Molekulargenetische Untersuchung von Kindern mit der Verdachtsdiagnose Eines nephrogenen Diabetes insipidus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von

Andreas Möller

aus Lüdinghausen / Nordrhein-Westfalen

Gießen 2008

Aus dem Rudolf-Buchheim Institut für Pharmakologie
des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor Prof. Dr. M. Kracht

Betreuer: Priv. Doz. Dr. A. Oksche

Gutachter: Priv. Doz. Dr. A. Oksche

Gutachter: Prof. Dr. Wudy

Tag der Disputation: 15.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Die Physiologie der Antidiurese 4

2.1 Der zentrale Diabetes insipidus 4

2.1.1 Die Regulation der Vasopressin-Freisetzung 4

2.1.2 Vasopressin: vom Gen zum Protein 5

2.1.3 Genetik und Klinik des zentralen Diabetes insipidus 6

2.2 Der nephrogene Diabetes insipidus 7

2.2.1 Die Antidiurese am Tubulussystem der Niere 7

2.2.2 Die Physiologie der Vasopressin-sensitiven Hauptzelle 10

2.2.3 Der X-chromosomale nephrogene Diabetes insipidus 13

2.2.3.1 Mutationen des Vasopressin-2-Rezeptor-Gens 17

2.2.4 Der autosomale nephrogene Diabetes insipidus 17

2.2.4.1 Mutationen des Aquaporin-2-Gens 20

2.3 Diagnostische Möglichkeiten und Therapie 20

2.3.1 Klinische Diagnostik 20

2.3.2 Therapeutischer Ausblick 21

3 Fragestellung 22

4 Material und Methoden 23

4.1 Material 23

4.1.1 Geräte 23

4.1.2 Software 23

4.1.3 Chemikalien und Kits 24

4.1.4 Enzyme 24

4.1.5 Oligonukleotid-DNA, Plasmid-DNA 25

4.1.5.1 Primerauswahl des Vasopressin-2-Rezeptorgens 25

4.1.5.2 Primerauswahl des Aquaporin-2-Gens 26

4.1.5.3 Plasmid-DNA 26

4.1.6 Bakterien, kompetente Zellen 26

4.1.7 Medien und Puffer 27

4.1.7.1 LB Medium 27

4.1.7.2 LB-Agarplatten 27

4.1.7.3 DNA-Ladepuffer 27

4.1.7.4 TAE Puffer 28

4.1.7.5 TE Puffer 28

4.1.7.6 TBE Puffer 28
4.2 Methoden 29
4.2.1 Isolierung von DNA 29
4.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut 29
4.2.1.2 Plasmidisolierung aus E.coli im Cs/Cl-Gradienten 30
4.2.1.3 Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien im kleinen Umfang 31
4.2.1.4 DNA-Fragmentisolierung aus Agarose-Gelen, I 32
4.2.1.5 DNA-Fragmentisolierung aus Agarose-Gelen, II 33
4.2.1.6 Präzipitation von PCR-Produkten mit Isopropanol 33
4.2.1.7 Präzipitation von Taq-cycling PCR-Produkten mit Ethanol 34
4.3 Elektrophorese 35
4.3.1 Denaturierende Polyacrylamidgele für die Sequenzierung 35
4.3.2 Agarose-Gel 37
4.4 Sequenzierungsmethoden 38
4.4.1 Manuelle Sequenzierung nach Sanger, modifiziert 38
4.4.2 Automatische Sequenzierung, Taq-PCR 40
4.5 PCR Techniken 40
4.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 40
4.5.2 PCR-Amplifikation aus genomischer DNA 42
4.5.3 Nested-PCR 43
4.5.4 Asymmetrische PCR 44
4.5.5 Taq. PCR 45
4.6 Klonierung 46
4.6.1 Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden 46
4.6.2 Dephosphorylierung von 5´-Enden 47
4.6.3 Ligasereaktion 47
4.6.4 Herstellung kompetenter Zellen mit Calciumchlorid 48
4.6.5 Transfektion von E.Coli 49
5 Ergebnisse 50
5.1 Mutationen des Vasopressin-2-Rezeptorgens 50
5.1.1 Familien 1 und 2 50
5.1.2 Familie 3 53
5.1.3 Familie 4 54
5.1.4 Familie 5 55
5.1.5 Familie 6 56
5.1.6 Familie 7 58

5.1.7 Familie 8 59
5.2 Mutation des Aquaporin-2-Gens 61
5.2.1 Familie 9 61
6 Diskussion 63
6.1 Missense Mutanten des Vasopressin-2-Rezeptorgens 64
6.2 Nonsensmutante des Vasopressin-2-Rezeptorgens 65
6.3 Insertionsmutante des Vasopressin-2-Rezeptorgens 66
6.4 Deletionsmutanten des Vasopressin-2-Rezeptorgens 66
6.5 Missensemutante des Aquaporin-2-Gens 69
6.6 Grenzen der Diagnostik und Differentialdiagnosen 71
6.7 Stellenwert der genetischen Testung 72
7 Zusammenfassung 75
8 Summary 76
9 Literaturverzeichnis 77

1 Einleitung

Der aus dem griechischen Wortschatz stammende Begriff Diabetes (διαβεινω) hat die Bedeutung "Durchfluss“ und beschreibt Erkrankungen, die mit dem Leitsymptom einer abnorm gesteigerten Diurese einhergehen. Das augenfälligste Symptom eines Diabetes ist die Polyurie. Die Harnproduktion ist beständig gesteigert (> 40 ml/kgKG/Tag) und kann durch eine Flüssigkeitsrestriktion nicht kontrolliert werden (Bichet et al. 1993, Baylis et al. 1998). Vielmehr muss der Verlust durch eine übermäßige Flüssigkeitszufuhr ausgeglichen werden. In den historischen Zeiten der Harnschau, als noch der Geschmack das wegweisende Diagnostikum war, wurde die Unterscheidung eines Diabetes mellitus für honigsüß und eines Diabetes insipidus geprägt.
Der Harn des Diabetes mellitus Patienten ist aufgrund der Glukosurie typischerweise hyperton. Der Diabetes insipidus Patient hingegen produziert große Mengen eines hypotonen, stark verdünnten und, wie der Name „insipidus“ suggeriert, geschmacklosen Harnes. Auch in Phasen einer Dehydratation bewirken die Nieren keine ausreichende Konzentrierung des Harns ($U_{osm} < 250$ mosmol/kg, Bichet et al. 1993). Wird dieser renale Wasserverlust nicht durch eine gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme kompensiert, bildet sich ein intravasaler Volumenmangel mit einer typisch hypernatriämischen Dehydratation aus ($S^{Na+} > 150$ mmol/l Harrison, Principles of Internal Medicine).

So offensichtlich das Krankheitsbild eines Diabetes insipidus bei Erwachsenen häufig ist, so schwer kann die Diagnosestellung im Säuglings- und Kleinkindesalter sein. Oft ist die Flüssigkeitszufuhr des betroffenen, jungen Patienten aufgrund der Unwissenheit der Eltern nur unzureichend, so dass die Kinder dem Kinderarzt mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, rezidivierendem Erbrechen, Unruhe, Gedeihstörungen und Schreiattacken vorgestellt werden. Die Kardinalsymptome des Diabetes, die Polyurie und die Polydipsie, werden im Kindesalter in lediglich 50 % bzw. 12 % der untersuchten Fälle als führendes Symptom erwähnt (van Lieburg et al. 1999). Im frühen Säuglingsalter fehlen diese Symptome meist gänzlich (Marcovecchio 2006). Das mit Abstand häufigste Symptom hingegen ist ein im pädiatrischen Alltag so gängiges und triviales Erbrechen mit einer fehlenden Gewichtszunahme, gefolgt von Fieberschüben und Obstipationen. Desshalb sollte bei

einem Säugling mit rezidivierendem Erbrechen und hypernatriämischen Dehydratationen ein Diabetes insipidus stets als erweiterte Differentialdiagnose in Betracht gezogen werden.

Nicht nur diese unspezifische Symptomatik sondern auch die besonderen physiologischen Bedürfnisse eines Säuglinges machen einen Diabetes insipidus zu einer besonderen Gefährdung für das Kind . Der totale Körperwassergehalt des Säuglinges liegt mit 65 % bis 70 % ca. 10 bis 15 % über dem eines Erwachsenen. Darüberhinaus ist der tägliche Volumenbedarf und Wasserumsatz eines Kleinkindes gegenüber dem eines Erwachsenen um den Faktor drei erhöht. Eingedenk der Tatsache, dass bereits eine Gastroenteritis für den gesunden Säugling eine ernstzunehmende Erkrankung darstellt, wird offensichtlich, welchen Stellenwert die Homöostase des Wasserhaushaltes im Säuglingsalter einnimmt.

Eine rasche Diagnosestellung und eine adäquate Therapie des Diabetes insipidus ist für die Prognose des Kindes immanent wichtig. Episoden schwerer, hypernatriämischer Dehydratationen gehen mit kreislaufdepressiven Phasen einher. In Akutsituationen können Krampfanfälle bis hin zum Koma auftreten. In frühen Einzelfallberichten wurde diesem Patientenkollektiv regelmäßig eine mentale Retardierung zugeschrieben. Neuere Untersuchungen konnten nachweisen, dass bei einer raschen Diagnosestellung und einer adäquaten Therapie keine kognitiven Leistungsseinschränkungen mehr zu erwarten sind (Hoekstra et al. 1996). Darüber hinaus werden exkretorische Niereninsuffizienzen zwischen der ersten und zweiten Lebensdekade beobachtet, die sich wahrscheinlich im Rahmen glomerulärer Mikrothromben einstellen (Boyd et al. 1980). Hydronephrotische, nicht obstruktive Nierenveränderungen infolge der beständig polyuren Situation (Shalev et al. 2004) sowie ein Kleinwuchs im Rahmen einer flüssigkeitsorientierten, hypokalorischen Ernährung sind zusätzliche Komplikationen (van Lieburg et al. 1999).

Das Patientenkollektiv des Diabetes insipidus ist hinsichtlich der Ätiologie, des Inzidenzalters, der klinischen Ausprägung und der Therapierbarkeit inhomogen. Im Wesentlichen können drei Formen unterschieden werden:

1. Die erste Gruppe umfasst die Patienten eines zentralen Diabetes insipidus, der durch einen congenitalen oder erworbenen Mangel des antidiuretischen Hormons Vasopressin charakterisiert ist.

2. Die zweite Gruppe weist eine Endorganresistenz der Niere gegenüber dem Vasopressin auf. Die congenitale Form dieses nephrogenen Diabetes insipidus (NDI) kann sowohl autosomal dominant und rezessiv als auch X-chromosomal vererbt werden.
3. Eine dritte, seltene Form des Diabetes tritt in der Schwangerschaft in Erscheinung und ist durch einen gesteigerten Umsatz des zirkulierenden Vasopressin durch plazentare Vasopressinasen gekennzeichnet.

2 Die Physiologie der Antidiurese

Das Hormon Vasopressin nimmt die zentrale Rolle in der Homöostase des Wasserhaushaltes ein. Es wird in den supraoptischen und paraventrikulären Kerngebieten des Hypothalamus in der Form eines Vorläuferproteines (AVP-NPII) gebildet und bis zu dessen Inkretion in der Neurohypophyse gespeichert. Einmal durch osmotische oder nicht osmotische Stimuli in den Blutkreislauf freigesetzt, aktiviert es spezifische Vasopressin-2-Rezeptoren (V2R) an dem Sammelrohrsystem der Niere. Der stimulierte Rezeptor steht am Anfang einer intracellulären Signalkaskade, die *via* G-Protein (G_s) und einer membranständigen Adenylylcyclase schließlich zu einer Insertion spezifischer Wasserkanäle in die luminale Membran der Hauptzelle führt. Die Permeabilität des Sammelrohrsystemes gegenüber Wasser steigt sprunghaft an und führt zu einer Konzentrierung des Primärharns. Bei Patienten mit einem angeborenen Diabetes insipidus sind inaktivierende Mutationen in Genen identifiziert worden, die das Vaspressinvorläufermolekül (AVP-NPII), den Vasopressin-2-Rezeptor oder den spezifischen Wasserkanal Aquaporin-2 (AQP2) kodieren.

2.1 Der zentrale Diabetes insipidus

2.1.1 Die Regulation der Vasopressin-Freisetzung

Das Vasopressin (AVP) wird durch osmotische und nichtosmotische Stimuli freigesetzt. Auf der einen Seite reagieren Osmorezeptoren in den hypothalamischen Kerngebieten sehr sensibel auf Schwankungen der Serum Natriumkonzentration. Ab einer Gesamtosmolalität von ca. 280 mosmol/kg wird AVP in einer nahezu linearen Funktion freigesetzt. Bei einer Steigerung der Serumosmolalität auf ca. 290 mosmol/kg wird ein Plasmaspiegel des Vasopressin von 7 bis 8 pg/ml erreicht, der bei einer normalen Nierenfunktion die maximale Konzentration des Urins von 1200 mosmol/kg bewirken kann (Robertson et al. 1987).

Vasopressin agiert, wie der Name impliziert, auch als Streßhormon in akuten Situationen eines Volumenmangels oder einer Hypotension. Es führt über Stimulation des Vasopressin-1-Rezeptors (V1R) am Gefäßendothel zu einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Spezielle Barorezeptoren des Karotissinus, der Herzvorhöfe und der Lungenstrombahn überwachen das effektive Blutvolumen

und führen bei einem plötzlichen intravasalen Volumenmangel von 10 % oder mehr zur Freisetzung des AVP (Dunn et al. 1973). Unter physiologischen Bedingungen spielt das Vasopressin jedoch eine untergeordnete Rolle in der Regulation des Blutdruckes. Allerdings wird dieser Effekt bei einer Katecholamin-refraktären, arteriellen Hypotension genutzt.

2.1.2 Vasopressin: vom Gen zum Protein

Das humane Vasopressin, das 8-Arginin-Vasopressin (AVP), ist ein cyclisches Nonapeptid. Es ist bei allen Säugetieren konserviert. Lediglich beim Schwein und bei einigen Beuteltierarten liegt das Vasopressin als 8-Lysin-Vasopressin vor. Vasopressin wird in den magnocellulären Neuronen der supraoptischen und paraventrikulären Kerngebiete des Hypothalamus in der Form eines Vorläuferproteines (AVP-NP-II) gebildet. Das 2,5 Kilobasen (kb) große AVP-NP-II Gen ist auf dem Chromosom 20p13 lokalisiert (Riddell et al. 1985). Es setzt sich aus drei Exon- und zwei Intronbereichen zusammen und kodiert ein 163 Amiosäuren (AS) umfassendes Vorläuferprotein (Land et al. 1982). Dieses sogenannte „Präprovasopressin“ besteht aus einem Signalpeptid, dem eigentlichen Vasopressin, dem Neurophysin II und einem C-terminalen Glykopeptid.

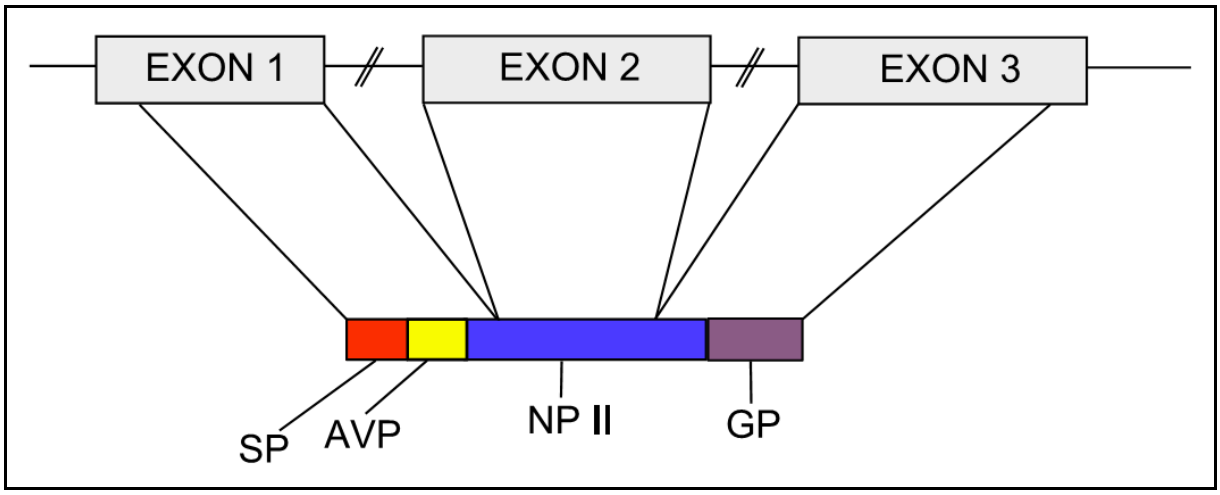

Abbildung 1: oben Darstellung AVP-NII Gens mit drei kodierenden Exonbereichen, unten Darstellung des AVP-NII mit seinen funktionellen Domänen: SP-Signalpeptid, AVP-Vasopressin, NPII-Neurophysin II, GP-Glykopeptid (modifiziert nach Oksche und Rosenthal 2001)

Die Sequenz des Signalpeptids enthält Informationen für die Bindung an das Ribosom und für die korrekte Einführung des Peptids in das endoplasmatische Reticulum (ER). Bereits im ER wird das Signalpeptid durch eine Peptidase abgespalten. Für den axonalen Transport in die Neurohypophyse wird das verbliebene Prohormon in Neurogranula gespeichert, in denen es weiter prozessiert und das Vasopressin enzymatisch von dem Neurophysin II getrennt wird. Dem Neurophysin II kommen dabei wichtige Aufgaben zu. Zum einen kann eine spezifische Endopeptidase das Vasopressin nur dann korrekt aus dem Prohormon heraustrennen, wenn die Schnittstelle und Erkennungssequenz des Tripeptid, duch die richtige Konformation des Neurophysin II korrekt präsentiert wird. Zum anderen gehen das Neurophysin II und das Vasopressin eine nichtkovalente Bindung ein, wodurch das Hormon vor einem proteolytischem Abau geschützt wird. Erst nach der Inkretion dissoziieren Vasopressin und Neurophysin II voneinander. Die Rolle des terminalen Glykopeptides ist immer noch unklar.

2.1.3 Genetik und Klinik des zentralen Diabetes insipidus

Der angeborene, zentrale Diabetes insipidus oder auch „**F**amilial **N**eurohypophyseal **D**iabetes **I**nsipidus“ (FNDI) zeichnet sich durch stark erniedrigte oder fehlende Plasmaspiegel des Hormones Vasopressin (AVP) aus. In einem Fall liegt auch die Synthese eines Hormons mit verminderter Affinität zum Rezeptor vor (Willcutts et al. 1999). Die angeborene Form folgt einem monogenen Erbgang mit einem Defekt des AVP-NP-II-Moleküles. In Abhängigkeit von der Mutation kann in den betroffenen Familien ein autosomal-dominanter, oder ein seltener, autosomal-rezessiver Erbgang vorherrschen.

Dominante Mutationen zeigen einen eher schleichenden Beginn innerhalb des ersten Lebenjahrzehnts. Akute und bedrohliche Krankheitsbilder sind die Ausnahme. Der Grund ist ein allmählicher Untergang der Vasopressin produzierenden Neurone. Die sich anreichernden, mutanten Genprodukte sind zelltoxisch, so dass es zu einem fortschreitenden Zelluntergang der Neurone kommt. Histopathologische Schnitte aus dem Hypothalamusbereich von Patienten des zentralen Diabetes insipidus belegen die selektive Degeneration der magnocellulären Kerngebiete (Braverman et al. 1965). Die Klonierung und Expression mutanter Gene in einer neuronalen Zelllinie bestätigen den zytotoxischen Effekt dieser Mutanten (Nijenhius et al. 1999). Der Vasopressinspiegel kann aufgrund des zweiten, gesunden Alleles eine gewisse Zeit

noch aufrecht gehalten werden. Schließlich mündet diese Form mit dem Untergang der Kernegebiete in dem Vollbild eines zentralen Diabetes insipidus.
Die autosomal-rezessive Form manifestiert sich bereits kurz nach der Geburt. Ihre klinische Ausprägung kann in Abhängigkeit der vorherrschenden Mutation variieren, je nachdem ob eine Restproduktion und Sekretion des AVP aufrecht erhalten wird oder nicht. Die Therapie besteht in der Gabe des V2R-selektiven Agonisten Desmopressin (DDAVP), in oraler, nasaler oder intravenöser Applikationsform.

2.2 Der nephrogene Diabetes insipidus

Der nephrogene Diabetes insipidus (NDI) stellt eine klassische Endorganresistenz dar. Trotz ausreichender Plasmaspiegel von Vasopressin kommt es zu keiner oder einer unzureichenden Harnkonzentrierung. Auch die Gabe von DDAVP führt zu keiner ausreichenden Steigerung der Wasserreabsorption.
Mit der Klonierung des Vasopressin-2-Rezeptor-Gens und des Aquaporin-2-Gens konnten die Kandidatengene für den X-chomosomal bzw. für den autosomal dominant und autosomal rezessiv vererbten nephrogenen Diabetes insipidus identifiziert werden (Rosenthal et al. 1992, Deen et al. 1994). Sie werden beide in den Hauptzellen des Sammelrohrsystems der Niere exprimiert.

2.2.1 Die Antidiurese am Tubulussystem der Niere

Die Hauptaufgabe der Nieren besteht neben der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen in der Homöostase des Wasserhaushaltes. Ca. 10 %-15 % des renalen Blutflussvolumens werden über die Glomerula abfiltiert und gelangen als Primärharn in das Tubulussystem der Nieren. Bei einer regelrechten glomerulären Filtrationsleistung (GFR) von 125 ml/min sind dies täglich rund 180 Liter Primärharn. Unter der Wirkung des Vasopressin werden diesem Primärharn im Tubulussystem jedoch bis zu 99,5 % des Volumen wieder entzogen. Die Osmolarität des ausgeschiedenen Urines kann dabei je nach Vasopressinspiegel zwischen plasmahypotonen Werten (min. U_{osm} 80 mosmol/kg) bis zu einer vierfachen Plasmakonzentration (max. U_{osm} 1200 mosmol/kg) variieren. Diese enorme Leistung wird durch den anatomischen Aufbau und durch die unterschiedlichen, physiologischen Eigenschaften der einzelnen Nephronabschnitte insbesondere durch die selektive Permeabilität für Wasser, Elektrolyte und osmotisch wirksamen Molekülen wie den Harnstoff erzielt.

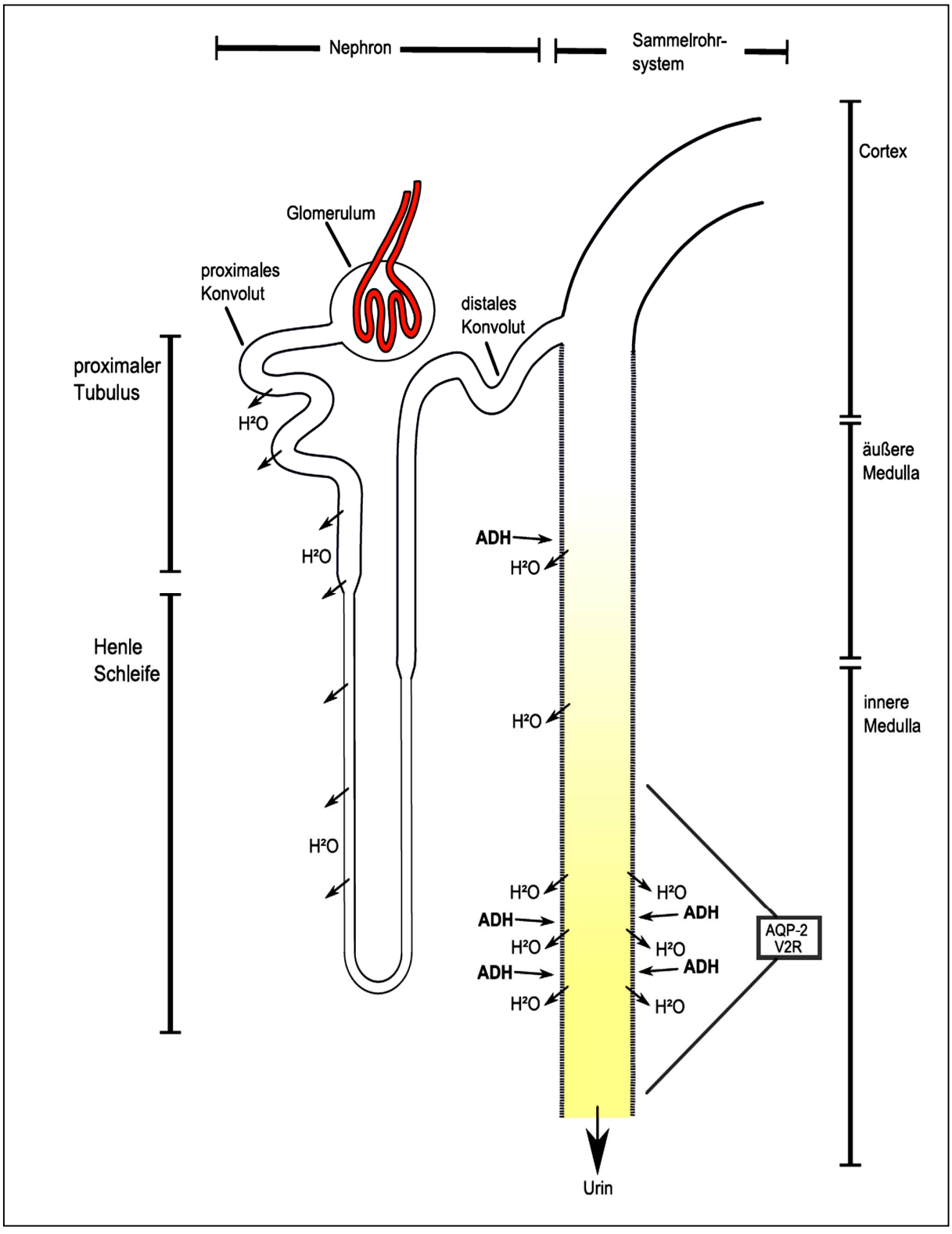

Abbildung 2: modellhafte Darstellung eines Nephron und des sich anschließenden Sammelrohrs, die Glomerula liegen in dem Kortexbereich, ab- und aufsteigende Schenkel der Henle Schleife durchziehen das Nierenmark (innere und äußere Medulla), V2R und AQP2 werden in den Hauptzellen des distalen Sammelrohrsystems in dem Bereich der inneren Medulla exprimiert (modifiziert nach Oksche, Rosenthal et al. 2001)

Das Nephron ist die kleinste funktionelle Einheit der Niere. Es gliedert sich in das Glomerulum und einem sich anschließenden Tubulussystem, welches in das Sammelrohrsystem mündet. Die menschliche Niere besitzt ca. 1 bis 2 Millionen Nephrone. Wie in Abbildung 2 gezeigt, werden der Kortex und die äußere und innere Medulla unterschieden. Die Glomerula sind in dem Kortexbereich lokalisiert. Verbunden durch das proximale Konvolut schließt sich der absteigende Teil der Henleschleife an, der tief in die Medulla hereinragt. Der aufsteigende Anteil der Henleschleife geht in den aufsteigenden Schenkel über, der in das distale Konvolut und schließlich in das Sammelrohrsystem mündet. Das Sammelrohrsystem durchzieht den Kortex, die äußere und innere Medulla und mündet in das Kelchsystem der Niere.

Bereits 1951 postulierten Kuhn und Mitarbeiter das Gegenstromprinzip („countercurrent mechanism“) als das grundsätzliche Prinzip der Antidiurese (Kuhn et al. 1951). Das Zusammenspiel einer aktiven Rückresorption der Natriumionen und einer passiven Diffusion des Wassers in den selektiv permeabelen, auf- und absteigenden Tubuli der Henleschleife und des Sammelrohrsystemes bildet den Grundpfeiler dieses Prinzips. Die Rückresorption des Harnvolumens geschieht bereits zu 75 % an dem proximalen Konvulut, zu ca. 10 bis 15 % an der Henleschleife und zu 10 % an dem vasopressinsensiblen Sammelrohrsystem.

Neben der osmotische wirksamen Glukose und kleineren Plasmaproteinen wird in dem proximalen Konvolut bereits ein Großteil der Natriumionen mittels eines Natrium/Phosphat-Cotranporter (NaPi2) und eines Natrium/H^+-Antiporter (NHE2) aktiv unter Energieverbrauch aus dem Tubuluslumen resorbiert. Durch die kontinuierliche Expression des Wasserkanales Aquaporin-1 (AQP 1) in den Epithelzellen des proximalen Konvolutes und der absteigenden Henleschleife kann das Wasser passiv dem Natriumchlorid folgen.

Die aufsteigende Henle Schleife ist für Wasser hingegen impermeabel. Ein aktiver Natrium/Kalium/Chlorid–Symporter (NKCC2), der Kalium-Kanal ROMK und die Chloridkanäle BARTIN, CIC-Ka und CIC-Kb erhöhen an diesem Teil des Tubulus die Tonizität des Interstitiums und damit den Diffusionsgradienten (Kim et al. 1999). Am Scheitelpunkt der Henleschleife erreicht das Interstitium seine maximale Osmolalität von 1200 mosmol/kg. Aufgrund des aktiven Salztransports am aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und der fehlenden Wasserpermeabilität ist das Tubuluslumen hingegen hypoton (60-100 mosmol/kg).

In dem distalen Konvolut und in dem Sammelrohren wird die endgültige Harnkonzentration bestimmt. Da dieser Teilbereich variabel durchlässig für Wasser ist, kann unter der Einwirkung von Vasopressin entweder ein hypoosmolarer oder hypertoner Harn generiert werden. Der in die Tiefe der Medulla zunehmende Konzentrationgradient ist die treibende Kraft für die passive Resorption des Wassers an der absteigenden Henleschleife und dem vasopressinsensiblen Sammelrohrsystem.

Die Entwicklung der menschlichen Niere ist zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossen. Sie ist vielmehr ein dynamischer Entwicklungsprozeß, der erst im Laufe des ersten Lebensjahres seinen Abschluß findet. Bereits zum Ende des ersten Trimesters der Fetalzeit beginnt die Urinproduktion. Die Homöostase des fetalen Organismus wird jedoch noch durch die Plazenta reguliert. Zum Zeitpunkt der Geburt beträgt die Tubuluslänge durchschnittlich nur 1/10 der adulten Niere (Horster et al. 1999). Der corticomedulläre Konzentrationsgradient ist noch gering und der Endharn kann nicht maximal konzentriert werden.
Diesem Umstand kommt eine noch verminderte Primärharnproduktion entgegen. Die GFR ist aufgrund einer minderpermeablen Basalmembran des glomerulären Apparates und eines noch niedrigen glomerulären Blutflussvolumens deutlich reduziert. Erst nach ein bis zwei Monaten erhöht sich die Permeabilität der Basalmembran, der renale Gefäßtonus nimmt allmählich ab und die Primärharnproduktion steigt (Guignard et al. 1975). Ein nephrogener Diabetes insipidus kann sich unter Umständen erst in diesem Entwicklungsstadium der Ausreifung und der Steigerung der Primärharnproduktion demaskieren. Klinisch deckt sich diese Überlegung mit der zu diesem Zeitpunkt erstmalig gestellten Verdachtsdiagnose eines Diabetes Insipidus.

2.2.2 Die Physiologie der Vasopressin-sensitiven Hauptzelle

Die Hauptzelle, in Abbildung 3 dargestellt, ist die Vasopressin sensitive Epithelzelle des Sammelrohrs. Ihre physiologische Bedeutung liegt in einer variablen Permeabilität für Wasser. In Abwesenheit von Vasopressin ist dieses Epithel, speziell die luminale, dem Tubuluslumen zugewandte Membran, nahezu wasserundurchlässsig (Harris et al. 1987).

Tight junctions an den lateralen Membranen machen einen intercellulären Wasserfluß unmöglich. Darüberhinaus verringert eine spingomyelin- und cholesterinreiche exofaciale Membranfläche die Fluidität aller transmembranären Proteine und hilft, die Asymmetrie der Hauptzelle aufrecht zu halten (Harris et al. , 1987, Warren et al. 1999).

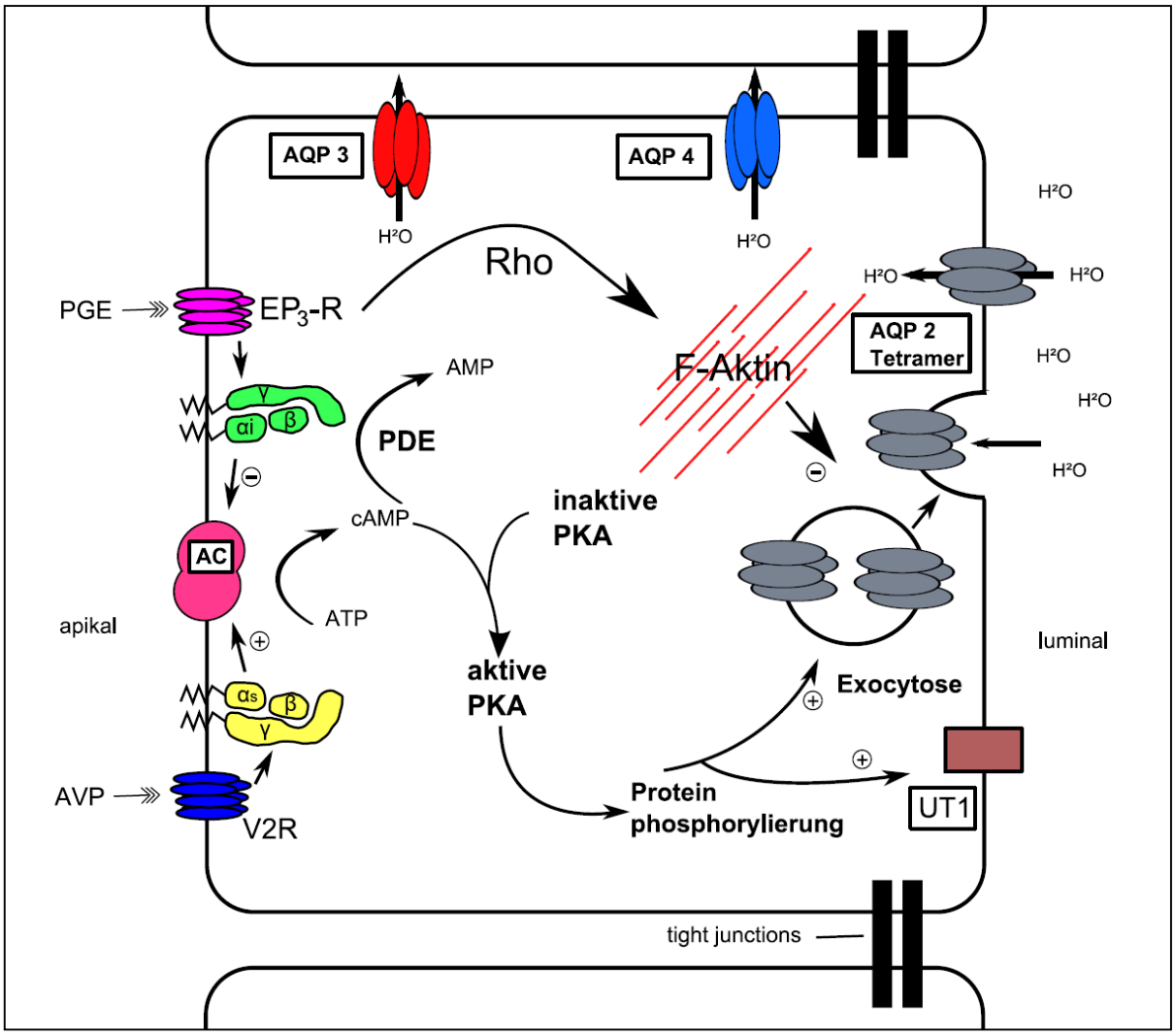

Abbildung 3: Modell einer Hauptzelle des medullären Sammelrohrs mit Darstellung der Vasopressin abhängigen Signalkaskade, Stimulation des V2-Rezeptor durch Vasopressin, infolge dessen dissoziiert die $G_{\alpha s}$ Untereinheit des G-Protein und aktiviert die membranständige Adenylycyclase AC. Durch sie wird der second Messenger cAMP produziert, der wiederum die cAMP abhängige Proteinkinase A aktiviert. Die Zielproteine der PKA sind nicht vollständig bekannt, die Phosphorylierung führt letzendlich zu einer Fusionierung Aquaporin-2 beladener Vesikel mit der luminalen Membran, das AQP-3 und AQP-4 werden beständig an der basolateralen Membran, der Harnstofftransporter UT1 an der luminalen Membran exprimiert (modifiziert nach Oksche, Rosenthal et al. 2001)

Die Expressionsrate des Vasopressin-2-Rezeptors ist in den tiefen, medullären Anteilen des Sammelrohrs, in dem Bereich des größten Diffusiongradienten, ausgeprägter als in den kortikalen. Des Weiteren konnte auch eine Expression des

V2R in dem aufsteigenden Teil der Henle Schleife und des distalen Tubulus nachgewiesen werden, wenn auch mit einer wesentlich niedrigeren Intensität (Nonoguchi et al. 1995).

Die Stimulation des V2R in der Hauptzelle durch AVP steht am Anfang einer Signalkaskade, die mit der Insertion des spezifischen Wasserkanals Aquaporin-2 in die luminale Membran endet (Abb. 3). Durch die Bindung von AVP wird der V2R stimuliert und das G-Protein G_s aktiviert. Die α-Untereinheit des G-Proteins führt zur Aktivierung einer membranständige Adenylylcyclase, die ATP in cyclisches AMP (cAMP) überführt. cAMP fungiert nun als "Second messenger" und reguliert die cAMP abhängige Proteinkinase (PKA). Sie besteht aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten. Bindet cAMP an die regulatorische Einheit, dissoziert die enzymatisch aktive Untereinheit und phosphoryliert cytosolische Zielproteine. Dabei ist auch die Phosphorylierung des Serin 256 im AQP-2 durch die PKA für den Exocytosevorgang von Bedeutung (Agre et al. 2003, Klussman et al. 2000). Die Endstrecke der Vasopressin vermittelten Exocytose des Aquaporin-2 ist noch nicht vollends geklärt. Als gesichert gilt die Fusion Aquaporin-2 beladener Vesikel mit der luminalen Membran der Hauptzelle, sogenannte „shuttle hypothesis“ (Yamamoto et al. 1995, DiGiovanni et al. 1994).
Zwei weitere Aquaporine, das AQP-3 und das AQP-4, werden kontinuierlich an der basolateralen Membran der Hauptzelle exprimiert (Inase et al. 1995, Terris et al. 1995) und ermöglichen den transzellulären Fluß des Wassers in das Interstitium.
Der exocytotische Prozeß mit der Umverteilung des AQP-2 in die Membran findet in einer kurzen Zeit von ein bis fünf Minuten statt, als sogennanter „short term effect“ beschrieben (Verkmann et al. 1998). Darüber hinaus führt die V2R-Stimulation auch zu einer Steigerung der Expressionrate des AQP-2 (Wade et al. 1994). Eine Vasopressin Stimulation zeigte an der Rattenniere einen deutlichen Anstieg der AQP2-Transskripte (Marples et al. 1999), die Behandlung mit einem speziellen V2R-Antagonisten (OPC31260) hingegen verminderten diese signifikant (Christensen et al. 1998). Ein möglicher Signalweg ist die Kontrolle des AQP2-Gens durch cAMP abhängige Transkriptionsfaktoren wie dem CREB (cAMP responsive Elementbindeprotein) (Matsumura et al. 1997).

Durch die Phosphorylierung des CREB durch die PKA bindet diese an eine spezifische Promoterregion (CRE) des AQP2-Gens und induziert eine Steigerung der Translationsrate (Yasui et al. 1997).
Sinkt der AVP-Spiegel, kommt es zu einer raschen Endozytose des AQP2. Zudem wird das vorliegende cAMP durch Phophodiesterasen schnell zu AMP umgesetzt. Der Hormon-Rezeptor Komplex wird durch spezifische Proteinasen abgebaut (Kojro et al. 1995).

Wenn auch die Exocytose des AQP2 die wichtigste Wirkung des Vasopressin im Nierengewebe ist, so ist sie nicht die einzige. Auch ein spezifischer Harnstofftransporter (UT1) unterliegt einem regulatorischem Einfluß durch das Vasopressin. Die IMCD Zelle besitzt auch unter Abwesenheit von Vasopressin eine basale Permeabilität für Harnstoff. Diese kann jedoch unter Vasopressin Stimulation um ca. 400 % gesteigert werden (Sands et al. 1987, Knepper et al. 1990). Die Harnstoffpermeabilität wird durch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von UT1 in der luminalen Membran erhöht (Shayakul et al. 1996, Zhang et al. 2002). Die exakte Regulation des UT1 ist noch unklar, sie scheint aber nicht analog der Shuttle Hypothese des AQP2 zu verlaufen (Inoue et al. 1999).

Der Vasopressin-2-Rezepor wird auch in der aufsteigenden Henleschleife exprimiert, was in immunhistochemischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Nonoguchi et al. 1995, Terada et al. 1993). Allerdings ist die Expressionsrate hier deutlich geringer als im Sammelrohrsystem. Die physiologische Bedeutung dafür ist noch nicht endgültig geklärt, jedoch wird eine positiv regulatorische Einflußnahme auf die Aktivität des apikalen Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporters (NKCC2), des basolateralen Kaliumtransporters (ROMK) und einer Natrium-Kalium-ATPase angenommen (Ecelbarger et al. 2001).

2.2.3 Der X-chromosomale nephrogene Diabetes insipidus

Der angeborene, nephrogene Diabetes insipidus ist eine seltene Erkrankung. Die Prävalenz beträgt etwa 8 Patienten auf 1×10^6 männliche Neugeborene. In 90 % aller Fälle lässt sich ein X-chromosomal-rezessiver und in ca. 10 % ein autosomal-rezessiver oder dominanter Erbgang nachvollziehen (Bichet et al. 1996). Ein verlässliche Zahl über symptomatische, weibliche Patienten gibt es derzeit nicht. Der Genlocus für den X-chromosomalen Erbgang wurde auf dem langen Arm der Bande

28 lokalisiert (Xq28) (Seibold et al. 1992). Rosenthal und Mitarbeiter haben zuerst beweisen können, dass eine inaktivierende Mutation des Vasopressin-2-Rezeptorgens ursächlich für den X-chromosomal rezessiven Diabetes ist (Rosenthal et al. 1992).

Das Vasopressin-2-Rezeptorgen umfasst 2276 Basenpaare und kodiert ein 371 Aminosäuren umfassendes Protein (Abb. 4).

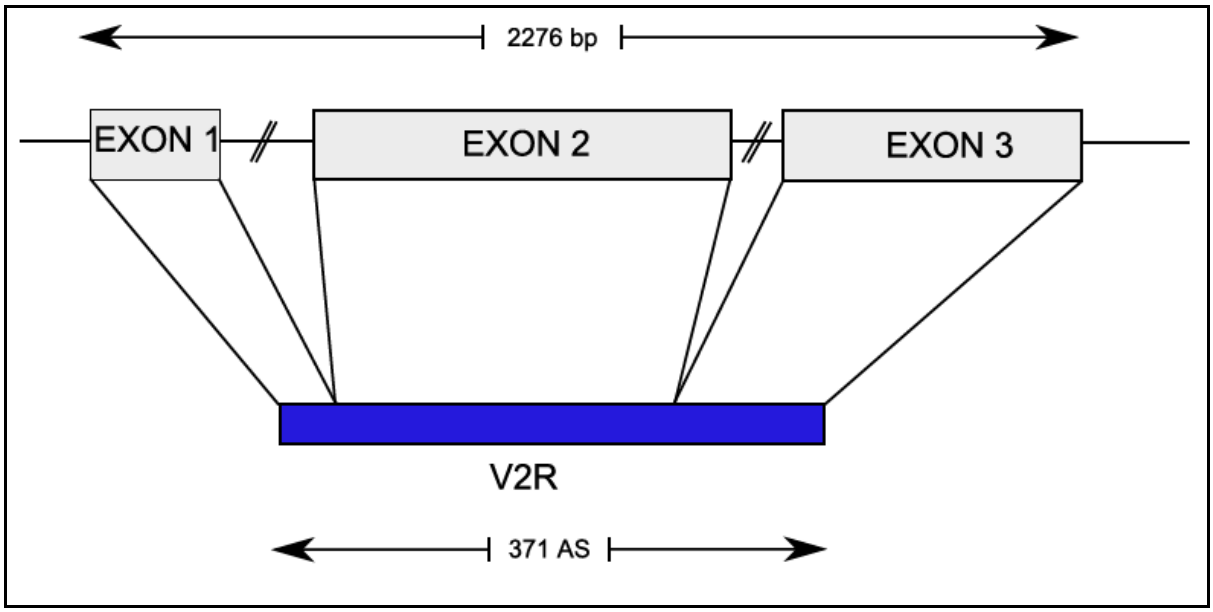

Abbildung 4: Modell des V2-Rezeptor Gens, Gesamtgröße des Gens 2276 bp, die kodierenden Bereiche sind auf drei Exon aufgeteilt, der V2-Rezeptor umfasst 371 AS, (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)(modifiziert nach Oksche et al. 2001)

Der V2-Rezeptor gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese sind membranständige Rezeptoren, die der Signaltransduktion an der Zellmembran dienen. Beim Menschen umfasst diese Gruppe etwa 600-800 Vertreter (McPherson et al. 2001).

Der V2R vereinigt die typischen Merkmale eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit sieben hydrophoben, transmembranären Bereichen bzw. α-Helices (TMD 1-7). Er besteht aus insgesamt 371 Aminosäuren. Das aminoterminale Ende (N-Terminus) liegt extrazellulär, das carboxyterminale Ende (C-Terminus) liegt intrazellulär vor. Es bilden sich drei intra (I-III-V) und drei extrazelluläre (II-IV-VI) Schleifen aus (Abb. 5). Der V2R erfährt nach der Translation eine Modifikation in dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und in dem Golgi Apparat, die für seine Funktionalität als Rezeptor und seinen intracellulären Transport zu der basalen Membran unerlässlich sind.

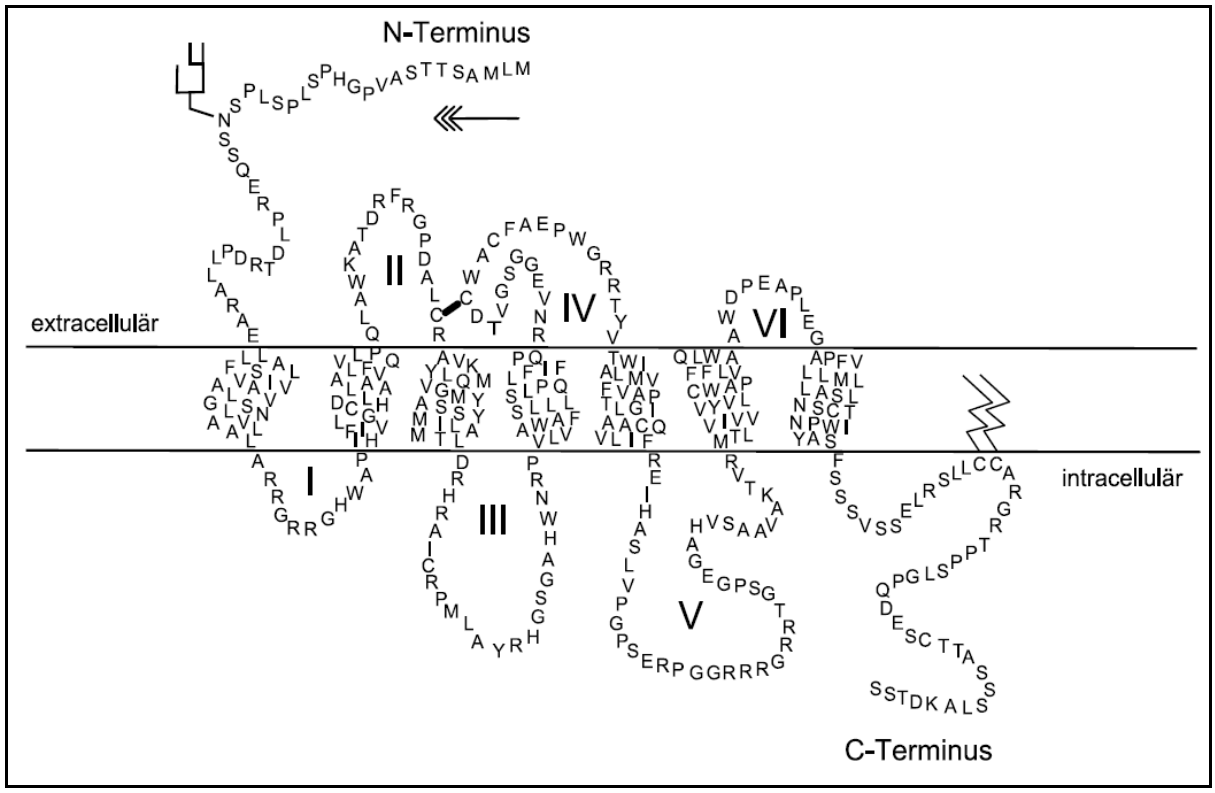

Abbildung 5: modellhafte Darstellung des V2-Rezeptors, Aminosäurensequenz gemäß 1-Buchstabencode, Beginn der Aminosäurensequenz mit einem Pfeil gekennzeichnet, der N-Terminus liegt extra - der C-Terminus intracellulär, es ergeben sich sieben putative, transmembranäre Bereiche mit drei extrecellulären (II,IV,VI) und drei intracellulären Schleifen (I,III,V), ferner Darstellung der Glykosylierung an dem Asparagin 12, die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 112 und 192 und die Palmitoylierung der Cysteine 341 und 342, (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)

Der G-Protein gekoppelte Rezeptor dient der Signalübermittlung an der Zellmembran und wird durch spezifische Liganden im Sinne eines Schlüssel-Schloß-Prinzips aktiviert. Die Aktivierung des GPCR führt zu einer Initialisierung von G-Proteinen, die unterschiedliche, intracelluläre Signalkaskaden starten.

G-Proteine sind heterotrimere Proteine, bestehend aus der größeren α- und den kleineren β- und γ-Untereinheiten. Derzeit sind 18 α-, 5 β- und 7 unterschiedliche γ-Untereinheiten beschrieben. Die G-Proteine werden in vier Gruppen eingeteilt. Die Gruppe der G_s Proteine aktiviert alle Formen der Adenylcyclase, die cyclisches AMP (cAMP) als second messenger bereitstellt. Die $G_{i/o}$-Proteine inhibieren bestimmte Isoformen der Adenylcyclase oder aktivieren direkt Ionenkanäle. Die Gruppe der $G_{q/11}$ regulieren die Aktivität der Phospholipase Cβ mit Inositolpolyphophaten und Diacylglycerol. Die Gruppe der $G_{12/13}$-Proteine regulieren die kleine-GTPase-Rho sowie den Wnt-Signalweg.

Die G-Proteine liegen intracellulär vor, sind jedoch durch Palmitoylierung und Myristoylierung an der Membran verankert. Der V2-Rezeptor gehört zu der Gruppe der G_s–koppelnden GPCR. Im inaktiven Zustand des V2R hat die α_s-Untereinheit Guanosindiphosposphat (GDP) gebunden, daher der Name „Guanin bindendes Protein“. Durch Aktivierung des V2R dissoziiert das GDP und wird durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt. Die α_s-Untereinheit löst sich aus dem Komplex und aktiviert ein weiteres Effektormolekül, die membranständige Adenylycyclase. Durch eine endogene, hydrolytische Aktivität der α_s-Untereinheit wird GTP in GDP umgewandelt, die Untereinheit kehrt in ihren inaktiven Urzustand zurück und lagert sich erneut der β- und γ-Untereinheit an.

Neben der unter Punkt 2.2.2 beschriebenen antidiuretischen Wirkung in der Niere führt Vasopressin auch zu einer vermehrten Ausschüttung des von Willebrand Faktors und des Faktors VIII. Bichet und Mitarbeiter fanden zudem heraus, dass Diabetes insipidus Patienten vom renalen Typ unter Gabe des V2R-spezifischen Desmopressin keine gesteigerte Inkretion der Faktoren aufwiesen, womit eine extrarenale Expression des V2R klinisch bewiesen wurde (Bichet et al. 1988). Die Expression des V2R konnte mittels PCR-Techniken in Lungengewebe nachgewiesen werden. Ein cAMP abhängiger Stimulationsweg wird derzeit angenommen. Die physiologische Rolle scheint aber nur untergeordnet zu sein (Kaufmann et al. 2000). Zum einen kann der Umstand dieses extrenalen Effekts zu diagnostischen Zwecken eines renalen Diabetes insipidus und zum anderen zu der Therapie eines von Willebrand Syndroms eingesetzt werden.

Vasopressin bindet neben dem V2R noch an den Vasopressin-1_a-Rezeptor ($V1_aR$) und den Vasopressin-1_b-Rezeptor ($V1_bR$). Sie zeigen eine 40-50%ige Sequenzhomologie zum V2R auf. $V1_aR$ und $V1_bR$ führen über eine $G_{Q/11}$-Aktivierung zur Stimulation der Phospholipase, dessen Substrat das Phosphatidylinositol ist. Der $V1_aR$ wird vornehmlich in der Leber und in der glatten Muskulatur der Gefäße exprimiert und nimmt Einfluß auf den Glukagonstoffwechsel und den Muskeltonus. Der $V1_bR$ wird in der Adenohypophyse exprimiert und fördert mit der Ausschüttung von ACTH die Produktion des Aldosteron.

2.2.3.1 Mutationen des Vasopressin-2-Rezeptor-Gens

Seit der Klonierung des V2R-Gens nimmt die Zahl der als krankheitsauslösend identifizierten Mutation stetig zu. Derzeit sind ca. 180 Mutationen identifiziert (aktualisierte Datenbank: http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?%20gene=AVPR2). Etwa die Hälfte dieser Mutationen sind Punktmutationen, ein Viertel sind Deletionen mit einem versetzten Leseraster, so dass eine veränderte Poypeptidkette resultiert. In frame Mutationen mit einem intakten Leseraster und Mutationen im Bereich der Exon- Intronübergänge (Spleißregion) bilden die zahlenmäßig kleinste Gruppe.

Bichet veröffentlichte eine Mutation (W71X), die bei 17 männlichen Patienten nachgewiesen werden konnte. Diese Häufung ist jedoch eher phylogenetisch zu erklären, da die Patienten Nachfahren eines Einwanderschiffes, der „Hopewell“, aus dem Jahre 1761 waren. In Zusammenschau aller Mutationen übersteigt die Genotypenhäufigkeit nie 4 %, so dass im V2R-Gen kein Hotspot für Mutationen vorzuliegen scheint (Bode et al. 1969, Bichet et al. 1993). Im Gegensatz dazu ist z.B. bei der Mukoviszidose die Deletionsmutante ΔF508 je nach Region in bis zu 70-80 % der Fälle die vorherrschende Mutation.

Nach einem Vorschlag von Tsukaguchi et al. können die Mutationen in drei Gruppen klassifiziert werden. Die erste Gruppe umfaßt mutante Genprodukte, die zwar an der Oberfläche exprimiert werden, jedoch eine defekte Ligandenbindung oder G-Proteinaktivierung aufweisen. Zu der zweiten Gruppe zählen mutante Rezeptoren, die inkorrekt prozessiert und intracellulär, meist im endoplasmatischen Reticulum, retiniert werden. Der überwiegende Anteil, ca. 2/3 aller bis dato charakterisierten V2R Mutationen, kann dieser Gruppe zugeordnet werden. Eine dritte Gruppe zeichnet sich durch eine RNA-Instabilität aus.

2.2.4 Der autosomale nephrogene Diabetes insipidus

Das Gen des humanen AQP2 liegt auf dem Chromsom 12 (12q13; Sasaki et al. 1994). Es umfasst ca 8500 Basenpaare und kodiert ein 272 Aminosäuren umfassendes Protein (Abb. 6). Die kodierenden und nicht kodierenden Exon- und Intronbereiche teilen sich wie unten dargestellt auf. Ein flankierender Bereich ca. 224 Basen upstream des AQP-2 Startcodon enthält eine cAMP-responsive Promotorregion (Hozawa et al. 1996, Matsumura et al 1997). Ergänzt wird die Promotorregion durch eine TATA-Box und zwei GATA-Sequenzen.

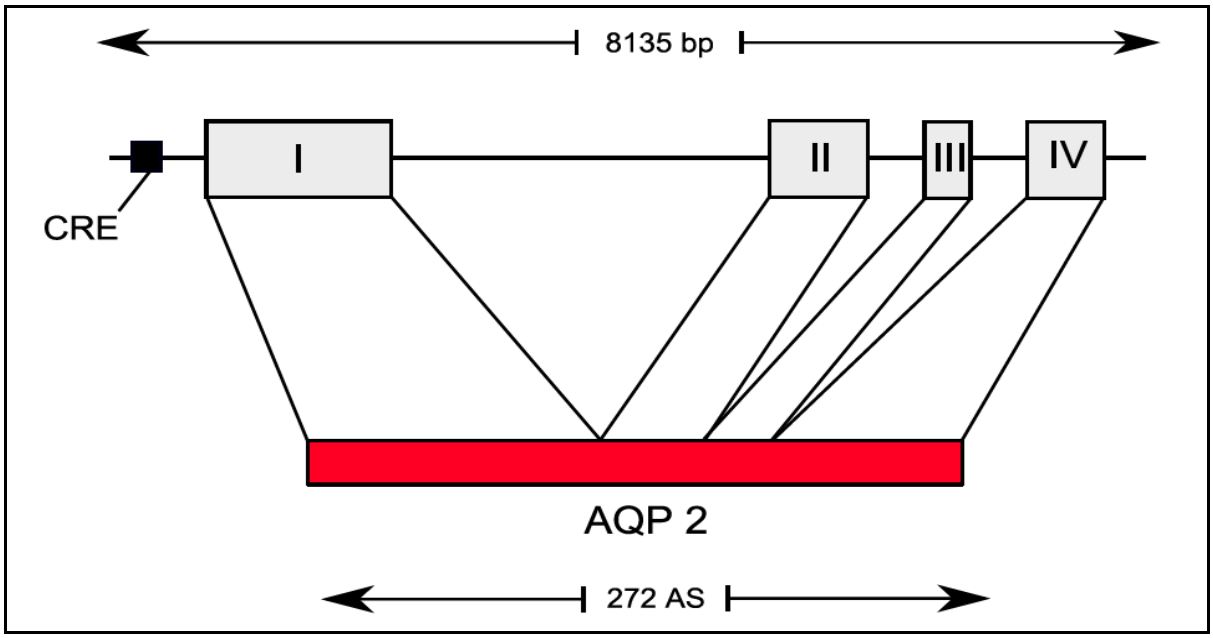

Abbildung 6: Modell des AQP2-Gens, Lokalisation auf dem Chromosom 12 (12q13), Gesamtgröße des Gens 8135 bp, Kodierende Bereiche sind auf vier Exone (I, II, III, IV) aufgeteilt, das AQP2 umfasst 272 AS, Promotor Region CRE, (GenBank Accession Number: AF147092) (modifiziert nach Oksche, Rosenthal 2001)

Das Aquaporin-2 ist der Vasopressin abhängige, selektive Wasserkanal der Niere. Es wird einer großen Familie membranständiger und Poren-formender Proteine zugerechnet, der sogenannten MIP-Familie. Die Bezeichnung resultiert aus dem zuerst beschriebenen Mitglied, dem „**M**ajor **I**ntrinsic **P**rotein of the lens fibre“. Die physiologische Rolle dieser Proteine liegt in dem transepithelialen Transport von Wasser und kleinen, apolaren Molekülen an der ansonsten nahezu undurchlässigen Lipidmembran. Derzeit sind ca. 150 Mitglieder dieser Familie in Vertebraten, Bakterien, Pilzen als auch Pflanzen identifiziert worden (Park et al. 1996). Der menschliche Organismus exprimiert zehn derzeit identifizierte Aquaporine, davon allein vier in der Niere. Diese weisen wie alle Aquaporine, eine große Sequenzhomologie von 40 % bis 50 % auf, unterscheiden sich aber in der Selektivität und der Lokalisation und damit in der Funktion für die Zelle und das Organ (Takata et al. 2004).

Aquaporine haben sechs hydrophobe Abschnitte (TM 1-6), die die Membran durchspannen (Abb. 7). Verbunden sind sie durch hydrophile Bereiche, den Schleifen A-E. Die amino- und carboxyterminalen Enden liegen intracellulär vor (Moon et al. 1993).

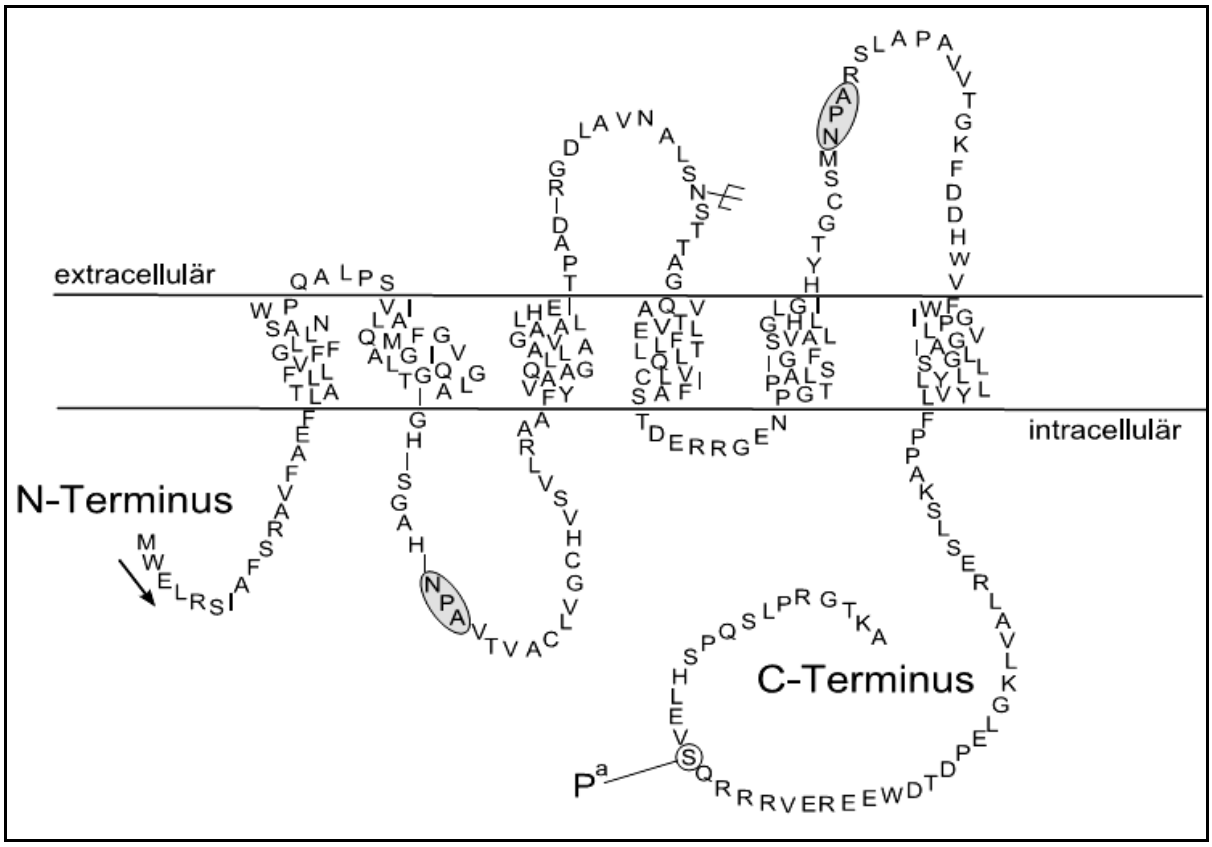

Abbildung 7: Modell des AQP-2, der Beginn der Aminosäurensequenz im 1-Buchstabencode ist mit einem Pfeil markiert, N- und C-Terminus liegen intrazellulär, sechs putative Transmembranbereiche mit der Ausbildung dreier extrazellulärer und zweier intrazellulärer Schleifen, grau unterlegt das hochkonservierte NPA-Motiv in der zweiten und fünften Schleife, Glykosylierung des Asparagin 123, Darstellung der C-terminalen Phosphorylierungsstelle (P^a) für die Proteinkinase A, (modifiziert nach Oksche 2001)

Bereits im endoplasmatischen Reticulum formieren sich die Wasserkanäle zu einem Homotetramer, agieren aber nachweislich als individuell, funktioneller Wasserkanal (Agre et al. 2003). Es wird angenommen, dass die hydrophilen Schleifen in die Membran eintauchen und zwischen den sechs α-helikalen Bereiche eine hydrophile Pore ausbilden, die Wassermolekülen nicht aber geladenen Ionen den Durchtritt erlauben (Gonen et al. 2006). Besonderer Bedeutung kommen dabei den Schleifen „B“ und „E“ zu. Sie enthalten ein unter den Wasserkanälen hochkonserviertes Asparagin-Prolin-Arginin Sequenzmotiv, die „NPA-Box“. Diese NPA-Box liegt in kurzen 10-12 AS zählenden hydrophoben Regionen.

Die anfänglich von Jung und Mitarbeiter anhand des AQP1 propagierte These (Jung et al. 1992), dass die Schleifen B und E in die Membran eintauchen und einer Sanduhr gleich („hourglassmodel“) die Pore ausbilden, konnte durch Strukturanalysen des AQP1 bestätigt werden (Heyman et al. 1999).

2.2.4.1 Mutationen des Aquaporin-2-Gens

Mit der Klonierung des AQP2-Gens konnte das Kandidatengen für den autosomal vererbten NDI vorgestellt werden. Die überwiegende Zahl der bis dato gefundenen Mutationen folgt einem rezessiven Modus. Einige Mutationen hemmen im Rahmen der Tetramerbildung auch die Prozessierung und Translokation des wildtypischen Wasserkanales, so dass ein autosomal dominanter Erbgang resultiert (Mulders et al. 1998, Kuwahara et al. 2001). Derzeit sind rund 34 Mutationen des AQP2 beschrieben. Davon sind 24 nonsense Mutatationen, sieben kleine Deletionen, eine Insertion und zwei gesicherte Splice Varianten.
(aktualisierte Datenbank unter http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=AQP2)

2.3 Diagnostische Möglichkeiten und Therapie

2.3.1 Klinische Diagnostik

Zur Differentialdiagnostik eines Diabetes insipidus hat sich die Durchführung eines Dursttests mit einer anschließenden Vasopressingabe bewährt (Testverlauf und Testauswertung unter Bichet et al. 1996).
Durch eine Flüssigkeitsrestriktion wird im Testverlauf die hypophysäre Vasopressinausschüttung stimuliert und der Mechanismus der Antidiurese in Gang gesetzt. In zweistündlichen Abständen werden die Urin- und Serumosmolarität sowie die Serumelektrolyte bestimmt. Bei einer physiologischen Antwort werden Urinosmolalitäten von maximal 800 bis 1200 mosmol/kg gemessen. Der Diabetes insipidus Patient hingegen lässt einen Anstieg der Urinosmolalität bei einer gleichzeitig einsetzenden Hypernatriämie vermissen (U_{osm} <250 mosmol/kg). Unter Umständen muß dieser Test vorzeitig beendet werden, wenn entsprechende Kriterien erreicht werden (i.e. Hypernatriämie S_{Na} >145 mosmol/l, S_{osm} >300 mosmol/l, Gewichtsverlust >4 %, Kreislaufdepression). Die Gabe des synthetischen Vasopressin Analogon Desmopressin zum Ende des Testes ermöglicht die Unterscheidung des zentralen von dem renalen Diabetes. Defekte des AQP2 oder des V2R können mit dieser Diagnostik nicht differenziert werden.
Der Dursttest wie auch die Infusion hypertoner Lösungen darf nur unter strenger, klinischer Kontrolle und unter der Berücksichtigung der Abbruchkriterien erfolgen. Im frühen Säuglingsalter sind diese Untersuchungen aufgrund der mit ihnen verbundenen Gefahren häufig nicht vertretbar.

2.3.2 Therapeutischer Ausblick

Die Therapie eines Diabetes insipidus renalis fußt neben einer ausreichenden Hydrierung, einer kalorisch ausgewogenen Diät und einer salzarmen Kost auf die kombinierte Gabe eines Thiaziddiuretikums (i.e. Hydrochlorothiazid) mit einem Cyclooxygenaseinhibitor (i.e. Indomathacin). Die paradoxe Wirkung des Diuretikum Hydrochlorothiazid wird durch eine gesteigerte Rückresorption des Natrium und damit auch des Wassers im proximalen Tubulusystem erklärt. Die Hemmung der renalen Prostaglandinsynthese durch Indomethacin führt durch eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate zu einer Abnahme der Primärharnbildung. Eine Hemmung einer Prostaglandin vermittelten diuretischen Wirkung durch renale Prostaglandin- (EP_3) und Endothelinrezeptoren (ET_B) wird diskutiert (Oksche et al.).

3 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, bei Patienten mit dem klinischen Verdacht auf das Vorliegen eines nephrogenen Diabetes insipidus durch molekulargenetische Analysen Mutationen im V2R- oder AQP2-Gen zu identifizieren. Das Patientenkollektiv von insgesamt 10 Familien war aufgrund klinischer Daten und Tests vorselektiert, so dass ein Diabetes insipidus klinisch als hinreichend gesichert galt. Das Probenmaterial wurden unserer Arbeitsgruppe von mehreren deutschen Kinderkliniken und nephrologischen Ambulanzen zur Verfügung gestellt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse dienten zum einen der Sicherstellung der klinischen Verdachtsdiagnose. Zum anderen wurden die neu beschriebenen Mutationen in ein Expressionssystem kloniert. Damit wurde die Vorraussetzung geschaffen, die jeweiligen Mutationen auf fuktionelle Defekte hin zu charakterisieren.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

- Thermal Cycler Cetus, System 2400, Perkin Elmer
- DNA-Sequenzer 373A, Applied Biosystems inc.
- Lumi Imager TM, Boehringer, Mannheim
- Photometer Pharmacia UV-visible Spectrometer
- Waage Mettler Toledo AG 245
- Zentrifugen: Beckman Optima Ultrazentrifuge, Beckman LE-70, Heraeus Biofuge 15, Beckmann, Heraeus
- Horizontale Elektrophoresekammer Roth
- Vertikale Elektrophoresekammer, Eigenbau
- Schüttelinkubator, New Brunswick Scientific
- pH-Meter, Hanna Instruments inc.
- Dampfsterilisator, Tecnomara
- Spannungsgeber, Hoefer Freiburg
- Geltrockner, Hoefer Freiburg
- Thermalblock, Hoefer Freiburg
- Röntgenfilme, Amersham Pharmacia

4.1.2 Software

- Microsoft Windows
- Microsoft Word
- Inkscape
- ABI PrismTM 3.0 , Tripos Inc. USA
- Clone Manager 2.0

4.1.3 Chemikalien und Kits

- 10 Kilobasen DNA Leiter, Gibco
- Agarose, Life Technologies
- Ethidiumbromid, Roth
- β-Mercaptoethanol, Merck
- Hefeextrakt, Gibco BRL, Eggenstein
- Peptone 140, Life Technolgie
- IPTG/X-Gal, Roth
- Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlormethan, Merck
- Nitrozellulose, Schleicher & Schüll
- Rotiphorese Gel 30 (5:1), Roth
- Ethanol reinst, Roth
- Isopropanol reinst, Roth
- Chloroform, Roth
- Phenol in wässriger Lösung, Roth
- Ampicillin, Roth
- [a-35S] dATP, Amersham
- GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase, Perkin Elmer
- JETstar Plasmid Midiprep Kit, Genomed
- GeneClean II Kit, Q-Biogene Inc.
- Qiagen Plasmid Midi Kit, Qiagen
- QiAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen

4.1.4 Enzyme

- alkalische Phosphatase, Boehringer
- Restriktionsenzyme, New England BioLabs
- T4-DNA-Ligase +10 × Puffer, New England BioLabs
- Taq-DNA-Polymerase +10 × Puffer, Pharmacia

4.1.5 Oligonukleotid-DNA, Plasmid-DNA

4.1.5.1 Primerauswahl des Vasopressin-2-Rezeptorgens

Primer des Sense-Stranges (V2R-Gen)

PCR1 5´-TCCTGGGGTTCTGTGCATCCGTCTGTCTGAC-3´

33 5´-GTGGGTGTCCGGATGGGGC-3´

A3 5´- GGGACCCGCTGCTAGCC-3´

A4 5´- CCGTGAAGTATCTGCAGA-3´

A5 5´-CTGGGCCTGCTTTGCG-3´

A6 5´- GTGGTCGTTCTATGTGC-3´

A7 5´- GGATCTATGCATCTTTC-3´

Primer des Antisense Stranges (V2R-Gen)

63 5´-CTACACCCAGCTCAAGTGAGCTGAC-3´

PCR2 5´- CTCCCAGGACCAGCCAGCCCCAGGAAGGCAGCTC-3´

B7 5´-GAAAGATGCATAGATCC-3´

B6 5´-GCACATAGACGACCAC-3´

B5 5´-CGCAAAGCAGGCCCAC-3´

B4 5´-TCTGCAGATACTTCACGG-3´

B3 5´-GGCATAGCAGCGGGTCCC-3´

B2 5´- GTCCAGAAGGAAGGGCAG-3´

4.1.5.2 Primerauswahl des Aquaporin-2-Gens

Primer des Sense Stranges (AQP2-Gen)

A1 5´- GTGCCCGGAGCATCCTGGCCCTGAGACAGC-3´

A2 5´- GAAGATGGAGCCAGAGAG-3´

A3 5´-GGACTTCCTGCCCTGTCC-3´

A4 5´- CTGAGGGCTCCGCGTGCCG-3´

Primer des Antisense Stranges (AQP2-Gen)

B1 5´- GGATGGCAAAGTTGTGGC-3´

B2 5´-GAGGCTGGAACCCATGGC-3´

B3 5´-CCAGCTCTTGTTCTCCCT-3´

B4 5´-CCTTCTGCCTCGGGCCTCACAAGCGTCCG-3´

4.1.5.3 Plasmid-DNA

- pCRII vector, Invitrogen

4.1.6 Bakterien, kompetente Zellen

- One Shot® Single-Reaction, Competent *E. coli,* Invitrogen
- MB7 118 *E.Coli*

4.1.7 Medien und Puffer

4.1.7.1 LB Medium

Das LB Medium wird zur Anzucht von E.Coli verwandt. Die Bestandteile werden gemischt und bei 120 ℃ für 15 min autoklaviert.

LB Medium	Peptone 140	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	H2O	ad 1000 ml

4.1.7.2 LB-Agarplatten

Dem LB Medium wird Agar in einer Endkonzentration von 1,5 % hinzugesetzt und das Gemisch bei 120 ℃ für 15 min autoklaviert. Für den Ansatz selektiver Ampicillin Platten wird nach dem Abkühlen (ca. 50 ℃) Ampicill in in einer Endkonzentration von 100 µg/ml und der Farbstoff IPTG/X-Gal 40 µg/ml zugesetzt. Die Lösung wird in sterile Petrischalen gegossen und kann bei 4 ℃ dun kel gelagert werden.

4.1.7.3 DNA-Ladepuffer

Glycerin 40 %

Bromphenolblau 0,25 %

Xylencyanol 0,25 %

4.1.7.4 TAE Puffer

Der TAE Puffer wird als Laufpuffer sowohl für Agarose- als auch für Acrylamidgele verwandt. Der Puffer wird als Konzentrat angesetzt und zum Gebrauch entsprechend (1:50) mit Aqua dest. verdünnt.

50 × TAE-Puffer	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA	100 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml

4.1.7.5 TE Puffer

TE Puffer	Tris/Cl pH8,0	10 mM
	Na2-EDTA	1 mM

4.1.7.6 TBE Puffer

10 × TBE	Tris/Cl pH 8,0	1×10^3 mM
	Borsäure	1×10^3 mM
	EDTA	20 mM
	Aqua dest.	ad 1000 ml

4.2 Methoden

4.2.1 Isolierung von DNA

4.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut

Die Patientenproben wurden uns als EDTA Vollblut zugesandt. Die Isolierung der genomischen DNA wurde mit Hilfe des QiAampDNA Blood Midi Kit der Firma Qiagen nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Material:

QIAamp Midi Spin Säule
QIAGEN Protease
Puffer AL
Puffer AW1
Puffer AW2
Puffer AE
Ethanol 100 %

Methode:

Für die Elution genomischer DNA sind in diesem Protokoll vier Schritte notwendig. Im ersten Schritt werden 200 µl EDTA Vollblut mit 20 µl Protease und mit 200 µl Puffer AL für 15 s auf dem Vortex gemischt und für 10 min bei 54 ℃ inkubiert. Die Zellen lysieren und Eiweiße werden abgebaut. Nun werden 200 µl Ethanol 96 % hinzugefügt und erneut gevortext. Im folgenden Schritt wird die Lösung auf eine Säule aufgetragen. Das Suspensat wird über eine Zentrifugationsschritt (6000 xg, 1 min) abgeschieden, die DNA bindet an das Silicagel der Säule. In zwei weiteren, separaten Wasch- und Zentrifugationsvorgängen mit jeweils 500 µl Puffer AW1 und AW2 werden weitere Proteine und Ionen eleminiert. Im abschließenden Schritt wird die an dem Gel gebundene DNA mittels 200 µl Puffer AE nach fünf minütiger Inkubation bei Raumtemperatur über einen letzten Zentrifugationsschritt (6000 xg, 1 min) eluiert und in ein neues Gefäß überführt. Die Ausbeute der DNA kann photometrisch abgeschätzt werden.

4.2.1.2 Plasmidisolierung aus E.coli im Cs/Cl-Gradienten

Diese Methode erlaubt es, die Plasmid-DNA über einen Dichtegradienten effektiv von der bakteriellen RNA und der chromosomalen DNA aufzutrennen. Diese so aufgereinigte DNA eignet sich sehr gut zur manuellen Seqenzierung gemäß der Methode nach Sanger.

Material:

LB Medium mit Ampicillin
Glukose/Tris/ EDTA Lsg. NaOH/SDS Lsg.
1 mol Na Acetet Lsg., pH 5,5
Isopropanol 95 %
Ethanol 70 %
TE Puffer
CsCl/TE Lösung: 100 TE Puffer/100 g CsCl
Ethidium Bromid 10 ng/ml
N-Butanol Lsg. TE gesättigt
Beckman JA-10- Rotor
Sorvall SS-34 Rotor

Methode:

Die Anzucht der E.Coli erfolgt wie bei der Minipreperation, jedoch in einem Volumen von 500 ml LB Medium. Ist die Kultur gesättigt ($OD_{600} \approx 4$), werden die Bakterien für 10 min bei 6000 xg zentrifugiert und in 4 ml GTE Lösung resuspendiert. Es folgt die Lyse der Zellen mit 10 ml Na/OH/SDS Lösung. Das Gemisch wird homogen viskös und kann für 10 min auf Eis gestellt werden. Weitere 7,5 ml Na-Acetat bewirken ein Ausflocken der Eiweiße. Die Lösung wird nun für 10 min bei 20.000 xg, 4 ℃ zentrifugiert. Der reine Überstand wir in ein neues Gefäß überführt und ihm das 0,6-fache Volumen an Isopropanol zugefügt und gemischt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wird die Lösung für 15 min bei 15.000 xg zentrifugiert. Das Pellet wird zweimalig mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert und getrocknet.

In den folgenden Schritten wird die Plasmid-DNA über einen Cs/Cl Gradienten von der chromosomalen DNA und RNA getrennt. Bei dem Umgang mit Ethidiumbromid sollten grundsätzlich Handschuhe getragen werden! Das Pellet wird in 4 ml TE Puffer

aufgenommen, mit 4,4 g Cs/Cl und 0,4 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml Ethbr.) versetzt und in Ultrazentrifugen Röhrchen überführt. Die Röhrchen müssen genau mit der Cs/Cl Lsg. austariert werden. In dem nächsten Zentrifugationsschritt (14 h bei 350,000 xg bei 20 ℃) bildet sich ein Dichtegradien t aus. Die Plasmid DNA ordnet sich entsprechend ihrer Dichte etwa in der Mitte des Gefäßes an und kann unter der UV-Lampe mittels einer feinen Glaspipette vorsichtig abgezogen werden.
Wird n-Butanol in gleichem Volumen zugesetzt und gemischt, geht das Ethidium-Bromid in die organische, obere Phase über und kann verworfen werden. Dieser Waschvorgang sollte mehrmals wiederholt werden, bis die Rotfäbung verschwindet. Die DNA wird nun mit TE-Puffer (2 × Vol.) und Ethanol (100 %, 2 × Vol.) präzipitiert, pelletiert (10.000 xg, 4 ℃, 10 min), mit 70%igem E thanol gewaschen, in TE Puffer aufgenommen und steht nun für die Sequenzierung bereit.

4.2.1.3 Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien im kleinen Umfang

Die bakterielle Plasmid DNA kann mit Hilfe eine alkalischen Lyse isoliert werden. Da diese Minipräparation sehr rasch durchführbar ist, kann eine große Anzahl an Bakterienclonen präpariert und analysiert werden.

Material:

LB Medium mit Ampicillin
Glucose/Tris/EDTA Lsg.
TE Puffer
NaOH/SDS Lsg.
NaAcetat Lsg. ph 4,8
Ethanol 95 % und 70 %

Methode

5 ml des LB Mediums werden mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37 ℃ bebrütet, bis eine OD_{600} von 4 erreicht ist. 1,5 ml der Kultur werden in eine Eppendorf Cup überführt, der Überstand abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl TE Lösung resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lyse der Zellen geschieht in 200 µl NaOH Lösung. Die Suspension wird für weitere 5 Minuten auf Eis gekühlt, Hinzufügen von 150 µl NaAcetat und Warten für 5 Minuten auf Eis. Das Gemisch wird für 3 Minuten zentrifugiert und 400 µl des Überstandes in einem

neuen Gefäß mit 800 µl Ethanol 95 % gemischt. Nach 2 Minuten bei Raumtemperatur fällt die DNA aus und kann herabzentrifugiert werden. Die präzipitierte DNA befindet sich als Pellet am Grund des Gefäßes, einmaliges Waschen mit 70%igem Alkohol und Trocknen im Vakuum Trockner. Die präzipitierte DNA kann nun in 30 µl TE Puffer aufgenommen werden und steht zur weiteren Verarbeitung bereit.

4.2.1.4 DNA-Fragmentisolierung aus Agarose-Gelen, I

DNA-Fragmente, die zuvor in einem Agarosegel ihrer Länge nach aufgetrennt worden sind, können mit dem "GeneClean-Kit" , Dianova , selektiv eluiert werden.

Material:

3 M NaI

Glasmilch-Suspension

"New-Wash-Puffer"

Methode:

Die entsprechende DNA-Bande wird mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Ist das Agarosestück gewogen, addiert man die 2,5-fache Menge an Natriumjodidlösung. Bei Erwärmen auf 50 ℃ auf dem Heizblock schmilzt die Agarose, so dass 5 µl Glasmilch-Suspension hinzugegeben werden können. Stellt man die Lösung für 5 min auf Eis, bindet die DNA an die Glaspartikel und kann zentrifugiert werden (20.000 xg, RT, 20 s) Das DNA-Glas Pellet wird 3 min mit 200 µl "New-Wash-Puffer" gewaschen. Ist der Überstand sorgfältig abgenommen worden, wird das Glas Pellet in 5 µl H_2O resuspendiert und für 3 min auf 50 ℃ erhitzt. Die DNA geht in die wäßrige Lösung über und kann nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

4.2.1.5 DNA-Fragmentisolierung aus Agarose-Gelen, II

Diese Methode dient zur Aufreinigung der linearisierten und zur Klonierung bestimmten DNA aus Agarosegelen mittels einer Phenol Extraktion und einer sich anschließende Ethanolpräzipitation.

Material:

Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol im Verhältnis 25/24/1

3 M Na-Acetat (pH 5,2)

Ethanol 100 %, -20 ℃

Ethanol 70 %, RT

TE-Puffer (pH 8,0)

Zelophanfolie

Methode:

Die unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnittene DNA-Bande wird zunächst in einem sterilen Cup bei -20 ℃ tiefgefroren und dann, durch eine Zelophanfolie geschützt, zwischen den Fingern aufgetaut. Die sich freisetzende Flüssigkeit enthält z.T. die DNA-Fragmente und wird mit einer Pipette in ein neues Cup überführt. Der sich anschließende Reinigungsschritt kann nach Art der Phenolextraktion geschehen.

4.2.1.6 Präzipitation von PCR-Produkten mit Isopropanol

Mit Hilfe dieser Isopropanol Fällung werden kleine Oligonucleotide, wie z.B. die verwendeten Primer, effektiv ausgewaschen, die PCR-Produkte hingegen werden in ausreichendem Maße gefällt.

Material:

Isopropanol 100 % und 70 %

Aqua dest.

3 M Na-Acetat (pH 5,2)

Methode:

Dem PCR-Ansatz werden bei RT 3 Volumina Isopropanol 100 % und 1/10 Totalvolumen Na-Acetat hinzugesetzt und in den Eppendorfcups gemischt. Nach dem Zentrifugieren (20.000 xg, RT, 15 min) wird die Phase abgenommen, das Pellet jeweils zweimal mit Isopropanol 70 % überschichtet, zentrifugiert und vorsichtig, im Vakuum getrocknet und in 50 µl Aqua dest. aufgenommen. Das PCR-Produkt ist nun bereit für eine nested-PCR.

4.2.1.7 Präzipitation von Taq-cycling PCR-Produkten mit Ethanol

Diese Methode ist erforderlich, wenn alle Oligonucleotide eines taq-cycling PCR Ansatzes präzipitiert werden sollen. So können auch gelabelte Oligonukleotide mit weniger als 20 bp Länge gefällt und auf dem Sequenzgel sichtbar gemacht werden.

Material:

Ethanol 100 %, -20 ℃

Ethanol 70 %, -20 ℃

Aqua dest.

3 M Na-Acetat (pH 5,2)

Methode:

Das Pippetierschema und die Zentrifugationsschritte können von der Isopropanolfällung übernommen werden. Die Alkohollösungen sollten jedoch bei -20 ℃ gelagert werden.

4.3 Elektrophorese

4.3.1 Denaturierende Polyacrylamidgele für die Sequenzierung

Polyacryalamidgele haben ein sehr hohes Auflösungsvermögen. Mit ihnen können lineare DNA Fragmente bis auf eine Base genau aufgetrennt werden. Aufgrund des stark harnstoffhaltigen Millieus liegt die Sequenzierungsprobe als linearisierte Einzelstrang-DNA vor. Die im Rahmen dieser Arbeit verwandten 6%igen Gele bieten ein gutes Auflösungsvermögen im Bereich von ca. 50 bis 550 bp downstream des verwandten Sequenzprimers.

Material:

2 % Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlormethan
70 % Ethanol
TEMED
10 % Ammoniumpersulfat (Lagerung bei 4 ℃)
TBE Elektrophorese Puffer pH 8,2-8,4
Acrylamid Gel Lösung (6%ig)
DNA Probe mit Formamid Stop Puffer
Bakterienfilter
2 Glasplatten 30×40 cm
Aluminiumplatte $0{,}4 \times 34 \times 22$ cm
2 Spacer 0,4 mm
Kamm 0,4 mm
Elektrophoresekammer
Buchklammern
Spannungsqelle
Vakuum-Gel-Trockner
Zelophanfolie
Blotting Paper 46×57 cm (Whatmann 3MM)
Röntgenfilm mit Kassette,
Chemikalien für die SW-Entwicklung

Methode:

Zunächst werden die beiden Glasplatten, zwischen denen das Gel gegossen wird, vorbereitet. Sie müssen mit Wasser und Seife und anschließend mit 70%igem Ethanol gereinigt werden. Auf einer der beiden Platten wird die Dimethyldichlorsilan-Lösung mit einem weichen Tuch gleichmäßig aufgetragen und die Platte markiert. Das Acrylamidgel löst sich später wesentlich besser von der so vorbehandelten Platte. Zwischen den behandelten Glasflächen werden die Spacer an beiden langen Seiten positioniert. Buchklammern pressen nun die Platten gegeneinander. Für ein Gel werden 60 ml Acrylamidlösung hergestellt. Die Acrylamidlösung wird zunächst mittels einer Spritze über ein Bakterienfilter gereinigt und in eine sauberes Becherglass gegeben. Mit der Zugabe von 60 µl TEMED und 0,6 ml 10%igem Ammoniumpersulfat wird die Polymerisation gestartet. Es bleibt nur wenige Minuten Zeit, mit einer Glaspippete die Lösung vorsichtig zwischen die Glasplatten zu geben, das gesamte Gel zu beladen und den Kamm einzusetzen. Lufteinschlüsse müssen vermieden werden.

Ist das das Acrylamid nach ca. 1-2 Stunden polymerisiert, wird das Gel in die Gelkammer eingespannt. Das obere und untere Reservoir wird nun mit $1 \times$ TBE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel an beiden Enden mit der Pufferlösung bedeckt ist. Der Kamm kann nun entfernt werden.

Die Aluminiumplatte dient zur gleichmäßigen Wärmeverteilung und wird mit den Klammern vor der Glasplatte befestigt. Das Gel muß zunächst eine halbe Stunde bei 1700 Volt bei 70 Watt warmlaufen. Erst dann kann es beladen werden. Hierzu werden die Geltaschen mit einer kleinen Pipette ausgespült. Die DNA Proben werden zuvor bei 95 ℃ kurzzeitig (10 s) denaturiert und auf das Gel geladen (ca. 5 µl, Basenfolge: A-C-G-T). Der Stoppuffer der manuellen Sequenzierung enthält zwei Farbstoffe, die in dem 6%igem Gel wie folgt laufen: Bromphenolblau » 26 bp, Xylen » 106 bp.

Nach ca. 5 bis 6 Stunden kann der Gellauf beendet werden. Nach weiteren 20 bis 30 Minuten ist es soweit abgekühlt, dass die zuvor markierte Platte vorsichtig abgehebelt werden kann. Durch Auflegen des Papieres auf das Polyacrylamidgel wird dieses übertragen. Das Gel wird nun mit der Zelophanfolie abgedeckt und zum Trocknen in den Vakuumtrockner gelegt. Nach weiteren 5 Stunden ist das Gel auf dem Papier fixiert. In der Dunkelkammer wird der Film mit der empfindlichen Schicht direkt auf das Gel gelegt und in einer herkömmlichen Röntgenfilmkassette

eingespannt. Die Expositionsdauer beträgt in der Regel 24 Stunden, kann aber je nach Güte der Radioaktivität und Erfolg der Sequenzierungsreaktion variieren. Der Film kann nun in der Dunkelkammer entnommen, entwickelt und fixiert werden.
Die hier beschriebene Prozedur gilt für die manuelle Sequenzierung mittels radioaktiv markierter Nukleotide (S^{35}). Die Gele der maschinellen Sequenzierung werden gleichermaßen hergestellt.

4.3.2 Agarose-Gel

Eine linearisierte Doppelstrang-DNA kann aufgrund ihrer negativen Ladungseigenschaften der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Für Fragmente zwischen 0,1 und 10 kbp Größe eignen sich insbesondere Agarosegele. Die Konzentration der Agarose ist dabei entscheidend für das Laufverhalten der DNA im Gel. Die folgende Tabelle listet Konzentration und Trennvermögen gegeneinander auf. Die Auflösung der DNA Fragmente über ein Agarosegel erfolgte sowohl zu analytischen, wie auch zu präparativen Zwecken.

Agarose	**Spectrum der DNA Fragmente**
0,5 %	1-30 kbp
0,7 %	0,8-12 kbp
1,0 %	0,5-10 kbp
1,2 %	0,4-7 kbp
1,5 %	0,2-3 kbp

<u>Material</u>
TAE Laufpuffer
Ethidium Bromid Lösung (0,5 µg/ml)
Agarose
DNA-Marker, Bromphenol Blau Puffer
Horizontale Gelkammer und Kamm
Gleichstrom-Spannungsquelle

Methode

Die Agarose wird mit dem Laufpuffer gemischt und mittels einer Mikrowelle zum Schmelzen gebracht. Ist die Lösung homogen viskös, kann sie auf die Gelplatte der Kammer aufgebracht und der Kamm eingesetzt werden.

Ist das Gel fest, wird die Gelkammer mit Laufpuffer gefüllt, so dass das Gel ca. 1 mm mit Puffer bedeckt ist. Die Kathode ist probennah, die Anode probenfern. Nach Entfernen des Kammes wird die DNA Probe (ca. 10 µl) mit dem Bromphenol Puffer (20-40 µl) versetzt und in die Geltasche geladen. Zusätzlich wird ein definierter Größenmarker in die erste Tasche gegeben. Für kleine Gele können Spannungen bis max. 10 V/cm angelegt werden. Das Bromphenol Blau dient als sichtbarer Marker und läuft mit Fragmenten um ca. 500 bp Länge. Gibt man das Gel für ca. 15 min in ein mit Ethidium Bromid versetztes TAE Bad, interkaliert der Farbstoff mit der DNA, die Banden sind jetzt unter UV-Licht sichtbar. Für präparative Gele sollte die Expositiondauer unter der Lampe so kurz wie möglich gehalten werden, um UV-induzierte DNA-Schäden zu minimieren.

4.4 Sequenzierungsmethoden

4.4.1 Manuelle Sequenzierung nach Sanger, modifiziert

Das Verfahren zur enzymatischen DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977) beruht auf einen basenspezifischen Abruch der von dem Enzym DNA-Polymerase katalysierten Polymerasereaktion aufgrund des Einbaus von Didesoxynukleotiden (ddNTP) in den neu synthetisierten DNA-Strang.

Der Sequenzprimer lagert sich zu Beginn der Reaktion am 3`-Ende der einzelsträngigen Matrize an. Die T7 DNA abhängige DNA-Polymerase bewirkt daraufhin eine Kettenverlängerung von 5´- in 3´-Richtung. In den so wachsenden, komplementären DNA Strang werden radioaktiv markierte [a-^{35}S] dATP´s eingebaut, so dass diese DNA Stränge später im Autoradiogramm sichtbar gemacht werden können. Die Sequenzierreaktion läuft in vier parallelen Ansätzen ab. Jeder Ansatz enthält neben den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) jeweils eines der Didesoxyribonukleosid-triphosphate (ddNTP) in geringer Konzentration. Diesem ddNTP fehlt die OH-Gruppe am C-3 Atom der Ribose, so dass ein Kettenabbruch erfolgt und DNA Fragmente mit einem definierten, terminalen Nukleotid entstehen. Der Zeitpunkt des Kettenabbruches geschieht willkürlich, so dass Fragmente

unterschiedlicher Länge entstehen. Werden die Fragmente der vier Reaktionsansätze nebeneinander auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen, kann die Basenabfolge aufgrund des Bandenmusters des Autoradiogrammes abgelesen werden.

Material:

1 pmol/µl DNA Template
1 pmol/µl Sequenzprimer
10 × Sequenase Puffer
Sequenase Terminations Mix
Sequenase/ Pyrophosphatase Mix
Sequenase diluent Mix
Labeling Mix [a-^{35}S] dATP (~500-1200 Ci/mmol)
Stop loading dye Mix
Mikrotiter Platten, hitzestabil

Methode:

Die einzelnen Pipettierschritte müßen während der Polymersasereaktion in einem engen zeitlichen Rahmen erfolgen. Im ersten Schritt wird die Sequenase mit dem Diluent Sequenase Puffer bis zu einer Konzentration von 1 U/µl verdünnt und auf Eis gelagert. Im zweiten Schritt werden 1 pmol DNA, als Einzelstrang oder Plasmid DNA, 1 pmol des Sequenzprimers, 1 µl 10 × Sequenase Puffer und eine entsprechende Menge Aqua dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl in einem Gefäß gemischt. Die DNA wird auf einem Heizblock für 10 s bei 95 ℃ denaturiert und anschließend für 30 min bei 37 ℃ inkubiert, so dass sich Primer und DNA anlagern. Während dessen können jeweils 2,5 µl des Terminationmixes (i.e. A,C,G,T) auf jeweils eine Bahn der Mikrotiterplatte gegeben werden. Im Dritten Schritt wird die Polymerasereaktion gestartet, indem der DNA Lösung 2 µl Labeling Mix, 1 µl 10 mCi/ml [a-^{35}S]dATP und 2 µl Sequenase Mix hinzugegeben werden. Die Lösung wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im vierten Schritt werden jeweils 3,5 µl dieses Ansatzes auf die vorbereitete Mikrotiterplatte gegeben. Die ddNTP werden eingebaut und somit der Strangabbruch provoziert. Diese Reaktion wird nach 5 bis 10 Minuten bei 37 ℃ durch die Zugabe von 4 µ l Stop loading dye Mix gestoppt und die Proben für 60 s bei 95 ℃ denaturiert. Die Proben stehen nun für den Gellauf bereit.

4.4.2 Automatische Sequenzierung, Taq-PCR

Die in dieser Arbeit verwandte, automatische Sequenzierung basiert auf der Methode von Sanger, unterscheidet sich aber in dem Gebrauch einer thermostabilen Polymerase anstelle der Sequenase. Die Markierung der Oligonukleotidketten erfolgte am 3´-Ende durch eine Fluoreszenzmarkierung der ddNTP. Radioaktiv markierte Marker werden für diese Reaktion nicht benötigt. Da für jedes der vier ddNTP ein spezifischer Farbstoff verwendet wird, kann die Reaktion nach dem weiter unten beschriebenen PCR Protkoll in nur einem Gefäß durchgeführt werden. Im Anschluß wird die Probe elektrophoretisch auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Fluoreszenznachweis erfolgte in einem DNA-Sequenzer (373A, Applied Biosystems). Ein Laserstrahl tastete das Gel ab und erfaßte die vier verschiedenen Terminatoren, die jeweils Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Die Emission wird in einer Photozelle gemessen und in digitale Signale umgewandelt. Somit werden die Daten einer Computeranalyse zugänglich, die die Signale als ein Chromatogramm darstellt.

4.5 PCR Techniken

4.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion lassen sich DNA Fragmente in vitro vervielfältigen. Zunächst wird die DNA durch Hitzeeinwirkung auf 95 ℃ zu Einzelsträngen denaturiert. Bei der folgenden Abkühlung auf ca. 60 ℃ hybridisieren an den 3`-Enden beider DNA-Stränge komplementäre Oligonukleotide, sog. Primer, von 18 bis 24 bp Länge („Annealing“). Von diesen Oligonucleotiden ausgehend wird im nächsten Schritt bei 72 ℃ die Synthese des komplementären DNA Stranges initiiert („Extension“). Die Synthese wird durch die hitzestabile Taq-Polymerase, eine DNA abhängige DNA-Polymerase eines thermophilen Bakteriums (Thermus Aquaticus) bewerkstelligt. Dieser dreiphasige Zyklus des Denaturierens, des sich anlagernden Primers und der DNA Synthese wird fortlaufend wiederholt. Bei jedem Zyklus ergibt sich eine Verdopplung der Ausgangs DNA. Theoretisch vervielfältigen sich die DNA Fragmente exponentiell um den Faktor 2^n (n = Anzahl der Zyklen). In der Realität ist jedoch bei hohen Zykluszahlen die Enzymaktivität der limitierende

Faktor, so dass die Synthese ab einem gewissen Punkt nur noch einer linearen Funktion folgt.

Die im folgenden erläuterten PCR Strategien unterscheiden sich aufgrund der variablen Längen der gewünschten DNA Fragmente und der unterschiedlichen Primerauswahl an den verwendeten „Annealing-Temperaturen“ und den „Extensions-Zeiten“.

Der unten beschriebene Reaktionsansatz ist standardisiert. Nur bei der Nested PCR und der PCR-Sequenzierung wurden gesonderte Primerkonzentrationen bzw. spezielle dNTPs, wie angegeben, verwandt. Die empirisch gewonnenen Zeiten und Temperaturen sind dem tabellarisch aufgeführtem Protokoll zu entnehmen.

Die PCR wurde in einem Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer (Cetus2400) durchgeführt. Die Taq Polymerase samt Puffer wurde ebenfalls von Perkin Elmer bezogen (Perkin Elmer GeneAmp PCR Reagent Kit).

Für die PCR wurden die Puffer- und Primerlösungen stets separat aliquotiert, um eine Kontamination mit einer Fremd-DNA zu vermeiden. Bei jedem PCR-Anatz wurde stets eine Nullkontrolle angesetzt, um eine eventuelle Kontamination der Reaktionsansätze aufzudecken.

<u>Material:</u>

Standard-PCR Ansatz:

10 × PCR Puffer (PE)	10 µl
Primerpaar A/B 50 µM	1+1µl
DNA	1 µl
25 mM 4 × dNTP mix (PE)	0,8 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl (PE)	0,5 µl
Aqua dest.	ad 100,0 µl

4.5.2 PCR-Amplifikation aus genomischer DNA

Die im folgendem aufgelistete Prozedur beschreibt die Standard PCR zur Amplifikation des V2R-Gens oder des AQP2-Gens aus genomischer Patienten-DNA. Die daraus entstandenen PCR Produkte wurden entweder zur Klonierung oder als Matrizen für eine weitere Sequenzierungsreaktion verwand.

Methode:

Der Ansatz erfolgt generell auf Eis, um einen vorzeitigen Start der Reaktion zu minimieren. Zunächst werden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß, je nach Anzahl der Ansätze, der Puffer, die Nukleotide (dNTP), die Taq-Polymerase und das erforderliche Volumen Wasser gemischt. Die Sense- und Antisense-Primer und die genomische DNA werden direkt in das jeweilige Reaktionsgefäßes gegeben. Sie werden mit 97 µl des Ansatzes gemischt und die Reaktion mit dem ersten Denaturierungschritt nach folgendem Protokoll gestartet.
Die Annealing Temperatur wurde in diesem Schritt möglichst hoch gewählt, um eine weitestgehende Produktspezifität zu erhalten.

PCR- Protokoll für die Amplifikation genomischer DNA:

Arbeitsschritte	**Temperatur**	**Zeit**
1 × Denaturierung	95 ℃	300 s
30 × Denaturierung	95 ℃	60 s
Annealing	63 ℃	40 s
Extension	72 ℃	90 s
1 × final Extension	72 ℃	240 s
Stop	4 ℃	Þ

Nach der Beendigung der PCR werden zur Erfolgskontrolle 10 µl des Probenansatzes für ein Agarosegellauf verwandt. Die Größe der Fragmente und somit die Spezifität des Produktes kann damit abgeschätzt werden. Weiterhin ist ein Endonukleaseverdau dieser Produkte möglich.
Die Replikation durch die Taq-Polymerase ist aufgrund einer fehlenden Exonuclease Aktivität mit Fehlern behaftet. In vitro hat sie eine Fehlerrate, die bei ca. einem

Basenpaar pro 10.000 Basenpaaren liegt. Die mit dem Taq-Cloning erzeugten Vektoren weisen mit einer gewissen Häufigkeit Mutationen auf, die artifiziell durch die Polymerase geschaffen worden sind. Aus diesem Grund muß jedes Klonierungprodukt in einem Zweitansatz kontrolliert werden.
Die Replikation des Einzelstrange erfolgt immer von dem 5´- zu dem 3´-Ende. Am 3´-Ende fügt die Taq-Polymerase stets ein überhängendes Adenosin dem neu sythetisiertem DNA Strang an. Diese besondere Eigenschaft macht man sich für die Klonierung, wie unten beschrieben, zu Nutze.

4.5.3 Nested-PCR

Bei der Nested-PCR werden die Produkte aus der genomischen Amplifikation als Matrize verwendet. Aus diesem Grund müssen für diese Zweitamplifikation innen liegende Primerpaare verwendet werden. Das Ergebnis diese PCR ist zum einen eine sehr hohe Ausbeute identischer DNA-Fragmente, welche nun der manuellen oder automatische Sequenzierung zugeführt werden. Zum anderen kann auf diese Weise DNA amplifiziert werden, die in der genomischen PCR nur eine schwache oder keine Bande im Agarosegellauf erbrachte.

Methode:
Die aus der genomischen PCR erhaltenen DNA Fragmente werden mittels der Isopropanolfällung von den zuvor verwandten Primern gereinigt. Da die Matrize im Überschuß vorliegt, kann die Annealing Temperatur erniedrigt und die Extensions Zeit bei kleineren Produkten verkürzt werden.

PCR- Protokoll für die Nested-PCR:

Arbeitsschritte	**Temperatur**	**Zeit**
1 × Denaturierung	95 ℃	300 s
30 × Denaturierung	95 ℃	60 s
Annealing	60 ℃	40 s
Extension	72 ℃	60 s
1 × final Extension	72 ℃	240 s
Stop	4 ℃	Þ

4.5.4 Asymmetrische PCR

Die asymmetrische PCR ermöglicht die Amplifikation von Einzelstrang DNA. Dazu dient das zuvor in der Nested-PCR hergestellte DNA Fragment als Matrize. Der Mangelprimer wird aus dem vorherigen Ansatz zusammen mit dem DNA Fragment übernommen, lediglich der Überschußprimer wird in gewohnter Weise hinzugesetzt. Es ergibt somit einer annähernde Ratio von 1:100 zwischen Mangel- und Überschußprimer.

Wird die asymmetrischen PCR gestartet, wird allmählich der Mangelprimer verbraucht, so dass in den restlichen Zyklen, einer linearen Funktion folgend, Einzelstränge synthetisiert werden. Die so hergestellte Einzelstrang DNA ergibt in der Direktsequenzierung von PCR Produkten die besten Ergebnisse, da weder Überschußprimer noch eine fremde DNA Matrize die Reaktion stören können. Der Mangelprimer dient in der folgenden Sequenzierung als Sequenzprimer.

Ansatz:

10 × PCR Puffer (PE)	10 µl
Überschußprimer 50 µM	2 µl
DNA aus Nested-PCR mit Mangelprimer	1 µl
25 mM 4dNTP mix (PE)	0,8 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl (PE)	0,5 µl
Aqua dest.	86,7 µl
	Σ 100,0 µl

PCR- Protokoll für die asymmetrische PCR:

Arbeitsschritte	**Temperatur**	**Zeit**
1 × Denaturierung	95 ℃	300 s
35 × Denaturierung	95 ℃	10 s
Annealing	54 ℃	20 s
Extension	72 ℃	60 s
1 × final Extension	72 ℃	240 s
Stop	4 ℃	Þ

4.5.5 Taq. PCR

Für den PCR Ansatz der automatischen Sequenzierreaktion wird einzelsträngige DNA aus der asymetrischen PCR als Matrize verwandt. Als Sequenzprimer dient der Mangelprimer der vorangegangenen, asymmetrischen Reaktion. Ein zweiter Primer fehlt in diesem Ansatz. Die Amplifikation folgt in diesem Ansatz einer linearen Funktion, die Termination der PCR Fragmente ist willkürlich. Durch den Einsatz vierer chromogener ddNTP´s kann die Sequenzierungsreaktion in nur einem Gefäß nach unten beschriebenem Protokoll stattfinden.
Die wässerige Lösung wird vorsichtig abpippetiert, über eine Chloroformextraktion gereinigt und durch eine ethanolische Fällung präzipitiert. Das getrocknete DNA-Pellet wird für den endgültigen Gellauf in 4 µl Laufpuffer aufgenommen.

Material:

Taq Polymerase + Puffer 10 ×	2 µl
Terminator Premix	2 µl
Sequenzierungsprimer (10 µM)	1 µl
ssDNA	2 µl
Aqua dest.	ad 20 µl

ÖL zum Überschichten der Probe

PCR- Protokoll für die Taq-Cycling PCR:

Arbeitsschritte	**Temperatur**	**Zeit**
1 × Denaturierung	95 ℃	120 s
25 × Denaturierung	95 ℃	10 s
Annealing	54 ℃	20 s
Extension	72 ℃	60 s
1 × final Extension	72 ℃	240 s
Stop	4 ℃	Þ

4.6 Klonierung

Die Klonierung ist eine Strategie, DNA-Fragmente in einem Vektor zu integrieren. Anschließend werden diese Vektoren in Wirtszellen eingebracht, um das klonierte Gen für die Sequenzierungsreaktion zu amplifizieren und für die Expression bereit zu stellen. In dieser Arbeit wurden das wildtypischen V2R-Gene betroffener Patienten zur weitergehenden Vervielfältigung und Sequenzierung mittels der TA-Klonierung in das Plasmid PCR-II (Invitrogen) eingebracht.

4.6.1 Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden

Das Plasmid wird zunächst durch einen Restriktionsverdau linearisiert. Das PCR-II Plasmid besitzt für das Restriktionsenzym *EcoR1* eine Erkennungssequenz im Bereich des LacZ-Gens. Durch den Verdau erhält das lineare Plasmid einen 5´-Thymidin Überhang.

Material:

Puffer	1:10
Plasmid DNA	50 ng
Restriktionsenzym	20 U
Aqua dest.	ad 100 µl

Methode:

Puffer, DNA, Enzym und Aqua werden in obiger Dosierung in einem Reaktionsgefäß angesetzt und für 2 Stunden bei 37 ℃ inkubiert. In einer Phenolextraktion werden die linearen Plasmide aufgereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt.

4.6.2 Dephosphorylierung von 5´-Enden

Die Phosphatase bewirkt eine Hydrolyse der Phosphatgruppe am 5´-Ende von Nukleinsäuren. Dieser Vorgang der Dephosphorylierung macht man sich im Rahmen der Klonierung zu Nutze. Werden linearisierte Vektoren mit der Phosphatase vorbehandelt, können sie keine Selbstligation mehr eingehen, wodurch sich die Klonierung mit Fremd-DNA wesentlich effizienter gestaltet. In diesen Versuchen wurde die CIP (**c**alf **i**ntestinal **p**hosphatasis), eine von Kälbern gewonne Phosphatase verwandt.

Material:

Plasmid DNA	20 µg
CIP	1 U
10 × CIP-Puffer (0,5 M Tris/HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA)	20 µl
Aqa dest.	ad 200 µl

Methode:

Das linearisierte Plasmid wird mit der Phosphatse in dem oben angegebenen Verhältnis für 60 min bei 37 ℃ inkubiert. Ein Erhi tzung für weitere 10 min. bei 75 ℃ läßt die Phophatase denaturieren. Die so vorbehandelten Vectoren werden über die Phenolextraktion aufgereinigt und stehen der Ligation zur Verfügung.

4.6.3 Ligasereaktion

Die Ligasereaktion ist der grundlegende Schritt bei der Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle. In ihr können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kompatible Enden doppelsträngiger DNA Fragmente miteinander verknüpft werden. Bei TA-Klonierung von PCR Fragmenten macht man sich die Eigenschaft der Taq-Polymerase zunutze, an den 3´-Enden ein zusätzliches Desoxyadenosin anzufügen. Das zuvor linearisierte Plasmid trägt ein komplementäres Thymidin am 5´-Ende.

Material:

linerarisierter Vektor und Insert (im molaren Verhältnis von 1:5)	90 µl
10 × Ligasepuffer	10 µl
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl

Methode :

Die Ligasereaktion erfolgt bei 4 °C im Wasserbad über 12 bis 16 Stunden. Als Nullkontrolle wird ein Ansatz ohne Insert gewählt.

4.6.4 Herstellung kompetenter Zellen mit Calciumchlorid

Eine Vorbehandlung der E.Coli-Zellen mit Calciumchlorid bewirkt eine effiziente Aufnahme der Plasmid-DNA in dem weiter unten beschriebenen Transfektionsschritt.

Material:

$CaCl^2$	100 %
Glyzerin	100 %
LB-Medium	

Methode:

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer Kultur des betreffenden E. coli Stammes beimpft und bei 37 °C bebrütet. Hat die Zellkultur eine optische Dichte von 0.8 (Wellenlänge 600 nm) erreicht, wird das Medium abzentrifugiert (7.000 xg, 4 °C, 10 min), das Pellet in 10 ml eiskaltem $CaCl_2$ resuspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden erneut pelletiert und in 2 ml eiskaltem $CaCl_2$ aufgenommen. Die Zellen können direkt zur Transformation eingesetzt werden. Gibt man der Lösung 1 ml Glyzerin 100 % hinzu, können die Zellen als Aliquots von 200 µl für ein Jahr bei -80 °C lagern.

4.6.5 Transfektion von E.Coli

In dem Transfektionsschritt werden rekombinante Plasmide nach folgendem Protokoll in die Wirtszelle, den E.Coli Zellen, eingeschleust.

Material:

LB-Medium

ß-Mercaptoethanol 0,5 M

Methode:

200 µl auf Eis vorsichtig aufgetaute kompetente Zellen werden mit 2 µl ß-Mercaptoethanol 0,5 M und 1 µg Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis belassen. Der Ansatz wird anschließend für 3 min in einem Wasserbad auf 42 ℃ erhitzt. Nach diesem Hitzeschritt fügt man 1 ml LB-Medium hinzu und inkubiert für 1 h bei 37 ℃.

Ampicillin selektive Agarplatten werden mit 100 µl des Ansatzes beimpft und über Nacht bei 37 ℃ bebrütet. Rekombinante Klone erlangen mit Hilfe des eingeschleusten Plasmides eine Ampicillin-Resistenz und können auf Selektivmedien Kolonien bilden. Eine weitere, visuelle Selektierung ist aufgrund des im Plasmid vorhandenen LacZ Gens möglich. LacZ katalysiert die Umsetzung des X-Gal in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo. Klone, in denen das klonierte Fremdgen enthalten ist, fehlt diese Eigenschaft, da das Fremdgen über die Schnittstelle in die Sequenz des LacZ-Gens inseriert worden ist. Demnach tragen weiße Clone das klonierte Fremdgen in sich, blaue Clone enthalten Plasmide mit einem selbstligierten Plasmid.

5 Ergebnisse

5.1 Mutationen des Vasopressin-2-Rezeptorgens

Nach der Isolierung der DNA aus Vollblut wurden in einer ersten, genomischen PCR das vollständige V2R-Gen des Indexpatienten amplifiziert und mittels TA-Klonierung in den pCRII-Vector eingebracht. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass alle kodierenden Genabschnitte inclusive TATA-Box umfasst wurden. Die Sequenzanalyse geschah mittels manueller oder automatischer Sequenzierung nach oben genannter Methode. Das Material der Familienmitglieder wurde über drei PCR-Schritte, einer genomischen, einer nested-PCR und einer asymmetrischen PCR, für die Sequenzierung vorbereitet. Jede Variation der Basenabfolge wurde in einem zweiten, unabhängigen Testansatz bestätigt oder widerlegt.

Die Nomenklatur der Mutationen auf DNA- und Proteinebene sind nach dem jeweiligen Genbankeintrag gewählt (V2R: GenBank Accession Number Z11687, AQP2: GenBank Accession Number AF147092).

5.1.1 Familien 1 und 2

Die Familie 1 hat zwei Indexpatienten. Bei dem älteren Bruder wurde das Vorliegen eines Diabetes insipidus erstmalig im Alter von 11 Monaten aufgrund seines Trinkverhaltens und einer auffällig raschen Ausbildung einer hypernatriämischen Dehydratation bei Flüssigkeitsentzug vermutet. Der jüngere Bruder habe eine ähnliche Symptomatik gezeigt. Der männliche Patient der Familie 2 wurde bereits in der frühen Neugeborenenperiode mit rezidivierenden Fieberschüben unklarer Genese wiederholt in einer Kinderklinik vorgestellt. Die Vermutung eines Diabetes insipidus wurde mit ca. sechs Monaten im Rahmen einer Rotavirus Enteritis geäußert.

Allen drei Patienten ist ein pathologischer Durstversuch und ein nicht Ansprechen auf die Desmopressingabe gemein. Die Mutter der Familie 2 berichtete über eine auffällige Nykturie während der Schwangerschaft, ein Dursttest hatte bei ihr nur ein partielles Ansprechen gezeigt (max. U_{osm} 540 mosmol/l).

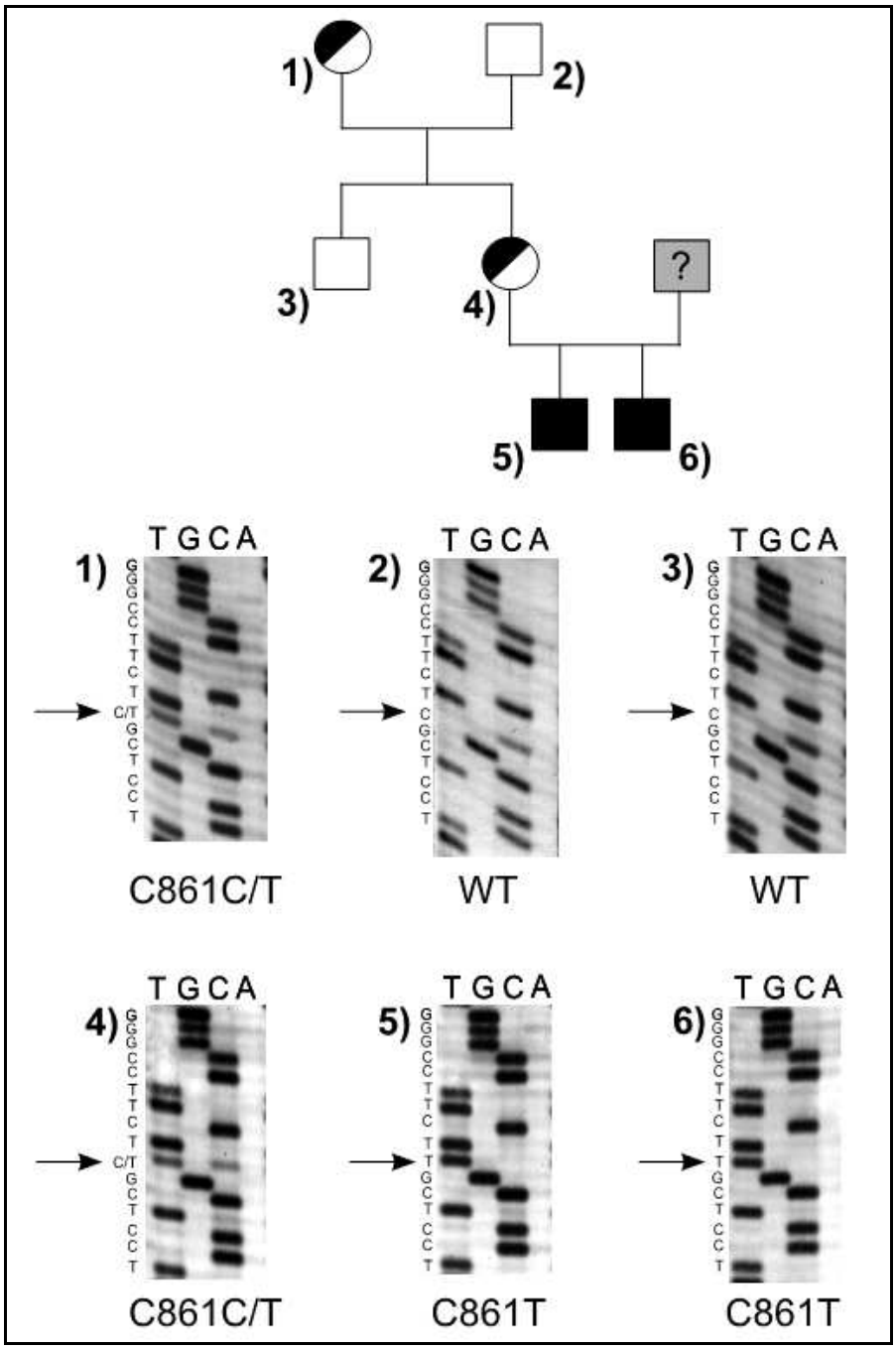

Abbildung 8: Familie 1, Autoradiographie, Auftrag der gelabelten Basen in der Reihenfolge T-G-C-A (Thymin-Guanin-Cytosin-Adenin), Identifizierung der C861T Mutation des V2R-Gens mittels manueller Sequenzierung asymmetrischer PCR Produkte (1-4) und clonierter DNA (5,6), Position 861 mit Pfeil markiert (→), Doppelsignal C/T in 1) und 4), Großmutter und Mutter somit heterozygot, wildtypische Sequenz in den Proben des Onkel und Großvater 2) und 3), Basenaustuasch kodiert für eine Missensmutation S167L, oben Stammbaum der Familie mit Trägerstatus (◐ = heterozygoter Merkmalsträger, ■ = homozygoter Merkmalsträger, □ = WT) (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)

Die manuelle Sequenzierung erbrachte für die betroffenen Geschwister der Familie 1 einen Basenaustausch eines Cytosin 861 zu einem Thymin (C861T). Dieser Basenaustausch konnte über drei Generationen verfolgt werden. Bei der Mutter und Großmutter des Patiente konnte der Trägerstatus für die Mutation nachgewiesen werden (Abb. 8). Der klinisch unbeeinträchtigte Großvater sowie ein Onkel mütterlicherseits zeigten erwartungsgemäß eine wildtypische Sequenz. Für die Familie 2 stand uns nur Probematerial des Patienten zur Verfügung. In der automatischen Sequenzierung fand sich gleichermaßen der Basenaustausch C861T (Abb. 9). Dieser Basenaustausch führt zu einer Veränderung der AS-Sequenz an Position 167, wobei das wildtypisch vorkommende Serin durch ein Leucin im Bereich des vierten transmembranären Abschnittes ersetzt wird (S167L).

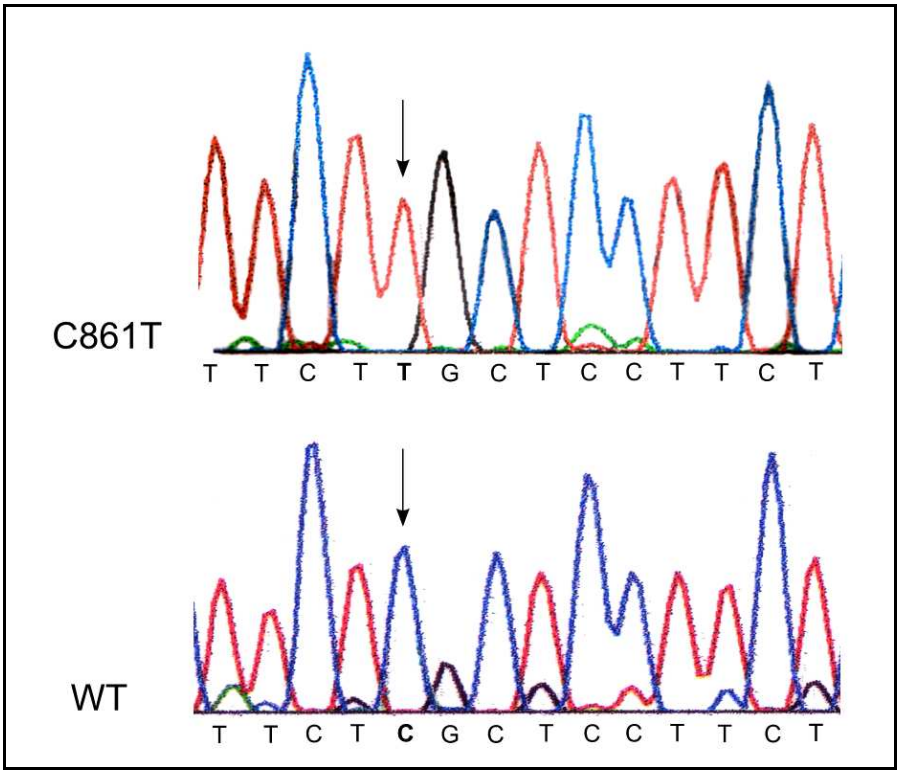

Abbildung 9: Familie 2, Chromatogramm, Kodierung der Basen: grün-Adenin, blau-Cytosin, rot-Thymin, schwarz-Guanin; Identifizierung der C861T Mutation des V2R-Gens mittels automatischer Sequenzierung; oberes Gel Darstellung des Basenaustausches C-T an der Position 861 (↓), unteres Gel Darstellung des Wildtypes (andere Familie), Basenaustausch kodierend für eine Missensmutation S167L, (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)

5.1.2 Familie 3

Der Patient der dritten Familie wurde im Alter von 4½ Jahren aufgrund eines Kleinwuchses in der Kinderklinik vorgestellt. Bis auf eine moderate hypertone Dehydratationsphase in der Neugeborenenperiode kam es zu keinen ernsthaften Zwischenfällen. Auffällig waren zu diesem Zeitpunkt eine Tagestrinkmenge von drei bis vier Litern und ein wiederholt pathologischer Schweißtest. Eine beständige Hypernatriämie, ein pathologischer Durstversuch sowie ein nicht Ansprechen auf Desmopressin lenkten den Verdacht schließlich auf einen nephrogenen Diabetes insipidus. Proben weiterer Familienmitglieder lagen uns nicht vor.

Die automatische Sequenzierung des V2R-Gens konnte den Basenaustausch eines Cytosin 902 in ein Thymin (C902T) nachweisen (Abb. 10). Auf der Proteinebene kodiert dieser Basenaustausch eine Missensmutation mit dem Aminosäurenaustausch eines Arginin 181 in ein Cystein im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife (R181C).

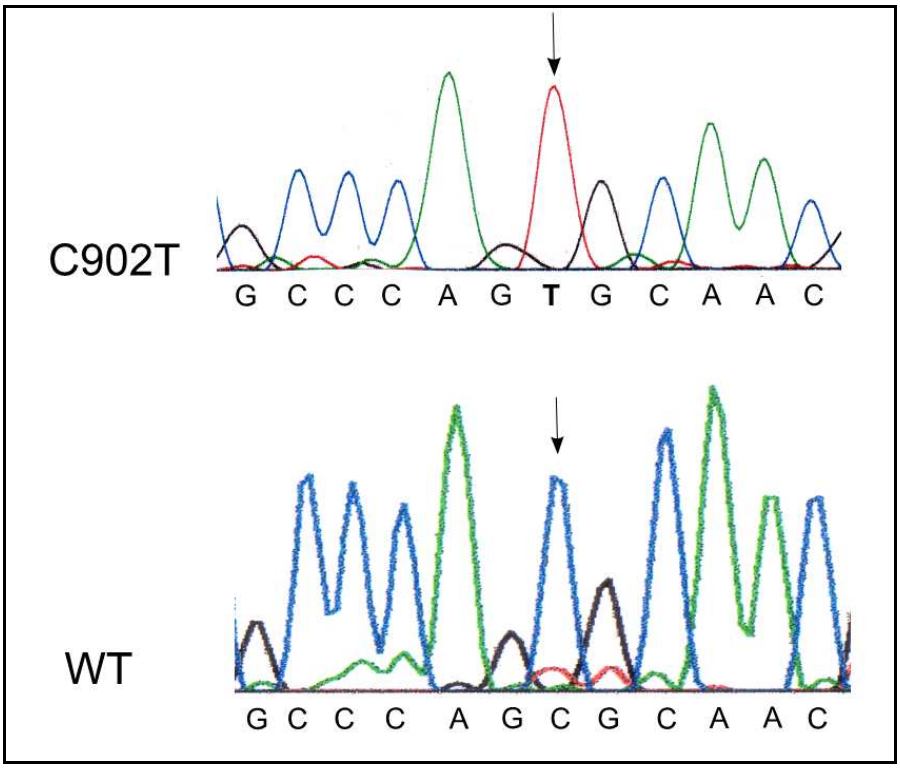

Abbildung 10: Familie 3, Chromatogramm, Kodierung der Basen: grün-Adenin, blau-Cytosin, rot-Thymin, schwarz-Guanin; Identifizierung der C902T Mutation des V2R-Gens mittels automatischer Sequenzierung, oberer Gellauf Darstellung des Basenaustausches C-T an der Position 902 (↓), unteres Gel Darstellung des Wildtypes (andere Familie), Basenaustausch kodierend für eine Missensmutation R181C, (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)

5.1.3 Familie 4

In der vierten Familie wurde bei zwei Brüdern die klinische Diagnose eines renalen Diabetes insipidus gestellt. Der jüngere Bruder habe bereits in einem Alter von fünf Wochen einen auffälligen Phänotyp gezeigt. Der Durstversuch sowie der Vasopressinbelastungstest waren bei dem älteren Patienten pathologisch. Weitere klinische Angaben liegen nicht vor.

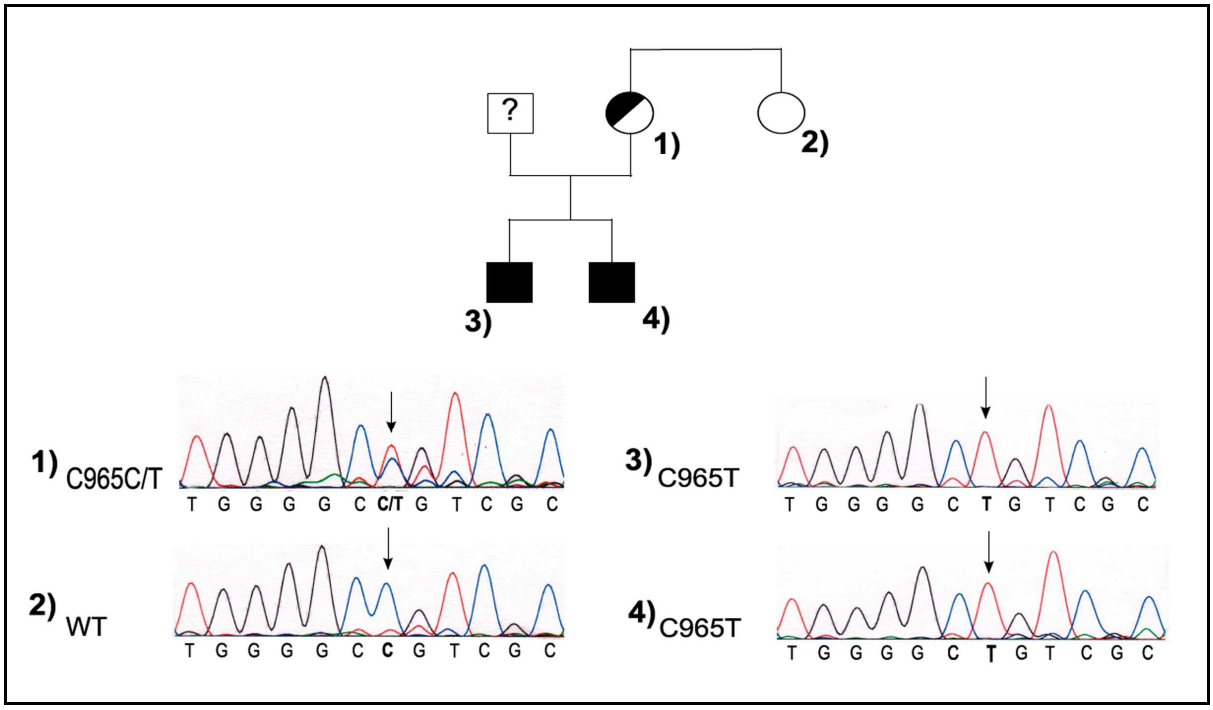

Abbildung 11: Familie 4, Chromatogramm, Kodierung der Basen: grün-Adenin, blau-Cytosin, rot-Thymin, schwarz-Guanin; Identifizierung der C965T Mutation des V2R-Gens mittels automatischer Sequenzierung, Darstellung des Basenaustausches C-T an der Position 965 (↓), Patienten 3) und 4) mit homozygotem Austausch, Mutter der Patienten 1) mit heterozygotem Signal, Tante der Patienten 2) mit homozygot wildtypischem Signal, Basenaustausch kodierend für eine Missensmutation R202C, oben Stammbaum der Familie mit Trägerstatus (◐ = heterozygoter Merkmalsträger, ■ = homozygoter Merkmalsträger, □ = WT), (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)

Die automatische Sequenzierung konnte den Basenaustausch eines Cytosin in ein Thymin an der Position 965 nachweisen (C965T). Beide Brüder zeigen ein homozygotes Signal, die Mutter ist Konduktorin für die Mutation, eine Tante zeigt das homozygot wildtypische Allel. Dieser Basenaustausch führt zu einer Missensemutation mit dem Austausch eines Arginin 202 in ein Cystein (R202C) in dem Bereich der zweiten extrazellulären Schleife (Abb. 11).

5.1.4 Familie 5

Der Patient der fünften Familie fiel bereits im ersten Lebensjahr mit mehrfachen, hypernatriämischen Krisen auf. Die Tagestrinkmenge liegt im Alter von neun Jahren bei 7 Litern. Ein Durstversuch sowie die Vasopressinbelastung waren pathologisch. Ein fehlender Anstieg der von Willebrand Faktoren nach Vasopressingabe erhärtete den Verdacht auf das Vorliegen eines X-chromosomalen Diabetes insipidus.

In der automatischenSequenzierung des V2R-Gens ließ sich eine In-frame-Deletion des Tripletts 1196-1198 (1996-1998delGTC) nachweisen (Abb. 12), welche den Wegfall eines Valin 279 auf Proteinebene bedingt (ΔV279). Der Patient zeigt das komplette Fehlen eines GTC-Triplett, die mütterlicher Sequenz weist ab dem Nucleotid 1196 ein heterozygotes Signal auf. Sie ist Überträgerin der Mutante.

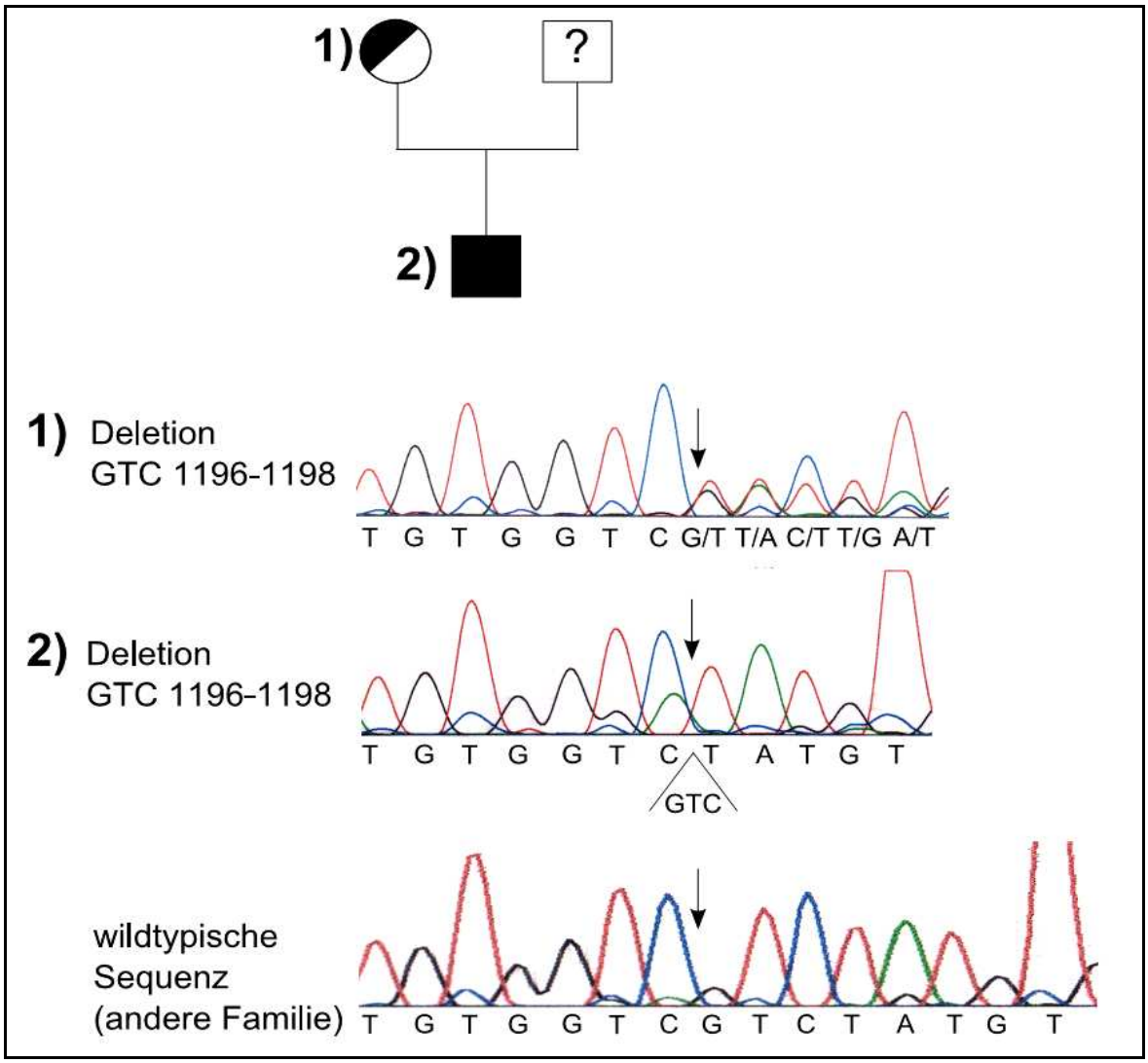

Abbildung 12: Familie 5, Chromatogramm, Kodierung der Basen: grün-Adenin, blau-Cytosin, rot-Thymin, schwarz-Guanin; Identifizierung einer Deletion 1196-1198delGTC des V2R-Gens mittels automatischer Sequenzierung, Darstellung der Deletion GTC ab der Position 1196 (↓), in der Sequenzreaktion der Mutter 1) heterozygotes Doppelsignal ab bp 1196, der Patient 2) zeigt eine Deletion des Triplett GTC, unteres Gel mit der wildtypischen Sequenz zum Vergleich, In-frame-deletion kodierend für eine Deletionsmutation ΔV279, oben Stammbaum der Familie mit Trägerstatus (◐ = heterozygoter Merkmalsträger, ■ = homozygoter Merkmalsträger), (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)

5.1.5 Familie 6

Für den Indexpatienten der sechsten Familie bestand der begründete Verdacht eines nephrogenen Diabetes insipidus. Weitergehende klinische Angaben wurden leider nicht mitgeteilt. In Sequenzierung für den Indexpatienten konnte der Basenaustausch eines Adenin anstelle eines Guanin an der Position 1212 (G1212A) nachgewiesen werden (Abb. 13).

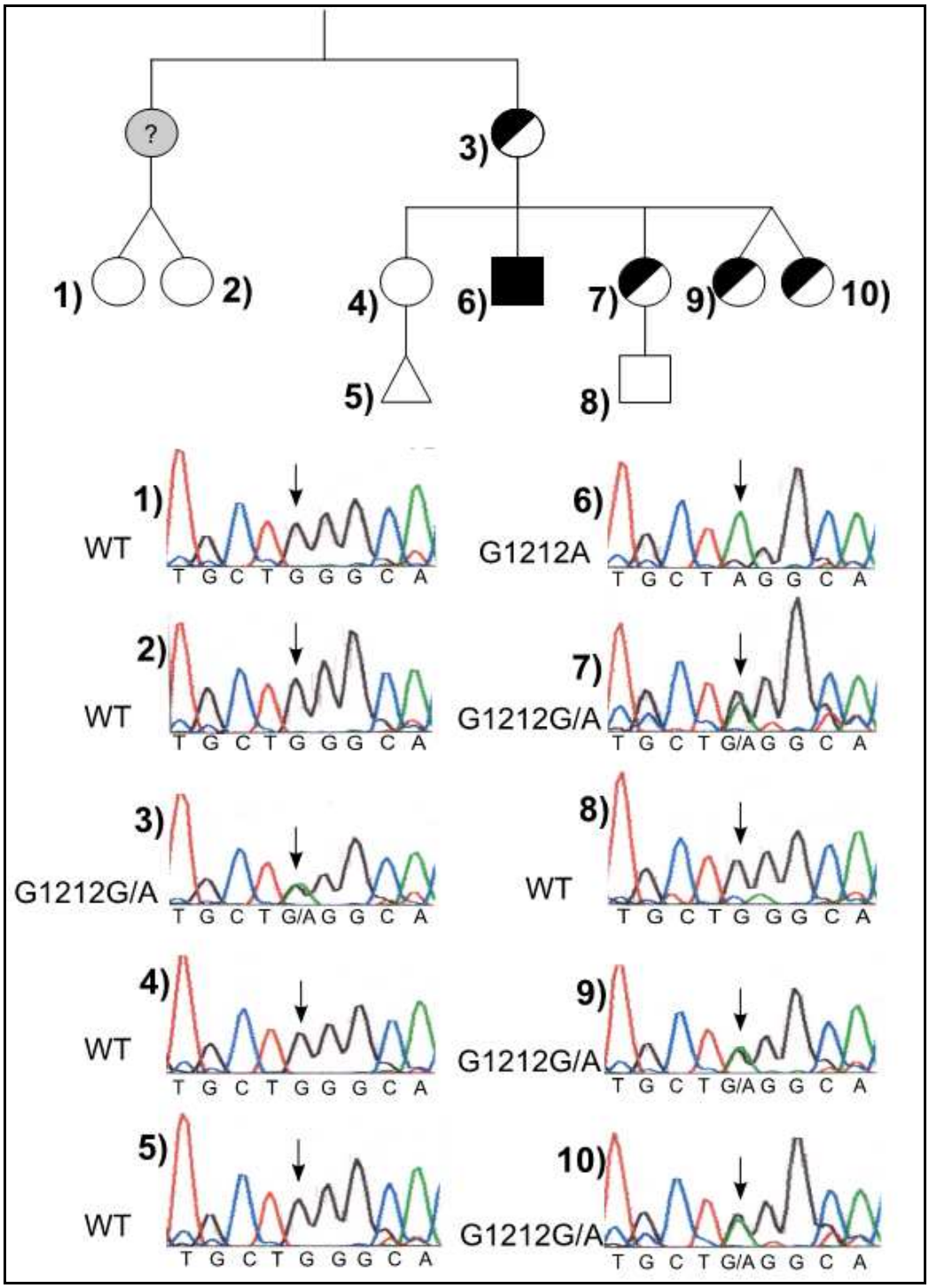

Abbildung 13: Familie 6, Chromatogramm, Kodierung der Basen: grün-Adenin, blau-Cytosin, rot-Thymin, schwarz-Guanin; Identifizierung der Missensemutation G1212A mittels automatischer Sequenzierung, Darstellung des Basenaustausches G–A an Position 1212 (↓), Patient 6) mit Basenaustausch, wildtypische Sequenz für die Cousinen 1) und 2), der Schwester 4), dem Neffen 8), und für eine Fruchtwasseruntersuchung Probe 5), heterozygotes Signal Mutter 3) und Schwestern 7), 9) und 10), Basenaustausch G1212A kodiert für eine Nonsensmutation W284X, oben Stammbaum der Familie mit Trägerstatus, (◐ = heterozygoter Merkmalsträger, ■ = homozygoter Merkmalsträger, □ = WT), (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)

Der Patient zeigt ein homzygotes Signal, drei Schwestern und die Mutter sind Konduktorinnen. Dieser Basenaustausch führt aufgrund des vorzeitigen Einfügens eines Stoppcodons zu einer frühzeitigen Termination der Proteinbiosynthese (ab Codon 284). Der mutante Rezeptor weist eine um den C-Terminus und der siebten Transmembrandomäne verkürzte Peptidsequenz auf.

5.1.6 Familie 7

Aufgrund eines perzentilenflüchtigen Wachstumsverhalten wurde bei dem jüngeren Bruder in dem Alter von 12 Monaten ein Schweißtest durchgeführt, der pathologisch ausfiel. Bei erhöhten Serum-Natriumwerten wurde ein Durstversuch mit einem maximalen Anstieg der Urinosmolalität auf lediglich 193 mosmol/kg durchgeführt, keine Änderung nach Vasopressingabe. Der älterer Bruder zeigte ähnliche Werte. Beide Patienten haben eine gesteigerte Trinkmenge und eine Poly- und Nykturie. Erwähnenswert ist die Tagestrinkmenge der Mutter von 5 bis 6 Litern pro Tag und eine Nykturie. Die Tochter sei klinisch unauffällig, zeigte jedoch in einem Durstversuch über 12 Stunden einen maximalen Anstieg der Urinosmolalität auf lediglich 180 mosmol/kg.

In der Sequenzanalyse konnte eine In-frame-Insertion eines CAG-Triplett an der Position 1236-1238 des V2R-Gens bei beiden Brüdern nachgewiesen werden (1236-1238InsCAG). Mutter und Tochter sind Konduktorin. Diese Mutation respektiert das Leseraster und kodiert für ein zusätzliches Glutamin 292 (insQ292) in dem Bereich der sechsten Transmembrandomäne (Abb. 14).

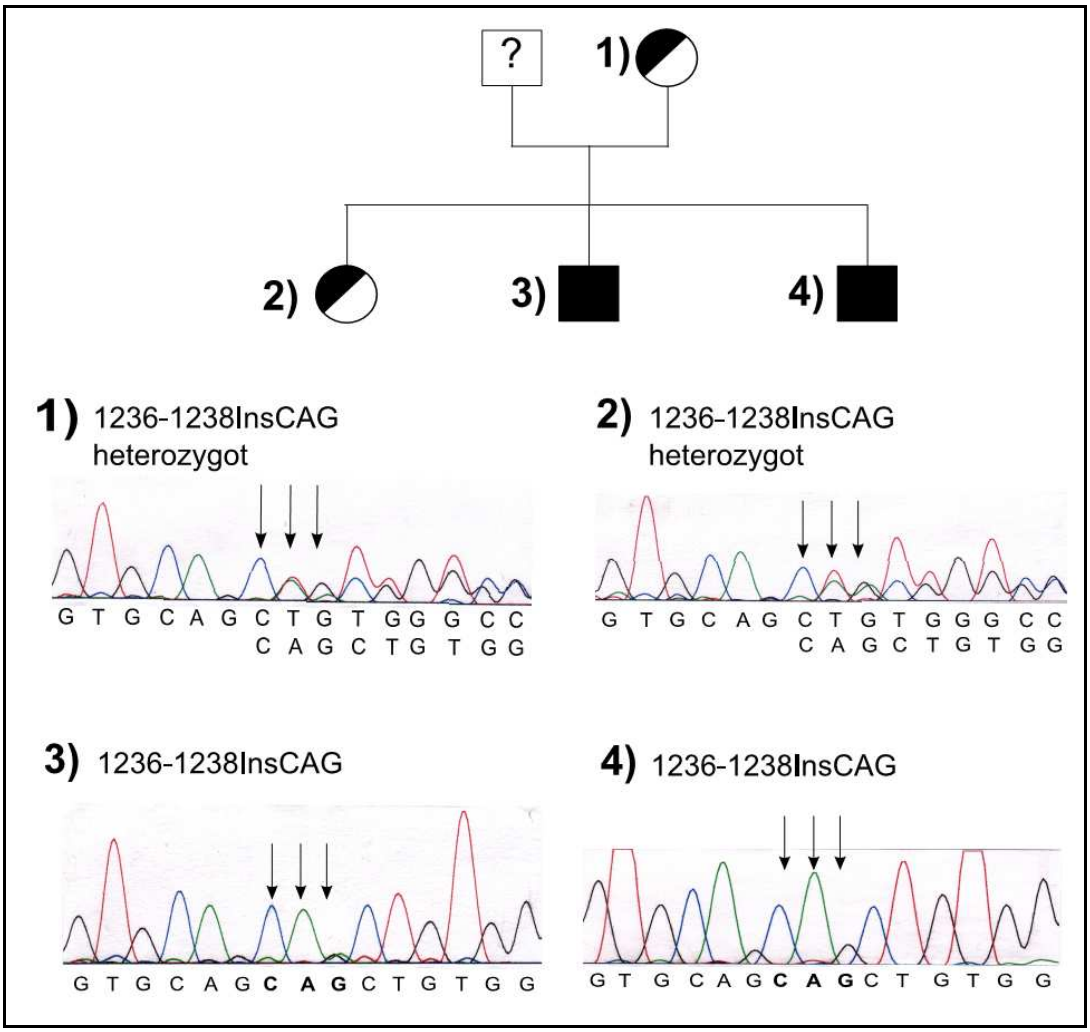

Abbildung 14: Familie 7, Chromatogramm einer Sequenzreaktion, Kodierung der Basen: grün-Adenin, blau-Cytosin, rot-Thymin, schwarz-Guanin; Identifizierung der Insertion 1236-1238InsCAG mittels automatischer Sequenzierung, Darstellung der Insertion CAG an der Position 1236-1238 (↓↓↓), Mutter 1) und Tochter 2) sind heterozygot, Doppelsignal ab der Position 1237, die beiden betroffenen Brüder 3) und 4) zeigen ein homozygotes Signal für die Insertion, die Insertion kodiert für die Insertionsmutante insQ292, oben Stammbaum der Familie mit Trägerstatus (◐ = heterozygoter Merkmal sträger, ■ = homozygoter Merkmalsträger), (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: Z11687)

5.1.7 Familie 8

Der betroffene, männliche Patient der Familie 8 zeigte bereits ab der sechsten Lebenswoche ein gravierendes Krankheitsbild mit rezidivierenden Fieberschüben unklarer Genese, Erbrechen und Dehydratationen. Ein Durstversuch musste vorzeitig abgebrochen werden. Die Bestimmung des Vasopressinspiegels erbrachte mit 32 pg/ml einen vierfach über der Norm liegenden Wert. Die Sequenzierung des V2R-Gens bewies die Deletion eines Cytosin an der Position 1001 (ΔC1001). Diese Mutation verhindert eine Erkennungssequenz für die Endonuklease *NlaIII*. Der in der Abbildung 15 abgebildete *NlaIII*-Restriktionsverdau von PCR Produkten zeigt ein

heterozygotes Signal für die Mutter. Der klinisch gesunde Bruder trägt das wildtypische Allel. Durch den Wegfall einer Base kommt es ab dem Codon 310 zu einer Leserasterverschiebung und kodiert einen komplett neuen C-Terminus ab dem siebten transmembranären Bereich. Der mutante Rezeptor hat eine putative Länge von nunmehr 434 Aminosäuren.

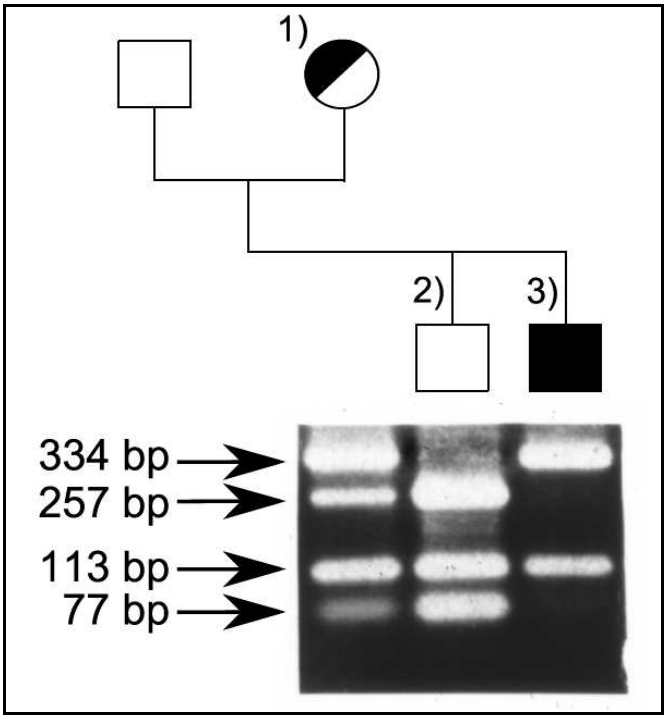

Abbildung 15: Familie 8, Identifikation der ΔC1001 Mutation des V2R-Gens mittels Restriktions-Endonukleaseverdau eines PCR Produktes, der *NlaIII* Verdau eines 447 bp PCR Produktes der Wildtyp-DNA erzeugt drei Fragmente (77, 113, 257bp) gezeigt in der Spalte 2) (gesunder Bruder), das PCR Produkt des Patienten 3) erzeugt durch den Wegfall einer *NlaIII* Schnittstelle lediglich zwei Produkte (113, 334bp), das PCR Produkt der Mutter 1) erbringt vier Fragmente (77, 113, 257, 334bp) und identifiziert sie als heterozygote Merkmalsträgerin, oben Stammbaum der Familie mit Trägerstatus, (◐ = heterozygoter Merkmalsträger, ■ = homozygoter Merkmalsträger, □ = WT)

5.2 Mutation des Aquaporin-2-Gens

5.2.1 Familie 9

Der Patient dieser türkischen Familie ist in einem Alter von vier Wochen erstmalig mit einer hypernatriämischen Dehydratation aufgefallen. Andere Familienmitglieder sind nicht betroffen. In einem Durstversuch blieb die Urinosmolalität trotz zusätzlicher Gabe von Desmopressin unter 180 mosmol/kg.

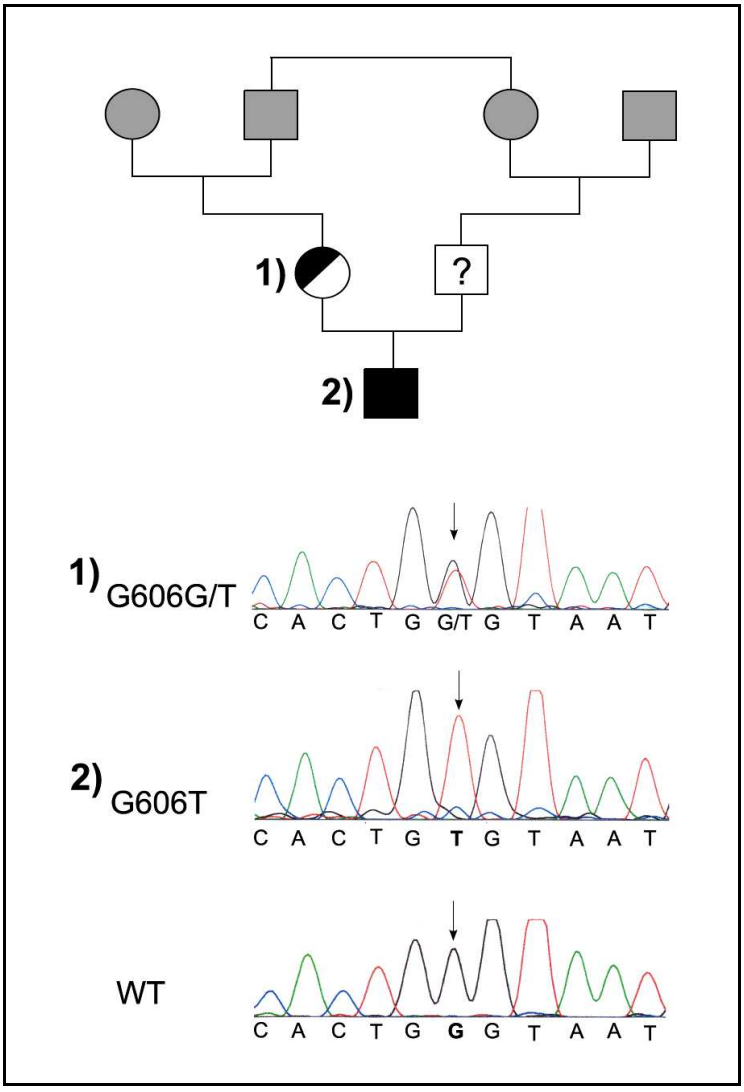

Abbildung 16: Familie 9, Chromatogramm, Kodierung der Basen: grün-Adenosin, blau-Cytosin, rot-Thymidin, schwarz-Guanin; Identifizierung der G606T Mutation im AQP2-Gen mittels automatischer Sequenzierung, Darstellung des Basenaustauches G-T an der Position 606 (↓); Gel 1) heterozygotes Signal in der Probe der Mutter, Gel 2) homozygoter Basenaustausch im Patientenmaterial, eine Probe des Vaters stand nicht zur Verfügung, unteres Gel wildtypische Sequenz einer anderen Familie, Basenaustausch kodierend für eine Missensemutation W202T, oben Stammbaum der Familie mit Trägerstatus (◐ = heterozygoter Merkmalsträger, ■ = homozygoter Merkmalsträger, □ = WT) (Kodierung gemäß GenBank Accession Number: AF147092)

Wie dem Stammbaum (Abb. 16) zu entnehmen ist, handelt es sich in dieser Familie um eine Verwandtenehe ersten Grades. Die Eltern des Jungen sind Cousin und Cousine.

Die Sequenzierung des V2R-Gens erbrachte eine wildtypische Sequenz. Die Direktsequenzierung asymmetrischer PCR Produkte des AQP2-Gen des Patienten offenbarte den homozygoten Basenaustausch eines Guanin zu einem Thymin an der Position 606 (G606T). Die Mutter zeigt ein heterozygotes Signal (Abb. 16). Eine Blutprobe des Vaters war nicht vorhanden. Eine Heterozygotie ist jedoch anzunehmen. Der Basenaustausch kodiert für einen Aminosäurenaustausch eines Tryptophan 202 durch ein Cystein (W202T) in dem sechsten transmembranären Bereich im Übergang zur dritten Extrazellularschleife.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in zehn Familien eine molekulargenetische Diagnostik zum Nachweis eines angeborenen Diabetes insipidus renalis durchgeführt. In acht Familien konnten Mutationen für das V2R-Gen (s. Abb. 17) in einer Familie eine Mutation für das AQP2-Gen (s. Abb. 19) identifiziert werden. Sechs Mutationen des V2R-Gens sind bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben worden. Zwei Mutationen des V2R-Gens und eine Mutation des AQP2-Gens werden in dieser Arbeit erstmalig beschrieben. In sieben Familien konnte die Mutation über zwei oder mehr Generationen verfolgt werden. In zwei Fällen war nur Probenmaterial des Indexpatienten vorhanden.

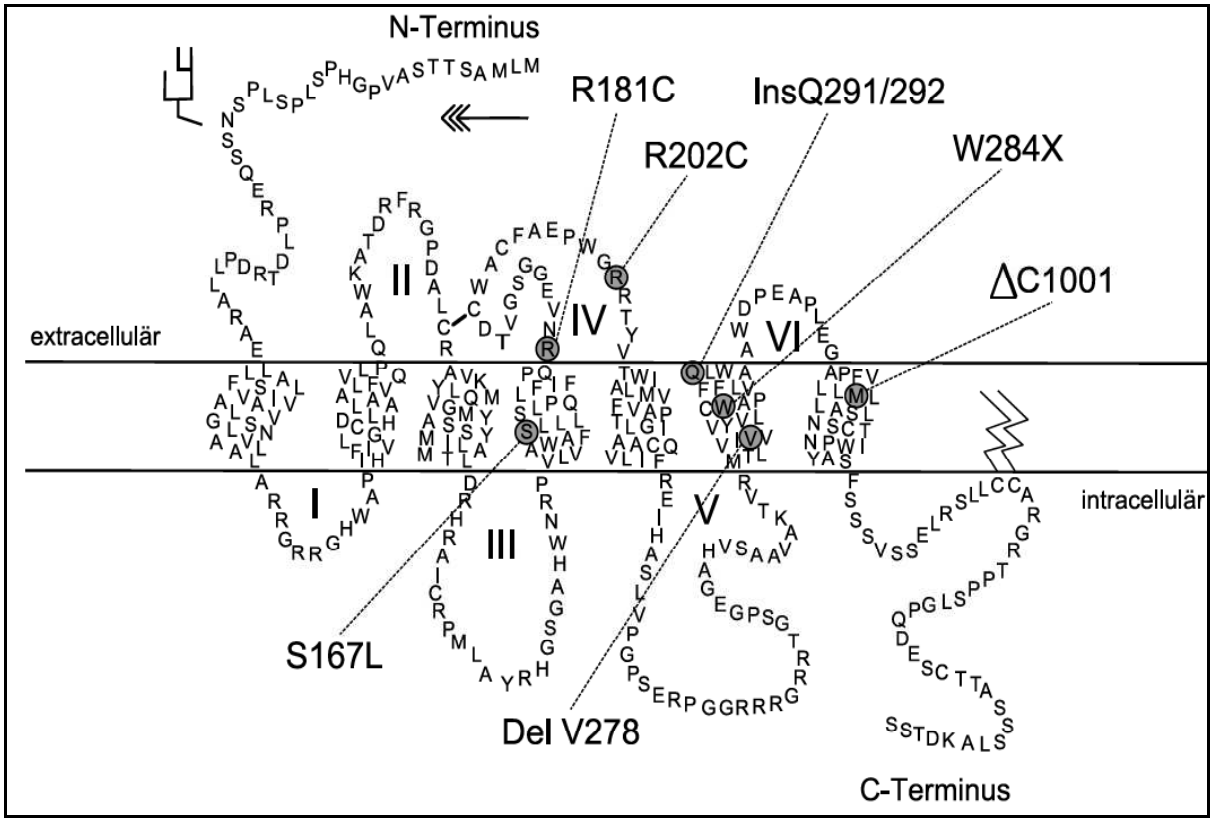

Abbildung 17: Modell des Vasopressin-2-Rezeptors mit einer Darstellung der Bereiche, an denen die Mutationen zur Veränderung der Aminosäuren-Sequenz führt. Die Aminosäuren sind im 1-Buchstaben-Kode dargestellt, die Mutationen sind grau unterlegt, die Mutation S167L ist in der IV. Transmembrandomäne (TMD), die Mutationen ΔV278, W284X und die Insertion Q291/292 sind in der VI. TMD lokalisiert, die Mutationen R181C und R202C erzeugen zusätzliche Cysteine in der zweiten extracellulären Schleife (IV) in unmittelbarer Nähe der Disulfidbrücke; die Deletion ΔC1001 liegt im Übergang der Schleife VI und der siebten TMD,

In Anlehnung an eine Klassifikation für den LDL Rezeptor können die Mutationen des Vasopressin-2-Rezeptors in drei grundsätzliche, pathophysiologische Gruppen

aufgeteilt werden (Tsukaguchi et al. 1995). Die erste Gruppe umfaßt Mutationen, die für Mutanten kodieren, die zu einem Defekt der Ligandenbindung oder der G-Protein Aktivierung führen. Die zweite Gruppe beinhaltet die Mutationen, die für V2R Mutanten mit einem Transportdefekt zur Membranoberfläche kodieren. Sie ist die zahlenmäßig bedeutenste Gruppe. In die dritte Gruppe werden diejenigen Mutationen eingeordnet, die mit einer verminderten Transkription oder Transkriptstabilität einhergehen. Die pathophysiologischen Überlegungen zu den gefundenen Mutationen sind im folgenden aufgeführt.

6.1 Missense Mutanten des Vasopressin-2-Rezeptorgens

Die V2R Mutante S167L (Familien 1# und 2#) ist bereits in sieben betroffenen, unabhängigen Familien als krankheitsauslösende Mutation beschrieben worden (Bichet et al. 1994, Wildin et al. 1998). Hier wird in dem Bereich der vierten Transmembranregion das wildtypische Serin durch Leucin ersetzt (s.a. Abbildung 17).

Die funktionelle Charakterisierung anhand einer transienten Expression in einer eukaryonten Zelllinie (Oksche et al.1996, Hermosilla et al. 2004, Robben et al. 2005) konnte nachweisen, dass das mutante Genprodukt translatiert aber bereits im Endoplasmatischen Reticulum retiniert wird. Die Prozessierung dieses Rezeptors wird schon in der Frühphase vor der Expresion an die Zelloberfläche unterbunden. Die S167L Mutante kann der Gruppe der Transportdefekte zugeordnet werden, die den überwiegenden Anteil aller bis dato charakterisierten Mutanten ausmacht. Dass die S167L Mutante in dem Patientenkollektiv gleich zweimalig nachgewiesen werden konnte, dürfte eher ein Zufall sein. Mit einer kumulativen Gesamthäufigkeit von maximal 4 % gibt es in dem Gen des V2R keine wahren Hotspot-Mutationen.

Die V2R Mutante R181C (Familie 3#) wurde in mehreren, nicht verwandten Familien beschrieben (Pan et al. 1994, Bichet et al.1994, Knoers et al. 1994). Die Missensemutation kodiert für einen Ersatz eines Arginin in ein zusätzliches Cystein in der zweiten extracellulären Schleife.

Der mutante Rezeptor konnte zwar auf der Zelloberfläche detektiert werden, die funktionelle Untersuchung in einem cAMP-Assay zeigte jedoch erst bei unphysiologisch hohen Dosen Vasopressin ein partielles Ansprechen (Wildin et al. 1998). Homolog zu der R202C Mutante, die im nächst folgenden Abschnitt

beschrieben wird, kann von einer verminderten Affinität des Vasopressin zum Rezeptor ausgegangen werden. Die zweite extrezelluläre Schleife ist eine wichtiger Bestandteil der Bindungsregion für den Agonisten Vasopressin. Schülein et al. konnten nachweisen, dass zusätzliche Cysteine im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife (R202C, Y205C) höchst wahrscheinlich eine alternative Disulfidbrücke mit dem originären Cystein 195 (C195) eingehen und damit die Affinität des Rezeptors zu dem Liganden negativ beeinflussen (Schülein et al. 2001).

Die Missensemutante R202C (Familie 4#) wurde bereits identifiziert und funktionell charakterisiert. Der mutante Rezeptor konnte zwar an der Membranoberfläche detektiert werden. Er scheint eine funktionelle Restaktivität zu besitzen und kann cAMP generieren. Die Ligandenbindung hingegen ist deutlich reduziert (van den Ouweland 1992, Wenkert 1994). Der Position 202 kommt bei der Ligandenbindung eine besondere Bedeutung zu. Mutationen die mit einem zusätzlichen Cystein der extrecellulären Schleifen gehen häufig mit einer verminderten Rezeptoraffinität zum Vasopressin einher. Grund dafür könnte, wie oben beschrieben, die Ausbildung einer zweiten Disulfidbrücke mit dem Cystein 195 sein (Schülein et al. 2000). Die Arbeitsgruppe um Cotte et al. konnte in vergleichenden Studien des humanen und porcinen V2R demonstrieren, dass speziell die Aminosäuren der Positionen 202 und 304 für die interindividuell unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Vasopressinanaloga und Antagonisten verantwortlich sind und somit eine entscheidende Rolle in der Ligandenbindung einnehmen (Cotte et al. 1998).

6.2 Nonsensmutante des Vasopressin-2-Rezeptorgens

Die Mutante W284X (Familie 6#), die zu einem vorzeitigen Abbruch der Polypeptidkette in der sechsten Transmembranregion führt, wurde bereits in mehreren, von einander unabhängigen Familie beschrieben (Bichet et al. 1994, Arthus et al. 2000). Durch das vorzeitige Stoppcodon fehlen diesem Rezeptor die siebte Transmembrandomäne und der intracelluläre C–Terminus und damit entscheidende Proteindomänen, wie z.B. die Palmitoylierungsstelle C341, C342, und ein C-terminales Glutamat-Dileuzin-Motiv (Schülein et al. 1998), die sowohl für die G-Proteinkopplung als auch für das intrazelluläre Routing zu der Zelloberfläche unerlässlich sind. Eine vorzeitige, intracelluläre Degeneration dieser Rezeptormutante ist sehr wahrscheinlich. Darüberhinaus scheinen Nonsense

Mutationen bereits auf Ebene der m-RNA Einschränkungen zu unterliegen. In einem experimentellen Ansatz von Oksche et al. mittels einer transienten Expression genomischer DNA waren die quantifizierten RNA-Mengen der Stopmutationen (Y124x, W193X, W284X, L312X) gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert, sei es durch eine verminderte Synthese oder durch eine verminderte RNA Stabilität (Oksche et al. 1997).

6.3 Insertionsmutante des Vasopressin-2-Rezeptorgens

Die Insertionsmutatante InsQ292 (Familie 7#) wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen. Das zusätzliche Glutamin liegt in der sechsten Transmembrandomäne im Übergang zu der dritten Extracellularschleife. Die funktionelle Analyse dieser Mutation (Hermosilla et al. 2004) in menschlichen Nierenzellen (HEK 293) legt eine vorzeitige Degeneration des mutanten Rezeptors nahe. Der Rezeptor passiert zwar das endoplasmatische Reticulum, wird aber in dem ERGIC (**E**ndoplasmic **R**eticulum-**G**olgi **I**ntermediate **C**ompartment) retiniert. Wie ein Großteil aller V2R Mutanten wird das mutante Protein aufgrund seines inkorrekten Faltungszustandes frühzeitig durch die Qualitätskontrolle des ER und Golgiapparates zurückgehalten. Die Funktionsweise dieses Qualitätsmanagementes liegt noch weitestgehend im Dunkeln und ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

6.4 Deletionsmutanten des Vasopressin-2-Rezeptorgens

Die Deletionsmutante ΔV279 (Familie 5#), wurde bereits mehrfach in von einander unabhängigen Familien nachgewiesen (Tsukaguchi et al. 1995). Tan et al. haben diese Mutante anhand eines eukaryonten Expressionssystem untersucht. Die Arbeitsgruppe konnte belegen, dass der mutante Rezeptor wahrscheinlich aufgrund seiner inkorrekten Faltung bereits im endoplasmatischen Retikulum retiniert wird. Darüber hinaus hat sie durch einige Kunstgriffe (Zellwachstum bei 28 ℃, Einsatz pharmakologischer Chaperone i.e. Glycerol) eine partielle Expression des vollständig gykosylierten Rezeptors an die Zelloberfläche erreichen können. Der auf diese Weise gerettete Rezeptor ließ jedoch eine cAMP-Generierung vermissen, sei es durch eine verminderte Ligandenaffinität oder einer gestörten G-Proteinkopplung. Damit ist diese Mutation ein Grenzgänger und weist sowohl einen Transportdefekt

als auch einen funktionellen Defekt hinsichtlich der Ligandenbindung und G-Proteinkopplung auf (Tan et al. 2003).

Die Deletionsmutation eines Cytosin an der Position 1001 (ΔC1001) des V2R-Gens (Familie 8#) wird im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Durch den Wegfall dieser Base kommt es ab dem Codon 310 zu einer Leserasterverschiebung, so dass ein komplett neuer C-Terminus ab dem Codon 311 (VII. Transmembranbereich) entsteht. Der mutante Rezeptor hat durch ein verspätetes Stop Codon eine putative Länge von nunmehr 434 Aminosäuren (s.a. Abb. 18). Mit dieser Deletion wird erstmalig eine Mutation beschrieben, die eine Elongation des Vasopressin-2-Rezeptors bewirkt.

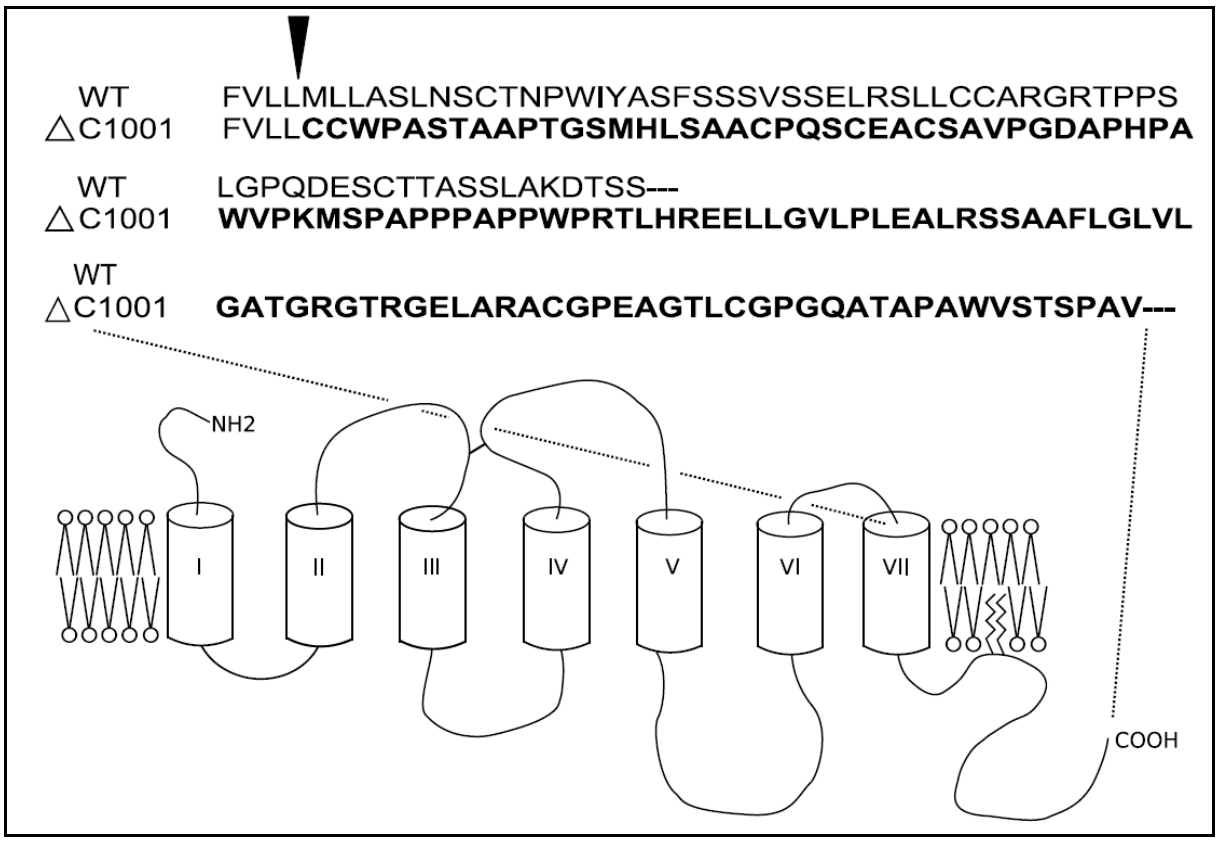

Abbildung 18: Modell des V2R mit Lokalisation der Deletion C1001 (ΔC1001); oben Darstellung der C-terminalen Aminosäurensequenz ab dem VII. transmembranären Abschnitt für den Wildtyp WT und die ΔC1001 Mutation; die Deletion bewirkt eine Leserasterverschiebung mit einem verspäteten Stop-Codon und einem putativen Rezeptor von 434 AS Länge; Start der Leserasterverschiebung ab Codon 310, veränderte Aminosäurensequenz ab Codon 311 mit einem Pfeil ▼ markiert (Abbildung in Anlehnung an Oksche, Moeller et al.).

Mit Hinsicht auf bisher beschriebenen Nonsensemutationen mit einem vorzeitigen Stopcodon und einem trunkierten Rezeptor kann davon ausgegangen werden, dass mit dem verlängerten und komplett veränderten C-Terminus wichtige, funktionelle Abschnitte wie z.B. die Palmitoylierungsstelle fehlen, die für den Transport aus dem ER und dem Golgi Apparat an die Zelloberfläche unentberlich sind. (Sadeghi et al. 1999, Oksche et al. 1998). Ein Routing zu der Zelloberfläche scheint für diese Mutante unwahrscheinlich.

6.5 Missensemutante des Aquaporin-2-Gens

Der Nachweis einer homozygoten Missensemutation des AQP2-Gens gelang in einer consanguinen, türkischen Familie (Familie 9#). Die Punktmutation G606T kodiert für einen Aminosäurenaustausch eines Tryptophan in ein Cystein an der Position 202 (W202C). Dieses in der dritten extracellulären Schleife gelegene Tryptophan (s.a. Abb. 19) ist in allen humanen Wasserkanälen hochkonserviert. Die dritte extracelluläre und die erste intracelluläre Schleife bilden zusammen die wasserselektive Pore aus.

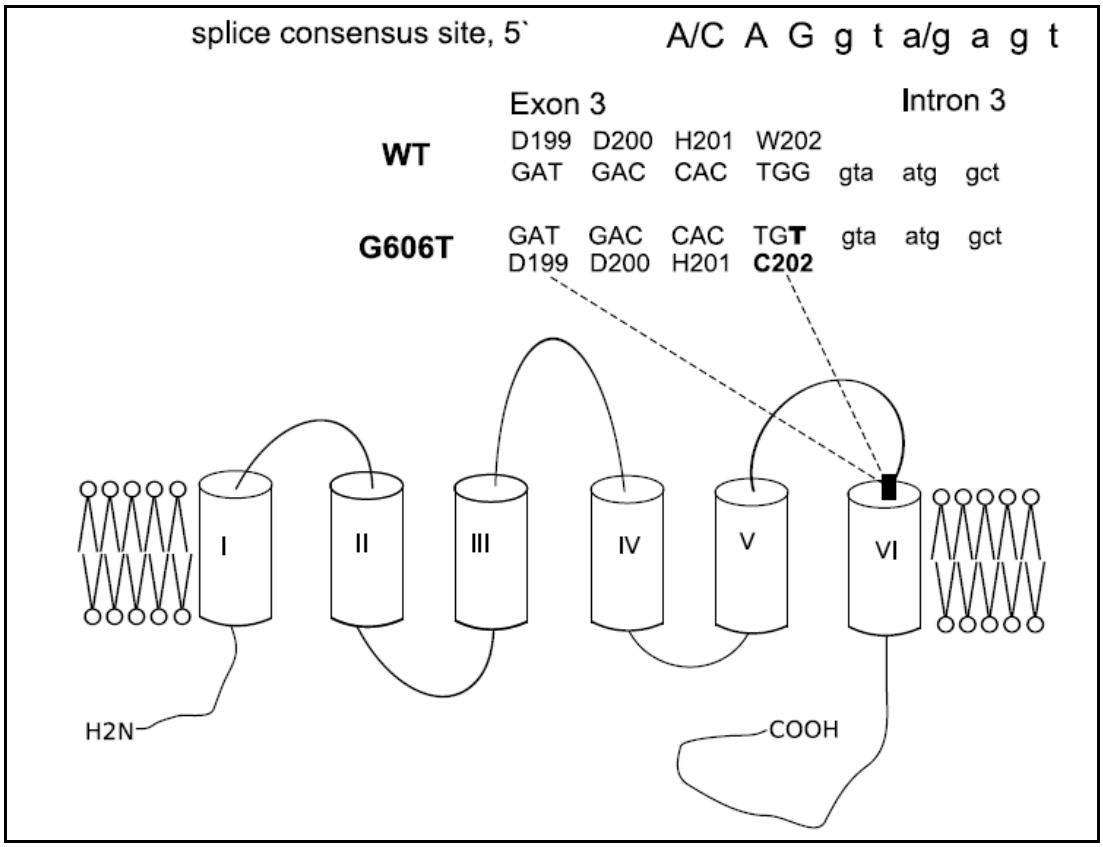

Abbildung 19: Modell des AQP2 mit sechs Transmembrandomänen I-VI, zwei intra- und drei extrazellulären Schleifen, N- und C-Terminus liegen intrazellulär vor, die Mutatante W202C ist in der dritten extrazellulären Schleife nahe der sechsten Transmembrandomäne lokalisiert, Kennzeichnung durch ein Quader; mittig Darstellung der DNA Sequenz am Exon-Intron Übergang für die Mutation G606T und den Wildtyp (WT), Großbuchstaben kodierender Exonbereich, Kleinbuchstaben nicht kodierender Intronbereich, darüber Darstellung der conservierten Sequenz für die 5´Splice-Donor-Site (modifiziert nach Oksche, Moeller 1996)

Eine Mutation in diesem sensiblen Bereich kann einen funktionellen Defekt des Wasserkanales bewirken. Diese Annahme wird durch das Verteilungsmuster der identifizierten Mutationen unterstrichen. Etwa die Hälfte aller bisher identifizierten Mutationen des AQP2 konzentriert sich auf diese beiden Schleifen. Die Sequenzierung von 120 Allelen gesunder Probanden konnte keine Mutation an dieser Stelle aufdecken, so dass das Vorliegen eines Polymorphismus unwahrscheinlich ist.

Eine alternative Überlegung über die krankheitsverursachende Rolle dieser Mutation ist die eines inkorrekten Splicing. Das betroffene Nucleotid (G606) ist das terminale Nucleotid am 3´-Ende des Exon 3 und liegt somit in unmittelbarer Nähe zu dem GT-Motiv der Splice-Donor-Consensus-Site am 5´-Ende des Intron 3 (s.a. Abb. 19). Auch wenn das in Eukaryonten hoch konservierte GT-Motiv nicht betroffen ist, ist durchaus denkbar, dass die G^{-1} zu T^{-1} Inversion ein aberrantes Splicing des Transskriptes hervorruft. Eine G^{-1} zu T^{-1} Inversion einer Donor-Splice-Site des Purin-Nukleosid-Phosphorylase Gens bewirkt ein inkomplettes Exon-Skipping (Andrews et al. 1992). In dem Dystrophin-Gen führt der gleiche Basenaustausch zu einem kompletten Ausfall des Exon 13 (Hagiwara et al. 1994).

Die Transkription Gewebe spezifischer Gene konnte in nicht spezifischen Zellen wie den Lymphocyten nachgewiesen werden (Chelly et al. 1989). Dieser Umstand einer ektopen Transkription bietet die Möglichkeit, ein aberrantes Splicing gewebeständiger Proteine im peripheren Blut nachzuweisen. Der Nachweis ektoper AQP2-Transkripte in Lymphocyten mittels RT-PCR gelang im Falle der G606T Mutation trotz des Einsatzes verschiedener Primerpaare leider nicht, so dass die Frage nach einem aberranten Splicing letztendlich unbeantwortet bleibt.

Die krankheitsverursachende Relevanz der oben beschriebenen Mutationen scheint ausreichend gesichert. In acht Familien ließen sich Mutationen des Vasopressin-2-Rezeptorgens, in einer Familie eine Mutation des Aquaporin-2-Gens nachweisen. Diese Verteilung deckt sich mit den in der Literatur gemachten Erfahrungen einer relativen Häufigkeit von 9:1 zugunsten der Mutationen im Vasopressin-2Rezeptor-Gen.

6.6 Grenzen der Diagnostik und Differentialdiagnosen

Bei einer jungen Patientin konnte keine endgültige Diagnose mittels Sequenzierung gesichert werden. Die Indikation zur Durchführung einer genetischen Testung fußte auf rezidivierende, hypernatriämische Phasen und einer milden Polydipsie mit 4 Liter pro Tag. Der Dursttest fiel grenzwertig pathologisch aus. Die familiäre Anamnese war hinsichtlich eines Diabetes unauffällig. Eine Vasopressinbelastung, die eine bessere, klinische Einschätzung erlaubt hätte, wurde seitens der behandelnden Klinik leider nicht durchgeführt.

Eine autosomal dominante oder auch rezessive Mutation des AQP2-Gen ist die wahrscheinlichste Erklärung, aber auch das Vorliegen einer V2R-Gen Mutation mit Hinblick auf eine variable X-Inaktivierung ist denkbar. Die Sequenzierung der kodierenden Bereiche und der Exon-Intron Schnittstellen mittels einer Direktsequenzierung von PCR Produkten zeigt in beiden Genen wildtypische Sequenzen. In der Restriktionsanalyse ließen sich keine Deletion oder Insertion nachweisen. Insbesondere eine autosomal dominante Mutation des AQP2-Gens kann mit der gewählten Sequenzierungsmethode mittels Direktsequenzierung von PCR Produkten nicht ausgeschlossen werden, da ein heterozygot vorliegender Basenaustausch im Chromatogramm unerkannt bleiben kann.

Eine weitere Erklärung wäre die, dass die krankheitsbedingende Mutation außerhalb der für das Gen kodierenden DNA-Sequenz liegt. Hierbei könnte es sich um eine Mutation im Promotor des Gens oder um eine veränderte DNA-Methylierung handeln. Möglich ist auch eine Mutation in den nicht kodierenden Intron Bereichen, die eine alternative Spleißstelle generieren könnte. Diese Art von Mutationen können mit der in dieser Arbeit gewählten Sequenzierungsstrategie nicht detektiert werden. In der Literatur sind derartige Mutationen bis dato weder für das V2R- noch für das AQP2-Gen berichtet.

Der zugrunde liegende Defekt dieser Familie kann theoretisch auch in einem anderen Kandidatengen zu suchen sein. In erster Linie seien hier renale Transportproteine genannt, die eine entscheidende Rolle in der Generierung des corticomedullären Diffusionsgradienten übernehmen. In diese Gruppe fallen zum Beispiel das heterogene Krankheitsbild des Bartter Syndromes (Typ I-V) und des Gitelman Syndromes, welches mit einer hypokaliämischen Salzverlustnephropathie und mit einer variablen Ausprägung eines Diabetes insipidus einhergeht. Durch Defekte renaler Natrium-, Kalium- oder Chloridkanäle (NKCC2, ROMK, CLCNKA/B, ClC-K1, BSND) in dem Bereich der aufsteigenden Henleschleife wird ein relativ

hypotones interstitielles Milieu generiert, wodurch der osmotische Gradient und damit die Wirksamkeit des Gegenstromprinzipes verringert werden (Jeck et al. 2001, Reinalter et al. 2002). Sands et al. beschrieb in einer Patientengruppe einen Defekt eines Harnstofftransporters (UTBA), der mit einer mild gesteigerten Diurese einherging (Sands et al. 1992).
Das klassische Bild eines Diabetes insipidus (Polydipsie, Vasopressinresistenz) konnte bis dato für keinen der oben genannten Defekte beschrieben werden.

Die Arbeitsgruppe um Behr et al. lieferten in einem Mausmodel den Hinweis, dass ein Defekt des Foxa1, eines renal tubulären Trankriptionsfaktors, die Transskriptionrate des NKCC2 und des ROMK signifikant reduzieren und das Bild eines nephrogenen Diabetes provozieren können (Behr et al. 2004).
In einem weiteren Tiermodel fand sich eine erhöhte Vasopressinresistenz aufgrund aktivitätsgesteigerter Isoenzyme der cAMP Phophodiesterase, die hemmend auf der Ebene des Second messenger Systemes eingreift (Frokiaer et al. 1999).
Weniger auf dem Boden klinischer Beobachtungen als vielmehr anhand hypothetischer Überlegungen wurde die Rolle der Wasserkanäle AQP1, AQP3 und AQP4 in Tiermodellen, speziell anhand von Knockout-Mäusen betrachtet. Insbesondere ein Fehlen des AQP3 scheint, einen nephrogenen Diabetes insipidus provozieren zu können (Ma et al. 2002). Ob sich diese letzgenannten Tiermodelle ohne weiteres auf den Menschen übertragen lassen und welche Rolle sie spielen, ist noch gänzlich unklar und bedarf weitergehender Untersuchungen.

6.7 Stellenwert der genetischen Testung

Laut Bichet et al. können nahezu 100 % der klinisch getesteten NDI Patienten auch einem Defekt des V2R (in ca. 90 %) oder des AQP2 (in ca. 10 %) zugeordnet werden. Eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp gibt es offensichtlich nicht (Bichet et al. 1998). Warum ist es dennoch sinvoll, eine über die klinische Diagnostik hinausgehende Sequenzierung dieser beiden Gene durchzuführen?

Die Diversität der V2R-Mutationen ist groß. Zum heutigen Zeitpunkt sind ca. 180 krankheitsrelevante Mutationen beschrieben. Eine Hotspot-Mutation wie z.B. die ΔF508 Mutation des CFTR-Gens der Mukoviszidose gibt es nicht, wesshalb stets eine gesamte Gensequenzierung angestrebt werden muß. De novo Mutationen

nehmen einen Anteil von 15 bis 20 % ein (Arthus et al. 2000). Anders als bei der klinischen Testung kann die Sequenzierung Auskunft über eine mögliche Trägerschaft der Mutter und den Heterozygotenstatus anderer Familienmitglieder geben. Dieses Wissen wird spätestens bei einem erneuten Kinderwunsch relevant.

Die endgültige Diagnosestellung eines nephrogenen Diabetes insipidus ist bereits in der Säuglingsperiode wünschenswert, um frühzeitig eine adäquate Therapie beginnen und Folgeerkrankungen verhindern zu können. Der Zeitpunkt der Diagnosestellung lag in Zeiten vor der genetischen Untersuchung im Mittel bei 2½ Jahren. Mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln konnte diese Spanne auf neun Monate reduziert werden, mittlerweile werden ca. 2/3 aller Diagnosen vor dem Erreichen des ersten Lebensjahres gestellt (van Lieburg et al. 1999).

Wenn auch der Defekt des Vasopressin-2-Rezeptors X-chromosomal rezessiv vererbt wird, mehren sich Berichte, in denen heterozygote Erbmalträgerinnen eine variable, klinische Ausprägung eines Diabetes bis zu einem Vollbild der Erkrankung zeigen. Erklärt wird dieser Umstand durch die X-Inaktivierung während der Blastemphase der Embryonalzeit (van Lieburg et al. 1995, Nomura et al. 1997). Dieser epigenetische Effekt ist in den somatischen Zellen irreversibel, in der Keimbahn jedoch variabel und erklärt eine intrafamiliär zu beobachtende Diversität der klinischen Symptomatik. In einer Familie mit einer nachgewiesenen Mutation des V2R-Gens (Familie 7#) zeigten die heterozygot getestete Mutter und Tochter eine milde Form eines nephrogenen Diabetes insipidus, was durch die variable X-Inaktivierung erklärt werden kann (Kinoshita et al. 2004). Bei einer weiteren Mutter (Familie 2#) demaskierte sich ein milder Diabetes insipidus erst mit Beginn der Schwangerschaft. Ein additiver Effekt einer subklinischen Vasopressinresistenz und eines gesteigerten Vasopressinumsatzes im Rahmen der Schwangerschaft ist die plausibelste Erklärung für diesen Umstand. Eine milde Form eines Diabetes insipidus renalis sollte deshalb bei Frauen Anlass zur weitergehenden Diagnostik inclusive der Sequenzierung des V2R-Gens geben, insbesondere wenn ein Kinderwunsch besteht.

Ein neuer, hoffnungsvoller Ansatz einer medikamentösen Therapie eines Diabetes insipidus wird speziell bei denjenigen Mutationen des V2R-Gens verfolgt, die eine intracelluläre Retention des Rezeptors bewirken. Die V1 und V1/V2R Antagonisten

SR49059 und Conivaptan® überwinden als Nonpeptide die Zellmembran. Sie können intracellulär als pharmakologische Chaperone wirken, indem sie die Faltung des mutanten Vasopressin-2-Rezeptors positiv beeinflussen und eine Expression des retinierten Rezeptors an die Zelloberfläche ermöglichen. Diese Therapieform wird derzeit vornehmlich noch an Zellmodellen erforscht und wird nur für eine bestimmte Auswahl an Mutationen, bzw. Patienten, von Nutzen sein (Bernier et al. 2006, Wüller et al. 2004). Mit dem Einsatz pharmakologischer Chaperone besteht erstmalig die Möglichkeit einer kausalen Therapie des X-chromosomalen Diabetes insipidus. Voraussetzung für eine Therapie ist jedoch die Kenntnis um die krankheitsverursachende Mutation und den zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismus des Defektes.

7 Zusammenfassung

Der kongenitale Diabetes insipidus renalis stellt eine Endorganresistenz der Niere gegenüber dem anidiuretischen Hormon Vasopressin dar. Er ist durch eine ausgeprägte Polyurie und eine konsekutive Polydipsie gekennzeichnet. Durch die Unfähigkeit den Harn zu konzentrieren, kommt es bei unzureichender Flüssigkeitszufuhr oder vermehrtem Wasserverlust (z.B. Gastroenteritis) zu einer schweren Dehydratation und einer Hypernatriämie. Dieser Defekt der Niere kann in den ersten Tagen und Wochen der Neugeborenenperiode noch durch eine physiologische Unreife der Niere kaschiert sein, kann sich jedoch dann mit unspezifischen Symptomen wie unklare Fieberschübe, Exsikkose, Gedeihstörungen und Erbrechen manifestieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit dem klinischen Verdacht eines nephrogenen Diabetes insipidus auf krankheitsverursachende Mutationen in den Genen des V2R und des AQP2 untersucht.

In acht von zehn Fällen konnte eine ursächliche Mutation im V2R-Gen, in einem Fall im AQP2-Gen detektiert werden. Die Häufigkeitsverteilung der gefundenen Mutationen deckt sich mit der in der Literatur postulierten Ratio von 9:1 zugunsten des V2R-Gens. Zwei der V2R-Gen Mutationen (InsQ292, ΔC1001) und die AQP2-Gen Mutation (W202C) sind in dieser Arbeit erstmalig beschrieben worden. De Novo Mutationen konnten in den sieben Fällen, für die DNA der Eltern und weiterer Verwandter vorlagen, nicht beobachtet werden.

8 Summary

The congenitale diabetes insipidus renalis represents an resistance of the kidney to the antidieuretic hormone vasopressin. It is characterised by increased diuresis, consecutive polyuria, dehydration and hypernatremia. This defect of the kidney can yet be concealed during the first days of the neonatal period by the physiological immaturity, but will be unmasked in early infancy by non-specific symptoms like fever of unknown origin, exsiccosis, vomiting and a failure to thrive.

In this study patients, who had been suspectively diagnosed clinically of nephrogenic diabetes insipidus, were tested for relevant mutations in the genes of V2R and AQP2. In eight out of ten cases a causative mutation in the V2R gene, in one case in the gene of AQP2 could be detected. The frequency distribution of the located mutations coincide with the ratio of 9:1, that is postulated in literature, to the advantage of the V2R gene. Two of the V2R gene mutations (InsQ292, ΔC1001) and the AQP2 gene mutation (W202C) have been described in this study for the first time. De novo mutations could, as far as parental material was present, not be observed.

9 Literaturverzeichnis

1. Agre P, Kozono D (2003) Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. FEBS Lett 555:72-78

2. Andrews L, Markert M (1992) Exon skipping in purine nucleoside phosphorylase mRNA processing leading to severe immunodeficiency. J Biol Chem 267: 7834-7838

3. Arthus M, Lonergan M, Crumley M, Naumova AK, Morin D, De Marco L, Kaplan B, Robertson G, Sasaki S, Morgan K, Bichet D, Fujiwara T (2000) Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. J Am Soc Nephrol 11: 1044-1054

4. Baylis P, Cheetham T (1998) Diabetes insipidus. Arch Dis Child 79:84-89

5. Behr R, Brestelli J, Fulmer J, Miyawaki N, Kleyman T, Kaestner K (2004) Mild nephrogenic diabetes insipidus caused by Foxa1 deficiency. J Biol Chem 279: 41936-41941

6. Bernier V, Morello J, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Lonergan M, Arthus M, Laperrière A, Brouard R, Bouvier M, Bichet D (2006) Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. J Am Soc Nephrol 17: 232-243

7. Bichet D, Arthus M, Lonergan M, Hendy G, Paradis A, Fujiwara T, Morgan K, Gregory M, Rosenthal W, Didwania A (1993) X-linked nephrogenic diabetes insipidus mutations in north america and the Hopewell hypothesis. J Clin Invest 92: 1262-1268

8. Bichet D, (1996) Diabetes insipidus and vasopressin. Diagnostic Endocrinology, Mosby-Year Book, 157-175.

9. Bichet D, Razi M, Lonergan M, Arthus M, Papukna V, Kortas C, Barjon J (1988) Hemodynamic and coagulation responses to 1-desamino[8-D-arginin] vasopressin in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. N Engl J Med 318: 881-887

10. Bichet D, Birnbaumer M, Lonergan M, Arthus M, Rosenthal W, Goodyer P, Nivet H, Benoit S, Giampietro P, Simonetti S, Fish A, Whitley C, Jaeger P, Gertner J, New M, DiBona F, Kaplan B, Robertson G, Hendy G, Fujiwara L, Morgan K (1994) Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus. Am J Hum Genet 55: 278-286

11. Bode H, Crawford J (1969) Nephrogenic diabetes insipidus in North America. The Hopewell hypothesis. N Engl J Med 280: 750-754

12. Boyd S, Raz D, Ehrlich R (1980) Diabetes insipidus and nonobstructive dilation of urinary tract. Urology 26: 266-269

13. Braverman L, Mancini J, MC Golderick D (1965) Hereditary idiopathic diabetes insipidus. A case report with autopsy findings. Ann Intern Med 63: 503-508

14. Chelly J, Concordet J, Kaplan J, Kahn A (1989) Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. Proc Natl Acad Sci 86: 2617-2621

15. Christensen B, Marples D, Jensen U, Frokiaer J, Sheikh-Hamad D, Knepper M, Nielsen S (1998) Acute effects of vasopressin V2-receptor antagonist on kidney AQP2 expression and subcellular distribution. Am J Physiol 275: 285-297

16. Cotte N, Balestre M, Phalipou S, Hibert M, Manning M, Barberis C, Mouillac B (1998) Identification of residues responsible for the selective binding of peptide antagonists and agonists in the V2 vasopressin receptor. J Biol Chem 273: 29462-29468

17. Deen P, Weghuis D, Sinke R, Geurts van Kessel A, Wieringa B, van Os C (1994) Assignment of the human gene for the water channel of renal collecting duct aquaporin 2 (AQP2) to chromosome 12 region q12-->q13. Cytogenet Cell Genet 66: 260-262

18. Di Giovanni S, Nielsen S, Christensen E, Knepper M (1994) Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. Proc Natl Acad Sci 13: 8984-8988

19. Dunn F, Brennan T, Nelson A, Robertson G (1973) The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. J Clin Invest 52: 3212-3219

20. Ecelbarger C, Kim G, Knepper M, Liu J, Tate M, Welling P, Wade J (2001) Regulation of potassium channel Kir 1.1 (ROMK) abundance in the thick ascending limb of Henle's loop. J Am Soc Nephrol 12: 10-18

21. Ecelbarger C, Kim G, Wade J, Knepper M (2001) Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. Exp Neurol 171: 227-234

22. Frokiaer J, Marples D, Valtin H, Morris J F, Knepper M, Nielsen S (1999) Low aquaporin-2 levels in polyuric DI +/+ severe mice with constitutively high cAMP-phosphodiesterase activity. Am J Physiol Renal Physiol 276: 179 -190

23. Gonen T, Walz T (2006) The structure of aquaporins. Q Rev Biophys 39:361-396

24. Guignard J, Torrado A, Da Cunha O, Gautier E (1975) Glomerular filtration rate in the first three weeks of life. J Pediatr 87: 268-272

25. Hagiwara Y, Nishio H, Kitoh Y, Takeshima Y, Narita N, Wada H, Yokoyama M, Nakamura H, Matsuo M. (1994) A novel point mutation (G-1 to T) in a 5' splice donor site of intron 13 of the dystrophin gene results in exon skipping and is responsible for Becker muscular dystrophy. Am J Hum Genet 54: 53-61

26. Harris H, Strange K, Zeide M, (1991) Current understanding of the cellular biology and molecular structure of the antidiuretic hormone-stimulated water transport Pathway. J Clin Inv 88: 1-8

27. Harrison (1998), Principles of internal medicine, McGraw-Hill 14th edition

28. Hermosilla R, Oueslati M, Donalies U, Schönenberger E, Krause E, Oksche A, Rosenthal W, Schülein R. (2004) Disease-causing V2 vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway. Traffic 5: 993-1005

29. Heymann J, Engel A (1999) Aquaporins; phylogeny, structure, and physiology of water channels, News Physiol Sci 14: 187-193

30. Hoekstra J, van Lieburg A, Monnens L, Hulstijn-Dirkmaat G, Knoers V (1996) Cognitive and psychosocial functioning of patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. Am J Med Genet 61: 81-88

31. Horster M, Braun G, Huber S (1999) Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. Physiol Rev 79: 1157-1191

32. Hozawa S, Holtzman E, Ausiello D (1996) cAMP motifs regulating transcription in the aquaporin 2 gene. Am J Physiol 270: 1695-1702

33. Inase N, Fushimi K, Ishibashi K, Uchida S, Ichioka M, Sasaki S, Marumo F (1995) Isolation of human aquaporin 3 gene. J Biol Chem 270: 17913-17916

34. Inoue T, Terris J, Ecelbarger C, Chou C, Nielsen S, Knepper M (1999) Vasopressin regulates apical targeting of aquaporin-2 but not of UT1 urea transporter in renal collecting duct. Am J Physiol 276: 559-566

35. Jeck N, Reinalter S, Henne T, Marg W, Mallmann R, Pasel K (2001) Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. Pediatrics 108: 5

36. Jung J, Preston G, Smith B, Guggino W, Agre P (1992) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. J Biol Chem 269: 14648-14654

37. Kaufmann J, Oksche A, Wollheim C, Gunther G, Rosenthal W, Vischer U (2000) Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. J Clin Invest 106: 107-116

38. Kim G, Ecelbarger C, Mitchell C, Packer R, Wade J, Knepper (1999) Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. Am J Physiol 276: 96-103

39. Kinoshita K, Miura Y, Nagasaki H, Murase T, Bando Y, Oiso Y (2004) A novel deletion mutation in the arginine vasopressin receptor 2 gene and skewed X-chromosome inactivation in a female patient with congenital nephrogenic diabetes insipidus. J Endocrinol Invest 27: 167-170

40. Klussmann E, Maric K, Rosenthal W. (2000) The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. Rev Physiol Biochem Pharmacol 141: 33-95

41. Knepper M, Star R (1990) The vasopressin-regulated urea transporter in renal inner medullary collecting duct. Am J Physiol 259: 393-401

42. Knoers N, van den Ouweland A, Verdijk M, Monnens L, van Oost B (1994) Inheritance of mutations in the V2 receptor gene in thirteen families with nephrogenic diabetes insipidus. Kidney Int 46: 170-176

43. Kojro E, Fahrenholz F (1995) Ligand-induced cleavage of the V2 vasopressin receptor by a plasma membrane metalloproteinase. Am J Physiol 270: 6476-6481

44. Kuhn W, Hargitay B, (1951) Das Multiplikationprinzip als Grundlage der Harnkonzentrierung in der Niere. Z Elektrochem 55: 539–558

45. Kuwahara M, Iwai K, Ooeda T, Igarashi T, Ogawa E, Katsushima Y, Shinbo I, Uchida S, Terada Y, Arthus M, Lonergan M, Fujiwara T, Bichet D, Marumo F, Sasaki S. (2001) Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the C-terminus. Am J Hum Genet 69: 738-748

46. Land H, Schutz G, Schmale H, Richter D (1982) Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding arginine vasopressin-neurophysin II precursor. Nature 295: 299-303

47. Ma T, Song Y, Yang B, Gillespie A, Carlson E, Epstein C, Verkman A (2000) Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. Proc Nat Acad Sci 97: 4386-4391

48. Marples D, Frokiaer J, Nielsen S (1999) Long-term regulation of aquaporins in the kidney. Am J Physiol 276: 331-339

49. Matsumura Y, Uchida S, Rai T, Sasaki S, Marumo F (1997) Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. J Am Soc Nephrol 8: 861-867

50. Marcovecchio M (2006) An infant with chronic hypernatremia. European Journal of Endocrinology 155: 141-144

51. McPherson J (2001) A physical map of the human genome. Nature 409: 934-941

52. Moon C, Preston G, Griffin C, Jabs E, Agre P (1993) The human aquaporin-CHIP gene. Structure, organization, and chromosomal localization. J Biol Chem 268:15772-15778

53. Mulders S, Bichet D, Rijss J, Kamsteeg E, Arthus M, Lonergan M, Fujiwara M, Morgan K, Leijendekker R, van der Sluijs P, van Os C, Deen P (1998) An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the golgi complex. J Clin Invest 102: 57-66

54. Nijenhuis M, Zalm R, Burbach J (1999) Mutations in the vasopressin prohormone involved in diabetes insipidus impair endoplasmic reticulum export but not sorting. J Biol Chem 23: 21200-21208

55. Nomura Y, Onigata K, Nagashima T, Yutani S, Mochizuki H, Nagashima K, Morikawa A (1997) Detection of skewed X-inactivation in two female carriers of vasopressin type 2 receptor gene mutation. J Clin Endocrinol Metab 82: 3434-3437

56. Nonoguchi H, Owada A, Kobayashi N, Takayama M, Terada Y, Koike J, Ujiie K, Marumo F, Sakai T, Tomita K (1995) Immunohistochemical localization of V2 vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V2 receptor in terminal inner medullary collecting ducts. J Clin Invest 96: 1768-1778

57. Oksche A, Kuhn R, Schülein R, Rosenthal W (1997) Analysis of effects of vasopressin V2 receptor mutations on mRNA turnover. 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, CA, 24.–29. August FASEB J A959

58. Oksche A, Dehe M, Schülein R, Wiesner B, Rosenthal W (1998) Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. FEBS Lett 424: 57-62

59. Oksche A, Rosenthal W, Molekulare Grundlagen des Diabetes insipidus centralis und renalis, In: Ganten D, Ruckpaul K, (2001) Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien, Springer Verlag, Berlin, S 279-307

60. Oksche A, Möller A, Dickson J, Rosendahl W, Rascher W, Bichet D, Rosenthal W (1996) Two novel mutations in the aquaporin-2 and the vasopressin V2 receptor Gens in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. Hum Genet 98: 587-589

61. Oksche A, Schülein R, Rutz C, Liebenhoff U, Dickson J, Müller H, Birnbaumer M, Rosenthal W (1996) Vasopressin V2 receptor mutants that cause X-linked nephrogenic diabetes insipidus: analysis of expression, processing, and function. Mol Pharmacol 50: 820-828

62. Pan Y, Wilson P, Gitschier J (1994) The effect of eight V2 vasopressin receptor mutations on stimulation of adenylyl cyclase and binding to vasopressin. J Biol Chem 269: 31933-31937

63. Park J, Saier M (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. J of Membr Biol 153: 171-180

64. Reinalter S, Jeck N, Brochhausen C, Watzer B, Nüsing R, Seyberth H (2002) Role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E. Kidney Int 62: 253-260

65. Riddell D, Mallonee R, Phillips J, Parks J, Sexton L, Hamerton J (1985) Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressin-neurophysin II and growth hormone releasing factor. Somat Cell Mol Genet 11:189-195

66. Robben J, Knoers M, Deen P (2005) Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model. Am J Physiol Renal Physiol 289: 265–272

67. Robertson G (1987) Physiology of ADH secretion. Kidney Int Suppl 21: 20-26

68. Rosenthal W, Seibold A, Antaramian A, Lonergan M, Arthus M, Hendy G, Birnbaumer M, Bichet D (1992) Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus. Nature 359: 233-235

69. Sadeghi H, Birnbaumer M (1999) O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. Glycobiology 9: 731-737

70. Sands J, Nonoguchi H, Knepper M (1987) Vasopressin effects on urea and H^2O transport in inner medullary collecting duct subsegments. Am J Physiol 253: 823-832

71. Sands J, Gargus J, Fröhlich O, Gunn R, Kokko J (1992) Urinary concentrating ability in patients with Jk(a-b-) blood type who lack carrier-mediated urea central diabetes insipidus. J Am Soc Nephrol 2: 1689-1696

72. Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. PNAS 74: 5463-5467

73. Sasaki S, Fushimi K, Saito H, Saito F, Uchida S, Ishibashi K, Kuwahara M, Ikeuchi T, Inui K, Nakajima K (1994) Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct. Clin Invest 93: 1250-1256

74. Schülein R, Hermosilla R, Oksche A, Dehe M, Wiesner B, Krause G, Rosenthal W (1998) A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. Mol Pharmacol 54: 525-535

75. Schülein R, Zühlke K, Oksche A, Hermosilla R, Furkert J, Rosenthal W (2000) The role of conserved extracellular cysteine residues in vasopressin V2 receptor function and properties of two naturally occurring mutant receptors with additional extracellular cysteine residues. FEBS Lett 466: 101-116

76. Schülein R, Zühlke K, Krause G, Rosenthal W. (2001) Functional rescue of the nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutants G185C and R202C by a second site suppressor mutation. J Biol Chem 276: 8384-8392

77. Seibold A, Brabet P, Rosenthal W, Birnbaumer M (1992) Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gene. Am J Hum Genet 51: 1078-1083

78. Shalev H, Romanovsky I, Knoers N, Lupa S, Landau D (2004) Bladder function impairment in aquaporin-2 defective nephrogenic diabetes insipidus. Nephrol Dial Transplant 19: 608-613

79. Shayakul C, Tsukaguchi H, Berger U, Hediger M (2001) Molecular characterization of a novel urea transporter from kidney inner medullary collecting ducts. Am J Physiol Renal Physiol 280: 487-494

80. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y (2004) Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. Prog Histochem Cytochem 39: 81-87

81. Tan C, Nickols H, Limbird L (2003) Appropriate polarization following pharmacological rescue of V2 vasopressin receptors encoded by X-linked nephrogenic diabetes insipidus alleles involves a conformation of the receptor that also attains mature glycosylation. J Biol Chem 278: 35678-35686

82. Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Yang T, Marumo F (1993) Different localization and regulation of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. J Clin Invest 92: 2339-2345

83. Terris J, Ecelbarger C, Marples D, Knepper M, Nielsen S (1995) Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. Am J Physiol 269: 775-785

84. Tsukaguchi H, Matsubara H, Aritaki S, Kimura T, Abe S, Inada M. (1993) Two novel mutations in the vasopressin V2 receptor gene in unrelated Japanese kindreds with nephrogenic diabetes insipidus. Biochem Biophys Res Commun 197: 1000-1010

85. Tsukaguchi H, Matsubara H, Mori Y, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Nakao K, Inada M. (1995) Two vasopressin type 2 receptor gene mutations R143P and ΔV278 in patients with nephrogenic diabetes insipidus impair ligand binding of the receptor. Biochem Biophys Res Commun 211: 967-977

86. van den Ouweland A, Dreesen J, Verdijk M, Knoers N, Monnens L, Rocchi M, van Oost B (1992) Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus. Nat Genet 2: 99-102

87. van Lieburg A, Knoers N, Monnens L (1999) Clinical presentation and follow-up of 30 patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. J Am Soc Nephrol 10: 1958-1964

88. Verkman A, Lencer W, Brown D, Ausiello D (1998) Endosomes from kidney collecting tubule cells contain the vasopressin-sensitive water channel. Nature 333: 268-269

89. Wade J, Nielsen S, Coleman R, Knepper M (1994) Long-term regulation of collecting duct water permeability: freeze-fracture analysis of isolated perfused tubules. Am J Physiol 266: 723-730

90. Warren G, Rickey L, Zeidela L (1999) Role of leaflet asymmetry in the permeability of model biological Membranes to protons, solutes, and gases. J Gen Physiol 1143: 405-414

91. Wenkert D, Merendino J, Shenker A, Thambi N, Robertson GL, Moses A, Spiege A (1994) Novel mutations in the V2 vasopressin receptor gene of patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. Human Molecular Genetics 3:1429-1430

92. Wildin R, Cogdell D, Valadez V (1998) AVPR2 variants and V2 vasopressin receptor function in nephrogenic diabetes insipidus. Kidney Int 54: 1909-1922

93. Willcutts M, Felner E, White P (1999) Autosomal recessive familial neurohypophyseal diabetes insipidus with continued secretion of mutant weakly active vasopressin. Hum Mol Genet 8: 1303-1307

94. Wüller S, Wiesner B, Löffler A, Furkert J, Krause G, Hermosilla R, Schäfer M, Schülein R, Rosenthal W, Oksche A (2004) Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. J Biol Chem 279: 47254-47263

95. Yamamoto T, Sasaki S, Fushimi K, Ishibashi K, Yaoita E, Kawasaki K, Marumo F, Kihara I (1995) Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats. Am J Physiol 268: 1546-1551

96. Yasui M, Zelenin S, Celsi G, Aperia A (1997) Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements. Am J Physiol 272: 443-450

97. Zhang C, Sands J, Klein J (2002) Vasopressin rapidly increases phosphorylation of UT-A1 urea transporter in rat IMCDs through PKA. Am J Physiol Renal Physiol 282: 85-90

Publikationen

Oksche A, Möller A, Dickson J, Rosendahl W, Rascher W, Bichet DG, Rosenthal W (1996) Two novel mutations in the aquaporin-2 and the vasopressin V2 receptor Gens in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus.
Hum Genet 98: 587-589

Vortrag auf dem 27. Kongreß der Gesellschaft für Nephrologie, 29. Jahrestagung der deutschen Arbeitsgemeinschaft für klinische Nephrologie, September 1996 in Berlin, Thema: „Functional and genetical analysis of two novel mutations responsible for autosomal recessive and x-linked nephrogenic diabetes insipidus“

Eidestattliche Versicherung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.

Gießen, den 27.02.2008

Lebenslauf

Name	Andreas Möller
Geburtsdatum	21.07.1971
Geburtsort	Lüdinghausen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1978-1982	Grundschule, *Olfen*
1982-1991	priv. Gymnasium Canisianum, *Lüdinghausen*

Universitäre Ausbildung

07/1995	1. Staatsexamen, JLU *Gießen*
03/1997	2. Staatsexamen, JLU *Gießen*
04/1998	3. Staatsexamen, JLU *Gießen*

Praktisches Jahr

ab 04/1997	Innere Medizin, Medizinische Klinik II am KKH *Wetzlar*, Prof. Dr. Kramer
ab 08/1997	Allgemein- und Unfallchirurgie am KKH *Wetzla*r, Prof. Dr. Brobmann
ab 12/1997	Pädiatrie an der Kinderklinik der JLU *Gießen*, Prof. Dr. Rascher

AIP

09/1998-03/2000 I. und II. Kinderklinik, Kinderchirurgie am Zentralklinikum *Augsburg*

- Kinderchirurgie, Prof. Dr. Bolkenius
- Neonatologie, Prof. Dr. Bernsau
- Allg. Pädiatrie, Prof. Dr. Heidemann

Facharztausbildung

ab 08/2000 Kinderklinik der JLU *Gießen*

- Pädiatrische Onkologie, Prof. Dr. Reiter
- Pädiatrische Neurologie, Prof. Dr. Neubauer

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt den Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Priv. Doz. Dr. Oksche danke ich ganz herzlich für das Überlassen dieses Themas und für die zuverlässige, freundliche und sehr engagierte Betreuung.

Vielen Dank auch an Claudia Rutz, Ralf Schülein und allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Rudolf-Buchheim-Instituts für die herzliche Unterstützung während der praktischen und theoretischen Arbeiten.

Im besonderen möchte ich mich bei bei Herrn John Dickson bedanken, der mir mit unermüdlicher Geduld das handwerkliche Rüstzeug für den Laboralltag nahe gebracht hat.