von 139 Basen zeigten. Ein dritter Klon dieser Reaktion, Klon „Ninég 4-6-E9“, besaß dagegen das vollständige Intron 4. Die Amplifikate der nested PCR mit Primerpaar A und B aller drei Proben dienten in einer weiteren nested PCR mit Primerpaar C als Templates. Die Primer 4-6/DF und 4-6/DR dieser Reaktion flankierten die Deletionsstelle mit einem Abstand von 368 bp. Im Falle einer Deletion waren solche Fragmente nur 229 bp lang.

Abbildung 4-14: Primer der nested PCR



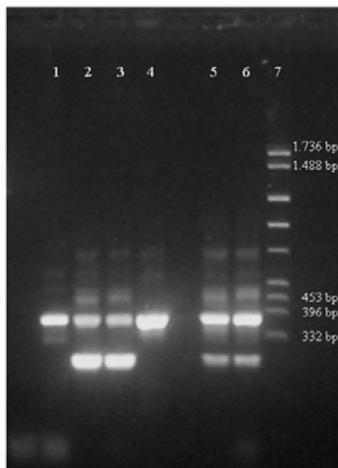
Im Genabschnitt von Exon 4 bis 6 können sechs Primer nach dem Prinzip der nested PCR kombiniert werden. Das Primerpaar A besteht aus den Primern fPKD4-6_2f und _1r. Zu Primerpaar B gehören die Primer fPKD4-6_1f und _2r. Die Amplifikation von Intron 4 erfolgt mit den Primern 4-6/DF und 4-6/DR als Primerpaar C. Für eine nested PCR wurde Primerpaar A mit Paar B oder C kombiniert. Bei einer doppelten nested PCR wurden alle drei Primerpaare hintereinander geschaltet.

Aus den PCR-Ansätzen der Proben D3143 und auch der Probe D2582 konnten sowohl Fragmente von 368 bp als auch Fragmente von 229 bp amplifiziert werden. Die Probe D2573 zeigte ausschließlich eine Bande in Höhe von 368 bp. Zusätzlich wurde mit Primerpaar C genomische DNS der Probe D3143 amplifiziert. Obwohl aus dieser Probe ein deletiertes Fragment kloniert und mittels nested PCR amplifiziert werden konnte, wurde in dem Ansatz ausschließlich ein vollständiges Fragment von 368 bp nachgewiesen (Abb. 4-15). Auch nach direkter Amplifikation genomischer DNS der Proben D2573 und D2582 mit Primerpaar C war kein deletiertes Fragment nachweisbar. Die Amplifikation der Proben D3143, D2573 und D2582 mit Primerpaar C, den beiden nested PCRs und der doppelten nested PCR wurde wiederholt. Dieses Mal wurde ein deletiertes Fragment nur in Probe D2573 beobachtet (Abb. 4-16). Deletierte PCR-Produkte wurden isoliert und sequen-

ziert (Sequenz „240DR“). Ihre Sequenz entspricht zu 100 % derjenigen von Klon „Nineg 4-6-E8“ und „-E12“.

Die 139 bp-Deletion konnte also nicht als Allel genomischer DNS nachgewiesen werden. Daher scheint es sich nicht um eine Keimbahnmutation zu handeln, die in jeder Zelle vorkommen würde. Lediglich durch mehrfaches Reamplifizieren von PCR-Produkten wurden unregelmäßig in einigen Proben deletierte Fragmente gefunden. Möglicherweise liegt eine somatische Mutation vor. Es wird angenommen, dass diese Mutation nur in wenigen Zellen vorkommt und daher erst nach mehrmaligem Reamplifizieren in so ausreichender Kopienzahl vorliegt, dass sie detektierbar ist

Abbildung 4-15: Doppelte nested PCR mit den Primerpaaren A, B und C

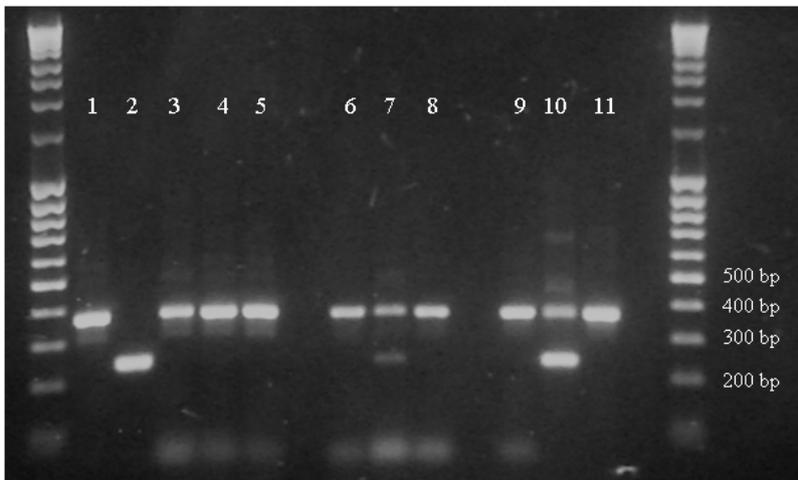


Spur 1: PCR mit Primerpaar C aus genomischer DNA der Probe D3143

Spur 2 - 7: Amplifikate der doppelten nested PCR

- Spur 2 und 3: Probe D3143
- Spur 4 und 5: Probe D2573
- Spur 6 und 7: Probe D2582

Abbildung 4-16: Amplifikation mit Primerpaar C



Spur 1: Amplifikat des Klones 4-6/4

Spur 2: Klon Nineg 4-6E8 zeigt die Deletion im Intron 4

Spur 3-5: Amplifikate aus genomischer DNS der Proben D3143, D2573, D2582

Spur 6-8: Amplifikate der nested PCR mit Primerpaar A und C der Proben D3143, D2573, D2582. Probe D2573 zeigt zusätzlich ein deletiertes Fragment

Spur 9-11: Amplifikate doppelten nested PCR A, B und C. Probe D2573 zeigt zusätzlich ein deletiertes Fragment

Abschnittes (GCCTGG und CCAGGC). Liegt die DNS einzelsträngig vor, könnten die zu einander komplementären Sequenzen aneinander binden. Dies hätte zur Folge, dass sich der dazwischen liegende Sequenzabschnitt des Einzelstranges zu einer Schleife legt (Hairpin-Loop, Abb. 4-19 A). Die Bildung eines Hairpin-Loops wäre in beiden Einzelsträngen möglich. Die Sequenz der Schleife deckte sich allerdings nicht mit der deletierbaren Sequenz.

Die zweite Struktur ist ein G-reicher Repeat von 8 Basen (GGGGGGTG). Die Sequenz zwischen den Repeats inklusive eines der beiden Repeats entspricht exakt der Sequenzlänge, die deletiert wurde. Hierbei könnte sowohl der erste Repeat als auch der weiter stromabwärts gelegene Repeat verloren gehen. Die resultierende Restsequenz wäre in beiden Fällen die gleiche. Bindet ein Einzelstrang wieder an seinem komplementären Gegenstrang, ist es theoretisch möglich, dass die Basen eines Repeats nicht an ihre eigentlichen Partnerbasen binden. Stattdessen kommt es zum Annealing an die zweite komplementäre Repeatsequenz im Gegenstrang. Damit würden sich im DNS-Doppelstrang zwei Schleifen ausbilden. Es können sowohl die 5'- als auch 3'-gelegenen Repeats fälschlich binden, wobei der jeweils zweite Repeat eines Stranges Teil der Schleife wird (Abb. 4-19 B und B2).

Denkbar wäre auch, dass die Schleifenbildung im Einzelstrang (Abb. 4-19 A) Voraussetzung dafür ist, dass die G-reichen Repeats sich für ein falsches Annealing nahe genug kommen. Damit sich die Struktur wie in Abbildung 4-19 B2 formiert, müsste sich zuerst im kodogenen Strang ein Hairpin-Loop ausbilden.

Diese Sekundärstrukturen können für das unterschiedliche Laufverhalten ein und derselben PCR-Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese verantwortlich sein. Die regelmäßig gesehene Bande von ca. 1.480 bp entsprach in etwa der Länge der PCR-Produkte aus dem Abschnitt von Exon 4 bis 6 von 1.450 bis 1.495 bp. Doppelsträngige PCR-Fragmente mit einem Doppel-Loop und Einzelstränge mit Hairpin-Loop könnten unter den zusätzlichen Banden von ca. 1.300 bp und 1.050 bp zu finden sein.

Abbildung 4-18: Sequenz von Intron 4 mit Repeats markiertem Inverted Repeat (unterstrichen) und G-reichem Repeat (fett). Die in einigen Proben deletierte Sequenz ist grau unterlegt.

```
5'GTGAGTATGGCTGAATGTGACCCGCTCGGTCCTTCTCTGTCGGCTAGGACCCCGTA
GGTGTTCAGGGTCACCGGCCTGGGGGGTGTTGGCAGGTGGGACTCTGGGAACAG
AGGCACCTGGGCAGCAATTGTGGCTGCTGAGACAGACCAGGTCGGGGGTCAAGGGA
GCAGTGCAGGTGGGAGGAGGGGAGGGTGGTGTGAGTGCCAGGCCGGGGGGGGGGGG
GGTGCTGGCGACGTGATCTGGGGTCTAGGATGGGGCACAGACACCGTAGGGGTGG
AGCCTGCCTGGGGACCAGCCTAGGCTGGGGGCAGGGGTGCAGCAAGGGCGGGGCC
CGACAAGGACCAGGCTGtCTGCTCTGTCCAG3'
```

Der Inverted Repeat (unterstrichen) und G-reichem Repeat (fett). Die in einigen Proben deletierte Sequenz ist grau unterlegt.

5 DISKUSSION

5.1 Strategie zur Identifizierung heterozygoter Sequenzvarianten

Das Polyzystische Syndrom der Perserkatze ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung. In der Humangenetik ist es üblich, von Dominanz zu sprechen, wenn ein Gen bereits in heterozygotem Zustand eine deutlich erkennbare pathologische Wirkung hat (Pschyrembel, 1998). Der Phänotyp einer dominant vererbten Erkrankung kann also theoretisch sowohl bei homo- als auch heterozygoten Merkmalsträgern beobachtet werden. Im Falle der PKD des Menschen und auch der Katze deutet jedoch vieles darauf hin, dass homozygote Merkmalsträger nicht auffällig werden, da sie bereits zu einem noch unbekanntem Zeitpunkt während der Gravidität sterben (Lu et al., 1997; Helmig, 2005). Aus diesem Grunde wurde besonderes Augenmerk auf heterozygot vorkommende Sequenzvarianten gerichtet.

Es bot sich die Analyse direkt sequenzierter PCR-Produkte an, da auf diesem Wege die Sequenzinformation des bis dahin noch unbekanntem feline PKD1-Gen aufgedeckt und gleichzeitig computerunterstützt das selbe Datenmaterial auf Sequenzunterschiede untersucht werden konnte. Daneben waren diese Sequenzen ebenfalls für die Suche nach Mutationen in Form von homozygoten Nukleotidsubstitutionen sowie hetero- und homozygoten Insertionen und Deletionen geeignet.

Wird ein gereinigter PCR-Ansatz direkt sequenziert, findet man in der Regel deutliche Peaks, die einer Base entsprechen. Liegt ein Doppelpeak vor, bei dem die Kurven in etwa die gleiche Größe haben und sich überlappen, ist es naheliegend, dass es zwei Allele gibt, die mit der gleichen Wahrscheinlichkeit amplifiziert wurden und sich genau an dieser Position in einer Base unterscheiden. Nachteil dieser Strategie war, dass insbesondere bei schlechter Sequenzqualität gehäuft zusätzliche kleine Peaks in Sequenzspuren zu finden waren. Im Zweifelsfall konnten Doppelpeaks unter solchen Umständen nicht berücksichtigt werden. Die PCR-Amplifikate wurden sowohl mit dem Vorwärts- als auch mit dem Rückwärtsprimer sequenziert. So konnte der Befund einer heterozygoten Nukleotidsubstitution abgesichert werden.

Mit dieser Methode konnte unter anderem die wahrscheinlich krankheitsauslösende Transversion identifiziert werden. Daher erwies sich die angewendete Strategie als geeignet.

Daneben gingen die Daten sequenzierter Klone in die Untersuchung ein. Diese Daten waren etwas einfacher auswertbar als direkt sequenzierte PCR-Produkte, da sie nur Kopien eines Allels enthielten und kleinere zusätzliche Peaks aus diesem Grund mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch Amplifikation der Klon-DNS entstanden. Um heterozygote Sequenzabschnitte auffindig machen zu können, müssten allerdings mehrere von einander unabhängige Klone sequenziert und analysiert werden. Im untersuchten eigenen Datenmaterial sequenzierter Klone fanden sich mehrere Sequenzvarianten, die nicht sicher einem Allel zugeordnet werden konnten. In diesen Fällen waren Polymeraselesefehler anzunehmen, die Mutationen vortäuschten.

Diese Methode erwies sich somit als aufwendiger und erleichterte es nicht, die vorliegenden Daten im Hinblick auf heterozygote Mutationen zu untersuchen. Daher wurden bei der Sequenzanalyse direkt sequenzierte PCR-Produkte gegenüber den sequenzierten Klonen bevorzugt verwendet.

5.2 C>A-Transversion in Exon 29 des PKD1-Gens

Die PKD der Perserkatze ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die vor allem durch Nierenzysten charakterisiert wird. Durch Kopplungsanalyse wurde das PKD1-Gen als möglicher Träger einer krankheitsauslösenden Mutation identifiziert.

In dieser Arbeit wird eine C>A-Transversion an Position 142 im Exon 29 des felines PKD1-Gens beschrieben, die bei 95 % der untersuchten Perserkatzen mit Nierenzysten nachzuweisen war. Der Austausch der Base Cytosin des Wildtypallels mit der Base Adenin hat zur Folge, dass an dieser Stelle fälschlicherweise ein Stopcodon vorliegt, so dass es aller Wahrscheinlichkeit nach während der Translation zum vorzeitigen Abbruch der Proteinkette kommt.

5.2.1 Verwendung der RFLP-Analyse

Zum Screening einer Stichprobe der Perserkatzenpopulation wurde eine RFLP-Analyse mit dem Restriktionsenzym MlyI verwendet. Unabhängig vom Vorhandensein der C>A-Transversion im Exon 29 besaßen alle Amplifikate eine Schnittstelle im Intron 27. Diese Schnittstelle diente als interne Positivkontrolle der Reaktion, so dass eine eventuell fehlgeschlagene Reaktion nicht mit einem negativen Testergebnis zu verwechseln war. Mutierte Allele besaßen zwei Schnittstellen und wurden daher in drei Fragmente geschnitten. Im Falle einer Heterozygotie bezogen auf die untersuchte Mutation wurden vier Banden nachgewiesen. Mit Längen von 208, 268, 408 und 676 bp waren sie nach Auftrennung im 2 %igen Agarosegel problemlos voneinander und von noch nicht geschnittenen PCR-Produkten zu unterscheiden. Damit konnte je nach Bandenmuster eindeutig das Vorliegen der C>A-Transversion im Exon 29 bestätigt oder verneint werden.

5.2.2 Vorkommen der C>A-Transversion bei Perserkatzen

Bei der Perserkatze ist die Erbkrankheit PKD die häufigste Ursache für Nierenzysten, wie es auch in dieser Studie belegt werden konnte. 95 % der Katzen mit sonographisch oder pathologisch-anatomisch beziehungsweise -histologisch nachweisbaren Nierenzysten zeigten die C>A-Transversion. Jedes dieser Tiere war bezogen auf diese Mutation heterozygot. Im Gegensatz dazu war bei keinem Tier ohne Nierenzysten die Mutation im Exon 29 vorhanden. Sie waren alle homozygot für das Wildtypallel. Unter diesen Katzen befand sich der Proband 1604/05, der zwar keine Nierenzysten dafür aber multiple Leberzysten zeigte. Daher scheint, zumindest bei

diesem Tier, das alleinige Auftreten von Leberzysten nicht mit der C>A-Transversion im Exon 29 und auch nicht mit der Erkrankung PKD in Zusammenhang zu stehen.

Unter den untersuchten Perserkatzen befanden sich 46 Tiere, deren Verwandtschaftsverhältnisse in vier Familienstammbäumen dargestellt werden konnten. Bei allen von der Erkrankung betroffenen Familienmitgliedern war die C>A-Transversion zu finden. Dagegen war kein einziges gesundes Tier in den Familien und auch keines von den anderen untersuchten gesunden Perserkatzen Träger der Mutation. Diese Beobachtungen sprechen für die Mutation als tatsächlichen Auslöser der PKD. Das Vererbungsmuster in den Familien entspricht dem erwarteten autosomal-dominanten Vererbungsmodus. Sowohl männliche als auch weibliche Tiere sind gleichermaßen betroffen und nach Anpaarung von PKD-freien Tieren findet man keine von der Erkrankung betroffenen Nachkommen. Symptomfreie Träger der Mutation, wie sie bei rezessiv vererbten Defekten vorkommen, wurden, zumindest in diesen Familien, nicht gefunden.

Mit diesen Ergebnissen konnte die von Lyons et al. (2004) publizierte Mutation im Exon 29 auch in einer Stichprobe deutscher Perserkatzen nachgewiesen werden. Die ADPKD des Menschen zeichnet sich unter anderem durch die hohe Zahl unterschiedlicher Mutationen im PKD1-Gen aus, die zum Teil nur in einzelnen Familien beobachtet werden. In dieser Studie wurden sowohl im PKD1-Gen selbst als auch am Übergang des TSC2-Gens zum PKD1-Gen keine weiteren auslösenden Mutationen gefunden. Das Auftreten der gleichen Mutation in der deutschen und in der amerikanischen Population lässt auf einen hohen Verwandtschaftsgrad zwischen den beiden Populationen schließen. Abweichend von den Ergebnissen dieser Arbeit wiesen in der untersuchten amerikanischen Stichprobe jedoch ausnahmslos alle zystenpositiven Perserkatzen die C>A-Transversion auf.

Als nicht-erbliche Ursachen von Nierenzysten können insbesondere bei älteren Tieren andere Nierenerkrankungen, wie z.B. Nephritis, Fibrose, Schrumpfnieren oder Nierentumore sowie die Nephrotoxizität einiger Arzneimittel und anderer chemischer Substanzen eine Rolle spielen. Bei jungen Tieren kommt ursächlich die renale Dysplasie, eine angeborene, mit Zysten einhergehende Entwicklungsstörung der Nieren, in Betracht. Unter den Probanden befanden sich vier Perserkatzen, die zwar zystenpositiv waren, bei denen allerdings die C>A-Transversion im Exon 29 nicht nachweisbar war. Bei einem dieser Tiere handelte es sich um eine einjährige Katze, die eine einzelne große Zyste aufwies und daher als zystenpositiv eingestuft wurde (D2040). Zusätzlich diagnostizierte man ultrasonographisch ein hochgradig verändertes Nierenparenchym unbekannter Ursache. Daher ist in diesem Fall anzunehmen, dass es sich entweder um eine erworbene Nierenzyste oder um eine angeborene Zyste anderer Ursache handelte. Die zweite Katze (S536/03) war acht Jahre alt und wies mehrere vereinzelt liegende Nierenzysten auf. Weiterhin fand sich histologisch im Parenchym ein lymphoplasmazelluläres Infiltrat unter Beteiligung zahlreicher eosinophiler Granulozyten. Die Ätiologie der Nierenveränderung konnte nicht näher bestimmt werden. Aufgrund der Entzündungszellinfiltration sind bei dieser Katze erworbene Zysten in Betracht zu ziehen. Die dritte Katze (D2009) wurde bei einer Ultraschalluntersuchung im Alter von zwei Jahren ebenfalls aufgrund einer Einzelzyste, allerdings ohne weitere Nierenbefunde, als zystenpositiv bewertet. Die vierte Katze (D2577) unbekannter Al-

ters zeigte multiple Zysten in Niere und Leber. Auch bei diesen beiden Tieren könnten vorausgegangene pathologische Veränderungen im Nieren- und Leberparenchym zur Ausbildung der Zysten geführt haben. Gerade bei den letzten beiden Katzen müssen allerdings auch eine de novo Mutation im PKD1-Gen oder Mutationen anderer Gene (z.B. des PKD2-Gens), wie sie beim Menschen zu beobachten sind, in Betracht gezogen werden. Solche Mutationen können in somatischen Zellen sowie in der Keimbahn auftreten. Diese letztere Variante hat zur Folge, dass die Mutation auch an die Nachkommen weiter vererbt wird. Ein Nachweis über den hier verwendeten Gentest ist jedoch nicht möglich. Die PKD1-Sequenz der Katze mit der Nummer D2577 wurde mit den zur Verfügung stehenden PCR-Systemen amplifiziert und sequenziert. Bei dieser Katze fanden sich insgesamt 16 Sequenzvarianten. Allerdings war hierunter keine Mutation, die Auswirkungen auf das Genprodukt haben könnte. Ein Teil dieser Daten ist bereits publiziert worden (Kappe et al., 2005).

5.2.3 Vorkommen der C>A-Transversion bei Katzen, die nicht der Rasse Perserkatze angehören

Ein ähnliches Ergebnis findet sich auch bei den untersuchten Tieren der Rasse Exotic Shorthair: Alle Tiere mit sonographisch nachweisbaren Nierenzysten waren heterozygot für die C>A-Transversion (n = 3), dagegen war keine der zystenfreien Katzen Träger der Mutation (n = 3). Die Rasse Exotic Shorthair ist eine amerikanische Neuzüchtung, die vorwiegend aus Kreuzungen zwischen Perserkatzen und amerikanischen Kurzhaarkatzen entstanden ist (Loxton, 1976). Somit ist zu vermuten, dass die PKD beziehungsweise die auslösende Mutation über Einkreuzung von PKD-betroffenen Perserkatzen in die Zucht gelangte.

Zu den Probanden zählten vier Katzen, die phänotypisch den Europäisch Kurzhaarkatzen (EKH) zugeordnet wurden. Der Begriff Europäisch Kurzhaar ist etwas irreführend. Rassekatzen, die zu den Europäisch Kurzhaarkatzen gehören, stammen ursprünglich aus Skandinavien und werden mit eigenem Zuchtstandard gezüchtet. Im Gegensatz zu den Britisch Kurzhaarkatze, die mit Perserkatzen gekreuzt wurden, entwickelte sich die Europäisch Kurzhaar ohne den Einfluss von Perserkatzen (Verhoef-Verhalle, 2002). Die Rassezugehörigkeit in dieser Arbeit wurde den Tagebüchern des Instituts für Veterinär-Pathologie und den jeweiligen Untersuchungsanträgen entnommen. Unter der Abkürzung „EKH“ ist in diesem Fall eine kurzhaarige Hauskatze zu verstehen, deren genaue Rassezugehörigkeit nicht näher bestimmbar war.

Alle vier Tiere wurden aufgrund von mindestens einer Nierenzyste als zystenpositiv bewertet, wobei aber nur eine Katze auch in der RFLP-Analyse positiv für die untersuchte Mutation war. Dieses Tier (Proband S141/06) wies multiple Nierenzysten auf. Zwei der Katzen ohne nachweisbare Mutation (Proband S422/03 und S1132/06) zeigten ebenfalls ein recht typisches Bild der PKD mit multiplen Nierenzysten ohne Hinweise auf primär zugrunde liegende Nierenveränderungen. Proband S422/03 hatte zusätzlich sogar Zysten in der Leber und im Pankreas. Die dritte Katze ohne die untersuchte Mutation (Proband S692/05) hatte nur eine einzelne nach-

weisbare Zyste in der Niere. Damit konnte nur bei 25 % ($n = 1$) der untersuchten kurzhaarigen Hauskatzen (EKH) ein Zusammenhang zwischen Nierenzysten und der Mutation im Exon 29 hergestellt werden. Bei der ätiologischen Beurteilung von Nierenzysten bei Nicht-Perserkatzen ist zu berücksichtigen, dass der Erkrankung neben primären Nierenveränderungen durchaus Mutationen zugrunde liegen können, die noch nicht durch einen Gentest erfassbar sind, aber auf die Nachkommen vererbt werden können. Um die PKD diagnostizieren zu können, ist in solchen Fällen eine genauere Familienanamnese notwendig, die gegebenenfalls Hinweise auf eine erbliche Ursache liefert.

Weiterhin gehörte eine zystenpositive langhaarige Hauskatze zu den Probanden. Es handelte sich um ein Fundtier, bei dem die Elterntiere und damit die Verwandtschaft zu einer bestimmten Rasse nicht bekannt waren. Der Phänotyp ließ nur aufgrund der Felllänge eine Perserkatze unter den Ahnen vermuten. Diese Katze war in der RFLP-Analyse heterozygot für die untersuchte Mutation. Daher kann in ihrem Fall die Ursache der Zystennieren in der C>A-Transversion des PKD1-Gens gesehen werden. Aufgrund der Felllänge und des Analyseergebnisses ist anzunehmen, dass sich unter den Vorfahren des Tieres eine Perserkatze befand, die die Mutation an ihre Nachkommen vererbte.

Eine Katze mit einer histologisch diagnostizierten Zyste gehörte der Rasse Russisch Blau an. Aufgrund der Einzelzyste wurde sie als zystenpositiv bewertet. Allerdings konnte die C>A-Transversion nicht als auslösende Mutation nachgewiesen werden. In die ursprünglich aus Russland stammende Zuchtlinie der Russisch Blau wurden Blue-Point-Siamkatzen eingekreuzt. Über verwandtschaftliche Beziehungen zu den Perserkatzen ist nichts bekannt (Verhoef-Verhalle, 2002).

Eine andere Katze wurde vorberichtlich als Mischlingskatze bezeichnet. Sie wurde in die Untersuchung aufgrund von Teleangiektasien in der Leber aufgenommen. Nierenzysten bestanden dagegen nicht. Ein Bezug zwischen den Leberveränderungen und der C>A-Transversion im Exon 29 konnte nicht hergestellt werden, da der Proband in der RFLP-Analyse homozygot für das Wildtypallel war.

5.3 Die homozygote Mutationen des PKD1-Gens ist ein Letalfaktor

Unter der Annahme, dass es sich bei der PKD um eine autosomal-dominante Erbkrankheit handelt, sind nach der Hardy-Weinberg-Verteilung in der untersuchten Stichprobe von 153 Perserkatzen 14 homozygote Merkmalsträger zu erwarten. Unter den Probanden fand sich jedoch kein einziges homozygotes Tier, so dass die beobachtete Verteilung der Genotypen im Chi-Quadrat-Test signifikant vom Erwartungswert abwich (χ^2 , 1FG, $p < 0,001$). In der Untersuchung von Lyons (2004) konnte ebenfalls kein homozygoter Merkmalsträger identifiziert werden (Lyons et al., 2004). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die homozygot vererbte Mutation des PKD1-Gens ein Letalfaktor ist (Biller et al., 1996).

5.4 Eignung eines Gentests für die Diagnose der PKD

Durch Aufdeckung der molekulargenetischen Grundlage der PKD der Perserkatze steht neben dem Ultraschall der Gentest als weiteres diagnostisches Hilfsmittel zur Verfügung. Die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung von Perserkatzen in Bezug auf Nierenzysten wurden mit den Ergebnissen des Gentests verglichen. Bei 97,4 % der Perserkatzen stimmte das Vorhandensein beziehungsweise Fehlen von Nierenzysten mit dem positiven beziehungsweise negativen Nachweis der Mutation überein. Betrachtet man nur die zystenpositiven Perserkatzen, waren 95 % der Tiere mit Nierenzysten Träger der Mutation.

Das Ziel der meisten Züchter ist es, ihre Tiere möglichst bald zu verkaufen oder als Zuchttiere einzusetzen. Allerdings lassen die Zuchtverbände wie z. B. der 1. DEKZV (Erste Deutsche Edelkatzenzüchter-Verband) nur Perserkatzen zur Zucht zu, die frei von Nierenzysten sind. In den Zuchtrichtlinien des Verbandes heißt es: „Um eine erbliche polyzystische Erkrankung (PKD) auszuschließen, wird vor allem für Katzen der Rassen PER/EXO, BRI [Perser, Exotic Shorthair, Britisch Kurzhaar] eine Ultraschalluntersuchung der Organe des Bauchraumes empfohlen.“ Nach § 11b Absatz 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 ist es „verboten, Wirbeltiere zu züchten (...), wenn damit gerechnet werden muss, dass bei der Nachzucht, den (...) Tieren selbst oder deren Nachkommen erblich bedingt Körperteile oder Organe für den artgemäßen Gebrauch fehlen oder untauglich oder umgestaltet sind und hierdurch Schmerzen, Leiden oder Schäden auftreten“. Die PKD der Perserkatze ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit, die im Alter von durchschnittlich sieben Jahren zur Niereninsuffizienz führt. Damit hat die Diagnose PKD bei dieser Rasse Tierschutzrelevanz und die Forderung nach PKD-freien Zuchttieren durchaus seine Berechtigung.

Bisher war die Ultraschalldiagnose für die Zuchtzulassung maßgeblich. Der Defekt des PKD1-Gens führt bereits in der fetalen Niere zur Anlage von Zysten. Diese füllen sich jedoch erst im Laufe der Zeit mit Flüssigkeit, so dass sie frühestens bei Welpen ab einem Alter von etwa 7 Wochen sonographisch nachweisbar sind. Aber erst im Alter von zehn Monaten ist eine Diagnose von Nierenzysten mit 98 %iger Sicherheit möglich. Strenggenommen reicht der morphologische Nachweis von Nierenzysten jedoch nicht aus, um die Erbkrankheit PKD diagnostizieren zu können.

Sieht man sich in diversen Internetforen der Katzenzüchter um, stößt man auf mehr oder weniger qualifizierte Beiträge, die den Zuchtausschluss ablehnen. Begründet wird diese Meinung damit, dass zum Einen der Nachweis der Erblichkeit allein aufgrund eines Ultraschallbefundes nicht erbracht ist und zum Anderen, dass auch eine Katze mit Nierenzysten ein beschwerdefreies Leben vor sich haben könnte.

Hier liegt in mehreren Punkten der große Vorteil des Gentests. Ein positives Testergebnis bedeutet, dass das untersuchte Tier Träger einer Mutation ist, die massive Auswirkung auf das Protein Polyzystin 1 hat. Die Untersuchung der Perserkatzenfamilien mit polyzystischen Nieren zeigte, dass ausnahmslos alle betroffenen Katzen auch Mutationsträger waren. Daher kann da-

mit gerechnet werden, dass auch ein Teil der Nachkommen eines positiv getesteten Tieres gemäß der Mendelschen Verteilung polyzystische Nieren entwickeln wird.

In dieser Studie konnte durch Screening der zur Verfügung stehenden Perserkatzen gezeigt werden, dass 95 % der Tiere mit Nierenzysten Träger der Mutation waren. Damit ist bei einer im Ultraschall zystenpositiven Perserkatze die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, dass ihre Erkrankung erblich ist. Der endgültige Nachweis der Erbkrankheit PKD ist jedoch erst mit dem Gentest möglich.

Bereits zum Geburtszeitpunkt des Welpen können Blutproben genommen und das Tier auf seinen PKD-Status untersucht werden. Alternativ zur Blutabnahme ist die Probenentnahme aus Schleimhautabstrichen relativ stressfrei zu bewerkstelligen. Der Gentest, insbesondere in Form einer RFLP-Analyse, ist eine einfach und kostengünstig durchführbare Methode, die bei Vorhandensein der Mutation im Exon 29 ein eindeutiges Ergebnis ohne Spielraum für Interpretationen liefert. Aufgrund des frühzeitigen Ergebnisses können betroffene Tiere bald aus der Zucht genommen und kastriert werden. Der Züchter erspart sich so Haltungskosten, die entstünden, wenn er das Tier bis zu einem sicheren Ultraschallergebnis im zehnten Lebensmonat behalten würde. Stattdessen können Welpen baldmöglichst an Liebhaber ohne züchterische Ambitionen abgegeben werden.

Bisher mussten Nierenzysten bei jedem Zuchttier durch eine Ultraschalluntersuchung ausgeschlossen werden. Durch den molekularbiologischen Nachweis der Mutation im Exon 29 wäre das Testen jeder Katze nicht mehr notwendig. Ist die Mutation schon bei den Eltern nicht nachweisbar, so wird sie auch bei den Nachkommen nicht zu finden sein.

Der unbestreitbare Vorteil der Ultraschalluntersuchung liegt darin, dass alle von Nierenzysten betroffenen Tiere durch eine Untersuchung von erfahrenen Tierärzten mit einem geeigneten Ultraschallgerät erfasst werden können. Bei 5 % der im Ultraschall positiven Perserkatzen fehlte die C>A-Transversion. Auch gab es in der vorliegenden Studie keine einzige Katze mit Mutation aber ohne nachweisbare Zysten.

Da die Abwesenheit der C>A-Transversion bei 5 % der Perserkatzen nicht das Vorhandensein einer anderen Mutation ausschließt, können diese Tiere dennoch als potentielle Vererber einer bislang noch unbekannt Mutation nicht ausgeschlossen werden. Beim Menschen gibt es viele Familien mit PKD, bei denen die auslösende Mutation nicht bekannt ist. Bei ihnen wird die Diagnose ARPKD oder ADPKD anhand des Ultraschallbefundes in Verbindung mit der Familienanamnese gestellt. Ein ähnliches Verfahren in Anlehnung an die PKD-Diagnostik des Menschen wäre auch bei der Katze in Fällen von eventuell ererbten Nierenzysten möglich.

Nur wenn zystenpositive Tiere und vor allem Tiere mit nachgewiesener Mutation konsequent aus der Zucht ausgeschlossen werden, ist es möglich, die PKD der Perserkatze zu bekämpfen.

Hierbei muss man sich allerdings im Klaren sein, dass, wenn das Ausschlusskriterium nur „Nierenzyste“ lautet, möglicherweise auch Tiere von der Zucht ausgeschlossen werden, deren Erkrankung durch andere, nicht genetisch bedingte Veränderungen des Parenchyms verursacht werden.

Auch wenn der Gentest positiv ausfällt, ist das nicht ihr Todesurteil. Über das Ausmaß der Erkrankung kann der Gentest keinerlei Auskunft geben, auch nicht, ob und wann Symptome einsetzen.

Der häufigste Grund für eine Ultraschalluntersuchung der Nieren bei Perserkatzen ist die Untersuchung zum Ausschluss von Zysten, damit das Tier für die Zucht zugelassen werden kann. In dieser Studie wurden die meisten Katzen innerhalb der ersten beiden Lebensjahre untersucht. Es handelte sich um 45 % der mutationspositiven Perserkatzen ($n = 28$) und 41 % der mutationsnegativen Katzen ($n = 24$). Daher fand hier bereits eine gewisse Vorselektion der Stichprobe statt. Bei Einsetzen klinischer Symptome sind Perserkatzen mit PKD durchschnittlich sieben Jahre alt (Biller et al., 1996). Ob die untersuchten Katzen dieser Studie bereits Zeichen einer Niereninsuffizienz hatten, ist nicht bekannt. Daher konnte das Datenmaterial in dieser Hinsicht nicht weiter aufgeschlüsselt werden. Allerdings lag der Anteil der untersuchten Perserkatzen, die die Mutation nicht aufwiesen und älter als sieben Jahre alt waren, bei sieben Prozent ($n = 4$). Das älteste dieser Tiere war 20 Jahre alt. Dagegen waren in der Gruppe der Perserkatzen mit Mutation nur 4 % ($n = 2$) älter als sieben Jahre. Diese Katzen waren neun und zwölf Jahre alt. Das spricht für die deutlich geringere Lebenserwartung von Mutationsträgern. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse von Meyer-Lindenberg und Mitarbeitern (1998). Hier wurden Perserkatzen mit Nierenzysten und einem durchschnittlichen Alter von 6,6 Jahren untersucht ($n = 57$). 15 Monaten nach Diagnosestellung war bereits über die Hälfte der betroffenen Katzen aufgrund der Niereninsuffizienz verstorben.

5.5 Ist eine Einzelzyste für die Diagnose der PKD ausreichend?

In dieser Studie wurden vier Katzen untersucht, die laut dem ultrasonographischen oder pathologischen Befund explizit nur eine Einzelzyste aufwiesen. Hierbei handelte es sich um zwei Perserkatzen, die Katze der Rasse Russisch Blau und eine Europäisch Kurzhaarkatze.

Vor allem bei Jungtieren, aber auch bei älteren Tieren, besteht die Gefahr, dass aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens des Ultraschallgerätes nur eine singuläre Nierenzyste nachweisbar ist, obwohl weitere Zysten vorhanden sind. Ebenso können bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung Zysten, die weder in der Nähe der Nierenoberfläche noch in der begutachteten Schnittebene liegen, übersehen werden. Aufgrund des autosomal-dominanten Erbgangs der PKD bei Perserkatzen und dem Bestreben, möglichst alle Merkmalsträger aus Zuchtbeständen zu entfernen, wird schon bei einer Nierenzyste die Erkrankung PKD angenommen (Gerwing et al., 1999; Herzog, 2001). Um die Diagnosen zu vereinheitlichen, wurden in dieser Arbeit alle Katzen unabhängig von der Rasse ab einer nachweisbaren Zyste als zystenpositiv eingestuft.

Im Falle der vier Katzen mit Einzelzyste war die C>A-Transversion im Exon 29 des PKD1-Gens nicht nachzuweisen. Da für diese Tiere weiterhin keine Informationen über Nierenzysten innerhalb der Familie vorliegen, kann über die Erbllichkeit der Zysten keine Aussage getroffen

werden. So ist anzunehmen, dass es sich bei den Zysten der vier Tiere um Zufallsbefunde handelte, die nicht im Zusammenhang mit dem Polyzystischen Syndrom standen.

Dennoch ist es insbesondere bei einer Perserkatze aus den oben genannten Gründen berechtigt, bereits bei einer nachweisbaren Zyste von der Möglichkeit des Polyzystischen Syndroms auszugehen. Unterstützt wird diese Ansicht durch die Beobachtung, dass auch Katzen, die nur eine Zyste in einer Niere aufwiesen, zystenpositive Nachkommen hatten (Biller, 2000). In Zweifelsfällen einer morphologischen Untersuchung kann der Gentest über das Vorliegen der bekannten Mutation bei Perserkatzen Aufschluss geben. Ist dieser negativ, ist die Wahrscheinlichkeit einer erblichen Ursache sehr gering.

5.6 Konformationsvarianten in Intron 4 als Ursache einer

139 bp-Deletion

Häufig konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung von PCR-Produkten aus dem Genbereich von Exon 4 bis 6 eine Doppelbande oder auch eine Dreifachbande beobachtet werden. Als Ursache kamen verschiedene Amplifikate aufgrund von unspezifischer Primerbindung während der PCR oder die Amplifikation von Pseudogenen in Betracht. In diesem Fall konnte jedoch angenommen werden, dass die Amplifikate unterschiedliche Konformationen bildeten, die in der Gelelektrophorese unterschiedliche Laufeigenschaften besaßen.

Eine Sequenzanalyse ergab, dass im Intron 4 ein Inverted Repeat von sechs Basen und ein G-reicher Repeat von acht Basen zu finden sind. Liegt die DNS einzelsträngig vor, können die zu einander komplementären Sequenzen eines Repeats so aneinander binden, dass sich der dazwischen liegende Sequenzabschnitt des Einzelstranges zu einer Schleife (Hairpin-Loop) legt. Im DNS-Doppelstrang kann sich durch versetzte Fehlpaarungen der G-reichen Repeats eine Doppelschleife ausbilden. Jede dieser Konformationsvarianten kann die Laufeigenschaft der DNS im Agarosegel beeinflussen. Der Einfluss der DNS-Konformation auf das Laufverhalten in Polyacrylamidgelen wurde bereits für dreiarmlige asymmetrische DNS-Moleküle, die durch Bindung eines kurzen DNS-Fragmentes entstehen, beschrieben (Heuer et al., 2004). Weiterhin gibt es Untersuchungen, dass DNS mit Hairpin-Loops veränderte elektrophoretische Mobilität im Polyacrylamidgel zeigt (Baumann et al., 1989). Daher ist anzunehmen, dass die beobachteten Banden auf Höhe eines 1.300 und 1.050 bp langen DNS-Fragmentes tatsächlich aus PCR-Amplifikaten bestehen, die eine Schleifenkonformation angenommen haben.

Die ausgeprägte Fähigkeit dieses Abschnitts, Sekundärstrukturen zu bilden, könnte die Ursache der schlechten Sequenzqualitäten bei PCR-Produkten aus dem Bereich von Exon vier bis sechs sein. Möglicherweise bildeten die als Template verwendeten PCR-Produkte während der Sequenzierungsreaktion Sekundärstrukturen aus. Dadurch könnten korrektes Ablesen und Synthese durch die Polymerase behindert worden sein. Denkbar ist auch, dass Sequenzfragmente während der anschließenden Elektrophorese Sekundärstrukturen bildeten und daher die korrekte Auswertung der Sequenz erschwerten.

Der G-reiche Repeat von acht Basen flankierte exakt einen Sequenzabschnitt von 139 bp Länge, der in einigen Proben deletiert war. Die 139 bp-Deletion konnte jedoch nur unregelmäßig nach mehrfachem Reamplifizieren von PCR-Produkten in einigen Proben nachgewiesen werden. Daher scheint es sich nicht um ein Allel genomischer DNS zu handeln, dem eine Keimbahnmutation zugrunde gelegen hätte. Möglicherweise liegt eine somatische Mutation vor. Diese würde nur in wenigen Zellen vorkommen und wäre daher erst nach mehrmaligem Reamplifizieren in detektierbarer Kopienzahl vorhanden. Es ist bekannt, dass Insertionen und auch Deletionen über verschiedene Mechanismen der Mutagenese entstehen können. Hierzu gehören versetzte Fehlpaarungen, die durch direkte Repeats entstehen sowie palindromische Sequenzen wie ein Inverted Repeat, die zur Ausbildung von Sekundärstrukturen führen (Cooper und Krawczak, 1991). In der Zelle kann der Verlust von Sequenzabschnitten über die Aktivierung von Reparaturmechanismen erfolgen. Eine Arbeit von Bacolla et al. (2001) zeigte *in vitro* am Beispiel des Poly-Pyrimidin-Purin-Traktes im humanen Intron 21 des PKD1-Gens den Zusammenhang zwischen ungewöhnlichen DNS-Konformationen und Reparaturmechanismen. Tripelhelixes und Repeats in der DNS führten zu versetzten Fehlpaarungen und aktivierten zelluläre Reparaturmechanismen (Bacolla et al., 2001).

Andererseits ist es denkbar, dass es sich bei der 139 bp-Deletion um Artefakte der PCR handelte. Sie könnten entstehen, wenn sich ein Hairpin-Loop während der Elongation des Amplifikates bildet. Der Polymerase wäre es unter Umständen nicht möglich, die Sequenz der Schleife abzulesen. Sie könnte die Synthese der DNS dennoch fortsetzen, indem die Schleife einfach übersprungen würde.

Zusammen mit der 139 bp langen Deletion von Intron 4 gehen zwei potentielle alternative Donor Splice Sites verloren. Allerdings ergeben sie in Kombination mit der folgenden Acceptor Splice Site keinen sinnvollen Leserahmen. Damit scheint es naheliegend, dass keine der Splice Sites funktionell aktiv ist.

Dennoch könnte diese Deletion Einfluss auf die Proteinfunktion haben. Ein Bericht beschreibt eine 20 bp-Deletion im Intron 43 des PKD1-Gens einer thailändischen Familie. Obwohl diese Deletion weder die Erkennungssequenz einer Splice Site noch einer Branch Site beeinflusste, führte sie zu Defekten des RNS-Processings. In der mRNA fehlte das gesamte Exon 43, was wiederum eine inframe-Deletion von 97 Aminosäuren des Proteins zur Folge hatte. Diese Mutation war bei allen betroffenen Familienmitgliedern nachzuweisen (Rungroj et al., 2001). Einen Erklärungsversuch des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus lieferte eine weitere Untersuchung. Hier fand man Deletionen von 18 bp beziehungsweise 20 bp in einem Intron von 75 bp Länge des PKD1-Gens. Sie segregierten mit einer von der ADPKD betroffenen Familie (Peral et al., 1995). Da zum Zeitpunkt der Untersuchung die Exon/Intron-Struktur noch nicht analysiert war, ist nicht bekannt, um welches Exon es sich handelte. Auch in diesem Fall führten die Deletionen zu einem Spleißdefekt, ohne eine Branch, Acceptor oder Donor Site zu beschädigen. Es entstanden zwei verschiedene defekte Transkripte: das eine enthielt das betroffene Intron, das andere wies eine Deletion von 66 bp aufgrund der Aktivierung einer kryptischen Acceptor Splice Site auf. Diese Spleißfehler werden möglicherweise dadurch hervorgerufen,

dass das Intron aufgrund der Deletionen zu kurz für die Spleißosomen wird. Für einen effizienten Spleißvorgang sollten mindestens 80 bp vorhanden sein. Auch wurde in dieser Studie ähnlich wie in den eigenen Ergebnissen ein Direct Repeat von 9 bp innerhalb des betroffenen Introns entdeckt. Es wurde hypothetisiert, dass der Repeat über Fehlpaarungen die Entstehung einer Deletion begünstigte (Peral et al., 1995).

In den eigenen Untersuchungen trat die 139 bp lange Deletion im Intron 4 bei den Probanden D3143, D2582 und D2573 auf, die alle zysten negativ waren. Daher kam sie nicht als krankheitsauslösende Mutation in Frage.

In der Pathogenese der PKD besitzt das Second-Hit-Modell eine große Bedeutung. Nach diesem Modell sind zwei von einander unabhängige Mutationen nötig, die beide Allele derart schädigen, dass weder von dem einen noch von dem anderen ein funktionsfähiges Protein synthetisiert werden kann. Die Mutation des einen Allels wird über die Keimbahn vererbt. Der Merkmalsträger entwickelt jedoch erst dann eine Zyste, wenn in einzelnen Zellen eine somatische Mutation des zweiten Allels hinzukommt.

In diesem Zusammenhang kann die Deletion im Intron 4 eine große Bedeutung erlangen. Denn sie könnte als somatische Mutation in einer Zelle auftreten, wenn durch zelluläre Reparaturmechanismen eine Schleife in der DNS „repariert“ wird. Über den nachfolgenden gestörten Spleißingprozess käme es zu Synthese funktionseingeschränkter oder sogar funktionsloser Proteine. Liegt gleichzeitig eine vererbte Mutation des PKD1-Gens auf dem zweiten Allel vor, kann dieser Mangel in der betroffenen Zelle nicht mehr ausgeglichen werden. Ausgehend von dieser Zelle käme es zur Ausbildung einer Zyste.

5.7 Sequenzvarianten des PKD1-Gens

Das PKD1-Gen liegt in einer Region von 750 kb, die außerordentlich reich an CpG-Dinukleotiden ist (Harris et al., 1990; Germino et al., 1992). Der durchschnittliche G/C-Gehalt des humanen Genoms wird mit 40 bis 41 % angegeben. Hierbei gibt es deutliche regionale Unterschiede. In den intergenischen Sequenzen liegt der G/C-Gehalt bei rund 40 %, in den Genen dagegen schon bei rund 42 %. Innerhalb der Gene besitzen Introns mit knapp 41 % einen geringeren GC-Gehalt als Exons mit 52 %. Der höchste Gehalt ist mit 62 % allerdings in den sogenannten CpG-Islands zu finden (Weitzman, 2001; Cooper et al., 2004).

Das PKD1-Gen ist bekannt für seinen hohen G/C-Gehalt. Dies konnte auch für das feline PKD1-Gen bestätigt werden. Der G/C-Gehalt lag in den untersuchten Abschnitten bei 38,8 % bis 75,6 % im Exons und bei 60,0 % bis 81,1 % in den Introns.

G/C-reiche Regionen werden als Hot Spots für Mutationen angesehen, da vor allem die Cytosinreste sehr empfindlich für Desaminierungsreaktionen sind. Durch Desaminierung von Cytosin entsteht die Base Uracil, die, wenn sie nicht von der Uracil-Glykosylase erkannt wird, durch Thymin ersetzt wird. Noch empfindlicher sind methylierte Cytosinreste. Durch Desaminierung entsteht das auch natürlich in der DNS vorkommende Thymin. Dieses kann nicht so leicht durch Reparaturmechanismen erkannt und beseitigt werden. Aus diesem Grund sind im huma-

nen Genom am häufigsten C>T- beziehungsweise G>A-Transitionen zu beobachten. In G/C-reichen Regionen wie den Exons und den CpG-Islands steigt ihre Häufigkeit sogar noch an. Jeder der vier Transitionstypen kommt im Vergleich zu einer der möglichen acht Transversionen vier Mal häufiger vor. Damit sind Transitionen insgesamt etwa doppelt so häufig zu finden wie Transversionen (Krawczak et al., 1998; Jiang und Zhao, 2006).

Auch diese Beobachtung konnte im feline PKD1-Gen gemacht werden. Transitionen kamen insbesondere in den Exons doppelt so häufig vor wie Transversionen. Wie für G/C-reiche Sequenzen aus den oben genannten Gründen zu erwarten ist, überwogen in den Exons mit 28,5 % die C>T-Transitionen gefolgt von den G>A-Transitionen mit 23,8 %.

Ein wenig anders sah es in den Introns aus. Obwohl sie einen höheren G/C-Gehalt als die Exons aufwiesen, wurden mit 37,5 % die A>G-Transitionen am häufigsten identifiziert. Die C>T-Transversionen standen mit 18,8 % erst an zweiter und die T>C-Transitionen mit 12,5 % an dritter Stelle. Hier zeigte sich eine Hierarchie in der Wahrscheinlichkeit der einzelnen Basen, durch eine andere ausgetauscht zu werden, die folgendermaßen aussah: A>G>C>T. Die Introns zeigten daher sogar die Tendenz, ihren G/C-Gehalt zu erhöhen.

Auf die gesamte untersuchte Region bezogen waren die C>T-Transitionen mit 24,3 % die häufigsten Mutationen. Es folgten die A>G-Transitionen mit 18,9 % und die G>A-Transitionen mit 13,5 %.

Über die Mutationshäufigkeit in nichtkodierenden Sequenzen sind Daten für das Genom von Primaten zu finden. Deletionen und Insertionen kommen hier im phylogenetischen Baum mit einer Häufigkeit von 0,2/kb/Myr (million years) vor, wobei Deletionen doppelt so häufig zu finden sind wie Insertionen. Die Rate von Nukleotidsubstitutionen liegt in der nichtkodierenden Region sogar zehnmal höher (Saitou und Ueda, 1994). Die Anzahl der identifizierten Deletionen und Insertionen war in den untersuchten Abschnitten des PKD1-Gens mit fünf Deletionen und einer Insertion relativ begrenzt. Dennoch kann auch hier bestätigt werden, dass Deletionen häufiger als Insertionen vorkamen. In den untersuchten Sequenzabschnitten des feline PKD1-Gens konnte die Rate der Nukleotidsubstitutionen von 6/kb in den Exons und von 7/kb in den Introns ermittelt werden. Nukleotidsubstitutionen sind im feline PKD1-Gen also außerordentlich häufige Ereignisse. Dies hat für die Erkrankung PKD bei der Perserkatze in zweierlei Hinsicht Bedeutung. Zum einen ist die Möglichkeit einer De Novo-Mutation, wie sie im Zusammenhang mit der ADPKD des Menschen regelmäßig gesehen wird, im Vergleich zu Mutationen in anderen Genen wahrscheinlich höher. Weiterhin hat die hohe Mutabilität des PKD1-Gens Bedeutung im Zusammenhang mit dem Second Hit-Modell. Nach diesem Modell treten somatische Mutationen in einzelnen Zellen auf, die so gravierend sind, dass sie das bisherige Wildtypallel inaktivieren. Die Inaktivierung des Wildtypallels kann sowohl in Form von Nonsense als auch Missense Mutationen erfolgen (Qian et al., 1996; Brasier und Henske, 1997; Koptides et al., 1998). Tritt eine solche Mutation in Nieren- oder Leberzellen bei Trägern einer über die Keimbahn vererbten Mutation auf, entwickelt sich an dieser Stelle eine Zyste. Aufgrund des hohen G/C-Gehaltes und der gezeigten hohen Mutabilität scheint das PKD1-Gen für solche Mutationen prädisponiert zu sein.

5.8 Transkription des PKD1-Gens im Katzenovar

In dieser Arbeit konnte die Transkription des PKD1-Gens im feline Ovar nachgewiesen werden. Ein Klon enthielt ein PCR-Amplifikat von PKD1-spezifischer cDNA aus dem Bereich von Exon 29 bis 37. Die zugrundeliegende mRNA hat bereits die prä-mRNA-Reifung durchlaufen, da dieses Fragment ausschließlich die Exonsequenzen enthielt.

Diese Beobachtung ist insofern interessant, da die PKD1-Expression und auch die Transkription im Ovar bisher nicht beschrieben wurden. Es existiert lediglich ein Artikel über die PKD2-Expression im Ovar der Ratte (Obermüller et al., 1999) und ein Artikel über die transgene Co-Expression von Polyzystin 1 in Chinese Hamster Ovary-Zelllinien (Babich et al., 2004). Über die Bedeutung der PKD1-Expression im Ovar der Katze kann jedoch keine Aussage getroffen werden. Ovarialzysten stehen mit dem Polyzystischen Syndrom der Perserkatze nicht in Zusammenhang (Gerwing et al., 1999). Dies könnte auf eine geringe Bedeutung des Polyzystin 1 im Ovar hinweisen. Die physiologische Funktion des Ovars bleibt so vermutlich auch bei Mutationen im PKD1-Gen weitgehend unbeeinflusst.

6 ZUSAMMENFASSUNG

1. Ziel dieser Arbeit war es, eine die PKD in der deutschen Perserkatzenpopulation auslösende Mutation im feline PKD1-Gen oder einen eng mit dem PKD-Phänotyp gekoppelten Marker zu identifizieren. Auf Grundlage der Ergebnisse sollte ein direkter oder indirekter Gentest entwickelt werden. Weiterhin sollten an der Pathogenese der PKD beteiligte Strukturen des PKD1-Gens auffindig gemacht werden.
2. Die Literaturübersicht stellt die Erkrankung PKD bei der Perserkatze vor und geht auf den gegenwärtigen Kenntnisstand der Pathogenese der PKD ein. Die ADPKD des Menschen gleicht der PKD der Perserkatze in vielerlei Hinsicht. Daher wird auch diese Erkrankung einschließlich der Pathogenesemechanismen beschrieben. Das letzte Kapitel der Literaturübersicht beschäftigt sich mit dem PKD1-Gen und seinem Genprodukt, dem Polyzystin 1.
3. Für die eigenen Untersuchungen standen DNS-Proben von 166 Katzen und einem Hund zur Verfügung. Bei den Katzen handelte es sich im Wesentlichen um Perserkatzen. Hierunter befanden sich vier Familien mit bekanntem Stammbaum. Die Tiere entstammten dem Patientengut der Klinik für Kleintiere, Abteilung Chirurgie, sowie dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Anhand der ultrasonographischen oder pathomorphologischen Befunde der Nieren erfolgte die Einteilung der Probanden in die Gruppen der zystenpositiven oder -negativen Tiere.
4. Es wurden eigene Primerpaare für sechs PCR-Systeme aus den Bereichen der erwarteten Exons 4 bis 6, Exon 27 bis 30, Exon 36 bis 40 sowie von Exon 43 des PKD1-Gens bis in den kodierenden Bereich des TSC2-Gens entwickelt. Hinzu kam ein eigenes PCR-System zur Amplifikation von cDNS aus dem Bereich von Exon 29 bis 37.
5. PCR-Amplifikate von zystenpositiven und -negativen Probanden wurden nach einer ausführlichen Strukturanalyse teilweise kloniert und sequenziert, teilweise direkt sequenziert, um insbesondere heterozygote Sequenzvarianten identifizieren zu können. Der Homologievergleich zu den entsprechenden PKD1-Sequenzen von Hund und Mensch zeigte die PKD1-spezifische Amplifikation aus feline DNS. Insgesamt wurden 6.401 Basen an Sequenzinformation des PKD1-Gens der Perserkatze untersucht. Ebenso wie das humane PKD1-Gen liegt auch das feline Gen in Tail-to-Tail-Orientierung zum TSC2-Gen. 43 identifizierte Sequenzvarianten belegten, dass das feline PKD1-Gen ein hochpolymorphes Gen ist. Dies wurde auf den hohen GC-Gehalt von bis zu 81 % in den untersuchten Abschnitten zurück geführt. Die Neigung des PKD1-Gens zu Nukleotidsubstitutionen könnte auch bei der Perserkatze die Gefahr neuer PKD-auslösender somatischer oder Second Hit-Mutationen mit sich bringen.

6. Bei 95 % der zystenpositiven Perserkatzen (73 von 77) lag eine C>A-Transversion im Exon 29 des feline PKD1-Gens vor, die durch Kodierung eines Stopcodons wahrscheinlich zum vorzeitigen Abbruch der Proteinkette führte. Jedes dieser Tiere war bezogen auf diese Mutation heterozygot. Im Gegensatz dazu war bei allen Tieren ohne nachweisbare Nierenzysten (n = 76) die Mutation im Exon 29 nicht vorhanden. Das Verteilungsmuster in den Familien entsprach dem erwarteten autosomal-dominanten Vererbungsmodus. Mit diesen Ergebnissen konnte die von Lyons et al. (2004) publizierte Mutation im Exon 29 auch in einer Stichprobe deutscher Perserkatzen nachgewiesen werden. Für ein Screening erwies sich die RFLP-Analyse als sehr geeignete Methode. Eine weitere ursächliche Mutation fand sich nicht. Bei 5 % der zystenpositiven Perserkatzen (n = 4) fand sich die C>A-Transversion nicht. Bei diesen Tieren sind andere primäre Nierenerkrankungen, eine weitere Mutation im PKD1-Gen oder Mutationen anderer Gene ursächlich möglich.
7. Alle zystenpositiven Katzen der Rasse Exotic Shorthair (n = 3) waren heterozygot für die C>A-Transversion. Dagegen war keine der zystenfreien Katzen (n = 3) Träger der Mutation.
8. Nur bei 25 % (eine von vier) der untersuchten kurzhaarigen Hauskatzen (EKH) lag eine Assoziation zwischen der PKD und der Mutation im Exon 29 vor. Bei einer Katze der Rasse Russisch Blau mit einer Einzelzyste, bei einer Mischlingskatze mit Teleangiektasien in der Leber sowie bei einer Perserkatze ohne Nierenzysten, dafür aber mit multiplen Leberzysten, war die bekannte Mutation ebenfalls nicht die Ursache der Veränderungen.
9. In der untersuchten Stichprobe der Perserkatzen befanden sich keine homozygoten Merkmalsträger, was für die untersuchte Mutation als Letalfaktor spricht.
10. Die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung von Perserkatzen auf Nierenzysten und des Gentests wurden miteinander verglichen. Betrachtet man alle untersuchten Perserkatzen stimmte zu 97,4 % der positive bzw. negative Zystenbefund mit dem positiven bzw. negativen Ergebnis des Gentests überein. Der Nachweis der Erbllichkeit der PKD ist im Gegensatz zur Ultraschalluntersuchung mit dem Gentest möglich.
11. Amplifikate des Genabschnitts von Exon 4 bis 6 zeigten unterschiedliche gelelektrophoretische Laufeigenschaften, die vermutlich durch Konformationsvarianten entstanden. Die Sequenz von Intron 4 weist einen Inverted Repeat sowie einen G-reichen Repeat auf, die durch gegenseitiges Annealing und Mismatches Sekundärstrukturen in Form von Schleifen auslösen könnten. Zusätzlich wurden Fragmente dieses Abschnittes isoliert, die zwischen den genannten Repeats eine Deletion von 139 Basen aufwiesen. Es handelte sich nicht um ein Allel des PKD1-Gens, sondern um ein unregelmäßig nachweisbares Phänomen. Der Verlust von 139 Basenpaaren eines Introns könnte zu Defekten während des Spleißens und damit zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Sollte Intron 4 auch in vivo eine Prädilektionsstelle für Deletionen sein,

könnte diese Besonderheit einen möglichen Second Hit in der Pathogenese der PKD verursachen.

12. Im feline Ovar konnte gespleißte mRNS des PKD1-Gens nachgewiesen werden. Bisher gab es keine Berichte über die natürliche Expression des PKD1-Gens im Ovar.

6.1 Summary

1. Purpose of this study was to identify a mutation which causes PKD in the German Persian cat population or, alternatively, to find microsatellite markers with linkage to the PKD phenotype to develop a method of direct or indirect genetic testing based on these findings. Furthermore, it was attempted to find structures within the PKD1 gene which are involved in the pathogenesis of PKD.

2. The literature review summarises the current state of knowledge concerning PKD in Persian cats and the pathogenesis of PKD. Because of the high similarity between PKD in cats and ADPKD in humans, features of ADPKD and its pathogenesis are described. The last chapter deals with the PKD1 gene and its gene product Polycystin 1.

3. Own investigations were performed on DNA samples of 166 cats, particularly Persian cats including four families, and a dog. Samples were collected from patients of the Clinic for Small Animals and from dissected cats of the Institute of Veterinary Pathology, Justus-Liebig-University, Giessen.

Cats were classified as positive or negative for renal cysts based on the results of ultrasound or pathomorphological examination of the kidneys.

4. Six PCR primer sets were designed for amplification of exon 4 to exon 6, exon 27 to exon 30, exon 36 to 40 and exon 43 of the PKD1 gene into the coding region of the TSC2 gene. Additionally, an own primer set for amplification of cDNA including exon 29 to exon 37 was used.

5. The gene structure of these fragments was analysed. Afterwards, PCR products of cats with and without renal cysts were cloned and sequenced or direct sequencing was used to identify heterozygous mutations. The sequences were homologous to the PKD1 genes of dog and human. A total of 6,401 base pairs of the feline PKD1 gene were analysed. Like their human counterparts the putative feline TSC2 and PKD1 genes are arranged in a tail-to-tail orientation. 43 identified variants in the feline PKD1 sequence show its high polymorphic nature. It might originate from the high G/C content up to 81 % in the investigated regions. Tendency of nucleotide substitution in the PKD1 gene might be predisposing for new PKD causing somatic mutations or second hit mutations in Persian cats.

6. 95 % of the affected Persian cats (73 of 77) showed a C>A transversion in exon 29 of the feline PKD1 gene resulting in a premature stop codon and loss of a large part of the protein. In all cases the mutation was found in the heterozygous state. None of the unaffected cats (n = 76) displayed the mutation. In the families the mutation correlated with the autosomal dominant

mode of inheritance. Previous studies have identified the same mutation (Lyons et al., 2004). This mutation also occurs in the German Persian cat population. RFLP analysis is an appropriate method for a screening. No other causative mutation was found. The mutation was absent in 5 % of the affected Persian cats ($n = 4$). In these cases the disease might be caused by a primary renal disease, another mutation of the PKD1 gene or mutations of other genes.

7. All affected exotic shorthair cats ($n = 3$) showed the mutation in the heterozygous state. No unaffected cat ($n = 3$) displayed the mutation.

8. 25 % of examined domestic shorthair cats (one of four) had renal cysts associated with the mutation in exon 29. The mutation in exon 29 was not found in one cat (Russian Blue) exhibiting a single renal cyst in one kidney, a hybrid cat with teleangiectasias of the liver and a Persian cat with multiple liver cysts but without renal cysts.

9. The homozygous mutation seems to be a lethal factor since only heterozygous cats were present in the population investigated.

10. The results of ultrasound examination for renal cysts in Persian cats were compared to the results of genetic testing. Presence or absence of renal cysts was concordant with a positive or negative test result in 97.4 %. Genetic testing is capable to attest inheritance of the disease in contrast to ultrasound examinations.

11. PCR products of exon 4 to 6 showed variable electrophoretic mobility most likely generated by presumed conformation variants. Intron 4 contains an inverted repeat and a G-rich repeat which are capable to form hairpin loops due to mismatches in the sequence. Additionally, a fragment was isolated with a deletion of 139 bp between these repeats. It was not an allele of the PKD1 gene but an infrequently occurring finding. Loss of intronic 139 bp might cause failures in Pre-mRNA splicing and therefore results in defective protein function. Intron 4 could be predisposed for deletions in vivo and produce second hits in the pathogenesis of PKD.

12. Spliced mRNA of the PKD1 gene was found in the feline ovary. To our knowledge this is the first report of expression of the PKD1 gene in the ovary.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Arnould, T., Kim, E., Tsiokas, L., Jochimsen, F., Gruning, W., Chang, J.D., Walz, G., 1998. The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J. Biol. Chem.* 273, 6013-6018.
- Avner, E.D., Sweeney, W.E., Nelson, W.J., 1992. Abnormal sodium pump distribution during renal tubulogenesis in congenital murine polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7447-7451.
- Babich, V., Zeng, W.Z., Yeh, B.I., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Cai, Y., Somlo, S., Huang, C.L., 2004. The N-terminal extracellular domain is required for polycystin-1-dependent channel activity. *J. Biol. Chem.* 279, 25582-25589.
- Bacolla, A., Jaworski, A., Connors, T.D., Wells, R.D., 2001. PKD1 unusual DNA conformations are recognized by nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 276, 18597-18604.
- Baert, L., 1978. Hereditary polycystic kidney diseases (adult form): a microdissection study of two cases at an early stage of the disease. *Kidney Int.* 13, 519-525.
- Barrs, V.R., Gunew, M., Foster, S.F., Beatty, J.A., Malik, R., 2001. Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian cats and related-breeds in Sydney and Brisbane. *Aust. Vet. J.* 79, 257-259.
- Barthez, P.Y., Rivier, P., Begon, D., 2003. Prevalence of polycystic kidney disease in Persian and Persian related cats in France. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 345-347.
- Baumann, U., Frank, R., Blocker, H., 1989. Probing hairpin structures of small DNAs by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 183, 152-158.
- Bear, J.C., Parfrey, P.S., Morgan, J.M., Martin, C.J., Cramer, B.C., 1992. Autosomal dominant polycystic kidney disease: New information for genetic counselling. *Am. J. Med. Genet.* 43, 548-553.
- Beck, C., Lavelle, R.B., 2001. Feline polycystic kidney disease in Persian and other cats: a prospective study using ultrasonography. *Aust. Vet. J.* 79, 181-184.
- Bhunja, A.K., Piontek, K., Boletta, A., Liu, L., Qian, F., Xu, P.N., Germino, F.J., Germino, G.G., 2002. PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 109, 157-168.
- Biller, D.S., 2000. Das Polyzystische Syndrom. Informationsbroschüre von Royal Canin Tiernahrung GmbH & Co. KG, Köln.
- Biller, D.S., Chew, D.J., DiBartola, S.P., 1990. Polycystic kidney disease in a family of Persian cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 1288-1290.
- Biller, D.S., DiBartola, S.P., Eaton, K.A., Pflueger, S., Wellman, M.L., Radin, M.J., 1996. Inheritance of polycystic kidney disease in Persian cats. *J. Hered.* 87, 1-5.

- Biller, D.S., DiBartola, S.P., Lagerwerf, W.J., 1998. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease in Persian Cats. homepage of the cats fanciers' association, <http://www.cfa.org/articles/health/pkd.html> (22.01.08).
- Blood, D.C., Studdert, V.P., 1999. Saunders comprehensive veterinary dictionary. 2. Auflage, WB Saunders, Harcourt Brace and Company Limited, 638 p.
- Bogdanova, N., Markoff, A., Gerke, V., McCluskey, M., Horst, J., Dworniszak, B., 2001. Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* 74, 333-341.
- Boletta, A., Qian, F., Onuchic, L.F., Bhunia, A.K., Phakdeekitcharoen, B., Hanaoka, K., Guggino, W., Monaco, L., Germino, G.G., 2000. Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol. Cell. Probes* 6, 1267-1273.
- Brasier, J.L., Henske, E.P., 1997. Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 99, 194-199.
- Bukanov, N.O., Husson, H., Dackowski, W.R., Lawrence, B.D., Clow, P.A., Roberts, B.L., Klinger, K.W., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., 2002. Functional polycystin-1 expression is developmentally regulated during epithelial morphogenesis in vitro: Down-regulation and loss of membrane localization during cystogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 11, 923-936.
- Burn, T.C., Connors, T.D., Dackowski, W.R., Petry, L.R., Van Raay, T.J., Millholland, J.M., Venet, M., Miller, G., Hakim, R.M., Landes, G.M., et al., 1995. Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. The American PKD1 Consortium (APKD1 Consortium). *Hum. Mol. Genet.* 4, 575-582.
- Cannon, M.J., MacKay, A.D., Barr, F.J., Rudorf, H., Bradley, K.J., Gruffydd-Jones, T.J., 2001. Prevalence of polycystic kidney disease in Persian cats in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 149, 409-411.
- Chapman, A.B., Johnson, A.M., Rainguet, S., Hossack, K.F., Gabow, P.A., Schrier, R.W., 1997. Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1292-1297.
- Chernova, M.N., Vantorpe, D.H., Clark, J.S., Alper, S.L., 2005. Expression of the polycystin-1 C-terminal cytoplasmic tail increases Cl channel activity in *Xenopus* oocytes. *Kidney Int.* 68, 632-641.
- Cooper, D.N., Krawczak, M., 1991. Mechanisms of insertional mutagenesis in human genes causing genetic disease. *Hum. Genet.* 87, 409-415.
- Cooper, G.M., Brudno, M., Stone, E.A., Dubchak, I., Batzoglou, S., Sidow, A., 2004. Characterization of evolutionary rates and constraints in three mammalian genomes. *Genome Res.* 14, 539-548.

- Dackowski, W.R., Luderer, H.F., Manavalan, P., Bukanov, N.O., Russo, R.J., Roberts, B.L., Klinger, K.W., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., 2002. Canine PKD1 is a single-copy gene: genomic organization and comparative analysis. *Genomics* 80, 105-112.
- Dalgaard, O.Z., 1957. Bilateral polycystic disease of the kidneys; a follow-up of 284 patients and their families. *Dan. Med. Bull.* 4, 128-133.
- de Almeida, S., de Almeida, E., Peters, D., Pinto, J.R., Tavora, I., Lavinha, J., Breuning, M., Prata, M.M., 1995. Autosomal dominant polycystic kidney disease: evidence for the existence of a third locus in a portuguese family. *Hum. Genet.* 96, 83-88.
- DEKZV, 2004. Zuchtrichtlinie des 1. DEKZV e. V. 1. Deutscher Edelkatzen Züchterverband e. V. <http://www.1dekzv.de/> (22.1.08).
- Delmas, P., Nomura, H., Li, X., Lakkis, M., Luo, Y., Segal, Y., Fernandez-Fernandez, J.M., Harris, P., Frischauf, A.M., Brown, D.A., Zhou, J., 2002. Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J. Biol. Chem.* 277, 11276-11283.
- Demetriou, K., Tziakouri, C., Anninou, K., Eleftheriou, A., Koptides, M., Nicolaou, A., Deltas, C.C., Pierides, A., 2000. Autosomal dominant polycystic kidney disease-type 2. Ultrasound, genetic and clinical correlations. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15, 205-211.
- DiBartola, S.P., Rutgers, H.C., 1994. Disease of the Kidney. In: Sherding, R.G. (Ed.) *The Cat : Diseases and clinical management*. Vol 2, Churchill Livingstone Inc. 1994, 2. Auflage, New York, pp. 1719-1723.
- Du, J., Wilson, P.D., 1995. Abnormal polarization of EGF receptors and autocrine stimulation of cyst epithelial growth in human ADPKD. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol* 269, 487-495.
- Eaton, K.A., Biller, D.S., DiBartola, S.P., Radin, M.J., Wellman, M.L., 1997. Autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian and Persian-cross cats. *Vet. Pathol.* 34, 117-126.
- European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transkript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77, 881-884.
- Everson, G.T., Emmett, M., Brown, W.R., Redmond, P., Thickman, D., 1990. Functional similarities of hepatic cystic and biliary epithelium: studies of fluid constituents and in vivo secretion in response to secretin. *Hepatology* 11, 557-565.
- Faraggiana, T., Bernstein, J., Strauss, L., Churg, J., 1985. Use of lectins in the study of histogenesis of renal cysts. *Lab. Invest.* 53, 575-579.
- Gabow, P.A., 1990. Autosomal dominant polycystic kidney disease - more than a renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 16, 403-413.
- Gabow, P.A., 1993. Medical Progress: Autosomal dominant polycystic kidney disease (Review). *N. Engl. J. Med.* 329, 332-342.

- Gabow, P.A., Johnson, A.M., Kaehny, W.D., Kimperling, W.J., Lezotte, D.C., Duley, I.T., Jones, R.H., 1992. Factors affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 41, 1311-1319.
- Gabow, P.A., Johnson, A.M., Kaehny, W.D., Manco-Johnson, M.L., Duley, I.T., Everson, G.T., 1990. Risk factors for the development of hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hepatology* 11, 1033-1137.
- Gabow, P.A., Kaehny, W.D., Johnson, A.M., 1989. The clinical utility of renal concentrating capacity in polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 35, 675-680.
- Germino, G.G., Weinstat-Saslow, D., Himmelbauer, H., Gillespie, G.A., Somlo, S., Wirth, B., Barton, N., Harris, K.L., Frischauf, A.M., Reeders, S.T., 1992. The gene for autosomal dominant polycystic kidney disease lies in a 750-kb CpG-rich region. *Genomics* 13, 144-151.
- Gerwing, M., Michele, U., Kramer, M., Schimke, E., 1999. PKD (polycystic kidney disease) - Polyzystisches Syndrom. *Prakt. Tierarzt* 80, 374-396.
- Grahn, R.A., Biller, D.S., Young, A.E., Roe, B.A., Qin, B., Lyons, L.A., 2004. Genetic testing for feline polycystic kidney disease. *Anim. Gen.* 33, 462-504.
- Granot, Y., Van Putten, V., Przekwas, J., Gabow, P.A., Schrier, R.W., 1990. Intra- and extracellular proteins in human normal and polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int.* 37, 1301-1309.
- Grantham, J.J., Geiser, J.L., Evan, A.P., 1987. Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 31, 1145-1152.
- Gregoire, J.R., Torres, V.E., Holley, K.E., Farrow, G.M., 1987. Renal epithelial hyperplastic and neoplastic proliferation in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 9, 27-38.
- Gretz, N., Zeier, M., Geberth, S., Strauch, M., Ritz, E., 1989. Is gender a determinant for evolution of renal failure? A study in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* 14, 178-183.
- Guay-Woodford, L.M., Wright, C.J., Walz, G., Churchill, G.A., 2000. Quantitative trait loci modulate renal cystic disease severity in the mouse bpk model. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 1253-1260.
- Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Plontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., Guggiono, W.B., Germino, G., 2000. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408, 990-994.
- Harris, P.C., Barton, N.J., Higgs, D.R., Reeders, S.T., Wilkie, A.O., 1990. A long-range restriction map between the alpha-globin complex and a marker closely linked to the polycystic kidney disease 1 (PKD1) locus. *Genomics* 7, 195-206.
- Harris, P.C., Thomas, S., Ratcliffe, P.J., Breuning, M.H., Coto, E., Lopez-Larrea, C., 1991. Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. *Lancet* 338, 1484-1487.

- Hartl, D.L., 1980. Principles of population genetics. 3. Auflage, Sinauer Associates Inc., US, Sunderland, MA.
- Hateboer, N., Lazarou, L.P., Williams, A.J., Holmans, P., Ravine, D., 1999a. Familial phenotype differences in PKD11. *Kidney Int.* 56, 34-40.
- Hateboer, N., v Dijk, M.A., Bogdanova, N., Coto, E., Saggarr-Malik, A.K., San Millan, J.L., Torra, R., Breuning, M., Ravine, D., 1999b. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* 353, 103-107.
- Hateboer, N., Veldhuisen, B., Peters, D., Breuning, M.H., San-Millan, J.L., Bogdanova, N., Coto, E., van Dijk, M.A., Afzal, A.R., Jeffery, S., Saggarr-Malik, A.K., Torra, R., Dimitrakov, D., Martinez, I., de Castro, S.S., Krawczak, M., Ravine, D., 2000. Location of mutations within the PKD2 gene influences clinical outcome. *Kidney Int.* 57, 1444-1451.
- Hayashi, T., Mochizuki, T., Reynolds, D.M., Wu, G., Cai, Y., Somlo, S., 1997. Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics* 44, 131-136.
- Helmig, S., 2005. Populationsgenetische Untersuchungen am PKD1-Gen der Katze im Hinblick auf das Polyzystische Syndrom. *Vet. Med. Diss.*, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Herold, G., 2008. Innere Medizin, Ausgabe 2008. Gerd Herold, Köln, 601 p.
- Herzog, A., 2001. Pareys Lexikon der Syndrome, Erb- und Zuchtkrankheiten der Haus- und Nutztiere. 1. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin, 329-331 pp.
- Heuer, D.M., Saha, S., Kusumo, A.T., Archer, L.A., 2004. Influence of branch length asymmetry on the electrophoretic mobility of rigid rod-like DNA. *Electrophoresis* 25, 1772-1783.
- Hirschberger, J., 1987. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes. *Vet. Med. Diss.*, Gießen.
- Hossack, K.F., Leddy, C.L., Johnson, A.M., Schrier, R.W., Gabow, P.A., 1988. Echocardiographic findings in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 319, 907-912.
- Huan, Y., Van Adelsberg, J., 1999. Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and catenins. *J. Clin. Invest.* 104, 1459-1468.
- Hughes, J., Ward, C.J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millan, J.L., Gamble, V., Harris, P.C., 1995. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat. Genet.* 10, 151-160.
- Iakoubova, O.A., Dushkin, H., Beier, D.R., 1995. Localization of a murine recessive polycystic kidney disease mutation and modifying loci that affect disease severity. *Genomics* 26, 107-114.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Dackowski, W.R., Foggensteiner, L., Coleman, N., Thiru, S., Petry, L.R., Burn, T.C., Connors, T.D., Van Raay, T., Bradley, J., Qian, F., Onuchic,

- L.F., Watnick, T.J., Piontek, K., Hakim, R.M., Landes, G.M., Germino, G.G., Sandford, R., Klinger, K.W., 1997. Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 6397-6402.
- Iglesias, C.G., Torres, V.E., Offord, K.P., Holley, K.E., Beard, C.M., Kurland, L.T., 1983. Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980. *Am. J. Kidney Dis.* 2, 630-639.
- International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995. Polycystic Kidney Disease: The complete Structure of the PKD1 Gene and Its Protein. *Cell* 81, 289-298.
- Jiang, C., Zhao, Z., 2006. Mutational spectrum in the recent human genome inferred by single nucleotide polymorphisms. *Genomics* 88, 527-534.
- Kappe, E.C., Hecht, W., Gerwing, M., Michele, U., Reinacher, M., 2005. Das polyzystische Syndrom in der deutschen Perserkatzenpopulation - Vergleichende sonographische und molekulargenetische Untersuchung. *Tierärztl. Prax.* 33 (K), 413-418.
- Kim, E., Arnould, T., Sellin, L.K., Benzing, T., Fan, M.J., Gruning, W., Sokol, S.Y., Drummond, I., Walz, G., 1999. The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 4947-4953.
- Kimberling, W.J., Fain, P.R., Kenyon, J.B., Goldgar, D., Sujansky, E., Gabow, P.A., 1988. Linkage heterogeneity of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 319, 913-918.
- Kimberling, W.J., Kumar, S., Gabow, P.A., Kenyon, J.B., Connolly, C.J., Somlo, S., 1993. Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-q23. *Genomics* 18, 467-472.
- Klingel, R., 1999. Zystische Nierenerkrankungen. In: *Thiemes Innere Medizin - TIM. 1. Auflage*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Stuttgart, pp. 1369-1373.
- Klingel, R., Dippold, W., Storkel, S., Meyer zum Buschfelde, K.H., Kohler, H., 1992. Expression of differentiation antigens and growth-related genes in normal kidney, autosomal dominant polycystic kidney disease, and renal cell carcinoma. *Am. J. Kidney Dis.* 119, 22-30.
- Knippers, R., 2001. *Molekulare Genetik. 8 Edition*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Knudson, A.G., jr, 1971. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 820-823.
- Koptides, M., Constantinides, R., Kyriakides, G., Hadjigavriel, M., Patsalis, P.C., Pierides, A., Deltas, C.C., 1998. Loss of heterozygosity in polycystic kidney disease with a missense mutation in the repeated region of PKD1. *Hum. Genet.* 103, 709-717.
- Koptides, M., Deltas, C., 2000. Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and molecular pathogenesis. *Hum. Genet.* 107, 115-126.
- Koptides, M., Hadjimichael, C., Koupepidou, P., Pierides, A., Constantinou Deltas, C., 1999. Germinal and somatic mutations in the PKD2 gene of renal cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum. Mol. Genet.* 8, 509-513.

- Kraft, W., 1996. Krankheiten der Harnorgane. In: Kraft, W., Dürr, U.M. (Eds.), Katzen Krankheiten, Klinik und Therapie. 4, Verlag M. & H. Schaper GmbH & Co KG, Alfeld (Leine) - Hannover, pp. 618-619.
- Krawczak, M., Ball, E.V., Cooper, D.N., 1998. Neighboring-nucleotide effects on the rates of germ-line single-base-pair substitution in human genes. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 474-488.
- Kumar, S., Kimberling, W.J., Gabow, P.A., Kenyon, J.B., 1991. Genetic linkage studies of autosomal dominant polycystic kidney disease: search for the second gene in a large Sicilian family. *Hum. Genet.* 87, 129-133.
- Lodder, A.L., Lee, T.K., Ballester, R., 1999. Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 1487-1499.
- Loftus, B.J., Kim, U.-J., Sneddon, V.P., Kalush, F., Brandon, R., Fuhrmann, J., Mason, T., Crosby, M., Barnstead, M., Cronin, L., Mays, A.D., Cao, Y., Xu, R.X., Kang, H.-L., Mitchell, S., Eichler, E.E., Harris, P.C., Venter, J.C., Adams, M.D., 1999. Genome Duplications and Other Features in 12 Mb of DNA Sequence from Human Chromosome 16p and 16q. *Genomics* 60, 295-308.
- Loxton, H., 1976. Katzenrassen der Welt. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München.
- Lu, W., Peissel, B., Babakhanlou, H., Pavlova, A., Geng, L., Fan, X., Larson, C., Brent, G., Zhou, J., 1997. Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted *Pkd1* mutation. *Nat. Genet.* 17, 179-181.
- Lulich, J.P., Osborne, C.A., Polzin, D.J., 1995. Cystic diseases of the kidney. In: Osborne, C., Finco, D. (Eds.), Canine and feline - nephrology and urology. WB Saunders Co., pp. 466-469.
- Lyons, L.A., Biller, D.S., Erdman, C.A., Lipinski, M.J., Young, A.E., Roe, B.A., Qin, B., Grahn, R.A., 2004. Feline Polycystic Kidney Disease mutation identified in *PKD1*. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2548-2555.
- Malhas, A.N., Abuknesha, R.A., Price, R.G., 2002. Interaction of the leucine-rich repeats of polycystin-1 with extracellular matrix proteins: possible role in cell proliferation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 19-26.
- Manzati, E., Aguiari, G., Banzi, M., Manzati, M., Selvatici, R., Falzarano, S., Maestri, I., Pinton, P., Rizzuto, R., del Senno, L., 2005. The cytoplasmic C-terminus of polycystin-1 increases cell proliferation in kidney epithelial cells through serum-activated and Ca(2+)-dependent pathway(s). *Exp. Cell. Res.* 304, 391-406.
- Maxie, M.G., 1992. The Urinary System. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (Eds.), Pathology of Domestic Animals. 4 Vol 2, Academic Press, pp. 463-465.
- Meyer-Lindenberg, A., Janthur, M., Sommer, B., Nolte, I., 1998. Untersuchungen zur polyzystischen Nierendegeneration bei Perserkatzen. *Prakt. Tierarzt.* 79, 1122-1136.
- Milutinovic, J., Fialkow, P.J., Agodoa, L.Y., Philips, L.A., Rudd, T.G., Bryant, J.I., 1984. Autosomal dominant polycystic kidney disease: symptoms and clinical findings. *Q. J. Med.* 53, 511-522.

- Milutinovic, J., Fialkow, P.J., Rudd, T.G., Agoda, L.Y., Philips, L.A., Bryant, J.I., 1980. Liver cysts in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Med. Genet* 68, 741-744.
- Milutinovic, J., Rust, P.F., Fialkow, P.J., Agoda, L.Y., Philips, L.A., Rudd, T.G., Sutherland, S., 1992. Intrafamilial phenotypic expression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* 19, 465-472.
- Moy, G.W., Mendoza, L.M., Schulz, J.R., Swanson, W.J., Glabe, C.G., Vacquier, V.D., 1996. The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J. Cell. Biol.* 133, 809-817.
- Murphy, W.J., Sun, S., Chen, Z., Yuhki, N., Hirschmann, D., Menotti-Raymond, M., O'Brien, S.J., 2000. A radiation hybrid map of the cat genome: implications for comparative mapping. *Genome Res.* 10, 691-702.
- NCBI-Entre-Gene-PKD1, 2006.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=gene&dopt=full_report&list_uids=5310 (22.1.08).
- NCBI-nucleotide, AC145332.48. felis catus clone rp86-2o7p24, complete sequence.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=69749857>.
- NCBI-Nucleotide, Accession Nr. AC005600. Homo sapiens chromosome 16, P1 clone 109-9G (LANL), complete sequence.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=3522919> (22.1.08).
- NCBI-Nucleotide, Accession Nr. AC145332.48. felis catus clone rp86-207p24, complete sequence.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=69749857> (22.1.08).
- NCBI-Nucleotide, Accession Nr. AF483210. Canis familiaris polycystin-1 (PKD1) gene, partial cds.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=20514242> (22.1.08).
- NCBI-Nucleotide, Accession-Nr. L39891. Homo sapiens polycystic kidney disease-associated protein (PKD1) gene, complete cds.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=790818> (22.1.08).
- NCBI-nucleotide-human-TSC2, AC005600 Homo sapiens chromosome 16, P1 clone 109-9G (LANL), complete sequence.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=3522919>.
- NCBI-Nucleotide-murine-PKD1, AF271381. mus musculus polycystic kidney disease 1 homolog (Pkd1), mRNA.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=14276738> (22.1.08).

- NCBI-Protein, Accession EAW85554. polycystic kidney disease 1 (autosomal dominant), isoform CRA_b (Homo sapiens).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=119605960>
(22.1.08).
- Nims, N., Vassmer, D., Maser, R.L., 2003. Transmembrane domain analysis of polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease-1 (PKD1) gene: evidence for 11 membrane-spanning domains. *Biochemistry* 42, 13035-13048.
- Obermuller, N., Gallagher, A.R., Cai, Y., Gassler, N., Gretz, N., Somlo, S., Witzgall, R., 1999. The rat *pkd2* protein assumes distinct subcellular distributions in different organs. *Am J Physiol* 277, 914-925.
- Parfrey, P.S., Bear, J.C., Morgan, J., 1990. The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 323, 1085-1090.
- Parnell, S.C., Magenheimer, B.S., Maser, R.L., Rankin, C.A., Smine, A., Okamoto, T., Calvet, J.P., 1998. The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 625-631.
- Parnell, S.C., Magenheimer, B.S., Maser, R.L., Zien, C.A., Frischauf, A.M., Calvet, J.P., 2002. Polycystin-1 activation of c-Jun N-terminal kinase and AP-1 is mediated by heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 19566-19572.
- Paterson, A.D., Magistroni, R., He, N., Wang, K., Johnson, A., Fain, P.R., Dicks, E., Parfrey, P., St George-Hyslop, P., Pei, Y., 2005. Progressive loss of renal function is an age-dependent heritable trait in type 1 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 755-762.
- Patterson, M., Gonzalez-Vitale, J.C., Fagan, C.J., 1982. Polycystic liver disease: a study of cyst fluid constituents. *Hepatology* 2, 475-478.
- Pei, Y., Watnick, T., He, N., Wang, K., Liang, Y., Parfrey, P., Germino, G., St George-Hyslop, P., 1999. Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1524-1529.
- Peral, B., Gamble, V., San Millan, J.L., Strong, C., Sloane-Stanley, J., Moreno, F., Harris, P.C., 1995. Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene induced by intronic deletion. *Hum. Mol. Genet.* 4, 569-574.
- Peral, B., Millan, J.L., Henrnandez, C., Valero, A., Lathrop, G.M., Beckmann, J., Moreno, F., 1993. Estimating locus heterogeneity in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in the Spanish population. *J. Med. Genet.* 30, 910-913.
- Peral, B., Ward, C.J., San Millan, J.L., Thomas, S., Stallings, R.L., Moreno, F., Harris, P.C., 1994. Evidence of linkage disequilibrium in the Spanish polycystic kidney disease I population. *Am. J. Hum. Genet.* 54, 899-908.
- Peters, D.J., Spruit, L., Saris, J.J., Ravine, D., Sandkuijl, L.A., Fossdal, R., Boersma, J., van Eijk, R., Norby, S., Constantinou-Deltas, C.D., et al., 1993. Chromosome 4 localiza-

- tion of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat. Genet.* 5, 359-362.
- Peters, D.J., van de Wal, A., Spruit, L., Saris, J.J., Breuning, M.H., Bruijn, J.A., de Heer, E., 1999. Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *J. Pathol.* 188, 439-446.
- Ponting, C.P., Hofmann, K., Bork, P., 1999. A latrophilin/CL-1-like GPS domain in polycystin-1. *Curr. Biol.* 9, R585-588.
- Pschyrembel, W., 1998. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Vol 258. de Gruyter.
- Puri, S., Magenheimer, B.S., Maser, R.L., Ryan, E.M., Zien, C.A., Walker, D.D., Wallace, D.P., Hempson, S.J., Calvet, J.P., 2004. Polycystin-1 activates the calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 55455-55464.
- Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Xu, H., Liu, L., Ahrabi, A.K., Watnick, T.J., Zhou, F., Germino, G.G., 2002. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 16981-16986.
- Qian, F., Germino, F.J., Yiqiang, C., Zhang, X., Somlo, S., Germino, G.G., 1997. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat. Genet* 16, 179-183.
- Qian, F., Watnick, T.J., 1999. Somatic Mutation as Mechanism for Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mol. Genet. Metabol.* 68, 237-242.
- Qian, F., Watnick, T.J., Onuchic, L.F., Germino, G.G., 1996. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87, 979-987.
- Qian, F., Wei, W., Germino, G., Oberhauser, A., 2005. The nanomechanics of polycystin-1 extracellular region. *J. Biol. Chem.* 280, 40723-40730.
- Ravine, D., Gibson, R.N., Walker, R.G., Sheffield, L.J., Kincaid-Smith, P., Danks, D.M., 1994. Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *Lancet* 343, 824-827.
- Reeders, S.T., Breuning, M.H., Davies, D.E., 1985. A highly polymorphic marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317, 542-544.
- Reeders, S.T., Breuning, M.H., Ryyanen, M.A., Wright, A.F., Davies, K.E., King, A.W., Watson, M.L., Weatherall, D.J., 1986. A study of genetic linkage heterogeneity in adult polycystic kidney disease. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 99, 154-160.
- Reichle, J., DiBartola, S.P., Leveille, R., 2002. Renal ultrasonographic and computed tomographic appearance, volume and function of cats with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Vet. Radiol. Ultrasound* 43, 368-373.
- Roitbak, T., Ward, C.J., Harris, P.C., Bacallao, R., Ness, S.A., Wandinger-Ness, A., 2004. A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol. Biol. Cell.* 15, 1334-1346.

- Romeo, G., Devoto, M., Costa, G., Roncuzzi, L., Catizone, L., Zucchelli, P., Germino, G.G., Keith, T., Weatherall, D.J., Reeders, S.T., 1988. A second genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2, 8-11.
- Rossetti, S., Burton, S., Strmecki, L., Pond, G.R., San Millan, J.L., Zerres, K., Barratt, T.M., Ozen, S., Torres, V.E., Bergstralh, E.J., Winearls, C.G., Harris, P.C., 2002. The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1230-1237.
- Rossetti, S., Strmecki, L., Gamble, V., Burton, S., Sneddon, V., Peral, B., Roy, S., Bakaloglu, A., Komel, R., Winearls, C.G., Harris, P.C., 2001. Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 46-63.
- Rungroj, N., Thongnoppakhun, W., Vareesangthip, K., Sirinavin, C., Wilairat, P., Yenchitso-manus, P.T., 2001. Molecular defect of PKD1 gene resulting in abnormal RNA processing in a Thai family. *J. Med. Assoc. Thai.* 84, 1308-1316.
- Saitou, N., Ueda, S., 1994. Evolutionary rates of insertion and deletion in noncoding nucleotide sequences of primates. *Mol. Biol. Evol.* 11, 504-512.
- Scheff, R.T., Zuckerman, G., Harter, H., Delmez, J., Koehler, R., 1989. Diverticular disease in patients with chronic renal failure due to polycystic kidney disease. *Ann. Intern. Med.* 92, 202-204.
- Schwendenwein, I., 1993. Krankheiten der Niere. In: Schmidt, V., Horzinek, M.C. (Eds.), *Krankheiten der Katze. Vol 2, 1. Auflage, Fischer Verlag*, pp. 363-385.
- Stebbins, K.E., 1989. Polycystic Disease of the Kidney and Liver in an Adult Persian Cat. *J. Comp. Path.* 100, 327-330.
- Streets, A.J., Newby, L.J., O'Hare, M.J., Bukanov, N.O., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ong, A.C., 2003. Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 1804-1815.
- Sutters, M., Yamaguchi, T., Maser, R.L., Magenheimer, B.S., St John, P.L., Abrahamson, D.R., Grantham, J.J., Calvet, J.P., 2001. Polycystin-1 transforms the cAMP growth-responsive phenotype of M-1 cells. *Kidney Int.* 60, 484-494.
- Torra, R., Badenas, C., Darnell, A., Nicolaou, A., Volpini, V., Revert, L., Estivill, X., 1998. Clinical, genetic and molecular studies on autosomal dominant polycystic kidney disease. *Med. Clin. (Barc)* 110, 481-487.
- Tsiokas, L., Kim, E., Arnould, T., Sukhatme, V.P., Walz, G., 1997. Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 6965-6970.
- Verani, R.B., Silva, F.G., 1988. Histogenesis of the renal cysts in adult (autosomal dominant) polycystic kidney disease: a histochemical study. *Mod. Pathol.* 1, 457-463.
- Verhoef-Verhalle, E., 2002. *Katzen Enzyklopädie. Dörfler Edition, Nebel Verlag*, 325 p.
- Ward, C.J., Turley, H., Ong, A.C.M., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., Ratcliffe, P.J., Gatter, K., Harris, P.C., 1996. Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is

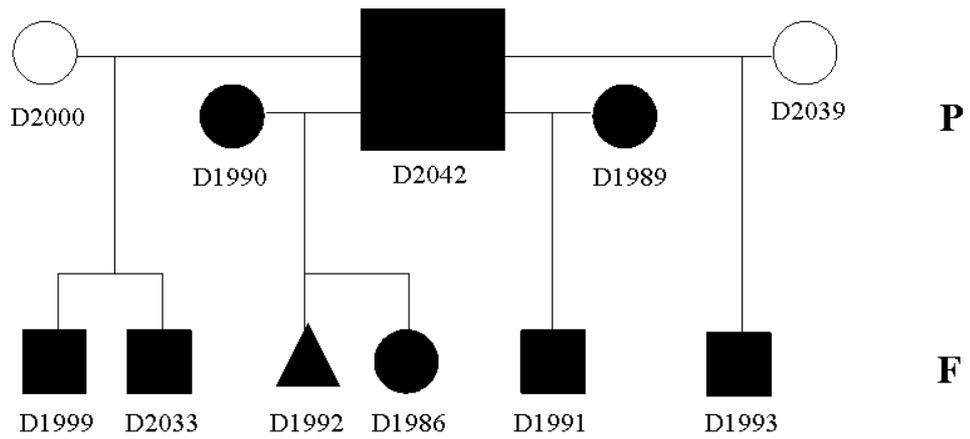
- expressed by epithelial cells in fetal, adult and polycystic kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1524-1528.
- Watnick, T., He, N., Wang, K., Liang, Y., Parfrey, P., Hefferton, D., St George-Hyslop, P., Germino, G., Pei, Y., 2000. Mutations of PKD1 in ADPKD2 cysts suggest a pathogenic effect of trans-heterozygous mutations. *Nat. Genet.* 25, 143-144.
- Watnick, T.J., Torres, V.E., Gandolph, M.A., Qian, F., Onuchic, L.F., Klinger, K.W., Landes, G., Germino, G.G., 1998. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol. Cell.* 2, 247-251.
- Watson, M.L., Wright, A.F., Macnicol, A.M., Allan, P.L., Clayton, J.F., Dempster, M., Jeremiah, S.J., Corney, G., Hopkinson, D.A., 1987. Studies of genetic linkage between adult polycystic kidney disease and three markers on chromosome 16. *J. Med. Genet.* 24, 457-461.
- Weiss, E., 2007. Harnorgane. In: Dahme, E., Weiss, E. (Eds.), *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Enke Verlag, 6. Auflage, Stuttgart, p. 175.
- Weitzman, J.B., 2001. The Human Genome Consortium paper: sequencing by collaborative mapping. *Genome Biology research news-February 2001*, (22.21.08)http://genomebiology.com/researchnews/default.asp?arx_id=gb-spotlight-20010213-20010202.
- Weston, B.S., Bagneris, C., Price, R.G., Stirling, J.L., 2001. The polycystin-1 C-type lectin domain binds carbohydrate in a calcium-dependent manner, and interacts with extracellular matrix proteins in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1536, 161-176.
- Wiesner, E., Ribbeck, R., 2000. *Lexikon der Veterinärmedizin*. 4. Auflage, Enke im Hippokraties Verlag GmbH, Stuttgart, 1627 p.
- Wilson, P.D., 1991. Aberrant epithelial cell growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* 17, 634-637.
- Wilson, P.D., Du, J., Normann, J.T., 1993. Autocrine, endocrine and paracrine regulation of growth abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney diseases. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 131-138.
- Wilson, P.D., Hreniuk, D., Gabow, P.A., 1992. Abnormal extracellular matrix and excessive growth of human adult polycystic kidney disease epithelia. *J. Cell. Physiol.* 150, 360-369.
- Wilson, P.D., Sherwood, A.C., Palla, K., Du, J., Watson, R., Normann, J.T., 1991. Reversed polarity of Na(+)-K(+)-ATPase: mislocation to apical plasma membranes in polycystic kidney disease epithelia. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 260, F420-F430.
- Woo, D.D., Nguyen, D.K., Khatibi, N., Olsen, P., 1997. Genetic identification of two major modifier loci of polycystic kidney disease progression in pcy mice. *J. Clin. Invest.* 100, 1934-1940.

- Xu, G.M., Sikaneta, T., Sullivan, B.M., Zhang, Q., Andreucci, M., Stehle, T., Drummond, I., Arnaout, M.A., 2001. Polycystin-1 interacts with intermediate filaments. *J. Biol. Chem.* 276, 46544-46552.
- Ye, M., Grantham, J.J., 1993. The secretion of fluid by renal cysts from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 329, 310-313.
- Young, A.E., Biller, D.S., Herrgesell, E.J., Roberts, H.R., Lyons, L.A., 2005. Feline polycystic kidney disease is linked to the PKD1 region. *Mamm. Genome* 16, 59-65.

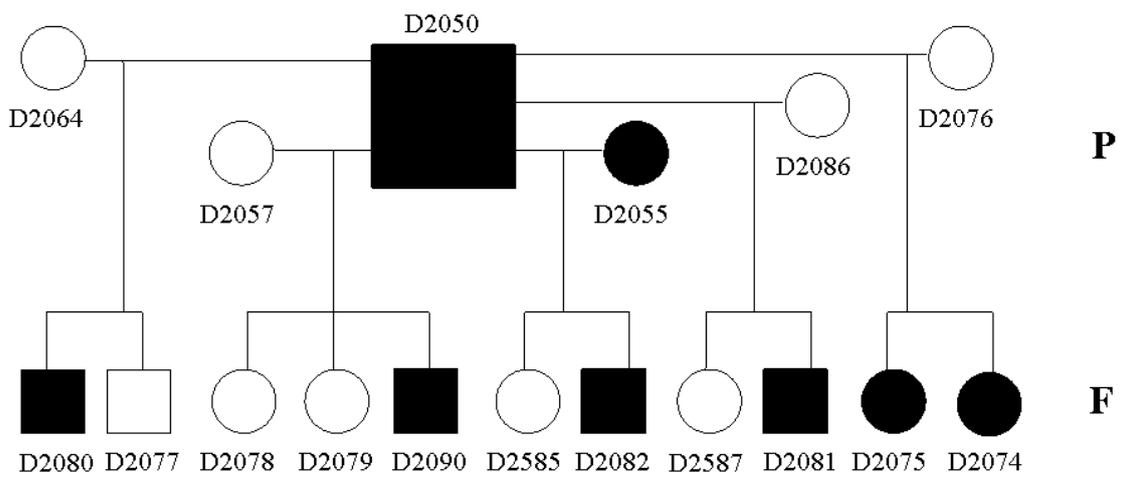
8 ANHANG

8.1 Familienstammbäume

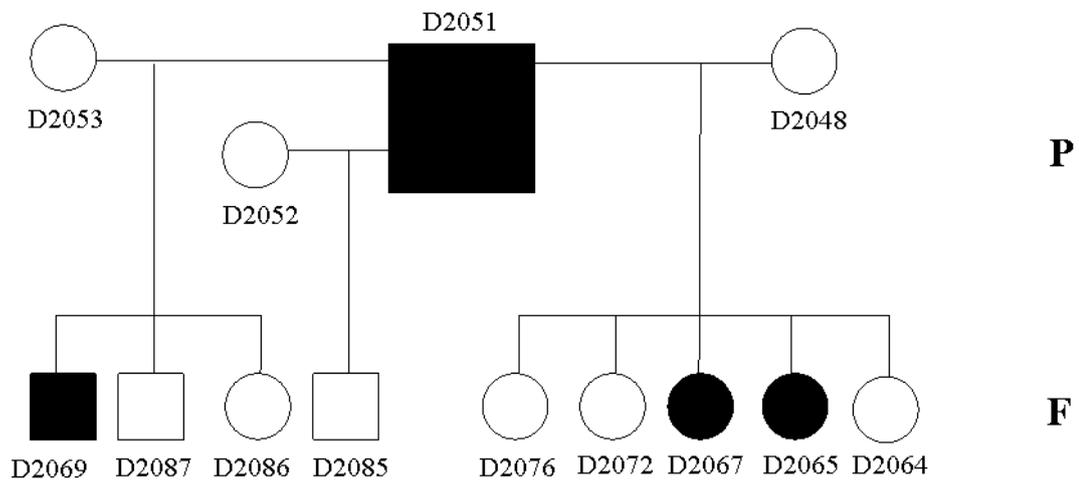
Familie A



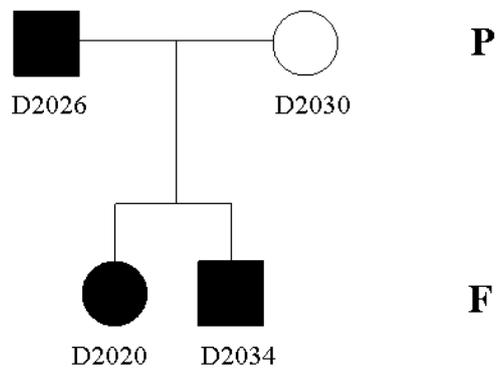
Familie B



Familie C



Familie D



- Weiblich, zystenpositiv
- Männlich, zystenpositiv
- ▲ Geschlecht unbekannt, zystenpositiv
- Weiblich, zystennegativ
- Männlich, zystennegativ

8.2 Tabellen

Tabelle 8-1: Liste der Probanden (die Legende befindet sich am Ende der Tabelle)

Probe	Katzenrasse	Herkunft	Phänotyp Nierenzysten	RFLP- Ergebnis	Geschlecht	Alter	Familie	Befundeintrag
1. D1973	Perser	CVK	nn	n	w	5M		sonographisch o.B
2. D1974	Perser	CVK	nn	n	w	1J		sonographisch o.B
3. D1977	Perser	CVK	pos	p	w	6J		Zysten an beiden Nieren
4. D1978	Perser	CVK	pos	p	w	2J		Zysten an beiden Nieren
5. D1979	Perser	CVK	nn	n	m	1J		Keine Zysten nachweisbar
6. D1980	Perser	CVK	pos	p	w	3J		Zysten an beiden Nieren
7. D1981	Perser	CVK	pos	p	m	4J		Zysten an beiden Nieren
8. D1982	Perser	CVK	nn	n	m	2J		Keine Zysten nachweisbar
9. D1983	Perser	CVK	pos	p	w	3M		Zysten an beiden Nieren
10. D1984	Perser	CVK	pos	p	m	1J		Zysten an beiden Nieren
11. D1985	Perser	CVK	pos	p	w	3M		Zysten an beiden Nieren
12. D1986	Perser	CVK	pos	p	w	1J	A	multiple Zysten an beiden Nieren
13. D1987	Perser	CVK	nn	n	m	1J		Keine Zysten nachweisbar
14. D1988	Perser	CVK	pos	p	w	1J		Zysten an beiden Nieren
15. D1989	Perser	CVK	pos	p	w	5J	A	Zysten an beiden Nieren
16. D1990	Perser	CVK	pos	p	w	3J	A	Zysten an beiden Nieren
17. D1991	Perser	CVK	pos	p	m	1J	A	Zysten an beiden Nieren
18. D1992	Perser	CVK	pos	p	k.A.	8M	A	Zysten an beiden Nieren
19. D1993	Perser	CVK	pos	p	m	k.A.	A	Zysten an beiden Nieren
20. D1995	Perser	CVK	pos	p	k.A.	k.A.		Zystenpositiv
21. D1997	Perser	CVK	pos	p	k.A.	k.A.		Zystenpositiv
22. D1999	Perser	CVK	pos	p	k.A.	k.A.	A	Zystenpositiv
23. D2000	Perser	CVK	nn	n	w	5J	A	Keine Zysten nachweisbar

Fortsetzung s. nächste Seite

Tabelle 8-1 (Fortsetzung)

Probe	Katzenrasse	Herkunft	Phänotyp Nierenzysten	RFLP- Ergebnis	Geschlecht	Alter	Familie	Befundeintrag
24. D2002	Perser	CVK	nn	n	k.A.	k.A.		Perser Colourpoint, keine Zysten nachweisbar
25. D2003	Perser	CVK	pos	p	m	1J		Zysten an beiden Nieren
26. D2004	Perser	CVK	pos	p	w	2J		Zysten an beiden Nieren
27. D2005	Perser	CVK	pos	p	w	2J		Zysten an beiden Nieren
28. D2006	Perser	CVK	pos	p	w	5J		Zystenpositiv
29. D2007	Perser	CVK	nn	n	w	3J		Keine Nierenzysten nachweisbar
30. D2008	Perser	CVK	nn	n	w	9M		Keine Nierenzysten nachweisbar
31. D2009	Perser	CVK	pos	n	m	2J		singuläre Zyste, rechte Niere
32. D2012	Perser	CVK	pos	p	m	2J		Zysten an beiden Nieren
33. D2013	Perser	CVK	nn	n	w	2J		Keine Nierenzysten nachweisbar
34. D2014	Perser	CVK	nn	n	w	3J		Keine Nierenzysten nachweisbar
35. D2015	Perser	CVK	pos	p	m	2J		multiple Zysten, beide Nieren
36. D2016	Perser	CVK	pos	p	m	1J		Zysten an beiden Nieren
37. D2017	Perser	CVK	pos	p	w	2J		Zysten an beiden Nieren
38. D2019	Perser	CVK	pos	p	w	2J		Zysten an beiden Nieren
39. D2020	Perser	CVK	pos	p	w	9M	D	Zysten an beiden Nieren
40. D2021	Perser	CVK	nn	n	m	2J		Keine Nierenzysten nachweisbar
41. D2023	Perser	CVK	pos	p	m	2M		Zysten an beiden Nieren
42. D2024	Perser	CVK	pos	p	w	3J		Zysten an beiden Nieren
43. D2026	Perser	CVK	pos	p	m	3J	D	Zystenpositiv
44. D2027	Perser	CVK	nn	n	w	3J		Keine Nierenzysten nachweisbar
45. D2028	Perser	CVK	pos	p	w	1J		Zysten an beiden Nieren
46. D2029	Perser	CVK	pos	p	w	5J		Zysten an beiden Nieren; eine große Leberzyste
47. D2030	Perser	CVK	nn	n	w	3J	D	Keine Nierenzysten nachweisbar

Fortsetzung s. nächste Seite

Tabelle 8-1 (Fortsetzung)

Probe	Katzenrasse	Herkunft	Phänotyp Nierenzysten	RFLP- Ergebnis	Geschlecht	Alter	Familie	Befundeintrag
48. D2031	Perser	CVK	nn	n	w	3J		Keine Nierenzysten nachweisbar
49. D2032	Perser	CVK	pos	p	w	1J		multiple Zysten in beiden Nieren
50. D2033	Perser	CVK	pos	p	m	2J	A	Zystenpositiv
51. D2034	Perser	CVK	pos	p	m	9M	D	Zysten an beiden Nieren
52. D2037	Perser	CVK	pos	p	w	1J		Zysten an beiden Nieren
53. D2038	Perser	CVK	nn	n	w	5J		Keine Nierenzysten nachweisbar
54. D2039	Perser	CVK	nn	n	k.A.	w	A	Keine Nierenzysten nachweisbar
55. D2040	Perser	CVK	pos	n	m	1J		Eine große Zyste, ultrasonographisch hochgradig verändertes Parenchym unbestimmter Ursache
56. D2041	Perser	CVK	nn	n	w	3J		Keine Nierenzysten nachweisbar
57. D2042	Perser	CVK	pos	p	m	5J	A	Zysten an beiden Nieren
58. D2043	Perser	CVK	nn	n	w	1J		Keine Nierenzysten nachweisbar
59. D2044	Perser	CVK	nn	n	m	2J		Keine Nierenzysten nachweisbar
60. D2045	Perser	CVK	nn	n	w	3J		Keine Nierenzysten nachweisbar
61. D2046	Perser	CVK	pos	p	w	2J		Zysten in beiden Nieren und in der Leber
62. D2047	Perser	CVK	pos	p	w	10M		Zysten an beiden Nieren
63. D2048	Perser	CVK	nn	n	w	9J	C	Keine Nierenzysten nachweisbar
64. D2050	Perser	CVK	pos	p	m	3J	B	Zysten an beiden Nieren
65. D2051	Perser	CVK	pos	p	m	6J	C	Zysten an beiden Nieren
66. D2052	Perser	CVK	nn	n	w	5J	C	Keine Nierenzysten nachweisbar
67. D2053	Perser	CVK	nn	n	w	5J	C	Keine Nierenzysten nachweisbar
68. D2054	Perser	CVK	nn	n	w	5J		Keine Nierenzysten nachweisbar
69. D2055	Perser	CVK	pos	p	w	3J	B	Zysten an beiden Nieren
70. D2056	Perser	CVK	nn	n	w	3J		Keine Nierenzysten nachweisbar
71. D2057	Perser	CVK	nn	n	w	2J	B	Keine Nierenzysten nachweisbar

Fortsetzung s. nächste Seite

Tabelle 8-1 (Fortsetzung)

Probe	Katzenrasse	Herkunft	Phänotyp Nierenzysten	RFLP- Ergebnis	Geschlecht	Alter	Familie	Befundeintrag
72. D2058	Perser	CVK	pos	p	m	5J		Zysten in beiden Nieren und in Leber
73. D2059	Perser	CVK	pos	p	w	2J		Zysten an beiden Nieren
74. D2060	Perser	CVK	nn	n	w	5J		Keine Nierenzysten nachweisbar
75. D2061	Perser	CVK	nn	n	m	1J		Keine Nierenzysten nachweisbar
76. D2062	Perser	CVK	nn	n	w	7M		Keine Nierenzysten nachweisbar
77. D2063	Perser	CVK	pos	p	w	4J		Zysten an beiden Nieren
78. D2064	Perser	CVK	nn	n	w	4J	B*C	Keine Nierenzysten nachweisbar
79. D2065	Perser	CVK	pos	p	w	4J	C	Zysten in Nieren und Leber
80. D2067	Perser	CVK	pos	p	w	4J	C	Nieren fast vollständig zystisch durchsetzt
81. D2068	Perser	CVK	pos	p	m	1J		Zysten an beiden Nieren
82. D2069	Perser	CVK	pos	p	m	1J	C	Zysten an beiden Nieren
83. D2070	Perser	CVK	nn	n	m	6J		Keine Nierenzysten nachweisbar
84. D2071	Perser	CVK	nn	n	m	6J		Keine Nierenzysten nachweisbar
85. D2072	Perser	CVK	nn	n	w	3M	C	Keine Nierenzysten nachweisbar
86. D2073	Perser	CVK	pos	p	w	6M		Zysten an beiden Nieren
87. D2074	Perser	CVK	pos	p	w	7M	B	Perser Harlekin, Zysten an beiden Nieren
88. D2075	Perser	CVK	pos	p	w	1J	B	Zysten an beiden Nieren
89. D2076	Perser	CVK	nn	n	w	2J	B*C	Keine Nierenzysten nachweisbar
90. D2077	Perser	CVK	nn	n	m	7M	B	Keine Nierenzysten nachweisbar
91. D2078	Perser	CVK	nn	n	w	6M	B	Keine Nierenzysten nachweisbar
92. D2079	Perser	CVK	nn	n	w	6M	B	Keine Nierenzysten nachweisbar
93. D2080	Perser	CVK	pos	p	m	7M	B	Zysten an beiden Nieren
94. D2081	Perser	CVK	pos	p	m	7M	B	Zysten an beiden Nieren
95. D2082	Perser	CVK	pos	p	m	8M	B	Zysten an beiden Nieren
96. D2084	Perser	CVK	pos	p	m	10M		Zysten an beiden Nieren
97. D2085	Perser	CVK	nn	n	w	3J	C	Keine Nierenzysten nachweisbar

Fortsetzung s. nächste Seite

Tabelle 8-1 (Fortsetzung)

Probe	Katzenrasse	Herkunft	Phänotyp Nierenzysten	RFLP- Ergebnis	Geschlecht	Alter	Familie	Befundeintrag
D2086	Perser	CVK	nn	n	w	3J	B*C	Keine Nierenzysten nachweisbar
D2087	Perser	CVK	nn	n	m	10M	C	Keine Nierenzysten nachweisbar
D2088	Perser	CVK	nn	n	w	4J		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2089	Perser	CVK	pos	p	w	3J		Zysten an beiden Nieren
D2090	Perser	CVK	pos	p	m	6M	B	Zysten an beiden Nieren
D2092	Perser	CVK	nn	n	w	6M		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2551	Perser	CVK	nn	n	m	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2564	Perser	CVK	nn	n	w	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2565	Perser	CVK	pos	p	w	k.A.		Zystenpositiv
D2566	Perser	CVK	pos	p	w	k.A.		Zystenpositiv
D2576	Perser	CVK	nn	n	m	2J	B	Keine Nierenzysten nachweisbar
D2577	Perser	CVK	pos	n	w	k.A.		Zysten in Nieren und Leber
D2580	Perser	CVK	pos	p	m	2J		Zystenpositiv
D2582	Perser	CVK	nn	n	w	1J		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2583	Perser	CVK	nn	n	w	1J		Zystennegativ
D2584	Perser	CVK	pos	p	w	5J		Zystenpositiv
D2585	Perser	CVK	nn	n	w	8M	B	Keine Zysten
D2586	Perser	CVK	nn	n	w	6M		Keine Zysten
D2587	Perser	CVK	nn	n	w	7M		Keine Zysten
D2590	Perser	CVK	pos	p	m	k.A.		Zystenpositiv
D2594	Perser	CVK	nn	n	w	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2596	Perser	CVK	nn	n	w	1J		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2597	Perser	CVK	nn	n	w	11M		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2598	Perser	CVK	nn	n	w	3J		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2630	Perser	CVK	nn	n	w	10M		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2631	Perser	CVK	pos	p	w	1J		zystenpositiv

Fortsetzung s. nächste Seite

Tabelle 8-1 (Fortsetzung)

Probe	Katzenrasse	Herkunft	Phänotyp Nierenzysten	RFLP- Ergebnis	Geschlecht	Alter	Familie	Befundeintrag
D2632	Perser	CVK	nn	n	m	11M		Keine Nierenzysten nachweisbar
D3143	Perser	CVK	nn	n	k.A.	k.A.		Niernprobe ohne Zysten („Nineg“)
D3142	Perser	CVK	pos	p	k.A.	k.A.		Nierenprobe mit multiplen Zysten („Nipos“)
S1087/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S1107/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S1167/02	Perser	VPI	pos	p	k.A.	k.A.		Nierenzysten, nicht-eitrig interstitielle Nephritis, Leberzysten
S1177/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S1188/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S1384/02	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S1403/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S144/05	Perser	VPI	pos	p	wk	12J		Zysten in Leber und Niere, Adenokarzinom in der Lunge
S1473/02	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S1474/02	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S1604/05	Perser	VPI	nn	n	k.A.	20J		multiple Leberzysten, keine Nierenzysten nachweisbar
S1708/03	Persermix	VPI	pos	p	mk	9J		beidseits Nierenzysten, ggr. nicht-eitrig interstitielle Nephritis, abdominaler hepatoider epithelialer Tumor
S1753/02	Perser	VPI	pos	p	k.A.	k.A.		Nierenzysten, nicht-eitrig interst. Nephritis
S2035/02	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S2145/02	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S2155/02	Perser	VPI	pos	p	k.A.	k.A.		Nierenzysten, nicht-eitrig interstitielle Nephritis

Fortsetzung s. nächste Seite

Tabelle 8-1 (Fortsetzung)

Probe	Katzenrasse	Herkunft	Phänotyp Nierenzysten	RFLP- Ergebnis	Geschlecht	Alter	Familie	Befundeintrag
S2203/02	Perser	VPI	pos	p	k.A.	7		Einzelne kleine Zysten
S278/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S369/06	Perser	VPI	nn	n	wk	4J		Nephro- und Ureterolithiasis, hgr. Dilatation des Nierenbeckens. keine Nierenzysten nachweisbar
S420/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S522/05	Perser	VPI	nn	n	wk	10J		Infarktschrumpfniere, FiP, keine Nie- renzysten nachweisbar
S536/03	Perser	VPI	pos	n	wk	8J		einzelne Nierenzysten, lymphoplas- mazelluläre Infiltrate unter Beteili- gung von eosinophilen Granulozyten
S543/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		keine Zysten nachweisbar
S626/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
S674/04	Perser	VPI	pos	p	mk	k.A.		zahlreiche Nierenzysten, nicht-eitrig interstitielle Nephritis
S717/05	Persermix	VPI	pos	p	m	7J		beidseits Nierenzysten, walnußgroße gekammerte Leberzyste, hypertrophe Kardiomyopathie, Hydrocephalus
S984/03	Perser	VPI	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
D1972	ES	CVK	nn	n	m	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
D1994	ES	CVK	nn	n	k.A.	k.A.		Keine Nierenzysten nachweisbar
D2010	ES	CVK	pos	p	w			Zysten an beiden Nieren
D2049	ES	CVK	pos	p	m	5J		Zysten an beiden Nieren
D2563	ES	CVK	nn	n	w			Keine Nierenzysten nachweisbar
D2579	ES	CVK	pos	p	w			zystenpositiv
S2036/02	Russisch Blau	VPI	pos	n	w			Histologisch eine kleine Zyste

Fortsetzung s. nächste Seite

Tabelle 8-1 (Fortsetzung)

Probe	Katzenrasse	Herkunft	Phänotyp		RFLP-Ergebnis	Geschlecht	Alter	Familie	Befundeintrag
			Nierenzysten	pos					
S141/06	EKH	VPI	pos	p	k.A.	k.A.	k.A.		multiple Nierenzysten, phänotypisch EKH, Fundtier
S692/05	EKH	VPI	pos	n	k.A.	k.A.			1 Nierenzyste, nicht-eitrig interst. Nephritis, sek. Hyperparathyreoidismus, HCM, miliaries, papilläres Alveolarkarzinom
S422/03	EKH	VPI	pos	n	k.A.	14J			multiple Zysten in Niere, Leber und Pankreas; phänotypisch EKH
S1132/06	EKH	VPI	pos	n	w	14 Wo			vereinzelt stecknadelkopfgroße Zysten, Todesursache FiP
S385/03	Hauskatze, langhaarig	VPI	pos	p	k.A.	k.A.			Nierenzysten; Fundtier, Persermix aufgrund Felllänge möglich
S1541/03	Mischling	VPI	nn	n	k.A.	k.A.			Teleangiektasien der Leber; keine Nierenzysten nachweisbar

Legende der Tabelle 8-1

EKH: Phänotyp der Europäischen Kurzhaarkatze

ES: Phänotyp der Exotic Shorthair-Katze

CVK Klinik für Kleintiere, Abteilung Chirurgie

VPI: Institut für Veterinärpathologie

nn: Zysten nicht nachweisbar

pos: zystenpositiv/mindestens eine Zyste nachweisbar

n: RFLP-Analyse negativ, keine C>A-Transversion in Exon 29

p: RFLP-Analyse positiv, C>A-Transversion in Exon 29

w: weiblich

wk: weiblich-kastriert

m: männlich

mk: männlich-kastriert

J: Jahr

M: Monat

W: Woche

Eingehende DNS-Proben erhielten eine fortlaufende Nummer beginnend mit einem „D“. Die aus dem Sektionsbetrieb des Instituts für Veterinär-Pathologie stammenden Proben erhielten eine der dort verwendeten fortlaufenden Nummern beginnend mit einem „S“.

8.3 Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte

Bachofer GmbH, Reutlingen

- UV-Transilluminator, IL-200-K, 254 nm Wellenlänge

Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

- 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäße, RNase-frei, DNase-frei
- 2,0 ml-Mikrozentrifugengefäße, RNase-frei, DNase-frei
- Multicycler PTC 200
- Reaktionsgefäße, ultradünn 0,5 ml
- Reaktionsgefäße, ultradünn 0,2 ml
- Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) 1000 µl
- Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) 200 µl
- Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) 100 µl
- Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) 20 µl
- Pipettenspitzen 10 µl, farblos
- Pipettenspitzen, 20 µl, farblos

Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ

- MetaPhor[®] Agarose
- Seakem[®] LE Agarose
- SimplyLoad[™] Quant Ladder

Epicentre, Madison, Wisconsin, USA

- FailSafe[™] PCR System
- FailSafe[™] PCR PreMix Selection-Kit

Gentra Systems, Minneapolis, USA

- Gentra Puregene[®] DNA Isolation Kit, Blood 1ml
- Gentra Puregene[®] DNA Isolation Kit, Tissue

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

- Agar-Agar, Agar für die Mikrobiologie
- Ampicillin (Natrium-Salz)
- Borsäure > 99,5 % p.a
- Chloroform
- Ethanol *Rotipuran*[®] (RNase-/DNase-frei) > 99,8 % p.a.
- Ethanol 100 % vergällt
- Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml)
- Glycerin, *Rotipuran*[®]
- Hefeextrakt
- Isopropanol (2-Propanol/ Isopropylalkohol) > 99 %
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) > 99,5 % p.a
- Latexhandschuhe *Rotiprotect*[®]
- Methylalkohol (Methanol) > 99 %
- Natriumacetat-Trihydrat
- Natriumchlorid (NaCl) krist. > 99,5 % p.a.
- Natriumhydroxid (Plätzchen) > 99 % p.a.
- Nitrilhandschuhe *N-Dex*[®]

- N,N-Dimethylformamid-Lösung > 99,9 % p.a.
- Tischzentrifuge Roth® MicroCentrifuge Model SD
- Tryptone
- X-Gal, 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β -D-Galactopyranosid
- Xylol-Ersatz *Roti-Histol*®

Chemipharm GmbH, Sulzbach

- Formaldehyd-Lösung 36 % DAB 7

Dianova GmbH, Hamburg

- Tertiäranantikörper Maus-PAP
- Ratte Anti-Maus IgG (H+L)

Dako Cytomation, Glostrup, Denmark

- Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor
- Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction

Eastman Kodak Inc, USA

- Kodak Gel-Dokumentation System Version 1.0

Eppendorf GmbH, Hamburg

- Eppendorfszentrifuge 5415 C

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

- MassRuler™ DNA Ladder, Mix, ready-to-use, (SM0403)
- O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, ready-to-use, 0,1 μ g/ μ l, (SM1133)
- O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, ready-to-use, 0,1 μ g/ μ l, (SM1153)
- O'RangeRuler™ 200bp DNA Ladder, ready-to-use, 0,05 μ g/ μ l, (SM0633)
- O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder, ready-to-use, 0,05 μ g/ μ l, (SM0613)

Fluka Feinchemikalien GmbH, Buchs, Schweiz

- 3,3'- Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)
- Diethylpyrokarbonat
- Imidazol
- Na₂HPO₄xH₂O
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Haereus Instruments GmbH, Hanau

- Zentrifuge-Labofuge 400R

Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

- pCR 2.1-TOPO® Vektor-Kit
- TOPO TA Cloning® pCR II-Topo® Kit
- Library Efficiency DH5 α -Zellen

Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen

- Vortexer IKA®-Works MS1 Minishaker

Lab Vision/NeoMarkers, Fremont, USA

- Keratin Pan Ab-3 (Klon Lu-5)

Life Sciences Int. GmbH, Frankfurt/Main

- Coverplates™

Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren

- PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin® Extract
- PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin® Extract II
- Plasmid DNA Purification NucleoSpin® Plasmid
- Proteinase K

MAGV, Maßanalytische Glas- und Laborgerätevertriebsgesellschaft mbH, Rabenau-Londorf

- Einmal-Petrischalen ohne Nocken, 94x16 mm
- Falcon Rundbodenröhrchen aus PP, 4 ml Inhalt

MBI Fermentas, St. Leon Rot

- Lambda DNA

Menzel-Gläser, Braunschweig

- Objektträger StarFrost®
- Objektträger SuperFrost®/Plus

Merck Eurolab GmbH/Merck Biosciences Ltd., Darmstadt

- Salzsäure, HCl, 1N
- Kochsalz, NaCl krist.
- KCl
- NaH₂PO₄
- KCl
- KH₂PO₄
- Papanicolaou 1b-Lösung
- Perhydrol® 30% H₂O₂ p.a.
- Saures Hämatoxylin nach Ehrlich

Mettler GmbH, Gießen

- Präzisionswaage PM 4600 Delta Range
- Präzisionswaage AE 100

Microm GmbH, Walldorf

- Mikrotom HM 335E

Miles Scientific, Naperville, Illinois/USA

- Einbettautomaten Tissue Tek®-VIP

MWG-Biotech AG, Ebersberg

- Oligonukleotide

Natutec GmbH, Frankfurt

- BioTherm™ DNA Polymerase

New England BioLabs® GmbH (NEB), Frankfurt

- Bovines Serumalbumin (BSA)

- HindIII-Restriktionsenzym
- NEBuffer 2
- NEBuffer 4
- Restriktionsenzym MlyI
- λ -Phagen-DNS

Novagen, Madison, WI, USA

- pETBlueTM-1 AccepTorTM Vector Kits

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

- Deoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) dATP/dCTP/dGTP/dTTP
- PCR Buffer Y 10x

Privileg, Quelle, Gießen

- Mikrowellengerät 7020

Pharmacia Biotech/ LKB Biochrom Ltd., Cambridge, UK

- Genequant II

Qiagen GmbH, Hilden

- EDTA EasySol, 0,5 M EDTA-Na₂ (pH 8,0)
- Qiagen[®] PCR Cloning Kits

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

- RNase A

Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande

- Tissue Tek[®] O.C.T Compound

Shimadzu Corporation, Japan

- UV-1202[®] Spektrophotometer

Serva, Heidelberg

- EDTA-Na₂·2H₂O
- Peptone from Casein

Shandon GmbH, Frankfurt/ Main, Deutschland

- Färbeautomaten Varistain 24-3

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

- bakterielle Protease Typ XXIV
- N,N-Dimethylformamid (DMF)
- EDTA-Na₂
- Levamisol
- Natriumbicarbonat
- SDS (Sodium dodecyl sulfate)

Vector Laboratories Inc., Burlingame

- Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) made in goat
- Vectastain[®] ABC-AP Kit

Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich

- UV-Transilluminator 312 nm

Vogel GmbH & Co., Gießen

- Paraffin (in Granulatform; Schmelzpunkt: 56 - 58 °C)
- Tissue Tek®, Modell 4765

8.4 Lösungen und Puffer

8.4.1 DNS-Isolierung

Herstellung des DEPC-behandelten Wassers (DEPC-Wasser)

Ein Liter Aqua bidestillata wurde mit 1 ml Diaethylpyrocarbonat (DEPC, Fluka Chemie AG, CH-9470 Buchs) versetzt und unter Rühren für zwölf Stunden bei nicht verschlossenem Gefäß inkubiert. Anschließend wurde das DEPC-Wasser für 15 Minuten bei 134 °C autoklaviert (VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 250 T, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim). DEPC-Wasser muss geruchsneutral sein.

1x PBS-Puffer (phosphate buffered saline) für die DNS-Isolierung aus Vollblut, pH 7,4

NaCl	8000 mg
KCl	200 mg
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1440 mg
KH ₂ PO ₄	200 mg

1-molare Tris-Lösung (1x), pH 7,4 für die Molekularbiologie

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	12,1 g
A. bidest.	80 ml
Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit konzentrierter Salzsäure	
A. bidest.	ad 100 ml

8.4.2 Polymerasekettenreaktion

Gebrauchslösung der Desoxytrinukleotidtriphosphate

Durch den Hersteller (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wurden die Einzeldesoxynukleotidtriphosphate dATP, dGTP, dTTP, dCTP in wässriger Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM geliefert.

Aus diesen wurde ein gebrauchsfertiger Prämix mit allen vier Komponenten mit einer Konzentration von je 10 mM durch Verdünnung mit DEPC-Wasser hergestellt.

BioTherm™ DNA Polymerase, Natutec GmbH, Frankfurt

Thermostabile DNS-Polymerase aus einer *Thermus aquaticus*-Linie mit 5'-3'-Polymerase- und -exonukleaseaktivität.

Aktivität: 5U/μl

Pufferzusammensetzung, pH 7,0:

- 10 mM KH₂PO₄
- 100 mM NaCl
- 0,5 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 0,01 % Tween® 20
- 50 % Glyzerin (v/v)

FailSafe™ PCR PreMix Selection-Kit und FailSafe™ PCR System (Epicentre, Madison, Wisconsin, USA)

Pufferzusammensetzung (Puffer A bis L, pH 8,3):

- 100 mM Tris-HCl-Lösung
- 100 mM KCl
- 400 μM von jedem dNTP
- MgCl₂ (3-7 mM)
- PCR-Enhancer Betaine (0- bis 8-fach).

Thermostabiler Polymerasemix FailSafe™ Enzyme Mix, 2,5 U/μl

Zusammensetzung des Enzympuffers (pH 7,5):

- Glyzerin 50 %
- 50 mM Tris-HCl
- 100 mM NaCl
- 0,1 mM EDTA
- 0,5 % Tween®20
- 0,5 % NP-40
- 1 mM Dithiothreitol

PCR-Puffer Y, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, (pH 8,55)

- 200 mM Tris-HCl
- 160 mM (NH₄)₂SO₄
- % Tween 20
- 20 mM MgCl₂

8.4.3 Gelelektrophorese

10x TBE-Puffer, pH 8 für die Gelelektrophorese

Trisborat	108,0 g
EDTA	8,3 g
Borsäure	55,0 g
A. Bidest	ad 1000 ml

Gebrauchslösung 0,5x TBE für die Gelelektrophorese: 1:20-Verdünnung mit A. bidest.

8.4.4 Klonierung

Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium)

Peptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
A. bidest	950 ml

Im Becherglas mit einem Rührfisch mischen.

Mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 einstellen und mit A. bidest. auf 1000 ml auffüllen. Das Medium in Flaschen abfüllen und zwanzig Minuten bei 120 °C und 15 psi autoklavieren. Wenn das Medium auf etwa 55 °C abgekühlt ist, Ampicillin hineingeben. Für die meisten verwendeten Klonierungsprotokolle wurde eine Endkonzentration von 100 µg Ampicillin pro Milliliter LB-Medium benötigt.

Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)

Peptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
Agar-Agar	15 g
A. bidest	950 ml

Im Becherglas mit einem Rührfisch mischen.

Mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 einstellen und mit A. bidest. auf 1000 ml auffüllen. Die Suspension in Flaschen abfüllen und zwanzig Minuten bei 120 °C und 15 psi autoklavieren. Wenn der Agar auf etwa 55 °C abgekühlt ist, Ampicillin hinein geben und in noch flüssigem Zustand in Petrischalen gießen. Für die verwendeten Bakterienkulturen wurde eine Endkonzentration von 100 µg Ampicillin pro Milliliter LB-Medium benötigt.

Herstellung der IPTG-Stocklösung (100 mM)

23,8 mg IPTG (Carl Roth GmbH& Co KG) in 1 ml sterilem A. bidest. auflösen. Die Lagerung über einen längeren Zeitraum erfolgte bei -20 °C

Herstellung der X-Gal Stocklösung (40 mg/ml)

40 mg X-Gal (Carl Roth GmbH & Co KG) in 1 ml N,N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) unter einem Abzug auflösen. Bis zur Verwendung lichtgeschützt bei -20 °C lagern.

8.4.5 Immunhistologie**DAB-Lösung**

100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer), filtrieren

Unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30 %iges H₂O₂ zugeben

Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,1)

Imidazol 6,81 g

ad 1000 ml Aqua dest.

Zugeben von 500 ml 0,1 M HCl (die Lösung ist ca. 1 Woche haltbar)

10x NaCl-PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4, Stammlösung für die Immunhistologie

Na₂HPO₄ 11,5 g, (Alternativ: Na₂HPO₄·7H₂O 21,4 g)

KH₂PO₄ 2,0 g

NaCl 80,0 g

KCL 2,0 g

A. bidest. ad 1000 ml

ggf. mit 0,1 N NaOH-Lösung den pH-Wert einstellen

Gebrauchslösung: 1x NaCl-PBS, 1:10 Verdünnung der Stammlösung mit A. bidest.

10x TBS (tris buffered saline), pH 7,6 Stammlösung für die Immunhistologie

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 60,75 g

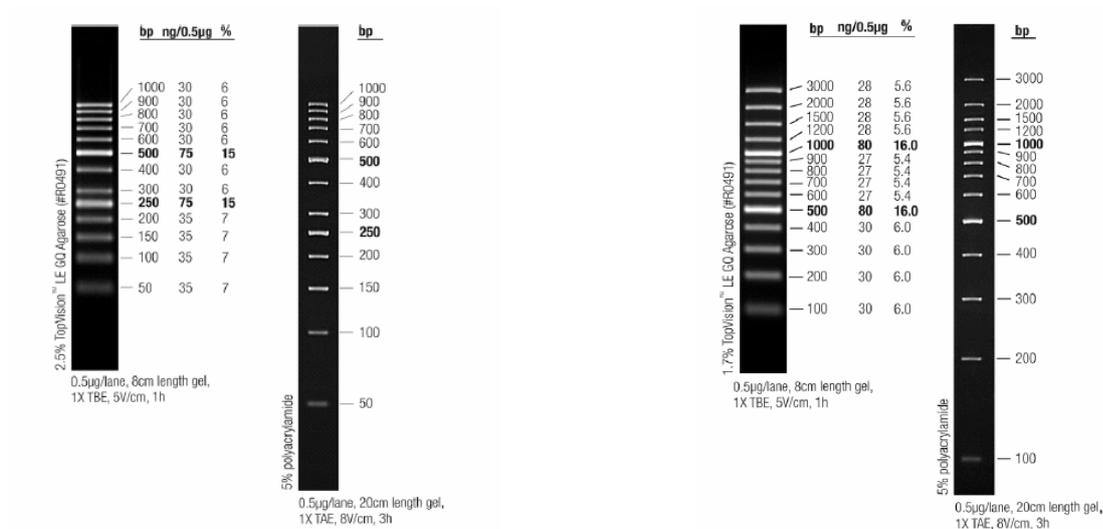
A. bidest. 610 ml

HCl 1N 390 ml

1x Gebrauchslösung: 1:10-Verdünnung mit NaCl 0,8 % in A. bidest

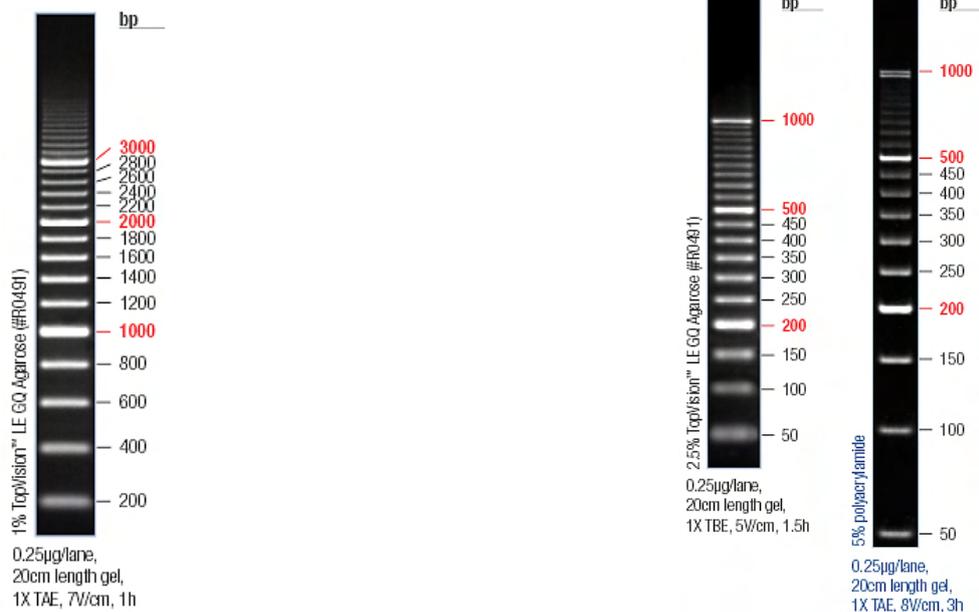
Verwendete DNS-Basenleitern

8.4.6 DNS-Größenmarker für die Gelelektrophorese



O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, ready-to-use, 0,1 µg/µl
SM1133
(Fermentas GmbH, St. Leon Rot)

O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, ready-to-use, 0,1 µg/µl
SM1153
(Fermentas GmbH, St. Leon Rot)



O'RangeRuler™ 200bp DNA Ladder, ready-to-use, 0,05µg/µl
SM0633
(Fermentas GmbH, St. Leon Rot)

O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder, ready-to-use, 0,05µg/µl
SM0613
(Fermentas GmbH, St. Leon Rot)

Herstellung eines λ-HindIII-Größenmarkers

5-10 µl dieses Größenmarkers wurden zur Fragmentgrößenbestimmung größerer PCR-Produkte und genomischer DNS verwendet. Der Verdau wurde in einem 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) durchgeführt.

DEPC-behandeltes A. bidest.	281,00 µl
NEB2-Puffer	50,00 µl
50 µg λ-Phagen-DNS	167,00 µl
HindIII-Restriktionsenzym	1,25 µl

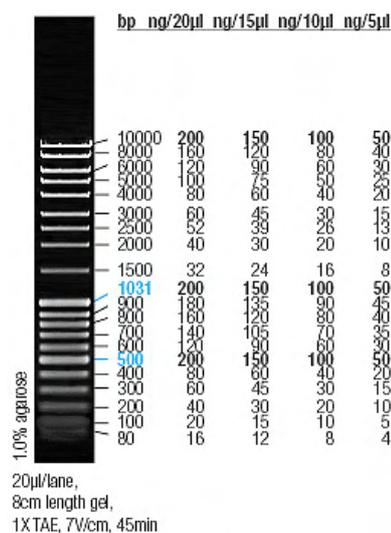
Den Ansatz im Wasserbad bei 37 °C für zwei Stunden inkubieren. Anschließend die Reaktion durch Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank oder auf Eis unterbrechen. Ein Aliquot von 5 µl mit 5 µl Wasser und 2 µl Bromphenolblau-haltigem Stopmix versetzen. Zur Kontrolle der Reaktion die Restriktionsfragmente in einer Gelelektrophorese mit einem 1 %igen, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel auftrennen und durch UV-Licht Durchleuchtung visualisieren. Die vollständig verdauete DNS-Lösung zunächst für fünf Minuten auf etwa 80 °C erhitzen, anschließend ad 900 ml mit A. bidest. auffüllen und mit 100 µl Bromphenolblau-haltigem Stopmix versetzen.

Herstellung des laboreigenen DNS-Größenmarkers „MF“

5-10 µl dieses Größenmarkers wurden zur Größenbestimmung von PCR-Fragmenten zwischen 100 bp und 1.700 bp verwendet. Der Verdau wurde in einem 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Hierzu wurde in DH5α-Zellen kultivierte pCR2.1-Plasmide (TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen, Karlsruhe) mittels Restriktionsverdau in Fragmente zwischen 134 bp und 1.736 bp geschnitten. 60% des Plasmidlösung wurde mit dem Enzym HinfI und 40 % der Lösung mit dem Enzym RsaI separat inkubiert. Die beiden Ansätze wurden vermischt und mit Farbstoff- und Ficollhaltigem Ladepuffer versetzt.

DNA-Massenmarker

Produkt	DNA QuantLadder
	
Größenbereich (bp)	100-1000
Fragmente	5
Konzentration	–
Gesamtvolumen	125 µl
Biozym Art.-Nr.	850334
[Cambrex Cat.-No.]	[50334]



Simply Load DNA Quant Ladder,
Cambrex Bio Science

MassRuler™ DNA Ladder,
Mix, ready-to-use
SM0403
(Fermentas GmbH, St. Leon Rot)

8.5 Sequenzierungsergebnisse

8.5.1 Klone

Insert des Klones 4-6/4, Sequenzierprimer: M13-FP, Spender: D2594

Sequenzlänge von 559 bp

Primer fPKD4-6_1f, Exon 4

ACCTGAGCGGAAACCCGTTGGAGTGTGATTGTGGTCTGGCGTGGCTGCCTCGCTGGGTGGAA

GAGcatcAGGTTTCGCGTGGTTCGGCCCCGAGGCGGCCACGTGTGCCGGGCCCGGCCCCCTAGCT

Intron 4

GGCCGGCCCCCTGCTCGGCGTCCCATTGTCAGACAGCGGCTGTGGTGAGTATGGCTGAATGTGA

CCCGCTCGGTCTTCTCTGTCTGGCTAGGACCCCGTAGGTGTTCCAGGGTCACCGGCCTGGGGGGTG

GTGGCAGGTGGGACTCTGGGAACAGAGGCACCTGGGCAGCAATTGTGGCTGCTGAGACAGACCAG

GTCGGGGGTCAAGGGAGCAGTGCAGGTGGGAGGAGGGGAGGGTGGTGAGTGCCAGGCNNNNGG

GGGGGGGTGCTGGCGACGTGATCTGGGGTCTAGGATGGGGCACAGACACCGTAGGGGTGGGGCCT

ACCTGGGGACCATCCTAGGCTGGGGGCAGGGGTGCCGAAGGGCGGGACCCGACAAGGACCAGGC

Exon 5

TGTCTGCTCTGTCCAGGTGAGGAGTACATCGCCTGCCTCCCGGACA

Insert des Klones 4-6/4, Sequenzierprimer: M13-RP, Spender: D2594, Sequenzlänge von 452 bp

fPKD4-6_1r, Exon 6

TGGTGACCTGGGAGACCAGGAAGCGCTGGACGGCGGGACTGTCCACCATGGCCAGGGCGGC

CCCGGCCAGGCCTGGCACTGCTCCTGTGCCTGCAGCCAGGCGGCCTTCTCGGCCACCAGGC

GGTAGCAGTGCCATTACCGGGGAAGATCACGGTGTCCGAGGGGCAGAGCGGATGCACCAC

Intron 5

TGGGAGTCAGCAGGCAGGGATGGGGGCATCAGTGTGGGCCAGCCAGGACTGCCCCACCCATTC

Exon 5

CAGCCCCTGGGGGCGAGAAGGCACCCACCTCGACCTGGCTCCTCGCCCAAAGACACAATACTG

TAGGTGGCTTCCAGGCCGGAGCCACCACGATTTCCGGACGccaAGCTTGAGGGTCTCATCACTG

AGTACCGAGACTGGACACTCGAGCTCCAGGGCAGCAGGGGCCGCCTTCCACTTGCACCTTGGC

CCCTAGCTGGGCCGA

Insert des Klones Nineg 4-6-E8, Sequenzierprimer M13 FP, Spender: Ni-, Sequenzlänge von 398 bp

Primer 4-61F, Exon 4

ACCTGAGCGGAAACCCGTTGGAGTGTGATTGTGGTCTGGCGTGGCTGCCTCGCTGGGTGGAA
 GAGCAGCAGGTTTCGCGTGGTTCGGCCCCGAGGCGGCCACGTGTGCCGGGCCCGGCCCCCTAG
 CTGGCCGGCCCCTGCTCGGCGTCCCATTGTCAGACAGCGGCTGTGGTGAGTATGGCTGAATGT
 GACCCGCTCGGTCCTTCTCTGTCTGGCTAGGACCCCGTAGGTCCAGGGTCACCGCCTGGGGGGTGC
 TGGCGACGTGATCTGGGGTCTAGGATGGGGCACAGACACCGTAGGGGTGGAGCCTGCCTGGGGAC
 CAGCCTAGGCTGGGGGCAGGGGTGCAGCAAGGGCGGGGCCCGACAAGGACCAGGCTGtCTGCTCT
Exon 5
 GTCCAGGTGAGGAGTACATCGCCTGCCTCCCGGACA

Insert des Klones Nineg 4-6-E8, Sequenzierprimer M13 RP, Spender: Ni-, Sequenzlänge von 537 bp

Primer fPKD4-6_1r, Exon 6

TGGTGACCTGGGAGACCAGGAAGCGCTGGACGGCGGGACTGTCCACCATGGCCAGGGCGGC
 CCCGGCCCAGGCCTGGCACTGCTCCTGTGCCTGCAGCCAGGCGGCCTTCTCGGCCACCAGGC
 GGTAGCAGTGCCCATTACCGGGGAAGATCACGGTGTCCGAGGGGCAGAGCGGATGCACCAC
 Intron 5
 TGGGGAGTCAGCAGGCAGGGATGGGGGCATCAGTGTGGGCCAGCCAGGACTGCCCCACCCATTC
Exon 5
 CAGCCCCTGGGGGCGAGAAGGCACCCACCTCGACCTGGCTCCTCGCCAAAGACACAATACTG
 TAGGTGGCTTCCAGGCCGGAGCCACCACGATTTTCGGACG^{cca}AGCTTGAGGGTCTCATCACTG
 AGTACCGAGACTGGACACTCGAGCTCCAGGGCAGCAGGGGCCGCTCCACTTGCACCTTGGC
 CCCTAGCTGGGCCGA

Insert des Klones Nineg 4-6-E8, Sequenzlänge 270 bp, Sequenzierprimer 4-6ZF

Intron 4

CTTAGCACGTAGGGGAGCCGCCTGGGGACCAGCCTAGGCTGGGGGCAGGGGTGCAGCAAGGGCGG
Exon 5
 GGCCCACAAGGACCAGGCTGTCTGCTCTGTCCAGGTGAGGAGTACATCGCCTGCCTCCCGGAC
 AACAGCTCCGGTGCCGTGGTGCCGGTGGCCTTCTCCACTGCCACGAGGGCCCCGCTGGCACC
 CGAGGCCTGCGGCGCCTTCTGCTTTGCGGCTGGCTGGGGCCCTCGGGGCCCTCTCGGACCAG
 TGCTGGTGCCTGCGCGTG

Insert des Klones Nineg 4-6-E8, Sequenzlänge 729 bp, Sequenzierprimer 4-6ZR**Exon 5**

CAGCAGGGGCCGCTCCACTTGACCTTGGCCCCTAGCTGGGCCGAGCCAGCCCCAGGGC
CAGCACGGCTGTACCTGGTAGTGGCCGGGCAGGGAATAGCGGTGAGTGGTGGCAGGACCA
GCAACATCCACCTTAGGGGAGCCGTCACCAAAGTCCCAGTGTGTGGAGCTGACGGGTAGGG
AGGCAGTGACATGGAAGGCTGCTGGCTGGCCAGAGGCCAGGGGTCCTGGAGGCCCCACCAG
GGCGGCCCTGGGGAGGCAGGGAAGACGTTCTCAAGGAGGGTGGGGCCCCCGCAGGCAGG
GGCGAGGGGCAGCGGGGGGCTGGAGCACAAGGGTAGGCAAGCCGAGGAGGCGTTGGGGGG
CTGGGCCGCCCGCACAGGCACCAGCCCTGGTCCGAGAGGGCCCCGAGGCCCCAGCCAGCC
GCAAAGCAGAAGGCGCCGACGGCCTCGGGTGCCAGCGGGCCCTCGTGGGCAGTGGAGAAGG
CCACCGGCACCACGGCACCGGAGCTGTTGTCCGGGAGGCAGGCGATGTACTCCTCACCTGGA
CAGAGCAGACAGCCTGGTCCTTGTTCGGGCCCGCCCTTGCTGCACCCCTGCCCCAGCCTAGGCTG
GTCCCAGGCAGGCTCCACCCCTACGGTGTCTGTGCCCATCCTAGACCCAGATCACGTCGCCAG
CACCCCCAGGCCGGTGACCCTGGAACACCTACGGGGTCCTAGCCGACA

Intron 4

Insert des Klones Nineg 4-6-E9, Sequenzlänge 574 bp, Sequenzierprimer M13FP**Primer fPKD4-6_1f, Exon 4**

ACCTGAGCGGAAACCCGTTGGAGTGTGACTGTGGTCTGGCGTGGCCGCTCGCTGGGTGGA
AGAGCAGCAGGTTGCGTGGTTCGGCCCAGGCGGCCACGTGTGCCGGGCCCGGCCCCCTA
GCTGGCCGGCCCCTGCTCGGCGTCCCATTGTCAGACAGCGGCTGTGGTGAGTATGGCTGAATG
TGACCCGCTCGGTCCTCCTCTGTCGGCTAGGACCCCGTAGGTGTTCCAGGGTCACCGGCCTGGGGG
GTGGTGGCAGGTGGGACTCTGGGAACAGAGGCACCTGGGCAGCAATTGTGGCTGCTGAGACAGAC
CAGGTCGGGGGTCAAGGGAGCAGTGCAGGTGGGAGGAGGGGAAGGTGGTGAGTGCCAGGCGGGG
GGGGGTGCTGGCGACGTGATCTGGGGTCTAGGATGGGGCACAGACACCGTAGGGGTGGGGCCTGC
CTGGGGACCAGCCTAGGCTGGGGGCAGGGGTGCAGCAAGGGCGGGGCCGACAAGGACCAGGCT
GTCTGCTCTGTCCAGGTGAGGAGTACATCGCCTGCCTCCCGGACAACAGCTCCGGTGCCGTGT
GG

Intron 4

Exon 5

Insert des Klones Nineg 4-6-E9, Sequenzlänge 777 bp, Sequenzierprimer M13RP**Primer fPKD4-6_2r, Exon 6**

ATGGCGGGACTGTCCACCATGGCCAGGGCGGCCCGGCCAGGCCTGGCACTGCTCCTGTG
CCTGCAGCCAGGCGGCCTTCTCGGCCACCAGGCGATAGCAGTGCCATTACCGGGGAAGATC
ACGGTGTCCGAGGGGCAGAGCGGATGCACCACTGGGGAGTCAGCAGGCAGGGATGGGGGCATC
AGTGTGGGCCAGCCAGGACTGCCCCACCCATTCCAGCCCCTGGGGGCGAGAAGGCACCCACCTC
Exon 5
GACCTGGCTCCTCGCCAAAGACACAATACTGTAGGTGGCTTCCAGGCCGGAGCCACCACGA
TTTCGGACGCCAAGCTTGAGGGTCTCATCACTGAGTACCGAGACTGGACACTCGAGCTCCAG
GGCAGCAGGGGCCGCTCCACTTGCACCTTGGCCCCTAGCTGGGCCGAGCCAGCCCCCAGG
GCCAGCACGGCTGTCACCTGGTAGTGGCCGGGCAGGGAATAGCGGTGAGTGGTGGCAGGAC
CAGCAACATCCGCCTTAGGGGAGCCGTCACCAAAGTCCAGTGTGTGGAGCTGACGGGTAG
GGAGGCAGTGACATGGAAGGCTGCTGGCTGGCCAGAGGCCAGGGGTCTGGAGGCCCCACC
AGGGCGGCCCTGGGGAGGCAGGGAAGACGTTCTCAAGGAGGGTGGGGCCCCCGCAGGCA
GGGGCGAGGGGCAGCGGGGGCTGGAGCACAAGGGTAGGCAAGCCGAGGAGGCGTTGGGGG
GCTGGGCCGCCCGCACAGGCACCAGCCCTGGTCCGAG

Insert des Klones Nineg 4-6-E12, Sequenzlänge 700 bp, Sequenzierprimer M13FP**Primer fPKD1f, Exon4**

ACCTGAGCGGAAACCCGTTGGAGTGTGATTGTGGTCTGGCGTGGCTGCCTCGCTGGGTGGAA
GAGCAGCAGGTTTCGCGTGGTTCGGCCCGAGGCGGCCACGTGTGCCGGGCCCGGCCCTAG
CTGGCCGGCCCCTGCTCGGCGTCCCATTGTCAGACAGCGGCTGTGGTGAGTATGGCTGAATGC
GACCCGCTCGGTCCTTCTCTGTCGGCTAGGACCCCGTAGGTGTTCCAGGGTCACCGGCCTGGGGGG
TGCTGGCGACGTGATCTGGGGTCTAGGATGGGGCACAGACACCGTAGGGGTGGGGCCTGCCTGGG
GACCAGCCTAGGCTGGGGGCAGGGGTGCAGCAAGGGCGGGGCCGACAAGGACCAGGCTGTCTGC
Exon 5
TCTGTCCAGGTGAGGAGTACATCGCCTGCCTCCCGGACAACAGCTCCGGTGCCGTGGTGCCG
GTGGCCTTCTCCACTGCCACGAGGGCCCGCTGGCACCCGAGGCCTGCGGCGCCTTCTGCTT
TGCGGCTGGCTGGGGCCTCGGGGCCCTCTCGGACCAGGGCTGGTGCCTGTGCGGGGCGGCC
CAGCCCCCAACGCCTCCTCGGCTTGCCTACCCTTGTGCTCCAGCCCCCGCTGCCCTCGC
CCCTGCCTGCGGGGGCCCCACCCTCCTTGAGAACGTCNNNTGCCTCCCCAGGGGCCGCGCCTG
GTGGGGCCT

Insert des Klones Nineg 4-6-E12, Sequenzlänge 678 bp, Sequenzierprimer M13RP**Primer fPKD4-6_2r, Exon 6**

ATGGCGGGACTGTCCACCATGGCCAGGGCGGCCCGGCCAGGCCTGGCACTGCTCCTGTG
 CCTGCAGCCAGGCGGCCTTCTCGGCCACCAGGCGGTAGCAGTGCCATTACCGGGGAAGAT
 CACGGTGTCCGAGGGGCAGAGCGGATGCACCACTGGGGAGTCAGCAGGCAGGGATGGGGGCAT
 CAGTGTGGGCCAGCCAGGACTGCCCCACCCATTCCAGCCCCTGGGGGCGAGAAGGCACCCACCT
Exon 5
 CGACCTGGCTCCTCGCCAAAGACACAATACTGTAGGTGGCTTCCAGGCCGGAGCCACCAG
 ATTCGGACGCCAAGCTTGAGGGTCTCATCACTGAGTACCGAGACTGGACACTCGAGCTCCA
 GGGCAGCAGGGGCCGCCTCCACTTGCACCTTGGCCCCTAGCTGGGCCGAGCCAGCCCCAG
 GGCCAGCACGGCTGTCACCTGGTAGTGGCCGGGCAGGGAATAGCGGTGAGTGGTGGCAGGA
 CCAGCAACATCCACCTTAGGGGAGCCGTCACCAAAGTCCCAGTGTGTGGAGCTGACGGGTAG
 GGAGGCAGTGACATGGAAGGCTGCTGGCTGGCCCCGAGGCCAGGGGTCTGGAGGCCCCACC
 AGGGCGGCCCTGGGGAGGCAGGGAAGACGTTCTCAAGGAGGGTGGGGCCCCCGCAGGCA
 GGGGCGAG

Insert des Klones CA1, Sequenzlänge 668 bp, Sequenzierprimer M13-RP**Primer cPKD27F, Exon 27**

GTGGGCATCATGCTGTACGGGGCTGAGGGCCGCAGCGGCCACCGGCACCTGGACGGGGACA
 GGGCCTTCCGCCCAACAGCCTGGACGTGTTCCAGATCGCCACGCCGCACAGCCTGGGCAG
 CGTGCGGAAGATCCGCGTGTGGCACGACAACAAAGGTCTGTGGGGCGCCCGCGGCTGCCCT
 CCGGCACCCACCGGCGCCCTTCAGCCTGACTCCCCGCCCTCCGCTGCAGGGCTCAGCCCCGCC
Exon 28
 TGGTTCTGCAGCACATCATCGTCCGGACCTGCAGACCGCCTGCAGCACCTTCTTCTGCT
 CAACGACTGGCTGTTCGGTGGAGACTGAGGCCAATGGCGGCCTCGTGGAGAAGGAGGTGCTG
Intron 28
 GCAGCAAGTAAGGGCCTGGGCCCGGCCCTGCCCGGGCTGGCCGAGGGGTGGCCTGTGCCACTGGC
Exon 29
 CTCCTGAAGCCAGCTGTGCCCTTCTGCAGGCGACGCGGCTGTGCGGCGGTTCCGGCGCCTCCT
 GGTGGCCGAGCTGCAGCGTGGCTTTTTTGACAAGCATCTCTGGCTCTCCCTCTGGGACCGGC
 CTCCTCGGAGCCGCTTACCCGCGTCCAGCGGGCCACCTGTTGAGTCTCCTCGTCTGCCTC
 TTCTGGGCGCCAATGCTGTGTGGTACGGGGTCTGGGAGA

Insert des Klonen CA1, Sequenzlänge 648 bp, Sequenzierprimer M13-FP**Primer cPKD30R2, Exon 30**

GAGAAACAGGATGACCAGGTAGACGGGATAGACGACCACACTGGACACCAGGCCGACGGCA
 Intron 29
 ACTGTGTCGGCACTCAGCGGGATCAGACCGGACACGGGCCCGCGCTGTGTGGCAGGAGAGG
 AGAGAGACCCGGGCTGGGAGAGGCTGTGGGGGGTAGGAGGGGTCGGGCAGGAGGAGGTCATCGG
 Exon 29
 GCCCCCTCGGGCACCCACCTGTAGGCGGGCTCTCCACGACCCCGTACCACACAGCATTGGC
 GCCCAGGAAGAGGCAGACGAGGAGGACTCAACAGGTGGCCCCGCTGGACGCGGGTGAAGCGG
 CTCCGAGGAGGCCGGTCCCAGAGGGAGAGCCAGAGATGCTTGTCAAAAAAGCCACGCTGCA
 Intron 28
 GCTCGGCCACCAGGAGGCGCCGGAACCGCCGCACAGCCGCGTCGCCTGCAGAAAGGGCACAG
 CTGGCTTCAGGAGGCCAGTGGCACAGGCCACCCCTCGGCCAGCCCGGGCAGGGCCGGGCCAGGC
 Exon 28
 CCTTACTTGCTGCCAGCACCTCCTTCTCCACGAGGCCGCCATTGGCCTCAGTCTCCACCGACA
 GCCAGTCGTTGACCAGGAAGAAGGTGCTGCAGGCGGTCTGCAGGTCCCGGACGATGATGTG
 CTGCAGGAACCAGGCGGGGCTGAGC

Insert des Klonen CA9, Sequenzlänge 660 bp, Sequenzierprimer M13-RP**Primer cPKD27F, Exon 27**

GTGGGCATCATGCTGTACGGGGCTGAGGGCCGCAGCGGCCACCGGCACCTGGACGGGGACA
 GGGCCTTCCGCCGCAACAGCCTGGACGTGTTCCAGATCGCCACGCCGCACAGCCTGGGCAG
 Intron 27
 CGTGCGGAAGATCCGCGTGTGGCACGACAACAAAGGTCTGTGGGGGCGCCCGCGGCTGCCCCCT
 Exon 28
 CCGGCACCCACCGGCGCCCTCAGCCTGACTCCCCGCCCTCCGCTGCAGGGCTCAGCCCCGCC
 TGGTTCCTGCAGCACATCATCGTCCGGGACCTGCAGACCGCCTGCAGCACCTTCTTCTGCT
 CAACGACTGGCTGTGCGGTGGAGACTGAGGCCAATGGCGGCCTCGTGGAGAAGGAGGTGCTG
 Intron 28
 GCAGCAAGTAAGGGCCTGGGCCCGTCCCTGCCCGGGCTGGCCGAGGGGTGGCCTGTGCCACTGGC
 Exon 29
 CTCCTGAAGCCAGCTGTGCCCTTTCTGCAGGCGACGCGGCTGTGCGGCGGTTCCGGCGCCTCCT
 GGTGGCCGAGCTGCAGCGTGGCTTTTTTTGACAAGCATCTCTGGCTCTCCCTCTGGGACCGGC
 CTCCTCGGAGCCGCTTACCCGCGTCCAGCGGGCCACCTGTTGCGTCTCCTCGTCTGCCTC
 TTCTGGGCGCCAATGCTGTGTGGTACGGGGTTCG

Insert des Klonen CA9, Sequenzlänge 650 bp, Sequenzierprimer M13-FP**Primer cPKD30R2, Exon 30**

GAGAAACAGGATGACCAGGTAGACGGGATAGACGACCACACTGGACACCAGGCCGACGGCA
 Intron 29
 ACTGTGTCGGCACTCAGCGGGATCAGACCGGACACGGGCCCGCGCTGTGTGGCAGGAGAGG
 AGAGAGACCCGGGCTGGGAGAGGCTGTGGGGGGTAGGAGGGGTCGGGCAGGAGGAGATCATCGG

Exon 29

GCCCCCTCGGGCACCCACCTGTAGGCGGGCTCTCCACGACCCCGTACCACACAGCATTGGC
 GCCCAGGAAGAGGCAGACGAGGAGGACGCAACAGGTGGCCCGCTGGACGCGGGTGAAGCG
 GCTCCGAGGAGGCCGGTCCCAGAGGGAGAGCCAGAGATGCTTGTCAAAAAAGCCACGCTGC
 AGCTCGGCCACCAGGAGGCGCCGGAACCGCCGCACAGCCGCTCGCCTGCAGAAAGGGCACA
 GCTGGCTTCAGGAGGCCAGTGGCACAGGCCACCCCTCGGCCAGCCGGGCAGGGACGGGCCCAGG
Exon 28
 CCCTTACTTGCTGCCAGCACCTCCTTCTCCACGAGGCGCCATTGGCCTCAGTCTCCACCGAC
 AGCCAGTCGTTGACCAGGAAGAAGGTGCTGCAGGCGGTCTGCAGGTCCCGGACGATGATGT
 GCTGCAGGAACCAGGCGGGGCTGA

Intron 28

Insert des Klones c29-36, Sequenzlänge 651 bp, Sequenzierprimer M13-FP

Primer fPKD36R3 in Exon 37

GCTCACTCACAGGGGTACAGCCGGGCTCTTCCACCAGGGTGTATCCTCGTCGGGGTGCAGCCGCTTG

Exon 36

GCCACCAGGgmgAAGTACAGGGCCTCCAGCAGGACCTTGAGCGGCTCCCAGCCGAAGAAGGAGGC

CAAGAAGCTGGAGCTGCTCGAGAGGAGCCACATCACACCCACACCAGGGGAGAAGCCGGCACCCA

CCCAGCCGGAGACCCCTACAGCCACAGCCACCAAGAGCAGGCTGAGTCCGTGGGCCAGGGGAGCA

Exon 35

CACCAGGCTGGCAGCAGCCGCCTCCGCAGACCGTCCACCAGTCTGTCTTGGCGGGCTTTGCTGAC

TGGGGCCGCTCCCAGGTCAGACCTGGGCTGGGCAGCCCCCTGTCCCCTAGCCTCTGCAGCATCAGC

Exon 34

GTCTCTGTCTCTCTGCAGGAGCGCTGGACAGGCCAGCGAGCAGATCCGTTTCTATTTGCGCTCC

Exon 33

CGGGCAGGGGCCAGGCTGCCGGCCCTTCAGCCACGATCCGCCGATGAGGTCTCTCGTCCGAAGC

TGAGAAGGACTTGGCAGGTGAGGAGGGGCTGACCAGGAGAGCCCGTCTCCTCCGGGCCAGGCCGA

CCCCGTGCCAGCCGCTGCAGGGTGCTGCCACGATGGATGGGTCACTCAGCAGGTCCG

Insert des Klones c29-36, Sequenzlänge 651 bp, Sequenzierprimer M13-RP

Primer fPKD36R3 in Exon 29

Exon 30

GCCAATGCTGTGTGGTACGGGGTCGTGGGAGACGCCGCCTACAGCGCGGGGCCCGTGTCCGGTCT

GATCCCGCTGAGTGCCGACACAGTTGCCGTCGGCCTGGTGTCCAGTGTGGTCTATCCCGTCTAC

Exon 31

CTGGTCATTCTGTTTCTCTTCCGGATGTCCCGGAGCAAGGTGGCTGGGGGCCCGAGCCCCACCCCT

GCGGGCAGCCGGTCTGGACATCGACAGCTACCTGGACTCGTCTGTGCTGGACAGCTCCTTCCTG

Exon 32

GCCTTCCCGGGGCTCCGCGTGAAGCCTTTGCCGGACAAATGAAAAGTGACTTATTTTGGATGATT

Exon 33G

CAAAAGCCTGGTGTGCTGGCCGTCCAGTGAAGGCACGCTGAATTGGCCGGACCTGCTGAGTGACC

CATCCATCGTGGGCAGCACCCCTGCAGCGGCTGGCACGGGGTCGCTGGGCCCGGAGGAGGACGGG

Exon 34

CTCTCCCTGGTCAGCCCTCCTCACCTGCCAAGTCTTCTCAGCTTCGGACGAGGACCTCATCCGGC

GGATCGTGGCTGAAGGGGCCGCGCAGCCT

Insert des Klonen 3+, Sequenzlänge 445 bp, Sequenzierprimer M13-FP

Primer 43-46-1f, Exon 43

GCTGCTCTTCGCGCTGTACTTCTCGGTGGCCGAGGCGCGTGTGTGGCGCCGGGAAGGGCGG

ACGCGCGCCGCACAGTCCGGAGCCTGGGCGCGGTGGCTGCTGGTGGCCCTGACCGCGGCCG

CGGTGCTCGTGCCTGGCCAGCTGGGTGTGCGCCACCGCCAGTGGACCCGCTTCGTGCG

CCGCCGCCCGCGCCGCTTCACCAGCTTCGAGCAGGTGGCGCAGCTGAGCTCCGCGGCTCGC

Intron 43

GGCCTGGCCGCCTCGCTGCTCTTTCTCCTGCTGGTCAAGGTGAGGGCTGGGCCGGCGGGGGTC

GGCCGGGGCCTGGGCCGGGCCGGGTTCGAACCGGCGGCGGTTTCGGTCAACCGACACCGCTCGCCCC

Exon 44

CAGGCCGCCAGCAGCTGCGCTTCGTGCGCCAGTGGTTCGGTTTTCGGCAAGACGCTGTACAG

GGCCCTGCCGG

8.5.2 PCR-Produkte

Diese Datensätze sind Textdateien des Analyseprogrammes Mutation Surveyor® und entsprechen den Sequenzabschnitten im abi-Format, die für die Analyse eine ausreichende Qualität aufwiesen. Zu Beginn findet sich die Vergleichsequenz des jeweiligen Abschnittes, in der die Positionen, an denen Sequenzvarianten gefunden wurden, grau unterlegt sind.

8.5.2.1 Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 4 bis 6

>Reference File(s): **Consensussequenz4-**

6_F_Synthesis_228.scf;Consensussequenz4-

6_F_Synthesis_568.scf;Consensussequenz4-

6_R_Synthesis_710.scf;Consensussequenz4-6_R_Synthesis_1128.scf;

1	ACCTGAGCGG	AAACCCGTTG	GAGTGTGATT	GTGGTCTGGC	GTGGCTGCCT	CGCTGGGTGG
61	AAGAGCAGCA	GGTTCGCGTG	GTTCGGCCCC	AGGCGGCCAC	GTGTGCCGGG	CCCGGCCCCC
121	TAGCTGGCCG	GCCCCTGCTC	GGCGTCCCAT	TGTCAGACAG	CGGCTGTGGT	GAGTATGGCT
181	GAATGTGACC	CGCTCGGTCC	TTCTCTGTG	GCTAGGACCC	CGTAGGTGTT	CCAGGGTCAC
241	CGGCCTGGGG	GGTGGTGGCA	GGTGGGACTC	TGGGAACAGA	GGCACCTGGG	CAGCAATTGT
301	GGCTSCTGAG	ACAGACCAGG	TCGGGGGTCA	AGGGAGCAGT	GCAGGTGGRA	GGAGGGGAGG
361	GTGGTGAAGT	CCAGGCGGGG	GGGGGGGGGG	GTGCTGGCGA	CGTGATCTGG	GGTCTAGGAT
421	GGGGCACAGA	CACCGTAGGG	GTGGAGCCTG	CCTGGGGACC	AGCCTAGGCT	GGGGCAGGG
481	GTGCAGCAAG	GGCGGGGCCC	GACAAGGACC	AGGCTGTCTG	CTCTGTCCAG	GTGAGGAGTA
541	CATCGCCTGC	CTCCCGGACA	ACAGCTCCGG	TGCCGTGGTG	CCGGTGGCCT	TCTCCACTGC
601	CCACGAGGGC	CCGCTGGCAC	CCGAGGCCTG	CGGCGCCTTC	TGCTTTGCGG	CTGGCTGGGG
661	CCTCGGGGCC	CTCTCGGACC	AGGGCTGGTG	CCTGTGCGGG	GCGGCCACGC	CCCCAACGC
721	CTCCTCGGCT	TGCCTACCCT	TGTGCTCCAG	CCCCCGCTG	CCCCTCGCCC	CTGCCTGCGG
781	GGGCCCCACC	CTCCTTGAGA	ACGTCTTCCC	TGCCTCCCCA	GGGGCCGCC	TGGTGGGGCC
841	TCCAGGACCC	CTGGCCTCTG	GCCAGCCAGC	AGCCTTCCAT	GTCACTGCCT	CCCTACCCGT
901	CAGCTCCACA	CACTGGGACT	TTGGTGACGG	CTCCCCTAAG	GTGGATGTTG	CTGGTCTCTG
961	CACCACTCAC	CGCTATTCCC	TGCCCGGCCA	CTACCAGGTG	ACAGCCGTGC	TGGCCCTGGG

```

1021 GGCTGGCTCG GCCCAGCTAG GGGCCAAGGT GCAAGTGGAG GCGGCCCTG CTGCCCTGGA
1081 GCTCGAGTGT CCAGTCTCGG TACTCAGTGA TGAGACCCTC AAGCTTGGCG TCCGAAATCG
1141 TGGTGGCTCC GGCCTGGAAG CCACCTACAG TATTGTGTCT TTGGGCGAGG AGCCAGGTCCG
1201 AGGTGGGTGC CTTCTCGCCC CCAGGGGCTG GAATGGGTGG GGCAGTCTCG GCTGGGCCCCA
1261 CACTGATGCC CCCATCCCTG CCTGCTGACT CCCCAGTGGT GCATCCGCTC TGCCCCCTCGG
1321 ACACCGTGAT CTTCCCCGGT AATGGGCACT GCTACCGCCT GGTGGCCGAG AAGGCCGCCT
1381 GGCTGCAGGC ACAGGAGCAG TGCCAGGCCT GGGCCGGGGC CGCCCTGGCC ATGGTGGACA
1441 GTCCCGCCGT CCAGCGCTTC CTGGTCTCCC AGGTCACCA

```

Sequenz der Probe D2600

>00-4-6.1F;

```

121 GCTGGCCG GCCCCTGCTC GCGTCCCAT TGTCAGACAG CCGTGTGGT GAGTATGGCT
181 GAATGTGACC CGCTCGGTCC TTCTCTGTCT GCTAGGACCC CGTAGGTGTT CCAGGGTCAC
241 CGGCCTGGGG GGTGGTGGCA GGTGGGACTC TGGGAACAGA GGCACCTGGG CAGCAATTGT
301 GGCTSCTGAG ACAGACCAGG TCGGGGGTCA AGGGAGCAGT GCAGGTGGGA GGAGGGGAGG
361 GTGGTGAG

```

>00-4-6.1R;

```

961 GTG ACAGCCGTGC TGGCCCTGGG
1021 GGCTGGCTCG GCCCAGCTAG GGGCCAAGGT GCAAGTGGAG GCGGCCCTG CTGCCCTGGA
1081 GCTCGAGTGT CCAGTCTCGG TACTCAGTGA TGAGACCCTC AAGCTTGGCG TCCGAAATCG
1141 TGGTGGCTCC GGCCTGGAAG CCACCTACAG TATTGTGTCT TTGGGCGAGG AGCCAGGTCCG
1201 AGGTGGGTGC CTTCTCGCCC CCAGGGGCTG GAATGGGTGG GGCAGTCTCG GCTGGGCCCCA
1261 CACTGATGCC CCCATCCCTG CCTGCTGACT CCCCAGTGGT GCATCCGCTC TGCCCCCTCGG
1321 ACACCGTGAT CTTCCCCGGT AATGGGCACT GCTACCGCCT GGTGGCCGAG AAGGCCGCCT
1381 GGCTGCAGGC ACAGGAGCAG TGCCAGGCCT GGG

```

Sequenz der Probe D2573

>240-DR;

```

121 GTGGT GAGTATGGCT
181 GAATGTGACC CGCTCGGTCC TTCTCTGTCT GCTAGGACCC CGTAGGTGTT CCAGGGTCAC
241 CGGCCT-----
301 -----
361 -----GGGG GTGCTGGCGA CGTGATCTGG GGTCTAGGAT
421 GGGGCACAGA CACCGTAGGG GTGGAGCCTG CCTGGGGACC AGCCTAGGCT GGGGGCA

```

>73-4-6.SR;

```

1081 CAGTGA TGAGACCCTC AAGCTTGGCG TCCGAAATCG
1141 TGGTGGCTCC GGCCTGGAAG CCACCTACAG TATTGTGTCT TTGGGCGAGG AGCCAGGTCCG
1201 AGGTGGGTGC CTTCTCGCCC CCAGGGGCTG GAATGGGTGG GGCAGTCTCG GCTGGGCCCCA
1261 CACTGATGCC CCCATCCCTG CCTGCTGACT CCCCAGTGGT GCAT

```

Sequenz der Probe D2577

>57-4-6.1F;

```

241 ACCTGGG CAGCAATTGT
301 GGCTGCTGAG ACAGACCAGG TCGGGGGTCA AGGGAGCAGT GCAGGTGGGA GGAGGGGAGG
361 GTGGTGAG

```

>57-4-6.1R;

```

1321 GGT AATGGGCACT GCTACCGCCT GGTGGCCGAG AAGGCCGCCT
1381 GGCTGCAGGC ACAGGAGCAG TGCCAGGCCT GGGCCGGGGC CGCCCTGGCC ATGGTGGGA

```

8.5.2.2 Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 27 bis 30

>Reference File(s): D2573-27-30ref_F_Synthesis_376.scf;D2573-27-30ref_R_Synthesis_376.scf;

```

1   AGGGCCTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61  AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121 CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCTCCG CTGCAGGGCT
181 CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241 CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301 GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCAGGC TGGCCGAGGG
361 GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421 TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481 TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541 CCTGTTGCGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTCC
601 TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661 CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721 GCGGGGCC

```

Sequenz der Probe D2573

>73-27-27F.abi;

```

1   AGGGCCTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61  AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GWGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121 CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCTCCG CTGCAGGGCT
181 CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241 CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301 GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCAGGC TGGCCGAGGG
361 GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421 TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481 TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCRTC YAGCGGGCYA
541 CCTGTTGCGT CCTCCTCGTC TGYCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTCC
601 TGTGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG

```

>73-27-30R1.abi;

```

181          TCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTKCAGACCG CCTGCAGCAC
241 CTTCTTCCTG GTCAACRACT GGCTGTGCGT GGAGACWGAG GCCAATRGCG GCCTCGTGGA
301 GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCAGGC TGGCCGAGGG
361 GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421 TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481 TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541 CCTGTTGCGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTCC
601 TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661 CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721 GCGGGGCC

```

Sequenz der Probe D2582

>82-27-P27.abi;

```

1           AACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61  AGCGTGCGGM AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121 CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG YCTGACTCCC CGCCCTCCG CTGCAGGGCT
181 CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241 CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301 GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCAGGC TGGCCGAGRG
361 GTGGCCTGWG CCACTGGYCT CCTGAAGCCA GMTGWGCCCT TTCT

```

>82-27-P30.abi;

```

481                                     CGTC CAGCGGGCCA
541 CCTGTTGCRW CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TRGGCGCCWA TGCTGTGTGG TACGGGGTCC
601 TGGGAGACGC CKCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGRCCY GATKATCTCC TCCTGCCCGA
661 CCCCTCKAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGRTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721 GCGGGGC

```

>82B-P27.abi;

```

1      CTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61 AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121 CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTCAG CCTGACTCCC CGCCCTCCG CTGCAGGGCT
181 CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241 CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301 GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCAGGC TGGCCGAGGG
361 GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421 TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481 TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541 CCTSTTGCGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCM TGGGCGCAA TGYTGTGTGG TACGGG

```

>82B-P30.abi;

```

241                                     GTGRA
301 GAAGRAGRWG CTGKCARCRA GTAAGKRCCT GGRCCGWCC CTGCCRRKKC WGGCCGARGG
361 GGTGGCCTGT GCCACWKGCC TCCTGAAGCC AGCTGTGCC TTTATGCAGG CGACGCGGCT
421 GTGCGGCGGT TCCGGCGCCT CCTGGTGGCC GAGCTGCRGC GTGGCTTTTT TGACAAGCAT
481 CTCTGGCTCT CCCTCTGGGA CCGGCCTCCT CGGAGCCGCT TCACCCGCGT CCAGCGGGCC
541 ACCTGTTGCG TCCTCCTCGT CTGCCTCTTC CTGGGCGCCA ATGCTGTGTG GTACGGGGTC
601 GTGGGAGACG CCGCCTACAG GTGGGTGCC GAGGGGGGCC CGATGATCTC TCCTGCCCCG
661 ACCCTCCTA CCCCCACAG CCTCTCCCAG CCCGGGTCTC TCTCCTCTCC TGCCACACAG
721 CGCGGGGCC

```

Sequenz der Probe D2004**>04-27F.abi;**

```

1      CTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61 AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121 CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTCAG CCTGACTCCC CGCCCTCCG CTGCAGGGCT
181 CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241 CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301 GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCAGGC TGGCCGAGGG
361 GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421 TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481 TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541 CCTGTTGMGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCAA TGCTGT

```

>04-31R1.abi;

```

181                                     C AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241 CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301 GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCAGGC TGGCCGAGGG
361 GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421 TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481 TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541 CCTGTTGAGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTCC
601 TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661 CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721 GCGGGGCC

```

Sequenz der Probe D2590

WdhD2590-27F.abi ;

```

1      CTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61    AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121   CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCTCCG CTGCAGGGCT
181   CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241   CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301   GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCCGGC TGGCCGAGGG
361   GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421   TCGGCGGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481   TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541   CCTGTTGMGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTGC
601   TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661   CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCA

```

WdhD2590-30R1.abi ;

```

1      CTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61    AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121   CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCTCCG CTGCAGGGCT
181   CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241   CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301   GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCCGGC TGGCCGAGGG
361   GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421   TCGGCGGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481   TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541   CCTGTTGMGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTGC
601   TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661   CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721   GCGGGGCC

```

Sequenz der Probe D2631

WdhD2631-27F.abi ;

```

1      CTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61    AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121   CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCTCCG CTGCAGGGCT
181   CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241   CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301   GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCCGGC TGGCCGAGGG
361   GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421   TCGGCGGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481   TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541   CCTGTTGMGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTGC
601   TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661   CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAG

```

>WdhD2631-30R1.abi ;

```

181   CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241   CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301   GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCCGGC TGGCCGAGGG
361   GTGGCCTGTG CCACTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421   TCGGCGGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481   TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541   CCTGTTGMGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTGC
601   TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661   CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721   GCGGGGCC

```

Sequenz der Probe D2577**2577-27F.abi;**

```

1      CTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61    AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121   CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCCTCCG CTGCAGGGCT
181   CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241   CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301   GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCCGGC TGGCCGAGGG
361   GTGGCCTGTG CCRCTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421   TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481   TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541   CCTGTTGCGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTGC
601   TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661   CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCAC

```

>77-27-P27.abi;

```

1      CCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61    AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121   CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCCTCCG CTGCAGGGCT
181   CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241   CTTCTTCCTG GTCAA

```

>2577-31R1.abi;

```

1      TG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61    AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121   CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCCTCCG CTGCAGGGCT
181   CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241   CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301   GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCCGGC TGGCCGAGGG
361   GTGGCCTGTG CCRCTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421   TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481   TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541   CCTGTTGCGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TACGGGGTGC
601   TGGGAGACGC CGCCTACAGG TGGGTGCCCG AGGGGGGCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661   CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721   GCGGGGCC

```

Sequenz der Probe Niere+**>N+-27F.abi;**

```

1      CTTCC GCCGCAACAG CCTGGACGTG TTCCAGATCG CCACGCCGCA CAGCCTGGGC
61    AGCGTGCGGA AGATCCGCGT GTGGCACGAC AACAAAGGTC TGTGGGGGCG CCCGCGGCTG
121   CCCCTCCGGC ACCCCACCGG CGCCCTTCAG CCTGACTCCC CGCCCCTCCG CTGCAGGGCT
181   CAGCCCCGCC TGGTTCCTGC AGCACATCAT CGTCCGGGAC CTGCAGACCG CCTGCAGCAC
241   CTTCTTCCTG GTCAACGACT GGCTGTGCGT GGAGACTGAG GCCAATGGCG GCCTCGTGGA
301   GAAGGAGGTG CTGGCAGCAA GTAAGGGCCT GGGCCCGTCC CTGCCCCGGC TGGCCGAGGG
361   GTGGCCTGTG CCRCTGGCCT CCTGAAGCCA GCTGTGCCCT TTCTGCAGGC GACGCGGCTG
421   TCGGCGGTT CCGGCGCCTC CTGGTGGCCG AGCTGCAGCG TGGCTTTTTT GACAAGCATC
481   TCTGGCTCTC CCTCTGGGAC CGGCCTCCTC GGAGCCGCTT CACCCGCGTC CAGCGGGCCA
541   CCTGTTGCGT CCTCCTCGTC TGCCTCTTCC TGGGCGCCAA TGCTGTGTGG TAC

```

>27N+-31R1.abi;

```

661      AC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721   GCGGGGCC

```

>GATC1N+31R1.abi;

```

601      GCCC GATGATCTCC TCCTGCCCGA
661   CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721   GCGGGGCC

```

>GATC2N+31R1.abi;

```

601                                     GCCC GATGATCTCC TCCTGCCCCGA
661 CCCCTCCTAC CCCCCACAGC CTCTCCCAGC CCGGGTCTCT CTCCTCTCCT GCCACACAGC
721 GCGGGGCC

```

8.5.2.3 Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 36 bis 38

>Reference File(s): 36-38ref_R_Synthesis_215.scf;36-38ref_F_Synthesis_215.scf;
= D2582

```

1   TCCAGCTTCT TGGCCTCCTT CTTCGGCTGG GAGCCGCTCA AGGTGAGTGG GACGTTGGGG
61  GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTTGGTG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCAGC TGTGACCCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAT
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CTGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCA CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTTGCCC CCAGCTCCCC GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCTT GCCCGGCTCG
481 ATGAGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CCGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

Sequenz der Probe D2573

>36-73-36F.abi;

```

1                                     GG GACGTTGGGG
61  GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTTGGTG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCAGC TGTGACCCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAT
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CTGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCA CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTTGCCC CCAGCTCCCC GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCTT GCCCGGCTCG
481 ATGAGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CCGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

>36-73-38R.abi;

```

1                                     AGTGG GACGTTGGGG
61  GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTTGGTG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCAGC TGTGACCCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAT
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CTGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCA CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTTGCCC CCAGCTCCCC GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCTT GCCCGGCTCG
481 ATGAGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CCGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

Sequenz der Probe D2582

>36-82-36F.abi;

```

1
61 GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTGGTGG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCAGC TGTGACCCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAT
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CYGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCA CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTTGCCC CCAGCTCCCG GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCT GCCCGGCTCG
481 ATGAGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CGGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

>36-82-38R.abi;

```

1 CT TGGCCTCCTT CTTCCGCTGG GAGCCGCTCA AGGTGAGTGG GACGTTGGGG
61 GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTGGTGG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCAGC TGTGACCCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAT
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CYGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCA CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTTGCCC CCAGCTCCCG GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCT GCCCGGCTCG
481 ATGAGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CGGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

Sequenz der Probe D2004

>36-04-F.abi;

```

1
61 GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTGGTGG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCAGC TGTGACCCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAT
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CTGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCA CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTTGCCC CCAGCTCCCG GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCT GCCCGGCTCG
481 ATGAGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CGGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

>36-04-38-R2.abi;

```

61 TT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTGGTGG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCAGC TGTGACCCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAT
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CTGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCA CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTTGCCC CCAGCTCCCG GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCT GCCCGGCTCG
481 ATGAGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CGGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC

```

721 TGGCCAAC

Sequenz der Probe D2577**36-77-F.abi;**

```

1                               GCTCA AGGTGAGTGG GACGTTGGGG
61  GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTGGTG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCGGC TGTGACCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAY
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CYGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCR CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTYGCCC CCAGCTCCCG GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCT GCCCAGGCTCG
481 ATGRGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CCGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

>GATC1-77-36F.abi;

```

1                               GCTCA AGGTGAGTGG GACGTTGGGG
61  GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTGGTG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCGGC TGTGACCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAY
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CYGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCR CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTYGCCC CCAGCTCCCG GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCT GCCCAGGCTCG
481 ATGRGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACC

```

>GATC1-77-38R.abi;

```

361                                                                                               C
421  AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCR CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
481  CCCCTTGCCC CCAGCTCCCG GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCT GCCCAGGCTCG
541  ATGAGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
601  GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCCTTGG
661  CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CCGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
721  AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGC

```

Sequenz der Probe Niere+**>36-N+-F.abi;**

```

1                               TGAGTGG GACGTTGGGG
61  GGCCGGGCTG CCAGCCCCTG GCGCCTGTGG GCCCCTCTGA CGCCTCCCTT GGCCCAGGTC
121 CTGCTGGAGG CCCTGTACTT CTCCTGGTG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181 ACCCTGGTGG AGAGCCCGGC TGTGACCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCC
241 CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAY
301 GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CYGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC
361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCR CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTYGCCC CCAGCTCCCG GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCT GCCCAGGCTCG
481 ATGRGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CCGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCCTGG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

>36-N+-R.abi;

```

121                               GTG GCCAAGCGGC TGCACCCCGA CGAGGATGAC
181  ACCCTGGTGG AGAGCCCGGC TGTGACCCT GTGAGTGAGC GTGTGCCCCG TGTGCGGCC
241  CCACACGGCT TTGCGCTCTT CCTGGCGAAG GAAGAGGCC GAAAGGTCAA GAAGCTGCAY
301  GGGATGCTGA GGGTGAGCCG CTCTCCTGTC CYGTGTCTGG CCGAAACCGC ACCTCCTTGC

```

```

361 AGGTTCTCCC TCGGAGACCC CGCGCGTGCR CCCTGTGGCC CTCTCGCCCC CGCCCCCGCC
421 CCCCTYGCCC CCAGCTCCCC GTGCCTGTGC CCTGCTGTGC CTCTTCCCCTG GCCCGGCTCG
481 ATGRGCAGCC TCGCGGGCCC TAGGGGCCAT CTTCTCTGCC TTTGGAGGGA CCACCTGTCC
541 GCCCCTCTGG CGGGATGCTG GCGGGTGTCT GTGCCGCCCC ACCGGCACCA GGCCCTTGG
601 CCACGGGCGG TTTGCTGGCC AGTGCCGTGA CCGTGGGCCA CACTGGGATT GGCTGACCCC
661 AGGGCCGTCC CTGCCCCCAG AGCTTCTCTG TATACATGCT CTTCTCTGCTG GTGACGCTGC
721 TGGCCAAC

```

8.5.2.4 Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 38 bis 40

>Reference File(s): 82-38-40ref_F_Synthesis_438.scf;82-38-40ref_R_Synthesis_438.scf;

```

1 GCTTCCTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241 AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841 GGCCTGGCAC TGCCTCTTGG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021 TGCTTTACAG ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA TCGGCTGGG

```

Sequenz der Probe D2573

>73-38-38F.abi;

```

1 GCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCAATTG ATGCCCGCCA CATCCCATCT CGATCTTGTG CTTGGTGCAA
181 CCCAGTCCCC AGGGGACGTG GGGCAGCGTC TTGGATTGTC GTGGGTTGTC AGGACCGGAG
241 TAGGTGGTGT TGGCAACACG GGACCGGAGA CACCATTCAA AACGTCCCGG GCGCCTGGG
301 GGTGCCCGGT CAGTTGAGCG TCAGAGTCTT GGTTCGGTGC CAGGTCACGA TCCCACAGTG
361 TCGGGGGTGA AAGCCCCGCG TCAGACTGCG TCCTGACGTT GCGGACCCTA CTTGGGATTG
421 TGTCTCCCTC ATTCTCTACC CCTACCCCGC TCATGCTGTC TGTGTCTCTC TCAAAAACAAA
481 TAAATAATCT TAGAGTACCC AGAACCGCCC CGTAACACTT CCTGCTCCAA ATGTCAGTAT
541 GCTGAGCTTG AGGCTTCTGG GTCTTGACCT CGTCCCGTCC CGTGGCACCG GCAGCCTGCT
601 GTTGGCTGGG CTGGGGCGGC AGGAGCAGTG CTCTGTGGGC CTCTGACCAC CCCCGCCCCC
661 AGGGGTGCAG GGCCTGCGG GGTAGAACAC GGGACTCTGT CTGTGTGAGC AGGTCTGAGG
721 A

```

>73-38-40R.abi;

```

421 TCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841 GGCCTGGCAC

```

Sequenz der Probe D2582**>82-38F.abi;**

```

1      CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61     CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121    CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181    CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241    AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAAC ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301    GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361    CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421    GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAAACAAAT
481    AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGT CAGTATG
541    CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601    TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661    GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721    GTTTTGGCC

```

>82-40R.abi;

```

361                                     GTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421    GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAAACAAAT
481    AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGT CAGTATG
541    CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601    TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661    GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721    GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781    AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841    GGCCTGGCAC TGCGTCTTGG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901    AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961    GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCAGC TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021   TGCTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081   CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGG

```

Sequenz der Probe D2004**>3804-38F.abi;**

```

1      CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61     CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121    CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181    CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241    AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAAC ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301    GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361    CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421    GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAAACAAAT
481    AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGT CAGTATG
541    CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601    TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661    GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721    GTTTTGGCCG

```

>3804-40R.abi;

```

421                                     CAAAAACAAAT
481    AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGT CAGTATG
541    CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601    TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661    GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721    GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781    AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841    GGCCTGGCAC

```

Sequenz der Probe D2577**>77-38F.abi ;**

```

1      CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61     CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121    CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181    CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCG TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241    AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACYGGAGAY ACCATTCAAAC ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301    GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361    GGGGGTGAAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421    TCTCCCTCAT TTCTCTACCC CTACCCCGCT CRTGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAA
481    A

```

>77-40R.abi ;

```

841                                         TC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901    AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961    GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021   TGCTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081   CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA

```

Sequenz der Probe D3142**>N+38-38F.abi ;**

```

1      CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCSGCAGC
61     CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121    CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181    CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCG TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241    AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACYGGAGAY ACCATTCAAAC ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301    GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361    CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421    GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CRTGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAA

```

>N+38-40R.abi ;

```

661                                         TC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721    GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCYTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781    AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841    GGCCTGGCAC TGCGTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901    AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961    GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021   TGCTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGS GCGGCAGCCG
1081   CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA TCGGCT

```

>GATC1-N+38-38F.abi ;

```

1      CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61     CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121    CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181    CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCG TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241    AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACYGGAGAY ACCATTCAAAC ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301    GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361    CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421    GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CRTGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAA
481    AA

```

>GATC1-N+38-40R.abi ;

```

661                                         TC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721    GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCYTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781    AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841    GGCCTGGCAC

```

Sequenz der Probe D1989**>89-38F.abi ;**

```

1          TGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATYTTGTCC TTGGTGCAAC
181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241 AGGTGGTGTG GGCAACACGG GACCGGAGAY ACCRATTCAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301 GTGCCCCGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAA

```

>89-40R.abi ;

```

841                                     TGGCTGCA TTCTGGTTCC
901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021 TGCTTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA

```

Sequenz der Probe D1990**>90-38F.abi ;**

```

1          CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241 AGGTGGTGTG GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301 GTGCCCCGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTGAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCAG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG

```

>90-38R.abi ;

```

361                                     CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTGAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCAG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841 GGCCTGGCAC TCGCTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021 TGCTTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA

```

Sequenz der Probe D2000**>00-38F.abi ;**

```

1          CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241 AGGTGGTGTG GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG

```

301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
 361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
 421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAA
 481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAGTATG
 541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
 601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
 661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
 721 GTTTTGGC

>00-40R.abi ;

361 CGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
 421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAA
 481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAGTATG
 541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
 601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
 661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
 721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
 781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TCGCGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
 841 GGCCTGGCAC TCGCTCCTTG CTCTCTCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
 901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
 961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
 1021 TGCTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
 1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTA

Sequenz der Probe D2039**>39-38F.abi ;**

1 AGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
 61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
 121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
 181 CCAGTCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
 241 AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
 301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
 361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
 421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAA

>39-40R.abi ;

841 TGGCTGCA TTCTGGTTCC
 901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
 961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
 1021 TGCTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
 1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGG

Sequenz der Probe D2042**>42-38F.abi ;**

1 CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
 61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
 121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
 181 CCAGTCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
 241 AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
 301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
 361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
 421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAA
 481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAGTATG
 541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
 601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
 661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
 721 GTTTTGGCCG TGGATG

>42-38R.abi ;

```

421          A TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCTAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCCG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841 GGCCTGGCAC TGCCTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021 TGCTTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGC

```

Sequenz der Probe D2050**>50-38F.abi ;**

```

1          TGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTGC CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCCGAGT
241 AGGTGGTGTGTT GGCAACACGG GACCCGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CCGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCTAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCCG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGAT

```

>50-38R.abi ;

```

361          GT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CCGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCTAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCCG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841 GGCCTGGCAC TGCCTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021 TGCTTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA TCGGCTGGG

```

Sequenz der Probe D2055**>55-38F.abi ;**

```

1          CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTGC CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCCGAGT
241 AGGTGGTGTGTT GGCAACACGG GACCCGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CCGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCTAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCCG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGAT

```

>55-38R.abi ;

```

361                                     TAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841 GGCCTGGCAC TGCGTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021 TGCTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTA

```

Sequenz der Probe D2057**>57-38F.abi ;**

```

1          CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241 AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGA

```

>57-38R.abi ;

```

361                                     TAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841 GGCCTGGCAC TGCGTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021 TGCTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTA

```

Sequenz der Probe D2064**>64-38F.abi ;**

```

1          CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCT TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
241 AGGTGGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTCAGTATG
541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG

```

601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
 661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
 721 GTTTTGGCCG TGGAT

>64-38R.abi ;

1 CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
 61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
 121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
 181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCTG TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
 241 AGGTGGTGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
 301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
 361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
 421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
 481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTGAGTATG
 541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
 601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
 661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
 721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
 781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
 841 GGCCTGGCAC TGCGTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
 901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
 961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
 1021 TGCTTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
 1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA

Sequenz der Probe D2076**>76-38F.abi ;**

1 CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
 61 CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTCATGCGCG TGTCCACCTG
 121 CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTCC TTGGTGCAAC
 181 CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCTG TGGGTTGTCA GGACCGGAGT
 241 AGGTGGTGTGTT GGCAACACGG GACCGGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
 301 GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
 361 CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
 421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
 481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTGAGTATG
 541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
 601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
 661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
 721 GTTTTGGC

>76-38R.abi ;

361 AC TTGGGATTCT
 421 GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
 481 AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTGAGTATG
 541 CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCGG CAGCCTGCTG
 601 TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
 661 GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGACTCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
 721 GTTTTGGCCG TGGATGTCCC ACGTCCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
 781 AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
 841 GGCCTGGCAC TGCGTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
 901 AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
 961 GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
 1021 TGCTTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCGGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
 1081 CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA TCGGCTGGG

Sequenz der Probe D2086**>86-38F.abi ;**

```

1      CTGCC ACAGCCACGC CTACCGCCTG CAGAGTGCCA TCAAACAGGA GCTCGGCAGC
61     CAGGCCTTCC TGGCCATCAC CCGGTACAGG CACCCCGTG CTGATGCGCG TGTCCACCTG
121    CCAGGCCGGG GAGGCATTGA TGCCCGCCAC ATCCCATCTC GATCTTGTC TTTGGTGCAAC
181    CCAGTCCCCA GGGGACGTGG GGCAGCGTCT TGGATTGTCG TGGGTTGTCA GGACCCGAGT
241    AGGTGGTGTG GGCAACACGG GACCCGAGAC ACCATTCAAA ACGTCCCGGG GCGCCTGGGG
301    GTGCCCGGTC AGTTGAGCGT CAGAGTCTTG GTTTCGGTGC AGGTCACGAT CCCACAGTGT
361    CGGGGGTGAA AGCCCCGCGT CAGACTGCGT CCTGACGTTG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421    GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481    AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTGAGTATG
541    CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCAG CAGCCTGCTG
601    TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661    GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGAATCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721    GTTTTG

```

>86-38R.abi ;

```

361                                     TG CGGACCCTAC TTGGGATTCT
421    GTCTCCCTCA TTCTCTACCC CTACCCCGCT CATGCTGTCT GTGTCTCTCT CAAAACAAAT
481    AAATAATCTT AGAGTACCCA GAACCGCCCC GTAACACTTC CTGCTCCAAA TGTGAGTATG
541    CTGAGCTTGA GGCTTCTGGG TCTTGACCTC GTCCCGTCCC GTGGCACCAG CAGCCTGCTG
601    TTGGCTGGGC TGGGGCGGCA GGAGCAGTGC TCTGTGGGCC TCTGACCACC CCCGCCCCCA
661    GGGGTGCAGG GCACTGCCGG GTAGAACACG GGAATCTGTC TGTGTGAGCA GGTCTGAGGA
721    GTTTTGCGCG TGGATGTCCC ACGTCCTGCT CCCCTACATC CATGGGAACC AGTCCAGCCC
781    AGAGCTGGGG CCCCCGCGAC TGCGGCAGGT GCGGCTGCAG GAAGGTGAGC CGTGGAGGGA
841    GGCCTGGCAC TGCGTCCTTG CTCTCTCCCA AAGAGACACC CCTGGCTGCA TTCTGGTTCC
901    AGCTGCCTAG CTGTGCATCC CTTACTTTCT CCGTCTGTGA CACTGTGACC TCTGCCTTCT
961    GGGTTGCAGG GAGGGTCTGG TGGGATCACG TAGAGCCCAG CTGGCCAAGA ACTCCCCCTC
1021   TGCTTTCAGC ACTCTGCCCA GACCCTGCTC GCCCAGGTGT GCCCGTGTGC GCGGCAGCCG
1081   CAGGCTCCTT CAGCACAGGC GACTATGGCA TCGGCTGGG

```

8.5.2.5 Sequenzen aus dem Abschnitt von Exon 43 bis 46

>Reference File(s) : 82- 43-46ref_F_Synthesis_364.scf;82- 43-46ref_R_Synthesis_364.scf ;

```

1      GCGGACGCG CGCCGCACAG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGCTGGTG GCCCTGACCG
61     CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCAGC TGGGTGTGCG CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121    TCGTGCGCCG CCGCCCGCGC CGCTTACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181    CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241    CGGCGGGGGT CGGCCGGGGC CTGGGCGGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301    CGACACCGCT CGCCCCAGG CCGCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTCCGGTTT
361    GGCACAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGG CCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421    GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481    AGGGGGGGCT CAGCCCGGGA CGCGCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTCCG
541    CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601    CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCGCTG CTGTGCACTG
661    GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCCTC CTGCGGTGGC
721    GGTACCACGC GCTGCGTGGG GAGCTTTACC GGCCGGCCTG GGAGCCGAG GACTACGAGA
781    TGGTGGAGCT GTTCTTGCGC CGGCTGCGCC TCTGGATGGG CTTAGTAAG GTTAAGGAGG
841    TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC GCACCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGGTGC
901    AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCC CCAGTTCCGT CACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961    GATGGAACCG CTGCCCTCGC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCCG ACGCACCCCC
1021   CCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCCGGCC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081   CCGCGGGGGC CTGAGCCGGC TGGGGCCGCG TGGGGAGCC

```

Sequenz der Probe D2573**>D73-P43F.abi ;**

```

1      ACGCG CGCCGCGCAG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGCTGGTG GCCCTGACCG
61    CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCCAGC TGGGTGTGCG CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121   TCGTGCGCCG CCGCCC GCGC CGCTTCACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181   CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241   CGGCGGGGGT CGGCTGGGGC CTGGGCCGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301   CGACACCGCT CGCCCCCAGG CCGCCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTTCGGTTTTT
361   CGGCAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421   GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GGCGGCGAGG CCGTCAGGGG
481   AGGGGGGGCT CAGCCC GGGG CGCGCCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTGC
541   CTTCTGCGT GACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601   CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCTGCT CTGTGCACTG
661   GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCCTC CTGCGGTGG

```

>D73-P46R.abi ;

```

541                                     CCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601   CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCTGCT CTGTGCACTG
661   GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCCTC CTGCGGTGGC
721   GGTACCACGC GCTGCGTGGG GAGCTTTACC GGCCGGCCTG GGAGCCGCAG GACTACGAGA
781   TGGTGGAGCT GTTYTTGCGC CGGCTGCGCC TYTGATGGG CTTTCAAGTAAG GTTAAGGAGG
841   TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC GCACCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGGTGC
901   AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCCC CCAGTTCCGT CACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961   GATGGAACCG CTGCCCTCGC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCCG ACGCACCCCC
1021  CCCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCC GGC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081  CGGCGGGGGC CTGAGCCGGC TGGGGCCGCG TGGGGAGCC

```

Sequenz der Probe D2582**>D82-P43F.abi ;**

```

1      G CGCCGCACAG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGCTGGTG GCCCTGACCG
61    CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCCAGC TGGGTGTGCG CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121   TCGTGCGCCG CCGCCC GCGC CGCTTCACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181   CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241   CGGCGGGGGT CGGCCGGGGC CTGGGCCGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301   CGACACCGCT CGCCCCCAGG CCGCCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTTCGGTTTTT
361   CGGCAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421   GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GGCGGCGAGG CCGTCAGGGG
481   AGGGGGGGCT CAGCCC GGGG CGCGCCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTGC
541   CTTCTGCGT GACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601   CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCTGCT CTGTGCACTG
661   GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCCTC CTGCGGTGG

```

>D82-P46R.abi ;

```

541                                     AGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601   CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCTGCT CTGTGCACTG
661   GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCCTC CTGCGGTGGC
721   GGTACCACGC GCTGCGTGGG GAGCTTTACC GGCCGGCCTG GGAGCCGCAG GACTACGAGA
781   TGGTGGAGCT GTTCTTGCGC CGGCTGCGCC TCTGGATGGG CTTTCAAGTAAG GTTAAGGAGG
841   TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC GCACCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGGTGC
901   AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCCC CCAGTTCCGT CACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961   GATGGAACCG CTGCCCTCGC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCCG ACGCACCCCC
1021  CCCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCC GGC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081  CGGCGGGGGC CTGAGCCGGC TGGGGCCGCG TGGGGAGCC

```

Sequenz der Probe D3143**>Ni-43-46.1R.abi;**

```

361                               GGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421 GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGGGGGCT CAGCCCGGGA CGCGCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTCC
541 CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601 CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCGCTG CTGTGCACTG
661 GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCTCTC CTGCGGTGGC
721 GGTACCACGC GCTGCGTGGG GAGCTYTACC GGCCGGCCTG GGAGCCGCAG GACTACGAGA
781 TGGTGGAGCT GTTYTTGCGC CGGCTGCGCC TCTGGATGGG CTTTCAAGTAAG GTTAAGGAGG
841 TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC GCACCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGGTGC
901 AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCC CCAGTTCCGT CACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961 GATGGAACCG CTGCCCTCGC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCGG ACGCACCCCC
1021 CCCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCCGGCC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081 CGGCGGGGGC CTGAGCCGGC TGGGGCCGCG TGGGGAGCC

```

Sequenz der Probe D2004**>4-43-43F.abi;**

```

1                               AG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGCTGGTG GCCCTGACCG
61 CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCCAGC TGGGTGTGCG CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121 TCGTGCGCCG CCGCCCGCGC CGCTTACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181 CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241 CGGCGGGGGT CGGCTGGGGC CTGGGCCGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301 CGACACCGCT CGCCCCCAGG CCGCCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTTCGGTTTTT
361 CGGCAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421 GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGGGGGCT CAGCCCGGGA CGCGCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTCC
541 CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601 CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCGCTG CTGTGCACTG
661 GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCTCTC CTGCGGTGGC
721 GGT

```

>4-43-46R.abi;

```

781 AGCT GTTCTTGCGC CGGCTGCGCC TCTGGATGGG CTTTCAAGTAAG GTTAAGGAGG
841 TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC KCACCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGKTGC
901 AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCC CCAGTTCCGT YACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961 GATGGAACCG CTGCCCTCGC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCGG ACGCACCCCC
1021 CCCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCCGGCC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081 CGGCGGGGGC CTGAGCCGGC TGGGGCCGCG TGGGGAGCC

```

> GATC1-4-43-43F.abi;

```

1                               AG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGCTGGTG GCCCTGACCG
61 CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCCAGC TGGGTGTGCG CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121 TCGTGCGCCG CCGCCCGCGC CGCTTACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181 CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241 CGGCGGGGGT CGGCTGGGGC CTGGGCCGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301 CGACACCGCT CGCCCCCAGG CCGCCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTTCGGTTTTT
361 CGGCAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421 GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGGGGGCT CAGCCCGGGA CGCGCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTCC
541 CTTCTT

```

> GATC1-4-43-46R.abi;

```

781 AGCT GTTCTTGCGC CGGCTGCGCC TCTGGATGGG CTTTCAAGTAAG GTTAAGGAGG
841 TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC KCACCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGKTGC
901 AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCC CCAGTTCCGT YACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961 GATGGAACCG CTGCCCTCGC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCGG ACGCACCCCC
1021 CCCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCCGGCC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081 CGGCGGGGGC CTGAGCCGGC TGGGGCCGCG TGGGGAGCC

```

Sequenz der Probe D2577**>7-43-43F.abi ;**

```

1           CG CGCCGCRGAG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGYTGGTG GCCCTGACCG
61  CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCCAGC TGGGTGTGCG CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121 TCGTGCGCCG CCGCCCAGCG CGCTTCACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181 CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241 CGGCGGGGGT CGGCGGGGGC CTGGGCCGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301 CGACACCGCT CGCCCCCAGG CCGCCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTTCGGTTTTT
361 CGGCAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421 GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGGGGGCT CAGCCCAGGA CGCGCCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTGC
541 CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601 CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCGCTG CT

```

> 7-43-46R.abi ;

```

361                                     GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421 GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGGGGGCT CAGCCCAGGA CGCGCCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTGC
541 CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601 CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCGCTG CTGTGCACTG
661 GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCCTC CTGCGGTGGC
721 GGTACCACGC GCTGCGTGGG GAGCTTTACC GGCCGGCCTG GGAGCCGCAG GACTACGAGA
781 TGGTGGAGCT GTTCTTGCGC CGGCTGCGCC TCTGGATGGG CTTAGTAAG GTTAAGGAGG
841 TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC GCACCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGGTGC
901 AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCCC CCAGTTCCGT CACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961 GATGGAACCG CTGCCCTCGC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCCG ACGCACCCCC
1021 CCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCCGGCC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081 CGGCGGGGGC CTGAGCCGGC TGGGGCCGCG TGGGGAGCC

```

Sequenz der Probe D2580**>2.x80-43F.abi ;**

```

1           ACGCG CGCCGCGCAG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGCTGGTG GCCCTGACCG
61  CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCCAGC TGGGTGTGCG CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121 TCGTGCGCCG CCGCCCAGCG CGCTTCACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181 CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241 CGGCGGGGGT CGGCTGGGGC CTGGGCCGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301 CGACACCGCT CGCCCCCAGG CCGCCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTTCGGTTTTT
361 CGGCAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421 GCTCGCCGTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGGGGGCT CAGCCCAGGA CGCGCCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTGC
541 CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601 CTGGGGG

```

>2.x80-46R.abi ;

```

421           GTG GCTTATGCCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGGGGGCT CAGCCCAGGA CGCGCCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTGC
541 CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601 CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCGCTG CTGTGCACTG
661 GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCCTC CTGCGGTGGC
721 GGTACCACGC GCTGCGTGGG GAGCTYTACC GGCCGGCCTG GGAGCCGCAG GACTACGAGA
781 TGGTGGAGCT GTTCTTGCGC CGGCTGCGCC TCTGGATGGG CTTAGTAAG GTTAAGGAGG
841 TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC GCMCCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGGTGC
901 AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCCC CCAGTTCCGT CACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961 GATGGAACCG CTGCCCTCGC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCCG ACGCACCCCC
1021 CCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCCGGCC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081 C

```

Sequenz der Probe D3142**>GATC1-N43F.abi ;**

```

1           CG CGCCGRCAG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGCTGGTG GCCCTGACCG
61  CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCCAGC TGGGTGTTCGC CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121 TCGTGCGCCG CCGCCCAGCG CGCTTACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181 CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241 CGGCGGGGGT CGGCCGGGGC CTGGGCCGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301 CGACACCGCT CGCCCCAGG CCGCCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTTCGGTTTT
361 CGGCAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421 GCTCGCCGTG GCTTATGCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGG

```

>N+43-43F.abi ;

```

1           ACGCG CGCCGRCAG TCCGGAGCCT GGGCGCGGTG GCTGCTGGTG GCCCTGACCG
61  CGGCCGCGGC GCTCGTGCGC CTGGCCCAGC TGGGTGTTCGC CGACCGCCAG TGGACCCGCT
121 TCGTGCGCCG CCGCCCAGCG CGCTTACCA GCTTCGAGCA GGTGGCGCAG CTGAGCTCCG
181 CGGCTCGCGG CCTGGCCGCC TCGCTGCTCT TTCTCCTGCT GGTCAAGGTG AGGGCTGGGC
241 CGGCGGGGGT CGGCYGGGGC CTGGGCCGGG CCGGGTCGAA CCGGCGGCGG TTCGGTCAAC
301 CGACACCGCT CGCCCCAGG CCGCCCAGCA GCTGCGCTTC GTGCGCCAGT GGTTCGGTTTT
361 CGGCAAGACG CTGTACAGGG CCCTGCCGGA GCTCGTGGGC GCGGCCTTGG GCCTGGTGGT
421 GCTCGCCGTG GCTTATGCC AGCTGGCCAT TCTGGTAGGT GCGGCGGAGG CCGTCAGGGG
481 AGGGGGGGCT CAGCCCGGGA CGCGCCCTC ACGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTCC
541 CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601 CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCGCTG CTGTGCACTG
661 GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCTCTC CTGCG

```

>N+43-46R.abi ;

```

481           CGCGCGCCC CTTCCCCTTG CAGCTGGTCC
541 CTTCTGCGT GGACTCGTTT CGGAGCGCCC TGAGGGCCGT CTTGGTGCCG TGTCCCGGGT
601 CTGGGGGTCC TGCCCCGTGC CCTGCCGAGT CCTGGCGCCT CTCCCCGCTG CTGTGCACTG
661 GGCTCTGGGC GCTGCGGCTG TGGGGGGCCC TGAGGCTGGG GCGGTCTCTC CTGCGGTGGC
721 GGTACCACGC GCTGCGTGGG GAGCTTTACC GGCCGGCCTG GGAGCCGCAG GACTACGAGA
781 TGGTGGAGCT GTTYTTGCGC CGGCTGCGCC TYTGGATGGG CTTAGTAAG GTTAAGGAGG
841 TGGGTACGGC CCAGTGGGGG GGAGAGGGAC GCACCCTGGG CCCAGGGGAG CCCGGGGTGC
901 AGCCGGACTG ACGGAGCCCC TGTGCCGCC CCAGTTCCGT YACAAAGTCC GGTTTGAAGG
961 GATGGAACCG CTGCCCTCRC GCTCCTCCAG GGGCTCCAAG TCGTCCCCGG ACGACCCCC
1021 CCCCAGTGGG GGCTCAGACG CCTCCCGGCC CTCCACGGCC TCCAGCCAGC TGGACACACC
1081 CGGCGGGGGC CTGAGCCGGC TGGGGCCGCG TGGGGAGCC

```

8.5.2.6 Sequenzen ab Exon 46 des felines PKD1-Gens bis im Exon 40 des felines**TSC2-Gens.****Vergleichsequenz für die mit Primer TSC-F sequenzierten PCR-Produkte**

>Reference File(s): backlon PKD-TSCF referenz_F_Synthesis_254.scf ;

```

1  TGCAGCCGGA CTGACGGAGC CCCTGTGCCG CCCCAGTTC CGTCACAAAG TCCGGTTTGA
61  AGGGATGGAA CCGCTGCCCT CGCGCTCCTC CAGGGGCTCC AAGTCGTCCC CGGACGCACC
121 CCCCCCAGT GGGGGCTCAG ACGCCTCCCG GCCCTCCACG GCCTCCAGCC AGCTGGACAC
181 ACCCGGCGGG GGCCTGAGCC GGCTGGGGCC GCGTGGGGAG CCCGAGCCCT CTCGTCTCCA
241 GGCCGTGTTT GAGGCCCTTC TGACCCAGTT CGACCGACTC AACCAGGCCA CGGAGGATGT
301 CTACCAGCTG GAGCAGAGGC TTCAGAGCCT GCAAGGCCGC AGGAGCACGG GTGCCACAG
361 CCCCTCCTCA GACCTGCGGC CGGCCCTGCC TGGCCGTCTT GCCCCGGCCA GTCGTGGCGT
421 GGGTCTGGCC CCGGGCCCCT GCAGGGTTTC CCTGCGGGCT AAGAACAAGG TCCACCCCGG
481 CAGCACTTAG TCCCGGGGGG TCCCGGGCTC AGACCCCTTC CCTGGGGTGG TCCTCTGGCT
541 TCAGTCCCCT CTGCAGAGGG AGCCAGAGCA GACACCGCTC AGTATTAATT TCTGCCACCC
601 TTACGGTCTC GGGCCAGGCA GAAGAGCTGC ACGAAGGCC CCAGGGAGCA GTCGTCTCTC
661 TCTCTGTGGG TCTCAGCACT TTAAAGACGC CATGTGGGCA GCCAGGACCC AGGGTCCCC

```

Vergleichsequenz für die mit Primer TSC-R sequenzierten PCR-Produkte

>Reference File(s) : backlon PKD-TSC-R_F_Synthesis_358.scf;

```

1   CCCGCCCCCG CTCCTTCCTG AAGGCTCCCC GTCCCCTGCA GATCCGTGAG GAAGCCCCACT
61  ACTCCAACCC CAGCCTGCCG CTGACGCAGA CGCACCCCTC GGGCCACGCC AAGGCCCCCG
121 CCGAGCCCAC GCCCACGTAC GAGACGGGCC AGCGGAAGCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCGGGTCCC GTGCCCCGCT GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTCCG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACACCCAC GGGGGGCCAC CCTGCCACCA CCCACGTGTT CTCCGGTGCA CAGACCCTCA
421 CCTGCCCCAG CCCCAGGGAG CAGCCCCGGG GCAGGGCTGC TTCCACCCTG GAGTTCCTGG
481 CCCGCCCGCG TCCTCCTCCT CCCCAGACC TGACACCCGC GGGTCTGGGG TCTGCCCTCT
541 TGCTGTCACA CCCCAGGCAG AGAGCAAGGC CGTGGGGGTG GGGAGGGGGG TGGTGCACAG
601 AAGTGCCGAG GCGATGGCTG GGCCCTTCCA ACAAGCCTCC CATCCCAGCC CCAGGCCCAA
661 CTTGGATCCA ACTCTGGTTA GGTGTCTGGG GAGGGAGGCC AGCGCTGCAG CCCAGCACC
721 CCTTCCCA

```

Sequenz der Probe D2573

>73-TSC-F.abi ;

```

121           CAG ACGCCTCCCG GCCCTCCACG GCCTCCAGCC AGCTGGACAC
181 ACCCGGCGGG GGCCTGAGCC GGCTGGGGCC GCGTGGGGAG CCCGAGCCCT CTCGTCTCCA
241 GGCCGTGTTC GAGGCCCTTC TGACCCAGTT CGACCGACTC AACCAGGCCA CGGAGGATGT
301 CTACCAGCTG GAGCAGAGGC TTCAGAGCCT GCAAGGCCGC AGGAGCACGG GTGCCACAG
361 CCCCTCCTCA GACCTGCGGC CGGCCCTGCC TGGCCGTCTT GCCCGGGCCA GTCGTGGCGT
421 GGGTCTGGCC CCGGGCCCCT GCAGGGTTTC CCTGCGGGCT AAGAACAAGG TCCACCCCGG
481 CAGCACTTAG TCCCGGGGGG TCCCGGGCTC ARACCCCTTC CCTGGGGTGG TCCTCTGGCT
541 TCAGTCCCCT CTGCARAGGG AGCCAGAGCA GACCCCGTTC AGTATTAATT TCTGCCACCC
601 TTACGGTCTC GGGCCAGGCA GAAGAGCTGC ACGAAGGCCC CCAGGGAGCA GTCGTCTCTC
661 TCTCTGTGGG TCTCAGCACT TTAAAGACGC CATGTGGGCA GCCAGGACCC AGGGTCCCCT

```

>73-TSC-R.abi ;

```

61           CACCCTCC GGGCCACGCC AAGGCCCCCG
121 CCGAGCCCAC GCCCACGTAC GAGACGGGCC AGCGGAAGCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCGGGTCCC GTGCCCCGCT GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTCCG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACACCCAC GGGGGGCCAC CCTGCCACCA CCCACGTGTT CTCCCTGCCA CCACCCACGT
421 GTTCTCCGGT GCACAGACCC TCACCTGCCC CAGCCCCGGG AGCCAGCCCC GGGGCAGGGC
481 TGCTTCCACC CTGGAGTTCT GGCGCCGCC GCGTCTCTCT CCTCCCCAG ACCTGACACC
541 CGCGGGTCTG GGCTCTGCCC TCTTGCTGTG ACAGCCCAGG CAGAGAGCAA GGCCGCGGGG
601 GTGGGGAGGG GGGTGGTGAC AGGAAGTGCC GAGGCGATGG CTGGGCCCTT CCAACAAGCC
661 TCCCATCCCA RCCYCAGGCC CAACTTGGAT CCAACTCTGG TTAGGTGTCT GGGGAGGGAG
721 GCCAGCGCTG CAGCCCCAGC ACCCCTTCCC

```

Sequenz der Probe D2582

>82-TSC-F.abi ;

```

61           AAGTCGTCCC CGGACGCACC
121 CCCCCCAGT GGGGGCTCAG ACGCCTCCCG GCCCTCCACG GCCTCCAGCC AGCTGGACAC
181 ACCCGGCGGG GGCCTGAGCC GGCTGGGGCC GCGTGGGGAG CCCGAGCCCT CTCGTCTCCA
241 GGCCGTGTTC GAGGCCCTTC TGACCCAGTT CGACCGACTC AACCAGGCCA CGGAGGATGT
301 CTACCAGCTG GAGCAGAGGC TTCARAGCCT GCAAGGCCGC AGGAGCACGG GTGCCACAG
361 CCCCTCCTCA GACCTGCGGC CGGCCCTGCC TGGCCGTCTT GCCCGGGCCA GTCGTGGCGT
421 GGGTCTGGCC CCGGGCCCCT GCAGGGTTTC CCTGCGGGCT AARAACAAGG TCCACCCCGG
481 CAGCACTTAG TCCCGGGGGG TCCCGGGCTC ARACCCCTTC CCTGGGGTGG TCCTCTGGCT
541 TCAGTCCCCT CTGCAGAGGG AGCCAGAGCA GACMCCGCTC AGTATTAATT TCTGCCACCC
601 TTACGGTCTC GGGCCAGGCA GAAGAGCTGC ACGAAGGCCC CCAGGGAGCA GTCGTCT

```

>82-TSC-R.abi ;

```

61
121 CCGAGCCCAC GCCCACGTAC GAGACGGGCC AGCGGAAGCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG CGG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCGGGTCCC GTGCCCCGCT GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACCTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTCCG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACACCCAC GGGGGGCCAC CCTGCCACCA CCCACGTGTT CTCCCTGCCA CCACCCACGT
421 GTTCTCCGGT GCACAGACCC TCACCTGCCC CAGCCCCGGG AGCCAGCCCC GGGCAGGGC
481 TGCTCCACC CTGGAGTTCT GCGCCCGCCC GCGTCCTCCT CCTCCCCAG ACCTGACACC
541 GCGGGTCTG GGCCTCTGCC TCTTGCTGTC ACAGCCCAGG CAGAKAGCAA GGCCGCGGG
601 GTGGGGAGGG GGGTGSTGAC AGGAAGTGYC GAGGCGATGG CTGGGCCCTT CCAACAAGCC
661 TCCCATCCCA GCCCCAGGCC CAAMTTGGAT CCAACTCTGG TTAGGTGTCT GGKGAGGGAG
721 GCC

```

Sequenz der Probe D2598**>98-TSC-F.abi ;**

```

61
121 CCCCCCAGK GGGGGCTCAG ACGCCTCCCG GCCCTCCACG GCCTCCAGCC AGCTGGACAC CC AAGTCGTCCC CGGACGCACC
181 ACCCGGCGGG GGCCTGAGCC GGYTGGGGCC GCGTGGGGAG CCCGAGCCCT CTCGTCTCCA
241 GGCCGTGTTC GAGGCCCTTC TGACCCAGTT CGACCGACTC AACCAGGCCA CGGAGGATGT
301 CTACCAGCTG GAGCAGAGGC TTCAGAGCCT GCAAGGCCGC AGGAGCACGG GTGCCACAG
361 CCCCTCCTCA GACCTGCGGC CGGCCCTGCC TGGCCGTCTT GCCCCGGCCA GTCGTGGCGT
421 GGGTCTGGCC CCGGGCCCCT GCAGGGTTTC CCTGCGGGCT AARAACAAGG TCCACCCCGG
481 CAGCACTTAG TCCCGGGGGG TCCCGGGCTC AGACCCCTTC CCTGGGGTGG TCCTCTGGCT
541 TCAGTCCCCT CTGCAGAGGG AGCCAGAGCA GACMCCGCTC AGTA

```

>98-TSC-F2.abi ;

```

241 C TGACCCAGTT CGACCGACTC AACCAGGCCA CGGAGGATGT
301 CTACCAGCTG GAGCARAGGC TTCARAGCCT GCAAGGCCGC AGGAGCACGG GTGCCACAG
361 CCCCTCCTCA RACCTGCGGC CGGCCCTGCC TGGCCGTCTT GCCCCGGCCA GTCGTGGCGT
421 GGGTCTGGCC CCGGGCCCCT GCAGGGTTTC CCTGCGGGCT AARAACAAGG TCCACCCCGG
481 CAGCACTTAG TCCCGGGGGG TCCCGGGCTC AGACCCCTTC CCTGGGGTGG TCCTCTGGCT
541 TCAGTCCCCT CTGCARAGGG AGCCAGAGCA GACMCCGYTC AGTATTAATT TCTGCCACCC
601 TTACGGTCTC GGGCCAGGCA GAAGAGCTGC ACGAAGGCC CCAGGG

```

>98-TSC-R.abi ;

```

61 CACCCTCC GGGCCACGCC AAGGCCCCGG
121 CCGAGCCCAC GCCCACGTAC GAGACGGGCC AGCGGAAGCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCGGGTCCC GTGCCCCGCT GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACCTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTCCG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACACCCAC

```

Sequenz der Probe D2004**>TSC04-TSCF.abi ;**

```

61 AAGTCGTCCC CGGACGCACC
121 CCCCCCAGT GGGGGCTCAG ACGCCTCCCG GCCCTCCACG GCCTCCAGCC AGCTGGACAC
181 ACCCGGCGGG GGCCTGAGCC GGCTGGGGCC GCGTGGGGAG CCCGAGCCCT CTCGTCTCCA
241 GGCCGTGTTC GAGGCCCTTC TGACCCAGTT CGACCGACTC AACCAGGCCA CGGAGGATGT
301 CTACCAGCTG GAGCARAGGC TTCARAGCCT GCAAGGCCGC AGGAGCACGG GTGCCACAG
361 CCCCTCCTCA RACCTGCGGC CGGCCCTGCC TGGCCGTCTT GCCCCGGCCA GTCGTGGCGT
421 GGGTCTGGCC CCGGGCCCCT GCAGGGTTTC CCTGCGGGCT AARAACAAGG TCCACCCCGG
481 CAGCACTTAG TCCCGGGGGG TCCCGGGCTC ARACCCCTTC CCTGGGGTGG TCCTCTGGCT
541 TCAGTCCCCT CTGCARAGGG AGCCAGAGCA GACCCCGTTC AGTATTAATT TCTGCCACCC
601 TTACGGTCTC GGGCCAGGCA GAAGAGCTGC ACGAAGGCC CCAGGGAGCA GTCGTCTCTC
661 TCTCTSTGGG TCTCAGCACT TTAAAGACGC CATGTGGGCA GCCAGGACCC AGGGTCCCCT

```

>TSC04-TSCR.abi ;

```

61                               TCC GGGCCACGCC AAGGCCCCGG
121 CCGAGCCCAC GCCCACGTAC GAGACGGGCC AGCGGAAGCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCGGGTCCC GTGCCCCGCT GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTCCG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACACCCAC GGGGGGCCAC CCTGCCACCA CCCACGTGTT CTCCGGTGCA CAGACCTCA
421 CCTGCCCCAG CCCCAGGAGC CAGCCCCGGG GCAGGGCTGC TTCCACCCTG GAGTTCTGGC
481 CCCGCCCGCG TCCTCCTCCT CCCCCAGACC TGACACCCGC GGGTCTGGGC TCTGCCCTCT
541 TGCTGTCACA GCCCAGGCAG AGAGCAAGGC CGTGGGGGTG GGGAGGGGGG TGGTGAC

```

>GATC1-TSC04-TSCR.abi ;

```

121                               ACGGGCC AGCGGAAGCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCGGGTCCC GTGCCCCGCT GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTCCG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACACCCAC GGAGGTGGTA CAGGGCCTGT CGGGCTGCGG TCGGGGGCCA TCCTGCCACC
421 ACCCAGTGT TCTCCCTGCC ACCACCCACG TGTTCTCCGG TGCACAGACC CTCACCTGCC
481 CCAGCCCCGG GAGCCAGCCC CGGGGCAGGG CTGCTTCCAC CCTGGAGTTC TGGCGCCGCC
541 CGCGTCTCC TCCTCCCCCA GACCTGACAC CCGCGGTCT GGGCTCTGCC CTCT

```

Sequenz der Probe D2577**>TSC77-TSCF.abi ;**

```

61                               AAGTCGTCCC CGGACGCACC
121 CCCCCCAGT GGGGGCTCAG ACGCCTCCCG GCCCTCCACG GCCTCCAGCC AGCTGGACAC
181 ACCCGGCGGG GGCCTGAGCC GGCTGGGGCC GCGTGGGGAG CCCGAGCCCT CTCGTCTCCA
241 GGCCGTGTTG GAGGCCCTTC TGACCCAGTT CGACCGACTC AACCAGGCCA CGGAGGATGT
301 CTACCAGCTG GAGCARAGGC TTCARAGCCT GCAAGGCCGC AGGAGCACGG GTGCCCACAG
361 CCCCTCCTCA RACCTGCGGC CGGCCCTGCC TGGCCGTCTT GCCCGGGCCA GTCGTGGCGT
421 GGGTCTGGCC CCGGGCCCTT GCAGGGTTTC CCTGCGGGCT AARAACAAGG TCCACCCCGG
481 CAGCACTTAG TCCCGGGGGG TCCCGGGCTC ARACCCCTTC CCTGGGGTGG TCCTCTGGCT
541 TCAGTCCCCT CTGCAGAGGG AGCCAGAGCA GACMCCGYTC AGTATTAATT TCTGCCACCC
601 TTACGGTCTC GGGCCAGGCA GAAGAGCTGC ACGAAGGCC CCAGGGAGCA GTCGTCTCTC
661 TCTCTSTGGG TCTCAGCACT TTAAAGACGC CATGTGGGCA GCCAGGACCC AGGGTCCCC

```

>GATC1-TSC77-TSCR.abi ;

```

121                               GCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCGGGTCCC GTGCCCCGCT GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTCCG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACA

```

>TSC77-TSCR.abi ;

```

121                               GCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCGGGTCCC GTGCCCCGCT GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTCCG GTGGGGATGG GATC

```

Sequenz der Probe D3142**>N+TSCF.abi ;**

```

61                               ACGCACC
121 CCCCCCAGT GGGGGCTCAG ACGCCTCCCG GCCCTCCACG GCCTCCAGCC AGCTGGACAC
181 ACCCGGCGGG GGCCTGAGCC GGCTGGGGCC GCGTGGGGAG CCCGAGCCCT CTCGTCTCCA
241 GGCCGTGTTG GAGGCCCTTC TGACCCAGTT CGACCGACTC AACCAGGCCA CGGAGGATGT
301 CTACCAGCTG GAGCAGAGGC TTCARAGCCT GCAAGGCCGC AGGAGCACGG GTGCCCACAG
361 CCCCTCCTCA RACCTGCGGC CGGCCCTGCC TGGCCGTCTT GCCCGGGCCA GTCGTGGCGT
421 G

```

> N+TSC-TSCR.abi ;

```

61                                     TCC GGGCCACGCC AAGGCCCCGG
121 CCGAGCCCAC GCCCACGTAC GAGACGGGCC AGCGGAAGCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCRGGTCCC GTGCCCCGCY GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACCTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTTCGG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACRCCCAC GG

```

>GATC1-N+TSCR.abi ;

```

61                                     CCACGCC AAGGCCCCGG
121 CCGAGCCCAC GCCCACGTAC GAGACGGGCC AGCGGAAGCG CCTCATCTCC TCTGTGGATG
181 ACTTCACCGA GTTCGTGTGA GCCRGGTCCC GTGCCCCGCY GTTATATGCG CAAATGAAAT
241 AAAGCAGTGG TGCAGCCCCG GCCTCCCCAT CGTGTCACCTC AGAGCCAGAC GCGGATGCAG
301 TCAGCCAGCT GGTTTATTTG ACTTTGTTCGG GTGGGGATGG GATCAAGGCT GTAGCTATGG
361 CCACRCCCAC GG

```

8.6 Erkennungssequenzen von Splice Sites

Erkennungssequenzen von Splice Sites in „Consensussequenz 4-6 „

Startposition	Endposition	Score	Sequenzabschnitt
Donor-Site-Erkennungssequenz			
162	176	0.95	Exon 4/Intron 4 ggctgtggtgagtat
1196	1210	0.89	Exon 5/Intron 5 ggtcagagtggtggtgc
Acceptor-Site-Erkennungssequenz			
510	550	0.92	Intron 4 Exon 5 (Hund) caggctgtctgctctgtccaggtgaggagtacatcgctgc
801	841	0.97	Intron 4 Exon 5 (Mensch) acgtcttccctgcctccccaggggcccctggtggggcct

Erkennungssequenzen von Splice Sites im Klon CA9

Startposition	Endposition	Score	Sequenzabschnitt
Donor-Site-Erkennungssequenz			
374	388	0.95	Exon 28/Intron 28 gcagcaagtaagggc
673	687	0.92	Exon29/Intron29 cctacagtggtggtgc
Acceptor-Site-Erkennungssequenz			
216	256	0.97	Intron 27 Exon 28 ctccccgccctccgctgcagggctcagccccgctggttc
448	488	0.94	Intron 28 Exon 29 ccagctgtgcccttctgcaggcgacgggctgtgcggcgg
759	799	0.89	Intron 29 Exon 30 ctctcctctcctgccacacagcggggggcccgtgtccggtc

Erkennungssequenzen von Splice Sites im Abschnitt von Exon 36 bis 38

Startposition	Endposition	Score	Sequenzabschnitt
Donor-Site-Erkennungssequenz			
14	28	0.99	Exon36/Intron36 gctcaaggtgagtgg
284	298	0.79	Exon37/Intron37 gctgagggtgagccg
Acceptor-Site-Erkennungssequenz			
75	115	0.85	Intron 36 Exon 37 ctgacgcctccctggcccaggctctgctggaggccctgta
638	678	0.64	Intron 377 Exon 38 cagggccgctccctgccccagagcttctggtatacatgct

Erkennungssequenzen von Splice Sites im Abschnitt von Exon 38 bis 40

Startposition	Endposition	Score	Sequenzabschnitt
Donor-Site-Erkennungssequenz			
77	91	0.42	Exon38/Intron38 tcaccgggtacaggc
818	832	0.97	Exon39/Intron39 caggaaggtgagccg
Acceptor-Site-Erkennungssequenz			
1009	1049	0.93	Intron 39 Exon 40 gaactccccctctgctttcagcactctgcccagaccctgct

Von Fruitfly berechnete Splice Sites im Abschnitt von Exon 43 bis 46

Startposition	Endposition	Score	Sequenzabschnitt
Donor-Site-Erkennungssequenz			
277	291	0.99	Exon43/Intron43 ggtcaaggtgagggc
504	518	0.73	Exon44/Intron44 ttctgtaggtggcg
889	903	0.90	Exon45/Intron45 taaggaggtgggtac
Acceptor-Site-Erkennungssequenz			
355	395	0.62	Intron 43 Exon 44 accgacaccgctcgccccaggccgcccagcagctgcgctt
569	609	0.97	Intron 44 Exon 45 gcgcgccccctcccttgcagctggctcgttctcgtgga
970	1010	0.64	Intron 45 Exon 46 gagccccctgtgccgccccagttccgtcacaagtccggtt

8.7 Abgeleitete Aminosäuresequenzen

8.7.1 Abgeleitete Aminosäuresequenz von Exon 4 bis 6

1: Acceptor Splice Site des Exon 5 homolog zur kodierenden Region des caninen PKD1-Gens:

```

      10      20      30      40      50      60
5' ACCTGAGCGGAAACCCGTTGGAGTGTGATTGTGGTCTGGCGTGGCTGCCTCGCTGGGTGG
  L S G N P L E C D C G L A W L P R W V E

      70      80      90      100     110     120
AAGAGCAGCAGGTTTCGCGTGGTTTCGGCCCCGAGGCGGCCACGTGTGCCGGGCCCCGGCCCC
  E Q Q V R V V R P E A A T C A G P G P L

      130     140     150     160     170     180
TAGCTGGCCGGCCCCCTGCTCGGCGTCCCATTGTCAGACAGCGGCTGTGGTGAGGAGTACA
  A G R P L L G V P L S D S G C G E E Y I

      190     200     210     220     230     240
TCGCTGCCTCCCGGACAACAGCTCCGGTGCCGTGGTGCCTGGCTTCTCCACTGCC
  A C L P D N S S G A V V P V A F S T A H

      250     260     270     280     290     300
ACGAGGGCCCGCTGGCACCCGAGGCCTGCGGCGCCTTCTGCTTTGCGGCTGGCTGGGGCC
  E G P L A P E A C G A F C F A A G W G L

      310     320     330     340     350     360
TCGGGGCCCTCTCGGACCAGGGCTGGTGCCTGTGCGGGGCGGCCAGCCCCCAACGCCT
  G A L S D Q G W C L C G A A Q P P N A S

      370     380     390     400     410     420
CCTCGGCTTGCTACCCTTGTGCTCCAGCCCCCGCTGCCCTCGCCCCTGCCTGCGGGG
  S A C L P L C S S P P L P L A P A C G G

      430     440     450     460     470     480
GCCCCACCCTCCTTGAGAACGTCTTCCCTGCCTCCCCAGGGGCCGCCCTGGTGGGGCCTC
  P T L L E N V F P A S P G A A L V G P P

      490     500     510     520     530     540
CAGGACCCTGGCCTCTGGCCAGCCAGCAGCCTTCCATGTCACTGCCTCCCTACCCGTCA
  G P L A S G Q P A A F H V T A S L P V S

      550     560     570     580     590     600
GCTCCACACACTGGGACTTTGGTGACGGCTCCCCTAAGGTGGATGTTGCTGGTCCCTGCCA
  S T H W D F G D G S P K V D V A G P A T

      610     620     630     640     650     660
CCACTCACCGCTATTCCCTGCCCGGCCACTACCAGGTGACAGCCGTGCTGGCCCTGGGGG
  T H R Y S L P G H Y Q V T A V L A L G A

      670     680     690     700     710     720
CTGGCTCGGCCCAGCTAGGGGCCAAGGTGCAAGTGAGGCGGCCCTGCTGCCCTGGAGC
  G S A Q L G A K V Q V E A A P A A L E L

      730     740     750     760     770     780
TCGAGTGTCCAGTCTCGGTACTCAGTGATGAGACCCTCAAGCTTGGCGTCCGAAATCGTG
  E C P V S V L S D E T L K L G V R N R G

```

```

      790      800      810      820      830      840
GTGGCTCCGGCCTGGAAGCCACCTACAGTATTGTGTCTTTGGGCGAGGAGCCAGGTTCGAG
  G S G L E A T Y S I V S L G E E P G R V

      850      860      870      880      890      900
TGGTGCATCCGCTCTGCCCTCGGACACCGTGATCTTCCCCGGTAATGGGCACTGCTACC
  V H P L C P S D T V I F P G N G H C Y R

      910      920      930      940      950      960
GCCTGGTGGCCGAGAAGGCCGCTGGCTGCAGGCACAGGAGCAGTGCCAGGCCCTGGGCCG
  L V A E K A A W L Q A Q E Q C Q A W A G

      970      980      990      1000      1010
GGGCCGCCCTGGCCATGGTGGACAGTCCC GCCAGCGCTTCTGGTCTCCAGGTCACCA 3'
  A A L A M V D S P A S A S W S P R S P

```

2. Acceptor Splice Site des Exon 5 homolog zur kodierenden Region des humanen PKD1-Gens:

DNASIS

***** DNA TRANSLATION LIST

```

      10      20      30      40      50      60
5' ACCTGAGCGGAAACCCGTTGGAGTGTGATTGTGGTCTGGCGTGGCTGCCTCGCTGGGTGG
  L S G N P L E C D C G L A W L P R W V E

      70      80      90      100      110      120
AAGAGCAGCAGGTTTCGCGTGGTTTCGGCCCCAGGCCGCCACGTGTGCCGGGCCCGCCCC
  E Q Q V R V V R P E A A T C A G P G P L

      130      140      150      160      170      180
TAGCTGGCCGGCCCCCTGCTCGGCGTCCCATTGTTCAGACAGCGGCTGTGGGGCCGCCCTGG
  A G R P L L G V P L S D S G C G A A L V

      190      200      210      220      230      240
TGGGGCCTCCAGGACCCCTGGCCTCTGGCCAGCCAGCAGCCTTCCATGTCACTGCCTCCC
  G P P G P L A S G Q P A A F H V T A S L

      250      260      270      280      290      300
TACCCGTGAGCTCCACACACTGGGACTTTGGTGACGGCTCCCCTAAGGTGGATGTTGCTG
  P V S S T H W D F G D G S P K V D V A G

      310      320      330      340      350      360
GTCCTGCCACCACTCACCCTATTCCCTGCCCGCCACTACCAGGTGACAGCCGTGCTGG
  P A T T H R Y S L P G H Y Q V T A V L A

      370      380      390      400      410      420
CCCTGGGGGCTGGCTCGGCCAGCTAGGGCCAAGGTGCAAGTGGAGGCGGCCCTGCTG
  L G A G S A Q L G A K V Q V E A A P A A

      430      440      450      460      470      480
CCCTGGAGCTCGAGTGTCCAGTCTCGGTA CTGATGAGACCCTCAAGCTTGGCGTCC
  L E L E C P V S V L S D E T L K L G V R

      490      500      510      520      530      540
GAAATCGTGGTGGCTCCGGCCTGGAAGCCACCTACAGTATTGTGTCTTTGGGCGAGGAGC
  N R G G S G L E A T Y S I V S L G E E P

      550      560      570      580      590      600
CAGGTCGAGTGGTGCATCCGCTCTGCCCTCGGACACCGTGATCTTCCCCGGTAATGGGC
  G R V V H P L C P S D T V I F P G N G H

```

```

        610          620          630          640          650          660
ACTGCTACCGCCTGGTGGCCGAGAAGGCCCGCCTGGCTGCAGGCACAGGAGCAGTGCCAGG
  C Y R L V A E K A A W L Q A Q E Q C Q A

        670          680          690          700          710          720
CCTGGGCCGGGGCCGCCCTGGCCATGGTGGACAGTCCCGCCAGCGCTTCTGGTCTCCCA
  W A G A A L A M V D S P A S A S W S P R

GGTCACCA 3'
  S P

```

8.7.2 Abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Bereich von Exon 27 bis 30

```

        10          20          30          40          50          60
5'GTGGGCATCATGCTGTACGGGGCTGAGGGCCGACGGCCACCGGCACCTGGACGGGGAC
  V G I M L Y G A E G R S G H R H L D G D

        70          80          90          100         110         120
AGGGCCTTCCGCCCAACAGCCTGGACGTGTTCCAGATCGCCACGCCGCACAGCCTGGGC
  R A F R R N S L D V F Q I A T P H S L G

        130         140         150         160         170         180
AGCGTGCGGAAGATCCGCGTGTGGCAGACAACAAAGGGCTCAGCCCCGCTGGTTCCTG
  S V R K I R V W H D N K G L S P A W F L

        190         200         210         220         230         240
CAGCACATCATCGTCCGGGACCTGCAGACCGCCTGCAGCACCTTCTTCTGGTCAACGAC
  Q H I I V R D L Q T A C S T F F L V N D

        250         260         270         280         290         300
TGGCTGTGCGGTGGAGACTGAGGCCAATGGCGGCCTCGTGGAGAAGGAGGTGCTGGCAGCA
  W L S V E T E A N G G L V E K E V L A A

        310         320         330         340         350         360
AGCGACGCGGCTGTGCGGCGGTTCCGGCGCCTCCTGGTGGCCGAGCTGCAGCGTGGCTTT
  S D A A V R R F R R L L V A E L Q R G F

        370         380         390         400         410         420
TTTGACAAGCATCTCTGGCTCTCCCTCTGGGACCGGCCTCCTCGGAGCCGCTTCACCCGC
  F D K H L W L S L W D R P P R S R F T R

        430         440         450         460         470         480
GTCCAGCGGGCCACCTGTTGCGTCTCCTCGTCTGCCTCTTCTGGGCGCCAATGCTGTG
  V Q R A T C C V L L V C L F L G A N A V

        490         500         510         520         530         540
TGGTACGGGGTCTGTGGGAGACGCCGCCTACAGCGCGGGGCGCGTGTCCGGTCTGATCCCG
  W Y G V V G D A A Y S A G P V S G L I P

        550         560         570         580         590         600
CTGAGTGCCGACACAGTTGCCGTCGGCCTGGTGTCCAGTGTGGTTCGTCTATCCCGTCTAC
  L S A D T V A V G L V S S V V V Y P V Y

        610
CTGGTCATCCTGTTTCTC 3'
  L V I L F L

```

8.7.3 Abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Bereich von Exon 36 bis 38

```

      10      20      30      40      50      60
5' TCGGCTGGGAGCCGCTCAAGGTCCTGCTGGAGGCCCTGTACTTCTCCCTGGTGGCCAAGC
   G W E P L K V L L E A L Y F S L V A K R

      70      80      90      100     110     120
GGCTGCACCCCGACGAGGATGACACCCTGGTGGAGAGCCCGGCTGTGACCCCTGTGAGTG
   L H P D E D D T L V E S P A V T P V S E

      130     140     150     160     170     180
AGCGTGTGCCCCGTGTGCGGCCCCACACGGCTTTGCGCTCTTCTGGCGAAGGAAGAGG
   R V P R V R P P H G F A L F L A K E E A

      190     200     210     220     230     240
CCCGAAAGGTCAAGAAGCTGCATGGGATGCTGAGGAGCTTCTGGTATAACATGCTCTTCC
   R K V K K L H G M L R S F L V Y M L F L

      250     260     270     280     290     300
TGCTGGTGCAGCTGCTGGCCAACCATGGGGACGCTTCTGCCACAGCCACGCCTACCGCT
   L V T L L A N H G D A S C H S H A Y R L

TACAGA 3'
   Q

```

8.7.4 Abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Bereich von Exon 38 bis 40

```

      10      20      30      40      50      60
5' GCTTCTGCCACAGCCACGCCTACCGCCTGCAGAGTGCCATCAAACAGGAGCTCGGCAGC
   A S C H S H A Y R L Q S A I K Q E L G S

      70      80      90      100     110     120
CAGGCCTTCTGGCCATCACCCGGTCTGAGGAGTTTTGGCCGTGGATGTCCACGTCCTG
   Q A F L A I T R S E E F W P W M S H V L

      130     140     150     160     170     180
CTCCCCTACATCCATGGGAACCAGTCCAGCCCAGAGCTGGGGCCCCCGGACTGCGGCAG
   L P Y I H G N Q S S P E L G P P R L R Q

      190     200     210     220     230     240
GTGCGGCTGCAGGAAGCACTCTGCCCAGACCCTGCTCGCCCCGGTGTGCCCGTGTGCGCG
   V R L Q E A L C P D P A R P G V P V C A

      250     260     270     280
GCAGCCGAGGCTCCTTCAGCACAGGCGACTATGGCATCGGCTGGGGCA 3'
   A A A G S F S T G D Y G I G W G

```

8.7.5 Abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Bereich von Exon 43 bis 46

```

      10      20      30      40      50      60
5' GGC G G A C G C G C G C C G C A C A G T C C G G A G C C T G G G C G C G G T G G C T G C T G G T G G C C C T G A C C G
  R T R A A Q S G A W A R W L L V A L T A

      70      80      90     100     110     120
CGG C C G C G G C G C T C G T G C G C C T G G C C C A G C T G G G T G T C G C C G A C C G C C A G T G G A C C C G C T
  A A A L V R L A Q L G V A D R Q W T R F

      130     140     150     160     170     180
TCG T G C G C C C G C C C G C G C C G C T T C A C C A G C T T C G A G C A G G T G G C G C A G C T G A G C T C C G
  V R R R P R R F T S F E Q V A Q L S S A

      190     200     210     220     230     240
CGG C T C G C G G C C T G G C C G C C T C G C T G C T C T T T C T C C T G C T G G T C A A G G C C G C C C A G C A G C
  A R G L A A S L L F L L L V K A A Q Q L

      250     260     270     280     290     300
T G C G C T T C G T G C G C C A G T G G T C G G T T T T C G G C A A G A C G C T G T A C A G G G C C C T G C C G G A G C
  R F V R Q W S V F G K T L Y R A L P E L

      310     320     330     340     350     360
T C G T G G G C G C G G C C T T G G G C C T G G T G G T G C T C G C C G T G G C T T A T G C C C A G C T G G C C A T T C
  V G A A L G L V V L A V A Y A Q L A I L

      370     380     390     400     410     420
T G C T G G T C G C T T C C T G C G T G G A C T C G T T T C G G A G C G C C C T G A G G G C C G T C T T G G T G C C G T
  L V A S C V D S F R S A L R A V L V P C

      430     440     450     460     470     480
G T C C C G G G T C T G G G G G T C C T G C C C C G T G C C C T G C C G A G T C C T G G C G C C T C T C C C C G T G C
  P G S G G P A P C P A E S W R L S P L L

      490     500     510     520     530     540
T G T G C A C T G G G C T C T G G G C G C T G C G G C T G T G G G G G C C C T G A G G C T G G G G G C G G T C C T C C
  C T G L W A L R L W G A L R L G A V L L

      550     560     570     580     590     600
T G C G G T G G C G G T A C C A C G C G C T G C G T G G G G A G C T T T A C C G G C C G G C C T G G G A G C C G C A G G
  R W R Y H A L R G E L Y R P A W E P Q D

      610     620     630     640     650     660
A C T A C G A G A T G G T G G A G C T G T T C T T G C G C C G G C T G C G C C T C T G G A T G G G C T T C A G T A A G G
  Y E M V E L F L R R L R L W M G F S K V

      670     680     690     700     710     720
T T A A G G A G T T C C G T C A C A A A G T C C G G T T T G A A G G G A T G G A A C C G C T G C C C T C G C G C T C C T
  K E F R H K V R F E G M E P L P S R S S

      730     740     750     760     770     780
C C A G G G G C T C C A A G T C G T C C C C G G A C G C A C C C C C C C A G T G G G G G C T C A G A C G C C T C C C
  R G S K S S P D A P P P S G G S D A S R

      790     800     810     820     830     840
G G C C C T C C A C G G C C T C C A G C C A G C T G G A C A C A C C C G G C G G G G C C T G A G C C G G C T G G G G C
  P S T A S S Q L D T P G G G L S R L G P

      850
C G C G T G G G G A G C C C G A G C C 3'
  R G E P E
```

8.7.6 Abgeleitete Aminosäuresequenz bis zum Stopcodon im Exon 46

Probe D2004

```

      10      20      30      40      50      60
5' GGCTCCAGTCGTCCCCGGACGCACCCCCCCCCAGTGGGGGCTCAGACNCCTCCCGGCCCT
  L Q S S P D A P P P S G G S D X S R P S

      70      80      90      100     110     120
CCACGGCCTCCAGCCAGCTGGACACACCCGGCGGGGGCCTGAGCCGGCTGGGGCCGCGTG
  T A S S Q L D T P G G G L S R L G P R G

      130     140     150     160     170     180
GGGAGCCCGAGCCCTCTCGTCTCCAGGCCGTGTTTCGAGGCCCTTCTGACCCAGTTCGACC
  E P E P S R L Q A V F E A L L T Q F D R

      190     200     210     220     230     240
GACTCAACCAGGCCACGGAGGATGTCTACCAGCTGGAGCAGAGGCTTCAGAGCCTGCAAG
  L N Q A T E D V Y Q L E Q R L Q S L Q G

      250     260     270     280     290     300
GCCGCAGGAGCACGGGTGCCACAGCCCCTCCTCAGACCTGCGGCCGGCCCTGCCTGGCC
  R R S T G A H S P S S D L R P A L P G R

      310     320     330     340     350     360
GTCTTGCCCGGGCCAGTCGTGGCGTGGGTCTGGCCCCGGGCCCTGCAGGGTTTCCCTGC
  L A R A S R G V G L A P G P C R V S L R

      370     380     390
GGGCTAAGAACAAGGTCCACCCCGGCAGCACTTAG
  A K N K V H P G S T *

```

8.7.7 Abgeleitete Aminosäuresequenz von Exon 40 des TSC2-Gens

```

      10      20      30      40      50      60
5' GCACCCTCGGGCCACGCCAAGGCCCCGGCCGAGCCCACGCCCACGTACGAGACGGGCCAG
  A P S G H A K A P A E P T P T Y E T G Q

      70      80      90      100
CGGAAGCGCCTCATCTCTGTGGATGACTTCACCGAGTTCGTGTGAGCCGG
  R K R L I S S V D D F T E F V *

```

8.8 Übersicht der Exons und Introns des PKD1-Gens der Perserkatze

Exon/ Intron	Länge (bp)	G/C- Gehalt (%)	Ähnlichkeit zum caninen PKD1-Gen (%)	Ähnlichkeit zum humanen PKD1-Gen (%)	Bemerkung
Exon 4	168	69,9	91,1	83,6	bis auf 2 bp vollständig
Intron 4	362 (653)	67,7	57,8	58,2	evtl. alternative Acceptor Splice Site;
Exon 5	672 (381)	69,0	86,9	78,2	evtl. alternative Acceptor Splice Site
Intron 5	94	70,2	74,7	46,7	
Exon 6	183	67,8	92,3	90,7	bis auf eine Base vollständig
Exon 27	157	68,6	96,8	84,8	unvollständig
Intron 27	79	79,7	77,8	54,9	
Exon 28	144	64,6	94,4	89,6	
Intron 28	88	71,8	64,6	58,2	
Exon 29	211	68,7	91,5	85,3	
Intron 29	100	71,0	76,2	69,0	
Exon 30	127	63,0	91,3	87,4	
Exon 31	117	71,8	88,9	88,0	
Exon 32	49	38,8	90,0	82,0	
Exon 33	173	68,2	82,7	79,3	
Exon 34	94	59,9	80,9	72,3	
Exon 35	119	68,1	76,2	81,5	
Exon 36	203	67,5	87,7	85,2	
Intron 36	75	76,0	73,3	54,0	
Exon 37	195	65,6	91,8	88,2	
Intron 37	368	72,3	59,3	51,6	
Exon 38	141	62,9	87,1	84,3	
Intron 38	628	61,6	56,2	48,8	
Exon 39	113	66,4	87,6	91,2	
Intron 39	205	60,0	59,9	49,7	
Exon 40	93	71,0	71,0	72,2	unvollständig
Exon 43	283	75,6	90,7	85,9	unvollständig
Intron 43	90	81,8	57,8	56,0	
Exon 44	137	69,3	90,4	82,2	
Intron 44	79	78,5	76,2	63,3	
Exon 45	306	70,6	86,6	81,0	
Intron 45	95	78,9	95,8	88,4	
Exon 46	453	70,6	85,8	78,1	

8.9 Abkürzungen

A	Adenin
Aa/AA	Aminosäure
A. dest./bidest.	Aqua destillata/bidestillata
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ADPKD	Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease
AD	autosomal-dominant
AP	alkalische Phosphatase
APCKD-Locus	Adult Polycystic Kidney Disease-Locus
ARPKD	Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease
AR	autosomal-rezessiv
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA/cDNS	complementary/copy DNA
DAB	3,3'Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
del	Deletion
DEKZV	Deutscher Edelkatzenzuchtverband
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dup	Duplikation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EL	embryonaler Lethalfaktor
ES	Exotic Shorthair-Katze
G	Guanin
GPS	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
HG	homologes Gen
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k. A.	keine Angaben
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LDL-A	Low Density Lipoprotein A
LOH	Loss Of Heterozygosity
LRR	Leucine-Rich Repeats
LVOTO	Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (Cells)
mRNA/mRNS	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
1 Myr	1 Mio Jahre
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells
nt	Nukleotid
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pc	Polyzystin
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PKD	Polyzystisches Syndrom, polycystic kidney disease
PKD1-Gen	Polyzystin1-kodierendes Gen
RBC	Red Blood Cells
REJ	Receptor for Egg Jelly
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBE	T-Zellfaktor-bindende Elemente
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris/HCl/EDTA-Puffer
TGF	Transforming Growth Factor
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-Cl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
TSC	Tuberous-Sclerosis-Complex
U	Unit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WSC	cell-wall integrity and stress-response component
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid

Zu guter Letzt möchte ich mich bedanken

bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben!

bei Herrn Prof. Dr. Reinacher für die freundliche Aufnahme am Institut für Veterinär-Pathologie und die Überlassung dieses interessanten Themas.

ganz besonders bei Herrn Dr. Werner Hecht für die immer geduldige und nützliche Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft bei molekularbiologischen und vielen anderen Fragestellungen.

bei Silke Engel für die freundschaftliche bis mütterliche Betreuung mit Latte Macchiato-Schokolade-Therapie in allen Phasen dieser Arbeit. Danke für Alles und ganz besonders für die „sozialen Aspekte“ und „das Prinzip Hoffnung“!

bei Robert, Alexander und Michael für die Einführung in die Geheimnisse der PCR und Gelelektrophorese. Michael, unter Deiner Aufsicht durfte ich meinen ersten Mastermix pipettieren; ich glaube, die PCR hat sogar funktioniert.

bei Dr. Gerwing und Dr. Michele aus der Klinik für Kleintiere sowie bei Marie, Michael und Corinna für die Überlassung der Organ-, Blut- und/oder DNA-Proben.

bei Kernt und Manfred, die sich immer geduldig und kompetent meiner Computerprobleme angenommen haben.

bei allen Mitarbeitern, Kollegen und Freunden aus dem Institut und ganz besonders bei Gisa und Maike. Ihr habt dafür gesorgt, dass ich mich immer wohl in der Patho gefühlt habe! Ich hoffe, dass sich die Doktoranden des Instituts auch weiterhin gegenseitig unterstützen und zusammenhalten, so wie ich es erlebt habe.

bei Markus, meinem Bruder Peter, meiner Mutter und Jenny für die Durchsicht von Teilen des Manuskriptes.

bei Herrn Prof. Dr. Petzinger, Herrn Prof. Dr. Bauerfeind, Frau Jana Heber und allen Kollegiaten für die freundliche Aufnahme im Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“.

bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung meines Stipendiums

und vor allem bei meinen Eltern, die niemals Zweifel am Gelingen dieser Arbeit aufkommen ließen und mich immer unterstützt haben!

Danke!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5317-6



9 1783835195317 8